



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

کشف ساپونین های جدید از احشاء خیار دریایی (*Holothuria lesson*)

چکیده :

خیار دریایی، که گاهی اوقات جنسینگ دریایی نامیده می شود، تولید ترکیبات متعددی با کارکرد های متنوع کرده و منبع بالقوه ترکیبات فعال برای محصولات کشاورزی، افزودنی های غذایی، دارویی و آرایشی بهداشتی محسوب می شود. ما به بررسی احشاء یک گونه خیار دریایی استرالیایی *Holothuria lesson* (ماسین و همکاران 2009) برای دست یابی به ترکیبات زیست فعال جدید با تاکید بر گلیکوزید های تری ترین، ساپونین ها پرداختیم. احشاء خیار دریایی با اتانول 70 درصد عصاره گیری شده و این عصاره با فرایند تفکیک جزء به جزء مایع-مایع و کروماتوگرافی ستونی تخلیص شده و سپس تحت عصاره گیری ایزوبوتانول قرار گرفت. ترکیب غنی از ایزوبوتانول ساپونین نیز با کروماتوگرافی جدایش گریز از مرکز با کارایی بالا (HPCPC) با خلوص و ریکآوری بالا، تخلیص گردید. نمونه های قطبی تخلیص شده حاصله، با استفاده از طیف سنج جرمی واجدبی/یونشی لیزری به کمک ماتریس (MALDI-MS)/MS و طیف سنج جرمی یونشی الکترو اسپری (ESI-MS)/MS)) برای شناسایی ساپونین ها و شناسایی ساختار های مولکولی آن ها تحلیل شد. در نتیجه، حداقل 39 ساپونین جدید در احشاء خیار دریایی با تنوع ساختمانی بالا شناسایی شده و 36 ساپونین دیگر، شامل گلیکوزید های تری ترین بودند که دارای آگلیکون های مختلف و واحد های قند می باشند. نمونه های احشاء تولید ترکیبات زیاد با تنوع بالاتر نسبت به نمونه های دیواره بدنی خیار دریایی می کند. تنوع ساختمانی بالا و تازگی ساپونین ها در خیار دریایی با فعالیت ها و وظایف کارکردی بالقوه، فرصتی بزرگ برای بهره گیری از کاربرد این گونه برای استفاده صنعتی، کشاورزی و دارویی باشد.

کلمات کلیدی : احشاء خیار دریایی، ساپونین ها، *Holothuria lessoni*، ترکیبات زیست فعال، MALDI، طیف سنج جرمی، ESI، گلیکوزید های تری ترین، تشریح ساختار، بی مهره دریایی، تیره خارپوستان، خیار دریایی

1- مقدمه

راب دریایی، بی مهره های دریایی غیر متحرک می باشند که عموماً موسوم به خیار های دریایی، جنیسینگ دریایی، بک دی مر یا گامات (1-2) بوده و متعلق به رده هولوتوریده از راسته اकिनودرماتا می باشد. خیار های دریایی تولید ترکیبات متعدد با کارکرد های متنوع کرده و منابع بالقوه محصولات کشاورزی یا کشاورزی-شیمیایی، افزودنی های غذایی، دارویی و آرایشی بهداشتی (3-5) می باشند. به همین دلیل است که در زبان چینی موسوم به جنیسینگ دریایی است.

اگرچه خیار های دریایی حاوی انواع مختلفی از ترکیبات طبیعی می باشند، ساپونین ها مهم ترین و فراوان ترین متابولیت های ثانویه می باشند (6-12). ساپونین ها به عنوان یک ترکیب زیست فعال اصلی در دارو های گیاهی هند و چین گزارش شده است.

ساپونین های خیار دریایی دارای طیف وسیعی از خواص دارویی به دلیل خواص و فعالیت های قلبی و عروقی، سیستم ایمنی، سیتوتوکسیک، ضد آسم، ضد آگزما، ضد التهاب، ضد آرتريت، ضد اکسیدان، ضد دیابت، ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد سرطان، ضد رگ زایی، ضد قارچ، همولیتیک، سیتو استاتیک، پایین آورنده کلسترول خون، کاهش قند خون و ضد دمانس و فراموشی می باشند (4-7-13-24).

ساپونین ها، ترکیبات آمفی پاتیک هستند که عموماً دارای یک ساختار تری تریپنی یا استروئیدی یا آگلیکونی می باشند. ساپونین های تری تریپنویید دارای آگلیکون هایی هستند که متشکل از 30 کربن می باشند، و این در حالی است که ساپونین های استروئیدی دارای آگلیکون های با 27 کربن بوده و در طبیعت به ندرت یافت می شوند (4).

ساپونین های تری تریپن متعلق به یکی از رایج ترین و متنوع ترین گروه های محصولات و فراورده های طبیعی می باشند که به فراوانی تولید می شوند. آن ها معمولاً موسوم به متابولیت های طبیعی گیاهان خشکی می باشند (25). تعداد کمی از گونه های دریایی متعلق به راسته اकिनودرم (26) موسوم به هولوتروئید ها (خیار های دریایی) (7، 10، 13، 27-33)، استروئید ها و اسفنج ها از راسته پوریرا (13، 34-35) تولید ساپونین می کنند.

اکثریت ساپونین های خیار دریایی، که عموماً موسوم به هولو تورین ها هستند، گلیکوزید های تری ترین بوده و متعلق به گروه نوع هولوستان می باشد تا گروه غیر هولوستان (36-37) که متشکل از یک آگلیکون نوع لانوستان-B3- اول حاوی لاکتون (20) 18- γ در حلقه D تری ترین تتراسایکلیک (B3-20S- دی هیدروکسی-5-الفا- لانوستانو-18-20 لاکتون)(25) می باشد که حاوی زنجیره های جانبی کوتاه و یک قطب کربوهیدرات متشکل از شش واحد مونو ساکاریدی می باشد که با C-3 آگلیکون(7-8-13-37-42) پیوند برقرار می کند.

واحد قند ساپونین های خیار دریایی عمدتاً متشکل از D- زایلوز ، D- کوینواز، O-3-متیل-D- گلوکز، 3-O-متیل-D- زایلوز و D- گلوکز و گاهی اوقات O-3-متیل-D- کوینواز ، O-3-متیل-D- گلوکورنیک اسید و O-6-استیل-D- گلوکز می باشند (40-41، 43-48). در زنجیره الیگو ساکارید، اولین واحد مونوساکاریدی معمولاً زایلوز می باشد، در حالی که O-3- متیلو کلوگز یا O-3- متیل زایلوز معمولاً قند انتهایی است.

اگرچه های تحقیقاتی مختلف به برخی از ساپونین های مشابه نام های متفاوتی (6) را داده اند زیرا آن ها می توانند شامل ترکیبات ایزومری باشند، مرور منابع جامع ما نشان داده است که بیش از 250 گلیکوزید تری ترین از گونه های مختلف خیار دریایی گزارش شده اند (7،13،18،25،29،41،44،49،50). آنها به چهار دسته ساختاری اصلی بر اساس قطب های آگلیکون خود طبقه بندی می شوند: ساپونین های گروه کلیکوزید نوع هولوستان حاوی 1-3-بتا هیدروکسی هولست-9 (11)- اسکلت آگلیکون 2- ساپونین های با اسکلت 3-بتا- هیدروکسی هولست-7- و 3-ساپونین های با قطب آگلیکون متفاوت با دو آگلیکون دیگر هولوستان) سایر آگلیکون های نوع هولوستان) و 4- یک آگلیکون غیر هولوستان (25، 38، 46، 51، 52).

یکی از ارزشمند ترین ویژگی های بسیاری از ساپونین ها از موجودات دریایی، سولفاسیون آگلیکون ها یا قطب های قند می باشد (4). در ساپونین های خیار دریایی، سولفاسیون زنجیره الیگو ساکارید در بقایای Xyl, Glc و MeGlc گزارش شده اند [38،40،46،53،54]. بیشتر آن ها، گلیکوزید های مونوسولفات می باشند که دارای تعداد کمی از گلیکوزید های دی و تری سولفات هستند. تنوع ساپونین با موقعیت پیوند های مضاعف و گروه های جانبی در آگلیکون بهبود می یابد.

گلیکوزید های تری ترین یک مکانیسم دفاعی می باشند زیرا آن ها برای بسیاری از موجودات کشنده و مضر هستند (6-10، 12، 55-57). بر عکس، مطالعه اخیر نشان داده است که این مواد شیمیایی دافع، کایرومون هایی هستند که همزیست ها را جذب کرده و به عنوان سیگنال های شیمیایی استفاده می شوند (58). با این حال، در خیار دریایی، گزارش شده است که ساپونین ها دارای دو نقش تنظیم کننده در طی تولید مثل می باشند 1- پیش گیری از بلوغ اوسیت 2- به عنوان یک واسطه گامتوژنز عمل می کند (18-59).

طیف وسیعی از ویژگی های زیستی و کارکرد های فیزیولوژیکی مختلف عصاره های خیار دریایی با تنوع ساختار شیمیایی بالا و فراوانی متابولیت های آن ها موجب شده اند تا محققان به مطالعه پتانسیل استفاده از خیار دریایی به عنوان یک منبع جایگزین موثر برای دارو های آینده بپردازند. با این حال، تعداد زیادی از ساختار های بسیار مشابه گلیکوزید های ساپونین موجب بروز مشکلاتی در تخلیص آن ها شده و تشریح ساختاری کامل این مولکول ها به خصوص ایزومر ها موجب گردیده است تا انجام آزمون هایی برای تعیین روابط ساختار- فعالیت سخت باشد که این مسئله منجر به توسعه ترکیبات جدید با کاربرد های تجاری شده است (16). به این ترتیب، برای غلبه بر این مسئله، ما از کروماتوگرافی جدایشی گریز از مرکز با کارایی بالا HPCPC برای تخلیص موفق ساپونین ها در این مطالعه استفاده می کنیم. کروماتوگرافی جدایشی گریز از مرکز با کارایی بالا HPCPC در تخلیص حجم زیادی از یک نمونه معین کارآمد تر بوده و در عین حال موجب کاهش مصرف حلال با عملکرد بالا در مقایسه با سایر روش های کروماتوگرافی سنتی دیگر می شود.

هدف این پروژه، شناسایی ترکیبات زیست فعال جدید از احشاء (همه اندام های درونی به جز دیواره بدن) خیار دریایی استرالیایی *Holothuria lessona* (ماسین و همکاران 2009) (ماسه ماهی طلایی) با تاکید بر ساپونین ها می باشد. خیار دریایی *Holothuria lessona* به این دلیل انتخاب شد که یک گونه جدید شناسایی شده هولوترین بوده و در آب های استرالیا فراوان است. اگرچه تنها تعداد کمی از مطالعات به مقایسه محتویات و مقادیر ساپونین دیواره بدن با لوله های اسفنجی در سایر گونه ها (50، 60-62) پرداخته اند، با این حال تا آن جا که می دانیم، هیچ مطالعه ای به بررسی میزان ساپونین های دیواره بدن یا احشاء *Holothuria lessona* پرداخته است. خیار های دریایی اندام های درونی خود را به عنوان یک مکانیسم

دفاعی موسوم به تخلیه شکم بیرون می ریزند، یک واکنشی که شامل آزاد سازی اندام های تنفسی، روده، و غدد جنسی از طریق مقعد می باشد (50، 59، 61، 63-68). فرضیه ما این است که دلیل این فرم از دفاع به این دلیل است که دارای سطوح بالایی از ترکیبات می باشد که شکارچیان را دفاع می کند (60، 61، 69، 70). به علاوه، نتایج این پروژه به شناسایی مزایای اقتصادی تبدیل احشاء خیار دریایی به محصولات و فرآورده های مهم و با ارزش برای صنعت و سلامت انسان کمک می کند.

طیف سنج جرمی زمان پرواز یونشی / واجذبی لیزر به کمک ماتریس (MALDI-ToF/MS) و روش های طیف سنجی جرمی یونشی الکتروسپری (ESI-MS) امکان یونیزاسیون نرم مولکول های زیستی بزرگ را می دهد که یک چالش اصلی بوده است (71). از این روی MALDI و ESI-MS و MS/MS برای تشخیص ساپونین ها و تشریح ساختار آن ها انجام شد.

