



بررسی ساختار و فعالیت آنتی اکسیدانی کربوهیدرات خالص شده از ریشه گیاه *Amygdalus elaeagnifolia* Spach

مهدی مریدی فریمانی^۱، الهام احمدی جویباری^{۲*}

۱- دانشیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۲۸

کلمات کلیدی:

استخراج،

بادام،

خالص سازی،

خواص بیولوژیکی،

شناسایی

DOI: 10.22034/FSCT.22.166.180.

* مسئول مکاتبات:

e.ahmadi@gu.ac.ir

کربوهیدرات ها به دلیل کاربرد در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی دارای اهمیت هستند. ارتباط مستقیمی بین فیتوشیمی کربوهیدرات ها و چگونگی عملکرد و کاربرد آن ها در این صنایع وجود دارد. در ایران، تحقیقات کافی در زمینه بررسی کربوهیدرات های موجود در گونه های بومی و اندمیک کشور انجام نشده است. بدین منظور هدف از این پژوهش بررسی ساختار و خواص آنتی اکسیدانی کربوهیدرات گونه بومی *Amygdalus elaeagnifolia* Spach می باشد. ریشه این گیاه از استان فارس جمع آوری شد. در ابتدا ریشه ها تمیز و پیش استخراج با حلال اتانول صورت گرفت. استخراج اصلی با استفاده از آب داغ انجام گردید. جهت خالص سازی کربوهیدرات ها، مراحل مختلفی از جمله رسوب دهی کربوهیدرات با اتانول، حذف پروتئین ها با روش سواگ، به کارگیری جاذب تبادل یونی DEAE-Cellulose و در نهایت سفادکس G-100 استفاده شد. کربوهیدرات خالص شده AEC-1 نامگذاری گردید. گروه های عاملی موجود در AEC-1 با استفاده از طیف سنج فروسرخ (FT-IR) مطالعه شدند. مطالعات کمی و شناسایی نوع مونومرها به ترتیب با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به آشکارساز یونیزاسیون شعله (GC-FID) و طیف سنج جرمی (GC-MS) انجام شد. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی AEC-1 با استفاده از سه نوع رادیکال آزاد، ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازین (DPPH)، ۲،۲'-آزینو-بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-اسیدسولفونیک) (ABTS) و رادیکال هیدروکسیل سنجیده شد. درصد خلوص AEC-1 $94.08 \pm 0.76\%$ بدست آمد. بررسی گروه های عاملی با استفاده از FT-IR نمایانگر آن است که این کربوهیدرات دارای گروه های اسیدی، کربن های آنومری آلفا و مونوساکاریدهای پیرانوزی می باشد. بررسی کروماتوگرام های GC-FID و GC-MS نشان داد که AEC-1 دارای مونوساکاریدهای آرابینوز، گالاکتوز، مانوز، گلوکز، فروکتوز و گلوکرونیک اسید به ترتیب با درصدهای ۳۱/۵۲٪، ۲۶/۱۰٪، ۱۹/۰۰٪، ۱۶/۱۷٪، ۴/۶۳٪ و ۲/۵۶٪ است. بررسی های حاصل از عملکرد آنتی اکسیدانی این کربوهیدرات در مقابل رادیکال های DPPH، ABTS و OH نشان می دهد که با افزایش میزان غلظت AEC-1 فعالیت مهار کنندگی این کربوهیدرات افزایش می یابد. بر اساس نتایج، کربوهیدرات خالص شده یک هتروپلی ساکراید اسیدی با فعالیت آنتی اکسیدانی نسبتاً قابل قبول است.

۱-مقدمه

کربوهیدرات‌های گیاهی، ترکیبات با ارزشی هستند که در سال‌های اخیر به دلیل کاربردهای مختلف در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی و همچنین به علت خواص زیستی گسترده، مانند ضد سرطان، ضد پیری، ضد چاقی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و تقویت‌کننده سیستم ایمنی مورد توجه فراوان قرار گرفته‌اند. این ترکیبات شامل مونوساکاریدها، الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدهای مختلفی هستند که از بخش‌های مختلف گیاهان قابل استخراج هستند [۱-۳].