2- نتایج و بحث

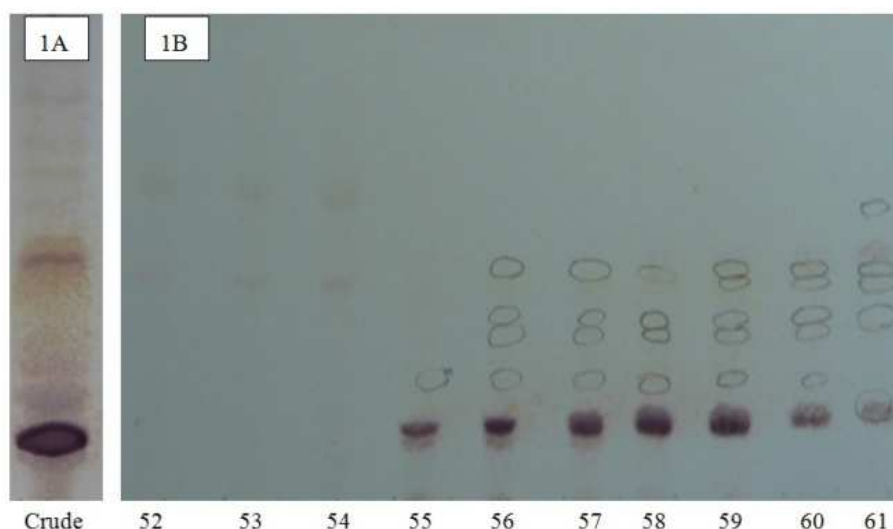
یک روش موثر برای تخلیص ساپونین ها توسعه یافته است و چندین ساپونین ایزوله شده و از احشاء خیار دریایی تخلیص شده اند. ترکیبات ساپونین غنی سازی شده از عصاره احشایی به طور موفق توسط HPCPC تخلیص شد که در تخلیص تریکبات با قطبیت پایین و نیز در پردازش حجم زیادی از نمونه ها موثر است. این روش، تولید ساپونین هایی با بازیابی بیش از 98 درصد با خلوص بالا (72) می کند. تخلیص ساپونین ها از ترکیبات ساپونین به غلبه بر مسائل مربوط به شناسایی ساپونین های مختلف با طیف سنج جرمی کروماتوگرافی مایع (LC-MS) و ESI-MS کمک می کند. طیف سنج جرمی برای تشریح ساختار ساپونین ها در هر دو حالت های یون مثبت و منفی (73-79) به کار برده شده است. در این مطالعه، شناسایی ترکیبات ساپونین با فنون MS یونیزاسیون نرم از جمله MALDI و ESI در حالت مثبت انجام شد. مطالعات قبلی گزارش کرده اند که یون های ترکیبات فلزی قلیایی ساپونین ها، اطلاعات ساختاری ارزشمند در خصوص ویژگی آگلیکون و محل پیوند بقایای قند ارایه می کند (80). با این حال، طیف های ساپونین را می توان بدون افزودن نمک سدیم شناسایی کرد. به دلیل شباهت بالای کاتیون های قلیایی برای گلیکوزید های تری ترپن، همه ساپونین های تشخیص داده شده در طیف های حالت یون مثبت با ترکیبات سدیم مولکول های $M + Na$ -19

18) قرار می گیرند. سایر پیک های مرئی از طریق کاهش واحد های خنثی نظیر دی اکسید کربن، آب و یا دی اکسید کربن متصل به آب تولید شد.

نمودار ساپونین های تولید شده از احشای این خیار دریایی با استفاده از MALDI-MS و ESI-MS ترسیم شد. MALDI موسوم به روش یونیزاسیون نرم می باشد زیرا این طیف عمدتاً به صورت ثابت بوده و دارای تک یون هایی برای مولکول های آنالیت است. با این حال در برخی از موارد، MALDI منجر به تقسیم حداقل آنالیت ها می شود (71).

تخلیص کروماتوگرافی اجزای غنی از ساپونین محلول ایزوبوتانول احشای خیار دریایی بر روی پلیت های کروماتوگرافی لایه نازک پوشش دهی شده پایش شده و حضور باند های مختلف را نشان داد. به عنوان مثال، پروفیل TLC در بخش های HPLC 52-61 از قسمت ساپونین ایزوبوتانول از احشای خیار دریایی در شکل 1 ب نشان داده شده است. روش کروماتوگرافی جدایشی گریز از مرکز نه تنها امکان تخلیص ساپونین ها را دارد، بلکه در برخی از موارد موجب تفکیک ساپونین های ایزومریک می شود برای مثال تفکیک ایزومر های شناسایی شده در پیک یون در m/z 1303.6 که در ادامه بحث می شود.

شکل 1: الگوی ترکیب ساپونین در کروماتوگرافی لایه نازک و اجزای کروماتوگرافی جدایشی گریز از مرکز با عملکرد بالا (HCPCP) از عصاره های تخلیص شده احشای خیار دریایی با استفاده از فاز پایین سیستم $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (7:13:8). اعداد زیر هر خط نشان دهنده کسری از کلکتور است. در این جا، تنها کسر های 52 تا 61 یک تحلیل (110 جزء) به صورت معرف یا مدل نشان داده شده اند.



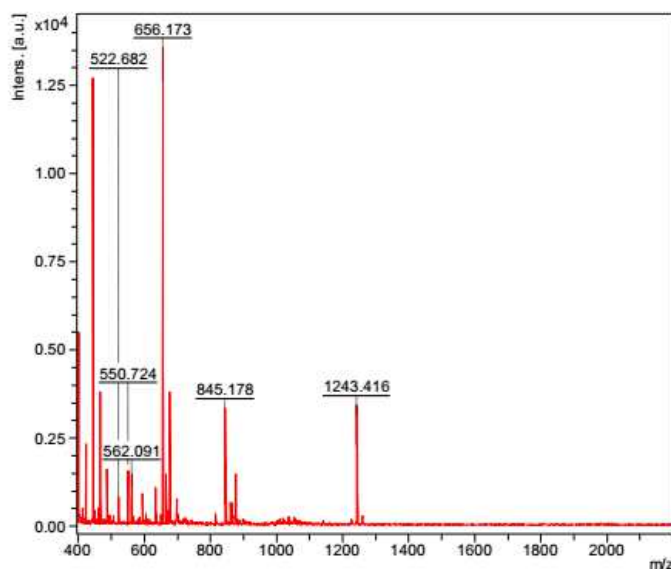
طیف سنج جرمی به طور گسترده ای برای شناسایی ساپونین ها و تایید ساختاری آن ها استفاده شده است. یکی از روش های قوی که به طور گسترده ای برای تحلیل مولکول های غیر فرار با وزن مولکولی بالا استفاده می شود MALDI (82) می باشد. اجزای HCPC مناسب بر اساس پروفیل های TLC ترکیب شده و توسط MS، MALDI و MS/MS و ESI MS/MS تحلیل می شوند. در حالت یون مثبت، همه یون های شناسایی شده گونه های سدیمی نظیر $[M + Na]^+$ مرتبط با ساپونین های سولفات و غیر سولفات (64) می باشند. اهمیت یون های مادر $[M + Na]^+$ در طیف های MS، امکان تحلیل ساپونین ها را در ترکیبات می دهد. نتایج MALDI نشان می دهد که اجزای ساپونین کاملاً خالص هستند و این با داده های TLC همخوانی دارد. طیف جرمی MALDI تمام اسکن از عصاره ساپونین بدست آمده از جزء 55 HPCPC از احشای خیار دریایی در شکل 2 نشان داده شده است.

این طیف، پیک شدید تشخیص داده شده در m/z 1243.4 را نشان می دهد که مرتبط با هولوترین A بوده و دارای یک ترکیب عنصری $[M + Na]^+$ C₅₄H₈₅NaO₂₇S است. سایر پیک های مرئی با قطب های قند و یون های اگلیکون تولید شده با کاهش قند ها یا کاهش آب و دی اکسید کربن از ساپونین های کاتیونی با یونش MALDI ارتباط دارند. این تحلیل ها نشان می دهند که این جزء حاوی یک ساپونین می باشد. از این روی، اگرچه تفکیک جز به جزء HPCPC از ترکیب ساپونین تفکیک شد، مقداری از ساپونین به دلیل تشابه در مهاجرت TLC در برخی از اجزا شناسایی شد. گزارش شده است که تفکیک کامل ساپونین ها در

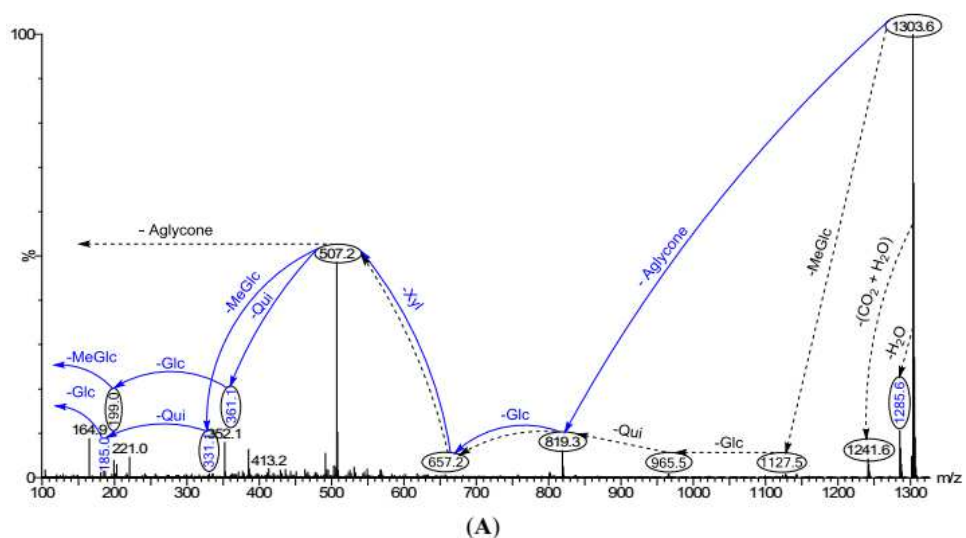
یک بار HPCPC سخت بود. با این حال، این روش امکان تفکیک ساپونین ها از جمله برخی ایزومر ها (شکل 4) را می دهد.

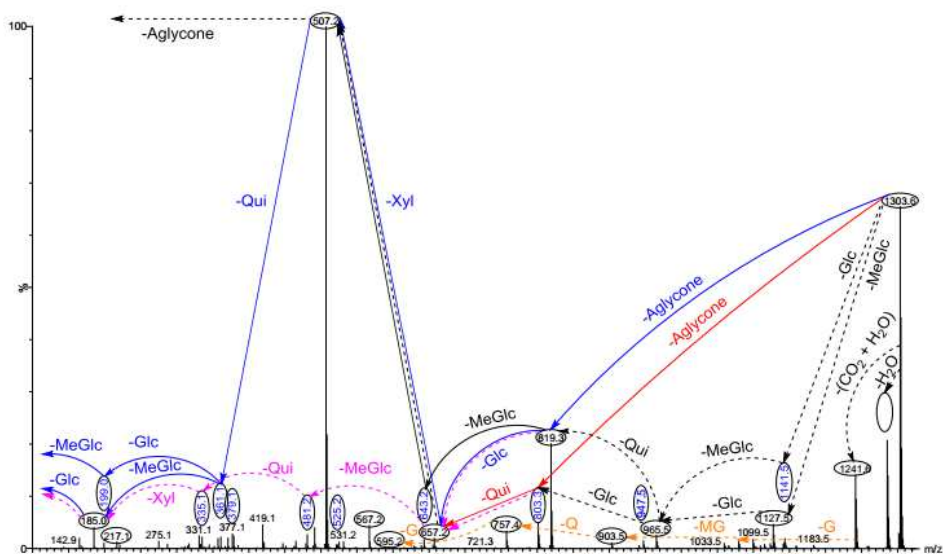
شکل 2: طیف جرمی از طیف سنج جرمی یونیزاسیون/ واجذب لیزری به کمک ماتریس فول اسکن از جزء

HPCPC 55 در حالت یون مثبت

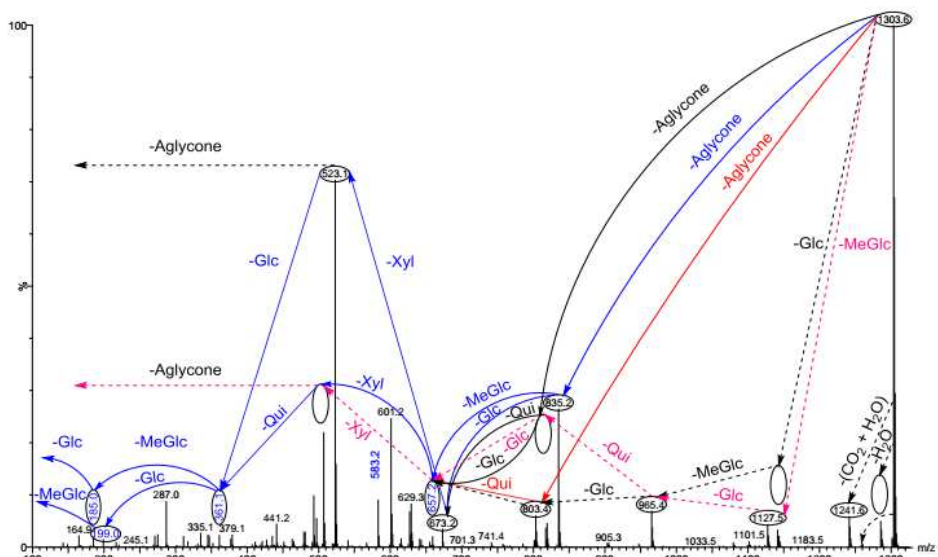


شکل 3: الگوهای تفکیک شماتیک یون شناسایی شده در m/z 1303.6 الف: جزء 15 ب: جزء 14 و پ: جزء 12. خطوط ممتد و خط چین دو مسیر تفکیک را نشان می دهد. پیک غالب (الف و ب) در m/z 507 متناظر با قطب اگلیکون و بقایای قند می باشد. پیک اصلی پ در m/z 523 متناظر با هر دو قطب اگلیکون و بقایای قند کلیدی است. علامت های اختصاری: G = Glc, MG = MeGlc, Q = Qui, X = Xyl





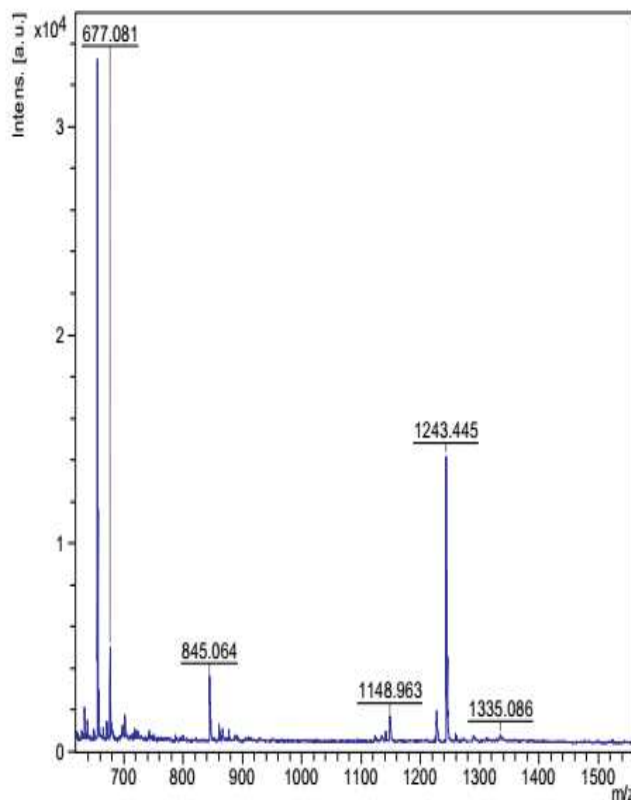
(B)



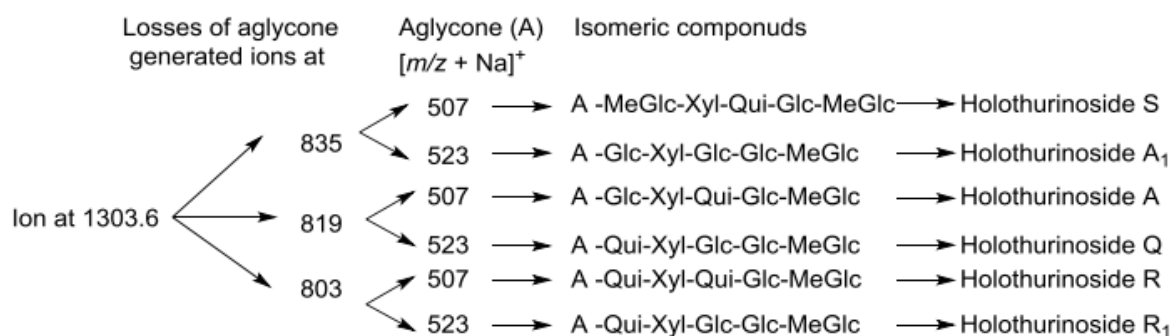
(C)

طیف جرمی تمام اسکن MALDI تمام اسکن از عصاره ساپونین غنی سازی شده با ایزوبوتانول که از احشای خیار دریایی بدست آمده است در شکل 4 نشان داده شده است. طیف وسیعی از ساپونین ها با شدت های مختلف شناسایی شدند. این طیف، 13 پیک را نشان می دهد که هر یک حداقل با یک نوع ساپونین ارتباط دارد. فراوان ترین یون های مشاهده شده تحت شرایط یون مثبت در 1303, 1289, 1287, 1259, 1245, 1123, 1141, 1149, 1227, 1229, 1243, و 1335 m/z شناسایی شدند. تحلیل بیشتر نشان داد که برخی از این پیک های MS، بیش از یک ترکیب را شامل می شوند. برای مثال، پیک ها در m/z 1303 و 1287 دارای حداقل شش و پنج همنوع متفاوت بود (شکل 3 و 5-7).

شکل 4: طیف جرمی MALDI تمام اسکن عصاره ساپونین غنی سازی شده با ایزوبوتانول از احشای خیار دریایی. یک دامنه جرمی 600 تا 1500 دالتون در این جا نشان داده شده است. لازم به ذکر است که این طیف برای این گونه منحصر به فرد است.

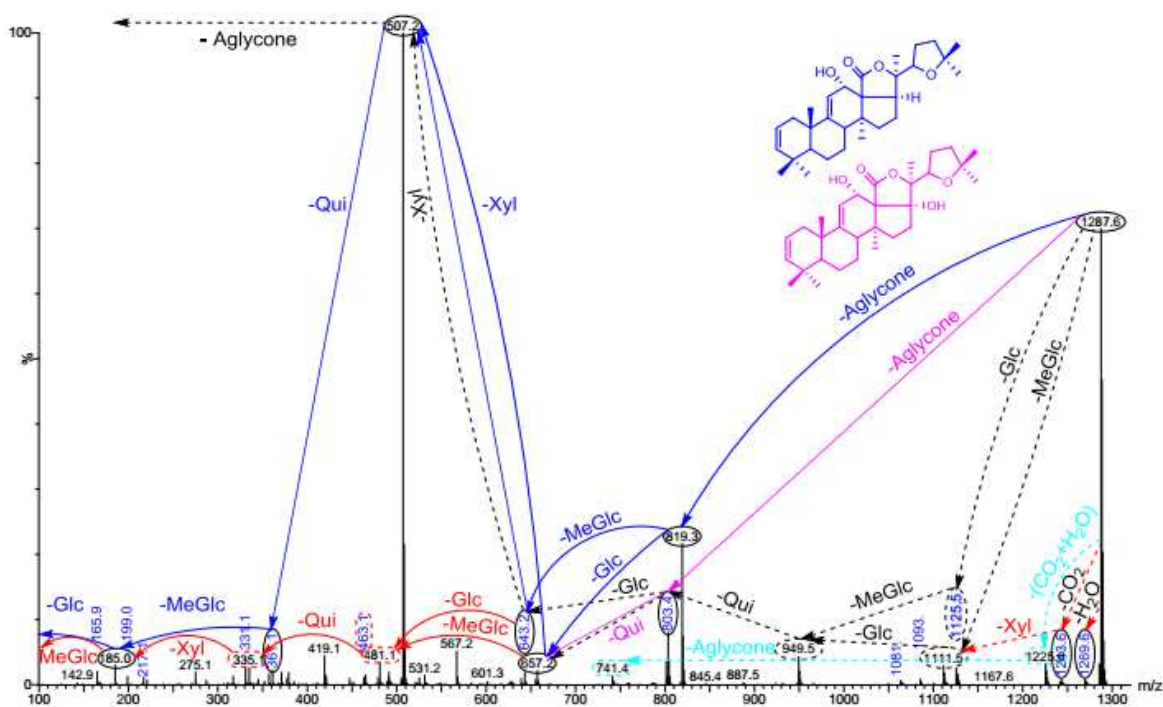


شکل 5: نمودار شماتیک از ساختارهای ایزومریک پیشنهادی یون در m/z 1303.6

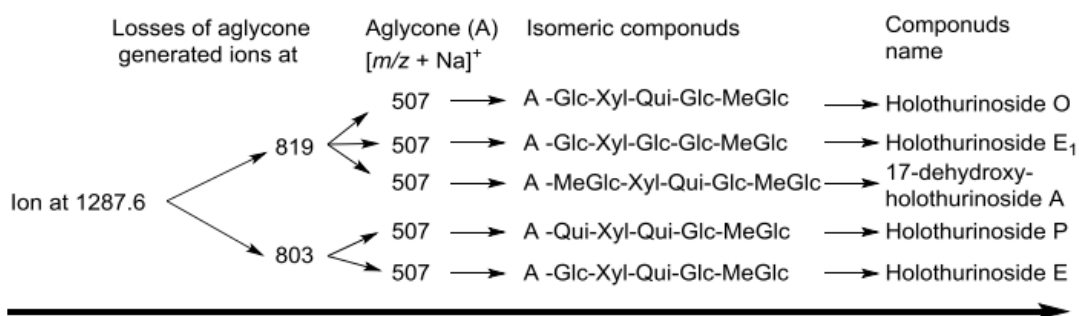


از دست رفت یون های تولید شده آگلیکون در، آگلیکون A $[m/z + Na]^+$ ، ترکیبات ایزومریک یون در 1303.6، هولوتریونوزید

شکل 6: طیف ESI-MS-MS حالت یونی مثبت ساپونین های شناسایی شده در m/z 1287.6. این طیف حضور دو آگلیکون متفاوت را نشان می دهد که تولید ساپونین های ایزومریک می کند. فلش های کامل و خط چین دو مسیر تفکیک اصلی را نشان می دهد.



شکل 7: یک نمودار شماتیک ساختار های ایزومریک پیشنهادی یون در m/z 1287.6



کاهش یون های تولید شده آگلیکون، آگلیکون A، $[m/z + Na]^+$ ، ترکیبات ایزومریک، نام ترکیبات

اندازه گیری های جرمی صحیح با MALDI-MS پیک های ساپونین را نشان داده و ترکیبات عنصری و فرمول مولکولی با ESI-MS-MS به شکلی که در جدول 1 خلاصه شده است تعیین شدند. نتایج نشان داد

که حداقل 75 ساپونین در خیار دریایی شناسایی شدند از جمله 39 گلیکوسید تری ترین سولفات، غیر سولفات و استیلات که حاوی طیف وسیعی از واحد های آگلیکون و واحد های قند می باشد.

جدول 1: خلاصه ای از ساپونین های شناسایی شده از احشاء خیار دریایی با طیف سنج جرمی زمان پرواز یونش / واجذب لیزر به کمک ماتریس (MALDI-ToF-MS) و طیف سنج جرم یونیزاسیون- الکترواسپری (ESI-MS). این جدول 39 ترکیب شناسایی شده جدید را همراه با 36 ترکیب نشان می دهد. این جدول برخی از ساپونین های مشاهده را نشان می دهد که نام های متفاوتی توسط محققان مختلف به آنها ارایه شده است.

[M + Na] ⁺ m/z	MW	فرمول شیمیایی	نام ترکیب	جدید (N)/ منتشر شده (P)	منابع
889.4	866	C ₄₁ H ₆₃ Na O ₁₆ S	B3 هولوترین	P	[83]
C ₄₂ H ₆₇ Na O ₁₅ S	Unidentif ied	N	-		
905.4	882	C ₄₁ H ₆₃ Na O ₁₇ S	B4 هولوترین	P	[83]
Holothurin B	P	[61,84–86]			
Nobiliside B	P	[87]			
907.4	884	C ₄₁ H ₆₅ Na O ₁₇ S	B2 هولوترین	P	[83]
Leucospilota side B	P	[8]			
911.6	888	C ₄₅ H ₉₂ O ₁₆	ناشناس	N	-
917.4	994	C ₄₄ H ₇₁ Na O ₁₅ S	ناشناس	N	-
921.4	898	C ₄₁ H ₆₃ Na O ₁₈ S	Leucospilota side A	P	[84]
1034.1	1011	a*	ناشناس	N	-
1065.5	1042	C ₄₈ H ₈₂ O ₂₄	ناشناس	N	-

1071.5	1048	C47H93Na O21S	ناشناس	N	-
1078.5	1055	a *	ناشناس	N	-
1083.3	1060	C58H64O2 5	ناشناس	N	-
1087.6	1064	C47H93Na O22S	ناشناس	N	-
1123.5	1100	C54H84O2 3	ناشناس	N	-
1125.5	1102	C54H86O2 3	Holothurinosi de C Holothurinosi de C1	P	[62,69,88,89]
1127.6	1104	C54H88O2 3	ناشناس	N	-
Unidentified	N	-			
1141.6	1118	C54H86O2 4	Desholothurin A (Nobiliside 2a), Desholothurin A1 (Arguside E)	P	[5,62,69,88– 90]
1149.2	1126	a *	ناشناس	N	-
1157.5	1134	C54H109O 25	Holothurinosi de J1	P	[50]
C49H91Na O25S	ناشناس	N	-		
1193.5	1170	C55H87Na O23S	ناشناس	N	-
1199.4	1176	C54H64O2 9	ناشناس	N	-
1221.5 **	1198	C56H78O2 8	ناشناس	N	-
1225.5	1202	C54H83Na O26S	ناشناس	N	-
1227.5	1204	C54H85Na O26S	Fuscocinerosi de B/C, Scabraside A or 24- Dehydroechin oside A	P	[29,56,89,91 ,92]

1229.5	1206	C ₅₄ H ₈₇ NaO ₂₆ S	Holothurin A2, Echinocide A	P	[7,61,91,93-95]
1243.5	1220	C ₅₄ H ₈₅ NaO ₂₇ S	Holothurin A Scabraside B 17-Hydroxy fuscocineroside B 25-Hydroxy fuscocinerosiden B	P	[29,58,61,95-97]
1245.5	1222	C ₅₄ H ₈₇ NaO ₂₇ S	Holothurin A1 Holothurin A4 Scabraside D	P	[91] [36] [92]
1259.5	1236	C ₅₄ H ₈₅ NaO ₂₈ S	Holothurin A3	P	[36]
Unidentified	N	-			
1265.5	1242	C ₅₆ H ₈₃ NaO ₂₇ S	Unidentified	N	-
1271.6	1248	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₇	Impatienside B	P	[5,98]
1287.6	1264	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₈	Holothurinoside E, Holothurinoside E1	P	[62,69]
Unidentified	N	-			
Unidentified	N	-			
17-Dehydroxyholothurinoside A	P	[5,99]			
1289.6	1266	C ₆₀ H ₉₈ O ₂₈	Griseaside A	P	[99]
1301.6	1278	C ₆₁ H ₉₈ O ₂₈ C ₆₀ H ₉₄ O ₂₉	Holothurinoside M ناشناس	P N	[65] -
1303.6	1280	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉	Holothurinoside A	P	[5,62,69,88]