پلی‌ساکاریدها و سایر کربوهیدرات‌های موجود در گیاهان به دلیل قطبیت بالا، قابلیت انحلال در آب را دارند. برای استخراج این دست از ترکیبات از روش‌های مختلفی چون استخراج با امواج مایکروویو، اولتراسونیک، اسید و باز و آنزیم‌ها استفاده می‌شود. علاوه بر آن، استخراج با آب داغ نیز یکی از روش‌های اصلی و متداول در این زمینه محسوب می‌شود [۲-۳]. روش سنتی استخراج با آب داغ و رسوب‌دهی با الک، به دلیل سادگی و بهره‌وری بالا، معمولاً انتخاب اول محققان بوده است [۴]. در این روش، مولکول‌های درشت مانند پلی‌ساکاریدها به دلیل نامحلول بودن در الک رسوب کرده و در نهایت از طریق جداسازی فیزیکی قابل استخراج هستند. فرایند خالص‌سازی کربوهیدرات‌ها با استفاده از روش‌های مختلفی چون پیش استخراج با حلال‌های آلی، حذف پروتئین و نوکلئیک اسید با استفاده از روش سواگ، رسوب‌دهی با اتانول، استفاده از رزین‌های آنیونی و سفادکس‌ها انجام‌پذیر است [۵]. این ترکیبات بعد از خالص‌سازی به وسیله روش‌های اسپکتروسکوپی و کروماتوگرافی شناسایی و ارزیابی می‌شوند [۶].

جنس *Amygdalus* از تیره گل‌سرخیان (Rosaceae) شامل گونه‌های مختلفی از درختان و درختچه است. بیش از ۳۰ گونه از این جنس قابلیت رشد در نواحی مختلف آسیای مرکزی دارد. در ایران، تقریباً ۲۱ گونه از این جنس رشد می‌کند. این گونه‌ها از نظر زیست‌محیطی و اقتصادی دارای اهمیت ویژه‌ای بوده و به دلیل مقاومت به شرایط خشک، در عرصه‌های طبیعی و اکوسیستم‌های کوهستانی ارزشمند هستند [۷]. در طب سنتی، گیاهان جنس *Amygdalus* به طرق مختلف برای تسکین دردهای اسکلتی، عضلانی، مفاصل، دفع اخلاط چسبیده به دیواره دستگاه گوارشی و تسکین سردردهای سرد مزاجی استفاده می‌شوند [۸-۹].

عصاره الکلی استخراج شده از گونه *Prunus amygdalus* var. *amara* فعالیت ضد سرطانی بر روی سلول‌های U937، APL، NB4، Huh-7، A-549، SKOV-3، PC-3، T-24 و Hep-2 را نشان داده است [۱۰]. کربوهیدرات خالص شده از صمغ گونه *Prunus amygdalus* که دارای گالاکتوز، آرابینوز، زایلوز، مانوز، رامنوز و گلوکرونیک اسید با نسبت ۴۵، ۲۶، ۱۰، ۷، ۱۱ است، فعالیت آنتی باکتریال بر روی باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Enterococcus faecalis* و *Pseudomonas aeruginosa* را نشان داده است. به علاوه، این کربوهیدرات در برابر رادیکال‌های DPPH^۱، مقدار^۲ IC₅₀ معادل ۶/۶ mg/ml است [۱۱].

در تحقیق دیگری، کربوهیدرات‌های گونه *Amygdalus persica* L. که دارای رامنوز، آرابینوز، مانوز و گلوکوز با نسبت مولی ۰/۱۷، ۰/۳۴، ۱ و ۰/۱۷ است، رادیکال‌های DPPH^۳ و سوپراکساید را به ترتیب به میزان ۴۰۰ μg/ml (درصد مهار ۰/۱۲ ± ۸۵/۴۵)، ۶۰ μg/ml (درصد مهار ۰/۶۶ ± ۹۹/۹۶) و ۸۰ μg/ml (درصد مهار ۰/۵۹ ±