			Holothurinoside A1		
Unidentified	N	-			
Unidentified	N	-			
Unidentified	N	-			
Unidentified	N	-			
1305.6	1282	a *	ناشناس	N	-
1317.6	1294	C61H98O29	ناشناس	N	-
1335.3	1312	a *	ناشناس	N	-
1356.4	1333	a *	ناشناس	N	-
1409.4	1386	C61H78O36	ناشناس	N	-
1411.7	1388	C62H116O33	ناشناس	N	-
1419.7	1396	C66H108O31	ناشناس	N	-
1435.7	1412	C66H108O32	ناشناس	N	-
1465.7	1442	C67H110O33	Arguside B Arguside C	P	[5,32]
1475.6	1452	C65H96O36	ناشناس	N	-
1477.7 **	1454	C61H114O38	ناشناس	N	-
1481.7	1458	C66H106O35	ناشناس	N	-
1493.7	1470	C65H114O36	ناشناس	N	-
1495.7	1472	C61H116O39 C72H112O31	Holothurinoside K1 ناشناس	P N	[50] -
1591.7	1568	C66H120O41	ناشناس	N	

تعدادی از مطالعات حضور ساپونین های مختلف را گزارش کرده اند. الباندی و همکاران (5) به توصیف ساختار های 21 ساپونین غیر سولفات از دیواره بدنی *Bohadschia cousteau* پرداخته اند. این محققان ده ترکیب جدید را همراه با یازده گلیکوزید تری ترین از جمله *Holothurinoside I*, *Holothurinoside*

H, Holothurinoside A, Desholothurin A, 17-dehydroxyholothurinoside A, Arguside C, Arguside F, Impatienside B, Impatienside A, Marmoratoside A and Bivittoside گزارش کرده اند. باندوک و همکاران(64) به بررسی همونوع های ساپونین در سه گونه از هولوتوریده (H. scabra)، جاگر 1833، H. fuscocinerea، جاگر 1833 و H. impatiens فاروسکال (1775) پرداخت. این گروه 20 پیک یون ساپونین را با انواع سولفات ها و غیر سولفات ها در H. scabra گزارش کرد که حاوی بالاترین تنوع ساپونین در میان گونه های بررسی شده بوده و پس از آن H. fuscocinerea و H. impatiens به ترتیب با 17 و 16 پیک ساپونین قرار داشت. هم چنین این محققان کل 32 ترکیب در H. scabra و H. impatiens و 33 ترکیب در H. fuscocinerea را توصیف کردند. مقدار ساپونین پنج خیار دریایی از جمله H. atra, H. leucospilota, P. graeffei, A. echinites و B. subrubra توسط وان دیک و همکاران(50) مطالعه شد. این محققان حضور چهار، شش، هشت، ده و پانزده همونوع ساپونین را به ترتیب در این گونه ها گزارش کردند. به علاوه، این گروه(69) نیز تعداد زیادی از ساپونین ها(26) مورد را در لوله های کوارین H. forskali در مقایسه با دیواره بدن (12 ساپونین) شناسایی کرد. این نتایج موید شواهد ارایه شده در این مطالعه در خصوص تعداد زیادی از همونوع های ساپونین در احشاء می باشد.

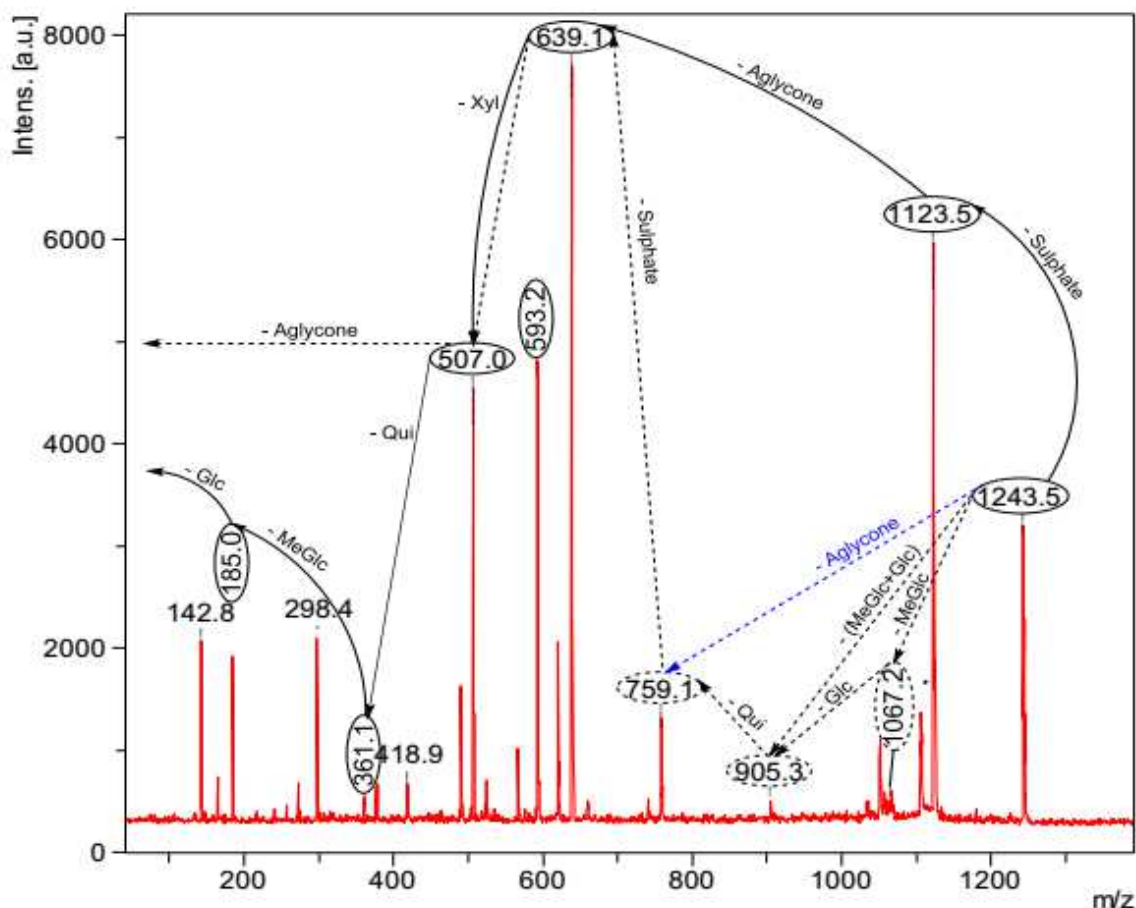
1-2 داده های ترکیب هولوترین MALDI-MS/MS A در حالت یون مثبت

روش های مرسوم برای تمایز بین ساپونین های ایزومریک از جمله تحلیل استرسکوپ و مشتق شیمیایی، روش هایی کسل کننده و زمان بر می باشند(100). طیف سنجی جرمی متوالی برای دست یابی به اطلاعات ساختاری بیشتر در خصوص قطب ساکارید و تشریح ویژگی های ساختاری آن ها انجام شد. به منظور درک این که یون ها و سیگنال های شناسایی شده در طیف تمام اسکن MALDI MS با یون های ساپونین، متناظر هستند یا خیر، تحلیل های طیف سنج جرمی متوالی برای هر یون انجام شد و پیک یون ساپونین نیز با استفاده از اثر انگشت MS/MS تولید شده با کمک تفکیک ناشی از برخورد (CID) از ساختار های گلیکان مربوطه تجزیه تحلیل شدند. CID می تواند اطلاعات بسیار زیادی را در خصوص ماهیت اجزای کربوهیدرات ارایه کند زیرا گلیکوزید ها را در پیوند های گلیکوزیدی تجزیه کرده و موجب می شود تا تفسیر داده ها ساده

تر شود. تقریباً همه یون های دختر مشاهده شده ناشی از کلیواژ و شکست پیوند های گلیکوزیدی (شکل 8) می باشند. از این روی باز سازی اثر انگشت آن ها (الگوهای تجزیه) ایجاد شده با شکست پیوند گلیکوزید برای ایجاد ساختار قطب های قندی استفاده شد. این روش قادر به تفکیک تفاوت های ساختاری بین ایزومر ها پس از تفکیک HPCPC می باشد. با این حال در برخی از موارد، طیف های MS/MS بدست آمده از CID برای یون های پیش ساز ایزومریک مشابه می باشند. به عنوان مثال، طیف جرمی MALDI-MS/MS برای یون شناسایی شده در m/z 1243.5 در شکل 8 نشان داده شده است. الگوی قطعه بندی و تفکیک ترکیب در m/z 1243.5[M + Na]⁺ در آزمایشات MS به طور مفصل در زیر برای تشریح گام به گام ساختار مولکولی این ترکیبات بحث می شود.

تفکیک ناشی از برخورد موجب فعال سازی دو مسیر قطعه بندی یون های مادر کاتیونی نشان داده شده با فلش های ممتد و خط چین می شود. اول، از دست دادن واحد قندی، از دست دادن متوالی 3-O- متیل گلوکز (-MeGlc)، گلوکز-(-Glc)، گوینوز (-Quit) واحد های سولفات و زایلوز تولید یون های شناسایی شده به ترتیب در m/z 1067, 905, 759, 639 و 507 می شود. همان طور که این شکل نشان می دهد، کاهش متوالی (MeGlc + Glc) هم زمان موجب تولید یون در m/z 905.3 و کوی (-146 Da) منجر به پیک در m/z 759.1 می شود که متناظر با [Aglycone + sulXyl-H + 2Na]⁺ می باشد.

شکل 8: تحلیل طیف MALDI متوالی مثبت یون پیش ساز (ساپونین) شناسایی شده در m/z 1243.5. شکل زیر جزء بندی یون های مادر ناشی از برخورد در m/z 1243.5 را نشان می دهد. از دست رفت متوالی گروه سولفات، آگلیکون، زایلوز، کوینواز و 3-O- متیل گلوکز موجب تولید یون هایی در به ترتیب 1123، 639، 507، 361 و m/z 185 می شود.



دوما، تجزیه یون های پیش ساز از طریق کاهش بقایای آگلیکون تحریک شده و ایجاد پیک هایی در 709 m/z می کند (شکل 8) که متناظر با قطب های قند 1234.5 می باشد. کاهش NaHSO_4 یون تولید شده در 1123.5 m/z ، بقایای آگلیکون (یون تولید شده در 639.1 m/z) و زایلوز (یون تولید شده در 507.0 m/z) به ترتیب با پیک های اثر انگشت گلیکون و آگلیکون از یون پیش ساز تولید شدند. از این روی، کاهش متوالی سولفات مونوهیدروژن سدیم از 1243.5 و واحد آگلیکون تولید سیگنال هایی در 1123 m/z و 639 (شکل 8) کردند. پیک 639 متناظر با قطب قند بدون سولفات بود. به علاوه کاهش متوالی Xyl, Qui و MeGlc تولید سیگنال هایی به ترتیب در 507، 361 و 185 m/z کرده و نتایج نشان داد که تجزیه یون ناشی از هولوترین A است (1243.5 m/z). پیاده سازی این فنون مولکولی بر روی همه یون های شناسایی شده در طیف های MALDI به ما امکان شناسایی ساختار های مولکولی ساپونین ها را نشان می دهد. همه طیف ها تحلیل و قطعه بندی شده و برخی از آن ها دارای الگو های قطعه بندی مشترکی را نشان دادند. قطعات کلیدی از طیف های MS متوالی حالت یون مثبت MALDI و ESI بر طبق مثال نشان داده شده برای

پیشنهاد ساختار های ساپونین باز سازی شدند. بر اساس این امضا های قطعات، 39 ساپونین جدید را می توان یافت. برخی از این ترکیبات، که دارای سیگنال های کلیدی 507 و m/z 523 به صورت امضای MeGlc-Glc-Qui و الیگوساکارید MeGlc-Glc-Glc مشترک می باشند، به آسانی شناسایی شدند. ساپونین های شناسایی شده دارای عناصر ساختاری آگلیکون متفاوت می باشد.

کاهش 18 دالتون از یون مولکولی، نشان دهنده حذف مولکول خنثی از گروه قند(19) بود. از دست رفت هم زمان دو واحد قند حاکی از ویژگی های یک زنجیره قندی منشعب بود. سایر پیک های مرئی متناظر با یون های محصول ساپونین بودند که با از دست رفت آب و دی اکسید کربن از ساپونین ها با یونیزاسیون MALDI تولید شدند. از این روی، توالی قند ساپونین ها را می توان با کاربرد CID تعیین کرد. داده های MALDI MS/MS برای این مقدار m/z کامل بود که مطابق با مقادیر گزارش شده در مطالعه قبلی بود(50-64).

سیگنال قطعه غالب در m/z 593.2 ناشی از کلیواژ $\alpha^{1,5}A_4$ بقایای sulXyl می باشد که مطابق با یافته های قبلی برای تحلیل MS/NS ساپونین های خیار دریایی(64) می باشد. با این حال این پیک تنها به صورت سیگنال قوی در ساپونین های سولفات نظیر هولترین A شناسایی شد، در حالی که در ساپونین های غیر سولفات نظیر هولترینوزید A مشاهده نشد. از این روی کلیواژ حلقه ای تنها با Xyl سولفات رخ می دهد. تحلیل با MALDI منجر به طیف جرمی متوالی غنی از اطلاعات حاوی پیوند گلیکوزید و کلیواژ های حلقه ای شد که اطلاعات ساختاری بیشتری را نسبت به مطالعات قبلی بر روی همان یون پیش ساز در اختیار گذاشت. قطب قند ساپونین ها از هگزااکسید غیر سولفات به تترازید های سولفات(64) تولید شد. تخصیص گروه سولفات با تفاوت جرم بین یون مادر در m/z 1243 و یون دختر $m.z$ 1123 بر اساس آگاهی از وزن مولکولی واحد سولفات تعیین شد. شکست پیوند گلیکوزید به طور کامل مشاهده شد که به ما امکان تعیین موقعیت سولفات(1123 m/z)، قطب های قندی کامل(639 m/z) و هر جزء از بقایای قندی را می دهد. کاهش بقایای قند و آگلیکون به طور کلی از شکست پیوند گلیکوزیدی مشاهده می شود. اگرچه یک کلیواژ حلقه ای تخصیص داده شد، تولید کلیواژ های پیوند گلیکوزیدی همراه با جرم صحیح برای تعیین کیفیت سولفات در امتداد توالی تتراساکارید برای هولترین A کافی است. یون شناسایی شده در m/z 1105 (شکل

8) یون اتلاف آب می باشد که از یون در m/z 1123 گرفته شده است، این در حالی است که یون مشاهده شده در m/z 1061 متناظر با از دست رفت خنثی دی اکسید کربن است (44 دالتون).

به گفته سانگ و همکاران (100)، کلیواژهای حلقه ای رخ داده در طیف های CID ساکاریدها با لینکاژ 1-2 آلفا نظیر باقی مانده قند برای هولوترین A، شامل انواع X و A می باشند، این در حالی است که کلیواژهای پیوند گلیکوزید شامل انواع C و B است. پیک اصلی در m/z 593.2 به کلیواژ متقابل واحد قند نسبت داده شد.

این طیف MS/MS به ما امکان باز سازی الگوی قطعه بندی ناشی از برخورد یون مادر (شکل 4) را داده و می توان تایید کرد که یون های پایش شده در m/z 1243.5 با هولوتورین A متناظر بود که توسط وان دیک و همکاران 50، کیتاگوا 96 و رودریگز و همکاران (88) گزارش شده است.

حضور یک گروه سولفات (NaHSO_4) در ترکیبات ساپونین در رابطه با هولوتورین A، با کاهش 120 دالتون در طی MS/MS تعیین شد. با ترکیب جرم صحیح و اطلاعات MS/MS، ساپونین ها به هفت نوع ساختاری کربوهیدرات مجزا طبقه بندی شدند. (A) MeGlc-Glc-Qui-Xyl-Aglycone; (B) MeGlc-Glc-Glc-Xyl-Aglycone; (C) (MeGlc-Glc)-QuisulXyl-Aglycone; (D) MeGlc-Glc-Qui-(Qui-Glc)-Xyl-Aglycone; (E) MeGlc-Glc-Qui-(MeGlc-Glc)-Xyl-Aglycone; (F) MeGlc-Glc-Glc-(MeGlc-Glc)-Xyl-Aglycone; (G) MeGlc-Glc-Glc-(Qui-Glc)-Xyl-Aglycone و ساپونین

های غیر سولفات دارای یک تا شش واحد مونوساکارید و شش نوع ساختاری مجزا بود. همه ساپونین های سولفاته از m/z 889 تا 1259 دارای ساختار (C) می باشند که در آن ها Xyl سولفاته شد. با این حال در برخی از موارد، سولفاسیون MeGlc, Xyl, Glc گزارش شد (13). تحلیل طیف سنج جرمی نشان داد که این گونه خیار دریایی تولید ترکیبی از انواع ساپونین های رایج و منحصر به فرد می کند. انواع ساپونین های منحصر به فرد نیز زمانی شناسایی شدند که طیف های وزنی این گونه ها با سایرین مقایسه شد. پیک های ساپونین با علایم یونی در مقادیر 1477، 1335، 1221، 1149 و 1123 در H. lesson منحصر به فرد بودند. در طیف سنج متوالی، فراوان ترین یون ها به کاهش اگلیکون ها و هر دو قطب قند کلیدی نسبت داده شد (507 و 523). برای 1243.5، فراوان ترین یون های مشاهده شده تحت شرایط یونی مثبت در 1123،

639, 507 متناظر با کاهش قطب های سولفات، اگلیکون و Xyl بود. برخی از ساپونین ها در میان گونه ها متداول بودند (هولوترین a-b)، در حالی که سایرین نسبت به هر گونه دیگر منحصر به فرد بود (برای مثال 1221 در H. lesson)، همان طور که این موضوع توسط بادوک و همکاران (64) و کالیر و همکاران (6) نیز نشان داده شده است. پروفیل ساپونین (پیک ها) در خیار دریایی، شدت های نسبی متفاوت ساپونین در احشا را نشان داد. پیکهای مشاهده شده (شکل 4) در 1149, 1227.5, 1229.5, 1243.5 و m/z 1259.5 در حالت یون مثبت مربوط به به ترتیب یک ساپونین ناشناس Scabraside A یا Fuscocinerosides B/C (ایزومر ها)، Holothurin A, Holothurin A2 (Echinoside A) و Holothurin A3 بود (36,56,61,89,93,94). بیشتر این ساپونین های سولفات به توسط کیتاگوا و همکاران (89) و باندک و همکاران (64) گزارش شده است. پیک های یون ساپونین های غیر سولفات در 1125, 1141, 1287, 1289, 1301 و m/z 1303 به ترتیب متناظر با Holothurinosides C/C (ایزومر ها)، Desholothurin A (مترادف Nobilside 2A) یا Desholothurin A1, Holothurinosides E/E1, Griseaside A, و Holothurinosides M and A بود (69). H. fuscocinerea و H. impatiens، H. scabra. حاوی Holothurin A, Scabraside B. Holothurin A, و Holothurinoside C (64) بود. این گروه 24- Desholothurin A و dehydroechinoside A را در H. scabra نشان داد. حضور Holothurinosides و Desholothurin A1, Desholothurin A, Holothurinosides A/A1.C/C1 و Holothurinosides E/E1 نیز در H. forskali توسط چندین گروه توصیف شده است (65, 69, 88). البته ما قادر به شناسایی همه همونوع های ساپونین در عصاره نیمه خالص در نمونه های جزء بندی شده HPCPC شناسایی شد. باندوک و همکاران (64) یک مسئله مشابه را تجربه کردند که در آن آن ها پیک هایی را در MALDI MS مشاهده کردند که در تفکیک ایزومری در LC-ESI MS مشاهده نشده بود. برای مثال، ما نتوانستیم یون ها را در 1149 و m.z 1335 در طیف های HPCPC توسط ESI-MS شناسایی کنیم. طیف های جرمی MALDI نیمه خالص و نمونه های HPCPC از خیار دریایی، 75 یون (29 سولفات و 46 غیر سولفات) را نشان داد که در آن ها مجموع 13 ایزومر شناسایی شد (جدول 1) که از آن ها 36 هم نوع

قبلا در سایر هولوتورین ها شناسایی نشده است. این اولین بار است که حضور این ساپونین های شناسایی شده در خیار دریایی گزارش شده است که جدا از ساپونین های گزارش شده توسط کولیر و همکاران (58) می باشد که در جلبک های دریایی اطراف خیار دریایی یافت شده است. آن ها ساپونین هایی با مقادیر m/z 1141، 1229، 1243 و 1463 یعنی Desholothurin A, Holothurin A2, Scabraside B (مترادف با هولوتورین A) و Holothurinoside H (58) را گزارش کردند. با این حال، ما قادر به تشخیص یون در m/z 1463 در نمونه خود نبودیم.

بیشتر ساپونین های سولفات ه که قبلا گزارش شده اند در این گونه شناسایی شده است از جمله (Holothurin B3 (m/z 889), Holothurin B/B4 (m/z 905), Holothurin B2 (m/z 907), Holothurin A2 (m/z 1229), Fuscocinerosides B (m/z 1227), که ایزومر های گروه عاملی (Holothurin A3 (m/z و Holothurin A (m/z 1243), Holothurin A1/A4 (m/z 1245), Holothurin 1259) می باشند. هموعان سولفات ه رایج در میان این گونه و سایر خیار های دریایی شامل Holothurin B (m/z 905) و Holothurin A (m/z 1243) می باشد. در میان این ساپونین ها، هولوتورین A یک هموع اصلی با بالاترین فراوانی نسبی در این گونه می باشد.

برای نشان دادن شناسایی یک ترکیب جدید در m/z 1149، یون مادر در m/z 1149.0 در معرض قطعه بندی و تجزیه MS/MS قرار گرفت. اثر انگشت MALDI نشان داد که ترکیب حاوی یک اگلیکون جدید در m/z 493 و یک قطب تترا ساکارید با مقدار 656 دالتون از جمله -Qui، -Glc، -Xyl، و -MeGlc در نسبت 1:1:1:1 می باشد. این ساپونین حاوی یک سیگنال کلیدی m/z 507 به عنوان اثر انگشت -MeGlc-Glc- Qui + Na⁺ است. ما نام هولوترینوزید T را پیشنهاد کردیم.

ایزومر های درون یک نمونه، طیف های MS متفاوتی (101) را نشان داد که امکان تشریح این ساختار ها را بر اساس اثر انگشت یون می دهد. در این جا ما نشان دادیم که حضور بسیاری از یون های محصول در طیف عصاره احشاء ناشی از وجود ترکیبی از ساپونین ها و ساپونین های ایزومریک (شکل 3 و 5-7) می باشد. این مشاهده مطابق با یافته های وان دیک و همکاران (69) برای لوله های کاورین H. forskali می باشد. با این

حال طیف سنج جرمی برای دست یابی به اطلاعات ساختاری بیشتر در مورد هم‌نوع‌های ایزومری قوی نیست. با این وجود، این خود امکان شناسایی ساده و سریع اجزای عناصر و توزیع ساپونین را با حضور یون‌ها در 507 و m/z 523 در طیف‌های متوالی عصاره‌های احسایی می‌دهد.

2-2 قطعات کلیدی و تشریح ساختاری ساپونین‌های جدید

قطعات کلیدی مشترک موجب تسهیل تشریح ساختاری ساپونین‌های جدید می‌شود. تحلیل ساپونین‌ها با طیف سنج جرمی متوالی منجر به شناسایی قطعات کلیدی تشخیصی متناظر با عناصر ساختاری رایج ساپونین‌های خلاصه شده رد جدول 2 شد.

جدول 2: یون‌های تشخیصی کلیدی در MS/MS ساپونین‌های هولوتترین

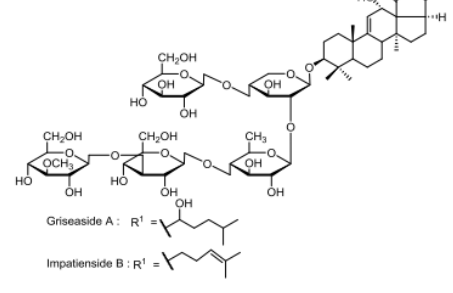
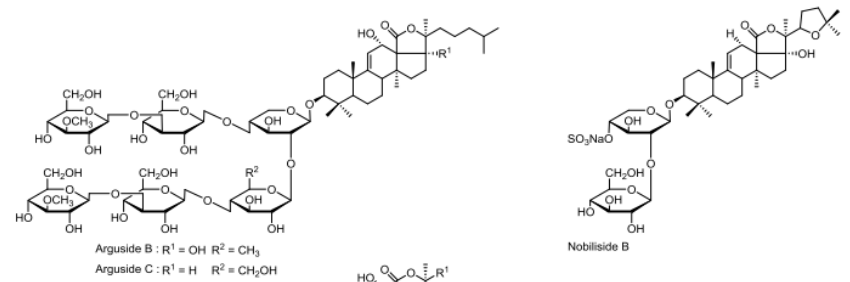
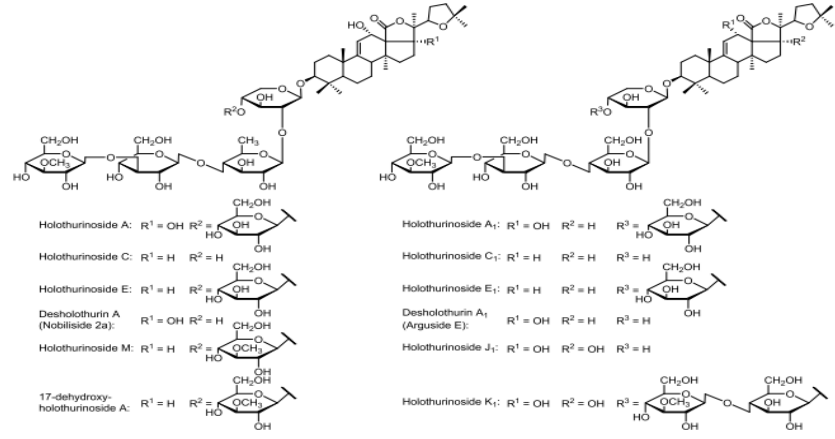
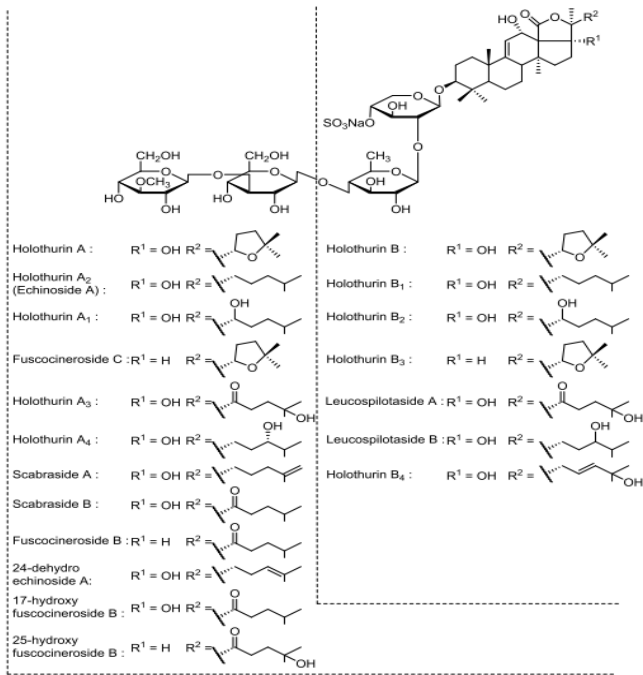
یون‌های تشخیصی در طیف‌های CID[M + Na]		
سیگنال M/Z (دالتون)		
507	523	639
MeGlc-Glc-Qui + Na	MeGlc-Glc-Glc + Na	MeGlc-Glc-Qui-Xyl + Na

ساختارهای ساپونین‌ها با شناسایی و پیاده‌سازی یون‌های قطعات کلیدی تولید شده با طیف سنج جرمی متوالی ایجاد شدند. حضور این بقایای الیگو ساکاریدها (507 و 523) موجب تسهیل تعیین ساختار ساپونین شد. با این حال برخی از ترکیبات با مقدار m/z کم‌تر از 1100 دالتون از جمله 905، 907، 921 و 889 تولید پیک m/z 523 نکرد که منعکس‌کننده عدم وجود این واحد الیگو ساکاریدی در ساختارهای آن‌هاست. بر خلاف ترکیبات دیگر، طیف MS/MS یون در m/z 1477.7 پروفایل اثر انگشت منحصر به فردی را نشان داد که حاوی یون‌هایی در 511 و m/z 493 به جای یون در m/z 507 می‌باشد. ساختار ترکیب با تحلیل MS/MS تایید شد.