3-2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

1-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

2 -Half-maximal inhibitory concentration

با توجه به اهمیت بررسی فیتوشیمیایی گونه‌های بومی و اندمیک ایران، هدف از انجام این پروژه استخراج، خالص سازی و شناسایی یکی از کربوهیدرات‌های موجود در این گونه است. استخراج با استفاده از آب داغ، خالص سازی با روش‌هایی چون پیش استخراج حلالی، روش سواگ و رزین تبادل یونی انجام شد و نهایتاً کربوهیدرات خالص شده با استفاده از دستگاه‌های طیف‌سنج فروسرخ ($FT-IR^4$)، کروماتوگرافی گازی متصل به آشکارساز یونیزاسیون شعله ($GC-FID^5$) و کروماتوگرافی گازی متصل به آشکارساز طیف‌سنج جرمی ($GC-MS^6$) شناسایی گردید. همچنین جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی کربوهیدرات بدست آمده، از رادیکال‌های DPPH، ABTS و OH استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد گیاهی

ریشه گونه *Amygdalus elaeagnifolia* Spach در خرداد ماه سال ۱۳۹۸ توسط دکتر مجتبی اسداللهی (گیاه‌شناس) از حوالی روستای برشنه از توابع شهرستان سپیدان در استان فارس ($30^\circ 17' N$, $51^\circ 55' E$) و در ارتفاع ۲۴۷۸ متری جمع‌آوری و شناسایی گردید. نمونه هرباریومی گونه با کد MPH-3219 در هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی ثبت گردید.

۲-۲ مواد و مواد شیمیایی

$DEAE-Cellulose A52^7$ و سفادکس G-100 از شرکت فارماسیا^۸ تهیه شدند. مونوساکاریدهای (ال-آرابینوز، دی-گالاکتوز، دی-فروکتوز، دی-مانوز، دی-گلوکز، ال-رامنوز، و دی-زیلوز) از شرکت بایو بیسیک کانادا^۹ خریداری گردید. DPPH، متوکسی آمین هیدروکلراید و ABTS از شرکت

مهار کرده است. فعالیت آنتی اکسیدانی این کربوهیدرات در مقابل رادیکال‌های OH، از غلظت $\mu g/ml$ ۱۰ (درصد مهار 0.42 ± 0.64) به $\mu g/ml$ ۵۰ (درصد مهار 0.98 ± 0.89) به طور قابل توجهی افزایش یافت. علاوه بر آن، در بازه غلظتی $\mu g/ml$ ۱۰ تا $\mu g/ml$ ۱۲۵ عملکرد بهتری نسبت به ویتامین C داشت [۲]. در پژوهش دیگری، کربوهیدرات خالص شده از صمغ گونه *Amygdalus scoparia* Spach دارای آرابینوز، رامنوز، مانوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکرونیک اسید، گالاکترونیک اسید، و گلوکوز با نسبت ۲۵/۳۲، ۹/۰۱، ۱۱/۵۴، ۱۰/۸۲، ۲۲/۰۴، ۳/۸۵، ۵/۸۸ و ۵/۱۶ گزله شده است [۱۲]. همچنین کربوهیدرات خالص شده از پوسته *Prunus amygdalus* دارای گالاکتوز، آرابینوز، مانوز و زایلوز با نسبت حدودی ۶۱/۴، ۳۲/۲، ۲/۹ و ۲/۶۸ است که رادیکال‌های DPPH و ABTS را به ترتیب به میزان mg/ml ۱/۲۵ (درصد مهار 0.23 ± 0.61) و mg/ml ۱/۲۵ (درصد مهار 0.11 ± 0.44) مهار کرده است [۱۳].