تحلیل MALDI نشان داد که یون با m/z 1243.5 یک پیک برجسته در طیف بود که با Holothurin A متناظر بود که در چندین گونه خیار دریایی [6,29,50,58,61,64,89,95-97] مشاهده شد. داده های MALDI با ESI-MS تایید شد.

جدول 1 داده های همه تحلیل های انجام شده بر روی نمونه غنی از ساپونین و نمونه های HPCPC با استفاده از MALDI و ESI بر روی ترکیبات از احشای خیار دریایی را نشان می دهد. ترکیب ساپونین شناسایی شده حاوی طیف وسیعی از ساختار ها و اوزان مولکولی می باشد. ساختار های شیمیایی ترکیبات شناسایی شده در شکل 9 نشان داده شده است. نمونه های ایزوبوتانول و HPCPC 29 یون ساپونین سولفات و 46 یون غیر سولفات را نشان داد. تعداد پیک های یون MS کم تر از تعداد ایزومر های شناسایی شده با MS/MS پس از تفکیک HPCPC بود (شکل 3).

شکل 9: ساختار ساپونین های شناسایی شده در احشای خیار دریایی

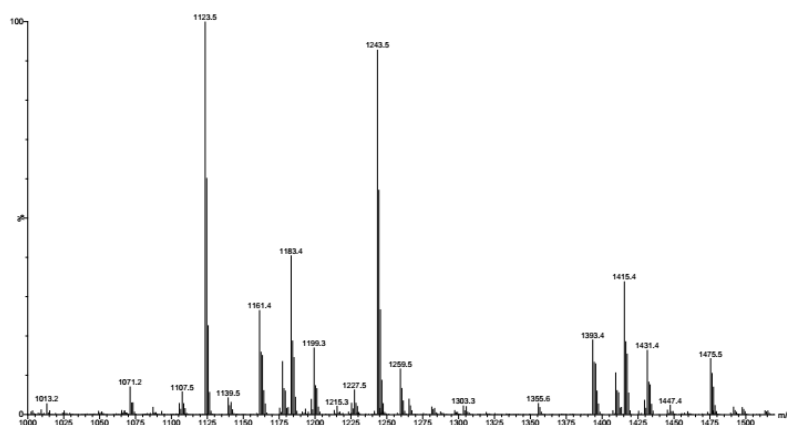


3-2 آنالیز ساپونین ها با ESI-MS

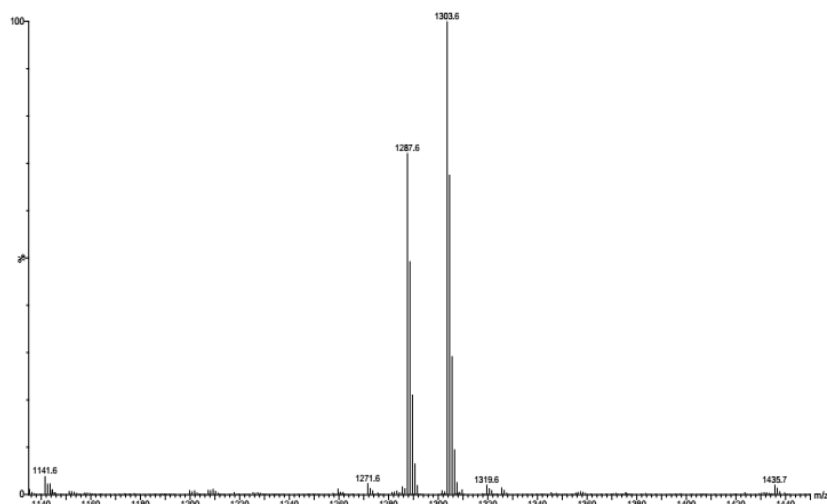
تحلیل ESI-MS حالت یون مثبت بر روی نمونه ها نیز انجام شد. طیف جرمی ESI ساپونین ها با $[M + Na]^+$ غالب است. این ها شامل برخی نمونه هایی بودند که در آن ها پیک های مشاهده شده در طیف های MALDI-MS از تفکیک ایزومر در ESI-MS نظیر پیک شناسایی شده در m/z 1149 در طیف های MALDI پایش نشد. سایر محققان، همین مسئله را گزارش کرده اند (50-64).

ESI-MS یک روش بسیار موثر و قوی برای تمایز ساپونین های ایزومریک می باشد (100). تحلیل MS متوالی بر روی یون های $[M + Na]^+$ ، اطلاعات ساختاری فراوانی را در مورد ساپونین ها ارائه کرده است. تحلیل ESI-MS/MS حالت یون مثبت بر روی همه یون های ترکیبی شناسایی شده در طیف ESI-MS اجزای HPCPC انجام شدند. این روش وجود ساپونین های گزارش شده در منابع را تایید کرد و از این روی امکان کشف هم نوعان ساپونین جدید را در گونه ها داد. جرم های مولکولی ترکیبات شناسایی شده در جدول 1 خلاصه شده است. طیف ESI-MS عصاره ساپونین از احشاء خیار دریایی در شکل 10 نشان داده شده است. چندین پیک اصلی شناسایی شده است. پیک ها در 1123 و m/z 1240 متناظر با ترکیب جدید و هولوترین A با ترکیبات عنصری $C_{54}H_{84}O_{23}$ و $C_{54}H_{85}NaO_{27}S$ بود. تحلیل های ESI-MS نیز بر روی اجزای HPCPC انجام شد. به عنوان مثال شکل 11 طیف ESI-MS از جزء 14 را نشان می دهد.

شکل 10: طیف ESI-MS عصاره ساپونین از احشاء خیار دریایی



شکل 11: طیف ESI-MS حالت یون مثبت عصاره ساپونین از جزء 14



همان طور که می توان در شکل 11 دید، دو پیک اصلی m/z 1303.6 و 1287.6 وجود دارند که به ترتیب مربوط به Holothurinosides A/A1 و Holothurinosides E/E1 است. این دو پیک، بر طبق تحلیل ms/ms ، با حداقل پنج و شش ایزومر متناظر است. مقایسه اوزان مولکولی هر دو ساپونین برخی تفاوت های جرمی را بین آن ها نشان داد نظیر تفاوت جرم 16 دالتون بین Holothurinosides A/A1 و E/E1 که منعکس کننده تغییرات ساختاری کوچک روابط درونی بین آن است. تحلیل های MS/MS حاکی از حضور برخی اگلیکون های مشابه در هر دو یون است.

1-3-2 جرم مولکولی ساپونین ها با ESI

ESI-MS اطلاعات ساختاری قابل ملاحظه ای را با حساسیت بسیار بالا برای ساپونین ها در اختیار می گذارد (60-63). پیک های متناظر با ترکیب سدیم زنجیره های جانبی قند اغلب در طیف های یون محصول پیش ساز ساپونین سدیم دار شدید بود. طیف های جرمی متوالی ساپونین منعکس کننده اثر انگشت های مختلف با شدت های نسبی متفاوت است.

2-3-2 تشریح ساختار ساپونین ها با ESI-MS/MS

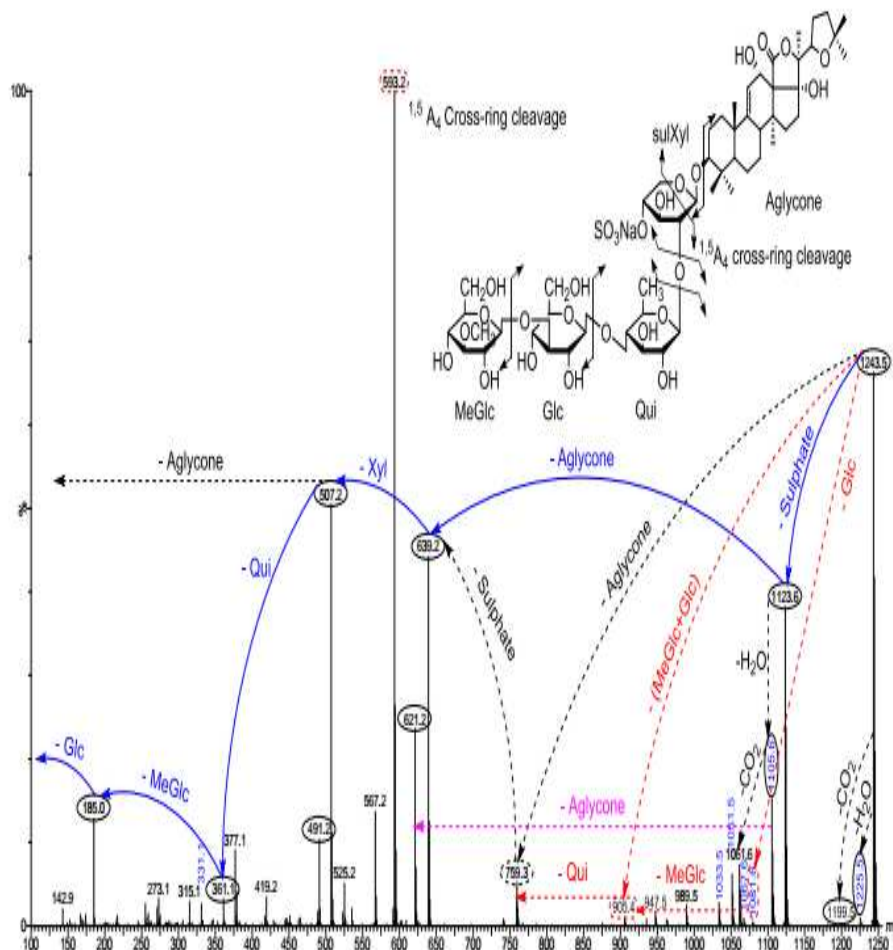
هفتاد و پنج ساپونین تری ترین متفاوت تخلیص شده از خیار دریایی توسط MALDI و طیف سنج وزنی متوالی یونش الکترو اسپری ESI-MS/MS در حالت های یون مثبت بررسی شد. همه طیف ها تحلیل شدند و برخی از آن ها دارای الگوهای قطعه بندی مشترک بودند. قطعات کلیدی از طیف های MS/MS حالت یون مثبت MALDI و ESI با یک مثال باز سازی شد. شدت های پیک یون های قطعه در طیف های MS/MS با

ویژگی های ساختاری و اولویت های قطعه بندی ساپونین های بررسی همبستگی داشت. به طور کلیف تشکیل قطعات از طریق کلیواژ پیوند های گلیکوزیدی در حالت مثبت برای شناسایی ساختار ساپونین ها استفاده شد. تفسیر یون های طیف های MS/MS اطلاعاتی را برای تشریح ساختاری ساپونین ها در شکل 12 ارائه می کند.

قطعه بندی یون در $m.z$ 1243.5 (ساپونین سولفات) تحت تفکیک ناشی از برخورد در شکل 12 نشان داده شده است. فلش های ممتد و خط چین دو مسیر اصلی را در این ساپونین نشان می دهد. پیک در 507 $m.z$ با هر دو قطعه اگلیکون و قطعه تشخیص کلیدی قطب قند متناظر بود.

فراوان ترین پیک ها در $639 [M + Na - 120 - 484, 1123 [M + Na - 120 (sulfate)]+$ و $507 [M + Na - 120 - 484 - 132]+ (aglycone)+$ شناسایی شد. به علاوه، پیک های مشاهده شده در 1225.5 و $1199.5 m/z$ با کاهش آب و دی اکسید کربن از یون مادر آن ها تولید شو شدید ترین پیک در $m.z$ 593 به دلیل کلیواژ حلقه ای مشاهده شد. قطعات مشاهده شده منطبق بر ساختار هولوترین A بودند که توسط دیک و همکاران (50) پیشنهاد شده است. تحلیل ESI-MS/MS، داده های MALDI را بر روی یون در $m.z$ 1243.5 تایید کرد. تحلیل کامل را می توانید در شکل s1 مشاهده کنید ESI-MS برای تفکیک ساپونین های ایزومری از طریق سانگ و همکاران (100) استفاده شد. ایزومر های ساپونین نیز با استفاده از طیف سنج وزنی متوالی با یونس الکترواسپری پس از تفکیک HPCPC شناسایی شدند. طیف های MS/MS این یون ها، اطلاعات ساختاری دقیق را ارائه کرده و موجب تمایز ساپونین های ایزومریک شد. نتایج در اشکال زیر نشان داده شده است. تحلیل ها بر روی یون در $m.z$ 1303.6 (ساپونین های غیر سولفات) به کار برده شد که از اجزای 15، 14 و 12 حاصل شده و در شکل 3 الف پ نشان داده شده است. الگوهای قطعه بندی اصلی برای این ترکیب ایزومری با فلش های ممتد و خط چین نشان داده شده است.

شکل 12: طیف ESI-MS/MS یون مثبت ساپونین شناسایی شده در 1243.5 (هولوتورین A). فلش ممتد و خط چین دو مسیر قطعه بندی اصلی را نشان می دهد. ساختار ساپونین بر اساس طیف سنج جرمی متوالی تشریح شد.



ساختار شش ساپونین ایزومری به یون های شناسایی شده در m/z 1303.6 نسبت داده شد (شکل الف-پ). این ایزومر ها حداقل دارای سه ساختار اگلیکون با 484، 486، و 500 m/z بوده و حاوی پنج بقایای مونوساکارید متفاوت است. این اشکال ایزومر های مختلف یون های شناسایی شده در $m.z$ 1303 را نشان می دهد. برای مثال، شکل 3 الف (جزء 15)، تشریح ساختار جز به جزء هولوتورینوزید الف را نشان می دهد. کاهش متوالی واحد های Glc، Qui، Glc، MeGlc، و Xyl تولید سیگنال هایی می کند که به ترتیب در 1127.5، 965.5، 819.3، 657.2، و 507.2 قابل تشخیص است و مربوط به Holothurinoside A

است (5-62, 69 و 88) است. همان طور که می توان در شکل 3 الف دید، این جزء ساپونین کاملا خالص است.

در یکی از این ایزومر ها (شکل 3 ب)، کاهش متوالی اگلیکون، Glc و Glc, Xyl, Qui سیگنال هایی را ارائه می کند که در 819, 657, 507, 361 و 188 m/z قابل تشخیص است و موید این است که یون های قطعه از هولوترینوزید با کاتیون سدیم گرفته می شوند. به علاوه، (6.1303 m/z)، یون پیش ساز به طور متوالی (4.803.4 m/z Glc, 5.965.5 m/z Glc, 5.1127.5 m/z MeGlc, 2.657.2 m/z Qui و Xyl (2.507.2 m/z) را از دست داد. پیک مشخص مشاهده شده در 507.2 تولید شده با MS متوالی به صورت بقایای MeGlc-Glc-Qui یا بقایای اگلیکون سدیم دار شناسایی شد. یون M.Z 803 ناشی از کاهش اگلیکون از یون مادر 1303.6 می باشد که یون قطعه متناظر با زنجیره ساکارید کامل بود و متعاقبا (شکل 3 ب) تولید یون هایی در 657 m.z و یون در 507 m.z با کاهش بقایای Qui و xyl کرد. به علاوه یون های 507 به یون هایی با مقدار یکسان 361 و 199 یا 195 m.z قطعه بندی شد. مشاهده یون ها در 507 و 657 m.z موید نتیجه فوق است. یون های شناسایی شده در 1285.5 و 1241.6 m.z به ترتیب متناظر با کاهش آب، آب+ دی اکسید کربن بود. این دو قطعه با کاهش متوالی آب و دی اکسید کربن همراه بود. از این روی بدیهی است که پیکر بندی های همه قند ها در همه گلوکوزید های تری ترین خیار دریایی موسوم به پیکر بندی های-D است. یک تحلیل مشابه (شکل 3 پ) بر روی یون در 6.1303 m.z از جزء 12 انجام شد. همان طور که می توان در شکل دید، این طیف دارای یک الگوی قطعه بندی متفاوت در مقایسه با طیف ها در شکل 3 الف و ب می باشد و این در حالی است که آن ها دارای مقدار m/z یکسانی هستند. در یکی از ایزومر ها، کاهش متوالی اگلیکون، Glc, Xyl, Glc و MeGlc تولید سیگنال هایی کرد که در 835.2, 673.2, 523.1, 361.1 و 185 به ترتیب شناسایی شده و این موید ساختار یکی از ترکیبات ایزومری (شکل 3 پ و 5) می باشد. تحلیل کامل را می توان در شکل 2 مشاهده کرد (جزء 12).

به علاوه، کلیواژ یون C2 در 673, 629, 601, 541 و 523 m/z (شکل 3 پ) منجر به ایجاد یک یون در 613, 583, 569, 541, 532 و 481 m/z شد و این از طریق از دست دادن (60 Da) C2H4O2

انجام شد که نشان دهنده یک پیوند گلیکوزیدی 1-4 در زنجیره الفا بوده و با مطالعات قبلی همخوانی دارد (100). این مشاهده مطابق با قواعد قطعه بندی برای یون های دی ساکارید های با پیوند 1-4 است.

طیف های MS/MS حضور سه ساختار آگلیکون متفاوت یعنی یون های شناسایی شده در 835.2، 819.2 و 803.4 با کاهش قطب های آگلیکون را نشان می دهد. این تحلیل حاکی از حضور حداقل شش ایزومر متفاوت با قطب های قند و آگلیکون ها می باشد زیرا طیف های MS/MS تولید هر دو قطعه تشخیصی را در 507 و 523 m/z می کند. این ایزومر ها متشکل از پنج مونوساکارید از جمله -Glc-Qui (Glc)-MeGlc Xyl-MeGlc (Glc or Qui) می باشند. ساختار های پیشنهادی در شکل 5 نشان داده شده اند و مرتبط با Holothurinoside A و Holothurinoside A1 و چهار ساپونین جدید است (5-69-88). ما این مولکول ها را به ترتیب Holothurinosides S, Q, R R1 می نامیم.

لازم به ذکر است که هر دو یون قطعه اصلی (507 و 523) با ترکیبات گلیکوزید جزیبی یا قطب های آگلیکون متناظر می باشند که این موید حضور ساپونین های ایزومریک است. یون قطعه غالب در 507 m/z ناشی از یون ترکیب سدیم [MeGlc-Glc-Qui + Na] می باشد. به طور مشابه، یون قطعه فراوان در 523 ناشی از یون ترکیب سدیم زنجیره جانبی [MeGlc-Glc-Glc + Na]+ آگلیکون می باشد. چون جرم آگلیکون ها مشابه با بقایای قند آلی یعنی [MeGlc-Glc-Qui + Na]+ و [MeGlc-Glc-Glc + Na]+ است، یون ها در 507.2 و 532.3 به ترتیب متناظر با هر دو بقایای قند و آگلیکون ها می باشد. وقتی که تجزیه یون مادر با کاهش بقایای قندی تحریک می شود، یون ها در 507.2 و 532.2 m/z متناظر با قطب های آگلیکون است. هم چنین، قطعه بندی یون مادر با کاهش پنج باقی مانده قندی انجام می شود که متناظر با قطب های آگلیکون می باشد. نتایج مشابه با وان دیک و همکاران (2009) برای گلیکوزید های تری ترین آرایه شده است. کاهش آب و دی اکسید کربن یا نتایج ترکیب آن ها از کلیواژ در شکست پیوند های گلیکوزیدی توسط والر و یاماسکی (3) آرایه شده است.

اجزای مختلف تفکیک HPCPC برای نشان دادن حضور یک گلیکون، حضور دو آگلیکون متفاوت (شکل 3 ب) و حضور سه آگلیکون متفاوت (شکل 3 پ) مقایسه شد و این نشان می دهد که HPCPC امکان تفکیک ایزومر ها را می دهد.

یک مقایسه طیف های MS/MS 1303.6 و 1243.5 (شکل 3 و 12) نشان می دهد که قطعه 523 M/Z (از دست رفت آگلیکون) از یون های $[M + Na]^+$ تنها با 1303.6 مشاهده شد که با حضور یک واحد آگلیکون جدید در m/z 500 متناظر است. الگوهای فردی از ساپونین های سولفات و غیر سولفات در Holothurinoside A و Holothurin A به صورت نمونه های معرف ، شناسایی شدند.

دیگر تشریح ساختار شیمیایی ساپونین های ایزومریک با MS متوالی در شکل 6 نشان داده شده است. این طیف علائم یونی نمونه را تحت MS متوالی از یون شناسایی شده در m/z 1287.6 نشان می دهد. تحلیل MS متوالی حضور دو آگلیکون متفاوت را با مقادیر 484 و 468 نشان داد که موید حضور ساختار های ایزومریک شیمیایی است. رفتار قطعه بندی مشابه از طیف های مثبت ساپونین با M/Z 1303 مشاهده شده است. ساختار های آگلیکون مشابه با ساختار های گزارش شده برای یون در m.z 1303 است. مسیر های قطعه بندی احتمالی با استفاده از فلش های ممتد و خط چین نشان داده شده است. کاهش قطب های آگلیکون تولید یون هایی در 819.3 و 803.4 m/z کرد که متناظر با اجزای کامل قند است. کاهش متوالی آگلیکون MeGlc و Glc or MeGlc, Xyl, Qui تولید قطعه در 819, 657, 643, 507, 361 و 185 m/z می کند.

تجزیه یون مادر نیز با از دست رفت قطب قند یعنی MeGlc, Glc, Qui, Qui or Glc و Xyl تحریک شد که پس از آن آگلیکون قرار داشت و این تولید یون های دختر در 1111.5, 949.5, 803.4, 657.2 یا 643.2 و 507.2 کرد. بدیهی است که یون در m/z 507، فراوان ترین یون قطعه بوده و یکی از علائم آگلیکون سدیم دار و اجزای قند کلیدی است. کاهش اب و دی اکسید کربن از طیف مشاهده شده است و برخی از پیک ها به مولکول ها تخصیص داده می شوند.

این تحلیل، حضور حداقل پنج ایزومر متفاوت را با اگلیکون های مختلف و قطب های قند نشان داد. این ایزومر ها دارای ساختار های اگلیکون مشابه با ساختار های شناسایی شده در یون در 1303 است (شکل 5). این ایزومر ها موسوم به ساپونین های پنتا گلیکوزیدی هستند. ساختار های پیشنهادی در شکل 7 نشان داده شده است که متناظر با Holothurinoside E1, Holothurinoside E, 17-dehydroxy- holothurinoside A و دو ساپونین جدید یعنی اولین و چهارمین ترکیب است. ما پیشنهاد می کنیم که نام این مولکول ها به ترتیب Holothurinosides O-P باشد.

داده ها نشان می دهند که قند اولین بار در کلیواژ پیوند گلیکوزیدی از بین می رود. چون Holothurinosides A - E حاوی واحد های قند یکسان در باقی مانده قند خود می باشند، آن ها تولید یون هایی با مقدار m/z 507 می کند.

3- بخش آزمایشی

3-1 نمونه خیار دریایی

بیست نمونه خیار دریایی از *Holothuria lesson* (ماسین و همکاران 2009) موسوم به ماسه ماهی طلایی از جزیره لیزارد (عرض $14^{\circ} 41'29.46''$ S و طول $145^{\circ} 26'23.33''$ E) کوپزلند استرالیا در سپتامبر 2010 جمع اوری شدند. اندام های درونی از دیواره بدن تفکیک شده و در کیسه های پلاستیکی زیپ دار نگه داری شدند سپس منجمد شده و سپس به آزمایشگاه انتقال داده شده و در دمای -20 درجه باقی ماند.

3-2 پروتکل عصاره گیری

بقایا و ذرات شن از اندام های درونی به طور دستی پاک سازی شده و احشاء انجماد خشک شد (VirTis BenchTop K, New York, NY, USA). نمونه های خشک با استفاده از نیتروژن مایع و هاون آسیاب شد.

همه محلول ها با آب زلال تولید شده توسط سیستم های Milli-Q (18.2 مگا اهم، میلی پور، بدفورد، MA، USA)) تولید شدند. همه حلال های آلی از مرک به جز زمانی که عرضه کننده ذکر کرده بود خریداری شد و دارای گرید HPLC یا بالاترین درجه خلوص بود.

عصاره گیری ساپونین ها

روش های عصاره گیری و تخلیص از مطالعه کامپانگلو و همکاران(34)، وان دیک و همکاران(69)، گارنو و همکاران(102) و گراسیا و همکاران(103) اقتباس شد. نمونه احشای اسباب شده(40 گرم) چهار بار با اتانول 70 درصد به میزان 400 میلی لیتر عصاره گیری شده و سپس با کاغذ صافی واتمن در دمای اتاق فیلتر شد. عصاره تحت فشار پایین در 30 درجه با استفاده از اواپراتور دوار تغلیظ شد(باکی AG، فلاویل سوییس) تا اتانول کاملاً خارج شود و سپس نمونه باقی مانده برای حذف آب انجماد خشک شد (BenchTop K, New VirTis, York, NY, USA). بقایای خشک شده به طور متوالی با استفاده از روش تقسیم بندی جز به جز کوپجان اصلاح شده عصاره گیری شد(104): عصاره خشک در 90 درصد متانول محلول انحلال یافته و با 400 میلی لیتر n-هگزان دو بار تفکیک شد. مقدار آب فاز هیدرو متانولیک به 20 درصد حجمی تعدیل شده و سپس به 40 درصد تعدیل شد و محلول ها با CH_2Cl_2 (450 mL) و CHCl_3 (350 mL) تفکیک شدند. در مرحله بعدی، فاز هیدرومتانولیک با استفاده از یک اواپراتور دوار و خشک کن انجمادی تغلیظ شد. پودر خشک در 10 میلی لیتر آب MilliQ (عصاره محلول) تحت تخلیص کروماتوگرافی محلول شد.