گونه *Amygdalus elaeagnifolia* که با عنوان ارژن و بادام کرمانی شناخته می‌شود، یکی از گیاهان بومی ایران است که در استان‌های کرمان، فارس، کهگیلویه بویراحمد، چهارمحال بختیاری، لرستان و اراک رشد می‌کند. این گونه به شکل درختچه یا درختی کوچک است که در طب سنتی جهت درمان عوارض پوستی ناشی از رادیوتراپی و کاهش استرس استفاده می‌شود [۷ و ۱۴]. اطلاعات فیتوشیمیایی کمی از این گونه موجود است. ایرانمنش و همکاران در سال ۲۰۱۷ اسانس میوه این گونه را مورد ارزیابی قرار داده و اسیدهای چرب میریستیک، پالمیتیک، پالمیتولیک، استئاریک، اولئیک، لینولئیک، لینولنیک، آراشیدیک، گادولئیک و بهنیک را در آن یافتند [۱۵]. بررسی‌های انجام شده نشان داد تا به حال کربوهیدرات‌های این گونه مورد بررسی قرار نگرفته است.

7 -Diethylaminoethyl cellulose

8 -Pharmacia

9-Bio Basic Canada

4- Fourier transform infrared spectroscopy

5 -Gas Chromatography Flame Ionization Detector

6 -Gas chromatography-mass spectrometry

محلول جمع‌آوری و با استفاده از روش فنل-سولفوریک اسید در ۴۹۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. نمونه نهایی با استفاده از ستون سفادکس G-100 ($1/6 \times 70$ سانتی متر) و با آب مقطر شست و شو و محلول‌های بدست آمده، با هم مخلوط، خشک و با نام AEC-1 با مقدار ۶۵ میلی گرم جمع‌آوری گردید.

۲-۴ آنالیز FT-IR و طیف سنج مرئی-فرابنفش (UV-Vis)¹³

اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل UV-2501PC (شیمادزو^{۱۴})، ژاپن) برای اطمینان از خالص شدن نمونه و عدم وجود اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها به ترتیب در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت [۱۶]. جهت تشخیص گروه‌های عاملی از FT-IR مدل تنسور ۱۵۲۷ (بروکر^{۱۵}) ایالات متحده آمریکا) در محدوده فرکانس cm^{-1} ۴۰۰-۴۰۰۰ استفاده شد [۱۷].

۲-۵ تعیین نوع و مقدار مونوساکاریدها

مقدار کربوهیدرات AEC-1 به عنوان قند غیراحیایی، از تفاوت بین قند کل و قند احیایی بدست آمد [۱۸]. جهت اندازه‌گیری محتوای قند کل از روش فنل-سولفوریک اسید استفاده شد و همچنین مقدار قند احیایی نیز با روش DNS¹⁷ در طول موج ۵۷۵ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت [۱۹].

خلوص AEC-1 با فرمول زیر قابل محاسبه است:

$$100 \times (\text{مقدار نمونه AEC-1} / \text{مقدار قند غیر احیا}) = \text{درصد خلوص}$$

سیگما^{۱۰} خریداری شد. تری متیل کلروسیلان، Bis-O,N (تری متیل سیلیل) تری فلورواستامید، تری فلورواستیک اسید، آهن(II) سولفات، سالیسیلیک اسید، پراکسید هیدروژن، پتاسیم پر سولفات و پیریدین از شرکت مرک^{۱۱} تهیه شد. کلروفرم، اسید هیدروکلریک (۳۷٪) و n-بوتانول از شرکت کارلواربا^{۱۲} خریداری شد.

۲-۳ جداسازی کربوهیدرات A. elaeagnifolia

ریشه‌های A. elaeagnifolia پس از جمع‌آوری، خشک و تمیز شده و ۱۰۰ گرم از آن به اندازه‌های کوچک خرد گردیدند. ریشه‌ها به مدت ۱ ساعت در ۱۰۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد تحت رفلکس قرار گرفته و پس از آن مایع رویی دور ریخته شد (تکرار این فرآیند سه مرتبه). ریشه‌ها جهت استخراج نهایی در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند (تکرار این فرآیند سه مرتبه). عصاره‌ها با هم مخلوط و پس از عبور از فیلتر تغلیظ گشتند. حدود ۳ برابر حجم عصاره آبی، به نمونه اتانول ۹۶ درصد اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت رسوب‌دهی قرار داده شد. پس از جداسازی رسوبات، پروتئین‌زدایی با استفاده از روش سواگ (نسبت n-بوتانول به کلروفرم ۱ به ۴) انجام گردید. مایع رویی جدا شده با فریز درایر خشک و کربوهیدرات خام (AEC) با مقدار ۲/۱ گرم بدست آمد.

۲ گرم از AEC در آب دیونیزه حل شده (در هر مرحله حدود ۰/۲ گرم در ۱۰ میلی لیتر آب حل گردید) و به دفعات بر روی ستون DEAE-52 سلولز ($2/6 \times 30$ سانتی متر) بارگذاری شد. ستون به صورت مرحله‌ای با محلول‌های ۰، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۳۵ مولار NaCl با سرعت جریان ۲/۵ میلی لیتر در دقیقه شسته شد. در هر ویال ۴ میلی لیتر از

14-Shimadzu

15 -Tensor 27

16 -Bruker

17- 3,5-Dinitrosalicylic acid

10 -Sigma

11- Merck

12- Calro Erba

13 -Ultraviolet-visible

فعالیت آنتی اکسیدانی AEC-1 با استفاده از روش Blois همراه با برخی اصلاحات انجام شد [۲۰]. به طور خلاصه، AEC-1 در آب مقطر با غلظت‌های مختلف از ۰ (کنترل) تا ۱۰ mg/mL حل گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از DPPH تازه تهیه شده (با غلظت ۰.۰۷۸۸ mg/mL در متانول) به ۵۰ میکرولیتر از محلول اضافه شد. پس از تکان دادن، محلول نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دما و شرایط تاریک نگهداری و سپس جذب محلول نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت اندازه‌گیری گردید [۲۱]. فعالیت جذب رادیکال DPPH به صورت زیر قابل محاسبه است [۲۲]:

$$DPPH \text{ محاسبه } = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

در این فرمول A_c جذب نمونه کنترل و A_s جذب نمونه AEC-1 است.

۲-۶-۲ مهار رادیکال ABTS

فعالیت آنتی اکسیدانی AEC-1 با استفاده از روش‌های گزارش شده قبلی همراه با تغییرات جزئی انجام شد [۲۳-۲۵]. به طور خلاصه، حجم‌های برابری از ۷ میلی مولار ABTS و ۲/۴۵ میلی مولار پتاسیم پرسولفات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و محیط تاریک به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. سپس محلول بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با pH ۷/۴ به محلول ABTS اضافه و تا جذب نهایی ± 0.02 در ۷/۳۴ نانومتر رقیق شد. ۲۹۰ میکرولیتر از محلول ABTS با ۱۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نهایتاً جذب در ۷۳۴ نانومتر همراه با اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فعالیت جذب رادیکال ABTS

برای تعیین نوع و مقدار مونوساکاریدهای موجود در AEC-1، ۵ میلی گرم از نمونه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه با TFA^{18} هیدرولیز شد. سپس با ۵۰ میکرولیتر متوکسی آمین هیدروکلرید در دمای ۸۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه تیمار گشت. در نهایت ۴۹/۵ میکرولیتر $BSTFA^{19}$ همراه با ۱ میکرولیتر تری متیل کلروسیلان به نمونه اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه حرارت داده شد. درصد مونوساکاریدهای مشتق‌شده با استفاده از دستگاه GC-FID مدل ترمو فیشر ساینتیفیک^{۲۰} (آمریکا) و ستون DB5 ($60m \times 0.25 \text{ mm ID} \times 0.25 \mu m$) بدست آمد. در این دستگاه ابتدا به مدت ۵ دقیقه دمای آون در $280^\circ C$ قرار گرفته و سپس با سرعت $5^\circ C/min$ به دمای $280^\circ C$ رسیده و به مدت ۱۱ دقیقه در این دما ثابت ماند. نیتروژن نیز به عنوان گاز حامل با جریان ۱/۱ mL/min استفاده شد. میزان دمای آشکارساز و محل تزریق در این دستگاه به ترتیب $280^\circ C$ و $250^\circ C$ تنظیم شدند. جهت تعیین نوع مونوساکاریدها از GC-MS مدل ترموکوئست فاینیگان تریس^{۲۱} و با برنامه ریزی دمایی مطابق با GC-FID مورد استفاده قرار گرفت. در GC-MS