3-3 تخلیص عصاره

محلول عصاره آبی تحت کروماتوگرافی ستون $\text{Amberlite}^{\circledR}$ XAD-4 (250 گرم XAD-4 رزین 20-69 مش، Sigma-Aldrich, MO, USA، ستون 4×30 سانتی متر) قرار گرفت. پس از شست و شوی ستون با یک لیتر آب، ساپونین ها به طور متوالی با MeOH (450 mL) و استون (350 mL) و آب (250 mL) رقیق سازی شد. محلول حاصل از رقیق سازی متانولیک، استون و اجزای آب، در 5 میلی لیتر آب عصاره تغلیظ شده، خشک شده و انحلال یافتند. در نهایت، عصاره آبی با 5 میلی لیتر ایزوبوتانول تقسیم شد. بخش غنی سازی شده با ساپونین ایزوبوتانیل با 5 میلی لیتر ایزوبوتانول تفکیک شد. بخش غنی سازی شده با

سایونین ایزوبوتانولیک برای تحلیل های طیف سنجی جرمی ذخیره شده و اجزای عصاره توسط HPCPC و RP-HPLC بررسی شد. پروفایل اجزا نیز با کراماتوگرافی لایه نازک با استفاده از سیستم حلال فاز پایین $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:13:8 v/v/v) پایش شد.

3-4 کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

نمونه ها در 90 درصد یا 50 درصد MeOH حل شده و 10 میکرو لیتر به ژل سیلیسم 60 و ورقه های الومینیوم F254 (Merck #1.05554.0001) بار گذاری شده و با فاز پایین سیستم حلال دو فازی $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:13:8) توسعه یافت. پروفیل ترکیبات بر روی صفحه TLC با اشعه فرابنفش و اسپری 15 درصد اسید سولفوریک در محلول ETOH و حرارت دهی به مدت 15 دقیقه در 110 درجه تا زمان تشکیل نقاط ارغوانی تیره، تشکیل شد.

3-5 کروماتوگرافی جدایش گریز از مرکز با کارایی بالا HPCPC یا CPC

سیستم حلال حاوی $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}-0.1\% \text{HCO}_2\text{H}$ (7:13:8) با استفاده از کیف جدا کننده ترکیب شده و به تعادل هیدرواستاتیک رسید. پس از تفکیک دو سیستم حلال فازی ترکیب پذیر، هر دو فاز با استفاده از سونیکاتور- دیگاسر، گاز زدایی شدند. سپس ستون روتور CPC240, HPCPC™ (شرکت اور سیکو، توکیو ژاپن) با فاز ساکن مایع با سرعت پایین 5 میلی لیتر بر دقیقه با مدل دوئل دامپ 214 پر شد. CPC با فاز بالایی محلول سیستم محلول در حالت نزولی در سرعت جریان 5 میلی لیتر بر دقیقه با سرعت 300 دور در دقیقه بار گذاری شد. فاز متحرک پایین در حالت نزولی در سرعت جریان 1.2 میلی لیتر بر دقیقه با سرعت 900 دور بر دقیقه در طی 2 ساعت پمپ شد. یک صد و یست میلی گرم ترکیب سایونین غنی شده با ایزوبوتانول در 10 میلی لیتر فاز فوقانی و فاز پایینی در نسبت 1:1 حل شده و به ماشین از جهت سر به انتها تزریق شده و سپس به حالت تعادل رسید. این نشان داد که رقیق سازی فاز ساکن متوقف شده و فشار برگشتی ثابت بود. کروماتوگرام در 254 نانومتر به مدت 3 ساعت در 1.2 میلی لیتر بر دقیقه و 900 دور بر دقیقه با استفاده از شناساگر طول موج متغیر فرابنفش- مرئی توسعه یافت (راس ریکورد، مدل 202، شرکت توپاک). اجزا در 3 میلی لیتر در لوله ها با استفاده از کلکتور جمع اوری شد. رقیق سازی نمونه با فاز

آلی پایین برای حذف ترکیبات با قطبیت پایین از نمونه در 200 میلی لیتر انجام شد. در این نقطه (جزء 4) ، حالت رقیق سازی به حالت نزولی سویچ شده و فاز فوقانی محلول با سرعت جریان یکسان برای 3 ساعت پمپاژ شد. بازیابی ساپونین با تغییر حالت رقیق سازی به فاز محلول حاصل شد که امکان رقیق سازی ترکیبات باقی مانده را با قطبیت بالا در فاز ساکن می دهد. پیک های ضعیف نیز پایش شدند. اجزاء با TLC با استفاده از فاز پایین CHCl₃/MeOH/H₂O (7:13:8) تحلیل شدند. پایش اجزا لازم است زیرا بسیاری از ساپونین ها با اشعه فرابنفش به دلیل نبود یک ساختار کروموفور تشخیص داده نشد. اجزا با گاز نیتروژن تغلیظ شدند.

3-6 طیف سنج جرمی

اجزای غنی سازی شده با ساپونین ایزوبوتانول و نمونه های قطبی تخلیص شده با HPCPC با MALDI و S,ESI برای شناسایی ساختار های مولکولی ترکیبات تحلیل شدند.

3-6-1 MALDI-MS

تحلیل MALDI بر روی Bruker Autoflex III Smartbeam (برمن آلمان) انجام شد. همه تجهیزات MALDI-MS، نرم افزار و موارد مصرفی مربوط به براکر دالتونیک می باشد (برمن آلمان). لیزر (355 نانومتر) دارای سرعت تکرار 200 هرتز بوده و در حالت یون بازتاب مثبت برای داده های MS در طیف وزنی 400 تا 2200 دالتون تحت کنترل نرم افزار FlexControl و FlexAnalysis انجام شد. (برکر دالتونیک، برمن، آلمان). کالیبراسیون خارجی با استفاده از PEG انجام شد. طیف های MS در FlexAnalysis (نسخه 3.3، براکر دالتونیک، برمن، آلمان) انجام شد. طیف های MALDI MS/MS با استفاده از حالت Bruker LIFT Autoflex III با کمک CID نشان داده شدند. یون های ایزوله شده با استفاده از آرگون در سلول برای فعال سازی و قطعه بندی قرار گرفتند. برای MALDI، یک انرژی لیزری استفاده شد که سطوح سیگنال خوب را ارائه می کند به طوری که انرژی لیزری برای MS/MS 25 درصد بالاتر از تحلیل MS است.

نمونه ها بر روی یک پلیت هدف MPT AnchorChip TM 600/384 فولاد ضد زنگ MALDI قرار داده شد. اسید الف-سیانو-4- هیدروکسی سینامیک اسید در استون/ ایزو پروپانول در نسبت 2:1 به عنوان ماتریسی برای تولید یون های فاز گازی استفاده شد. محلول ماتریس 1 میکرو لیتر بر روی پلیت هدف

MALDI لکه گذاری شده و هوا خشک گردید. سپس 1 میکرو لیتر نمونه به بلور های مارتیسی افزوده شده و هوا خشک شد. در نهایت 1 میکرو لیتر محلول (Sigma-Aldrich #383112, St Louis, MO, NaI (USA)) 2 میلی گرم بر میلی لیتر استونیتریل به نقاط نمونه اعمال شد. نمونه ها بر روی سطح پروب ترکیب شده و قبل از تحلیل خشک شد.

ESI-MS 3-6-3

طیف های جرمی ESI با Waters Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) بدست آمدند. طیف های جرمی در حالت یون مثبت با ولتاژ موئینه 3 کیلوولت و ولتاژ مخروط نمونه برداری 100 ولت بدست آمد.

شرایط دیگر به شرح زیر بود: ولتاژ مخروط عصاره گیری 4 ولتف دمای منبع یون، 80 درجه، دمای انحلال 350 درجهف سرعت جریان گاز 500 لیتر بر ساعت . جمع اوری داده ها با استفاده از واترز ماسلینکس انجام شد. طیف های جرمی یون مثبت در حالت وضوح V در کل طیف 100-2000 m/z با استفاده از حالت پیوسته بدست آمدند. واسنجی جرمی با ترکیب محلول یودید سدیم (2 میکرو گرم بر میکرو لیتر 1:1 آب/ ایزوپروپانول) انجام شد. برای تحلیل جرمی دقیق یک سیگنال چرمی از یون مولکولی رافیتوز(527.1588 m/z) استفاده شد.

طیف های MS/MS با انتخاب توده ای یون مورد نظر با استفاده از یک چهار پایه، قطعه بندی در سلول هایی که در آن ها آرگون به عنوان گاز تصادم انتخاب شد بدست آمد. انرژی تصادم (برخورد) 50 ولت بود. نمونه ها در سرعت جریان پایین 5 میکرو لیتر بر دقیقه ترکیب شدند به خصوص اگر رقیق سازی نمونه نیاز بود، استونیتریل استفاده شد(100). ساختار های شیمیایی از طرح های قطعه بندی محاسبه شده بر روی طیف های چرمی متوالی و از منابع تعیین شد.

4- نتیجه گیری

این اولین مطالعه بر روی ساپونین های احشاء خیار های دریایی است. نتایج ما تا کنون موید این است که طیف وسیعی از ساپونین های جدید در احشاء در مقایسه با دیواره بدن خیار دریایی وجود دارد(داده ها نشان

داده نشده است) و این نشان می دهد که احشاء خیار دریایی منبع مهم این ترکیبات است. این اولین مقاله ای است که حضور ساپونین های جدید را در احشای خیار دریایی گزارش می کند و در عین حال برای اولین بار بیشترین تعداد همونوع های ساپونین شناسایی شده در احشای همه گونه های خیار دریایی را نشان داد. جرم ساپونین ها برای این گونه از 460 تا 1600 دالتون متغیر بود. ما تا کنون بیش از ده ساختار آگلیکون را در این گونه شناسایی کرده ایم. شواهد مربوط به MALDI-MS نشان می دهد که قوی ترین یون ساپونین $m.z$ 1243.5 می باشد که یک جزء اصلی مربوط به Holothurin A است. با این حال در طیف سنج جرمی متوالی، فراوان ترین یون ها ناشی از بین رفتن آگلیکون ها و هر دو قطب های قند تشخیصی کلیدی (507 و 523) است. نتایج ما هم چنین نشان می دهد که وقوع کلیواژ های حلقه ای در ترکیبات سولفات به بیش از گلیکوزید های غیر سولفات بود. و از این روی می توان این طور نتیجه گیری کرد که حضور یک گروه سولفات در قطب قند ساپونین موجب شده است تا آن ها به کلیواژ آسیب پذیر تر باشند.

در حال حاضر، MS یکی از حساس ترین روش های تحلیل مولکولی برای تعیین ساختار های ساپونین است. این روش شناسایی ساختار مولکولی با استفاده از الگوهای قطعه بندی بدست آمده از اندازه گیری MS/MS، امکان پیشنهاد و شناسایی ساختار ساپونین را می دهد. نتایج نشان داد که تحت CID، برخی از ساپونین های شناسایی شده دارای اثر انگشت یونی یکسانی برای واحد های آگلیکون خود بودند که تولید یون های دختر m/z یکسان می کنند. برخی از این ساپونین ها بر اساس اندازه گیری MS/MS شناسایی شدند زیرا طیف های CID حاوی سیگنال های تشخیص کلیدی در 507 و M/Z 523 بودند که متناظر با زنجیره های الیگو ساکارید [MeGlc-Glc-Glc + Na⁺] and [MeGlc-Glc-Qui + Na⁺] است. از دست رفت همزمان دو واحد قند بیانگر ویژگی های زنجیره قند یک شاخه ای است. این روش امکان تشریح ساختاری ایزومر ها را می دهد.

خیار های دریایی مکانیسم های دفاعی شیمیایی را در برابر برخی شکارچی ها بر اساس ترشحات ساپونین توسعه داده اند. نتایج ما نشان می دهد که احشای آن ها غنی از ساپونین هم از نظر کمیت و هم از نظر تنوع است و این که این ساپونین ها در احشا بیشتر از دیواره بدن قرار دارند.

روش های کرماتوگرافی مورد استفاده در این مطالعه برای اولین بار قادر به تفکیک ساپونین های با خلوص بالا از خیار دریایی بود که جاکی از تنوع بالای همנוعان ساپونین بوده و بر پروفیل منحصر به فرد ساپونین ها برای این نمونه تاکید دارند. MALDI و ESI-MS روش هایی پر بازده و حساس برای شناسایی این متابولیت های ثانویه در ترکیب کمپلکس هستند. از این روی طیف سنج جرمی ، یک روش مطلوب برای تحلیل ساپونین می باشد زیرا هر دو ESI-MS و MALDI-MS اطلاعات ساختاری چشمگیری را ارائه می کنند. با این حال، تفسیر داده های MALDI در مقایسه با داده های ESI-MS به دلیل یون های تک باره ساده تر است. این موجود قدیمی با سابقه تکاملی طولانی، یک منبع غنی ترکیبات با ارزش است.

این مقاله، ساختار هفت ترکیب جدید را توصیف کرد: O, Holothurinoside S and Holothurinoside P, Holothurinoside Q, Holothurinoside R, Holothurinoside R1, Holothurinoside T in addition to six known compounds, including Holothurinoside A1, Holothurinoside E, Holothurinoside E1 and 17-dehydroxy-Holothurin A, Holothurinoside A holothurinoside A در پایان لازم به ذکر است که یافته های این مطالعه نشان می دهد احشای خیار دریایی حاوی ساپونین های جدید و منحصر به فرد و متعدد با تنوع ساختاری بالا هم ساپونین های سولفات و هم غیر سولفات و نیز قطب های مختلف قند و آگلیکون می باشد. به علاوه میزان بالای تنوع زیستی ساختاری این دسته از متابولیت های طبیعی که آن ها را قادر می سازد تا تنوع عملکردی چشمگیری داشته باشند، یک منبع مهم برای کشف ترکیبات با ارزش برای کاربرد های زیست فناوری است.



این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی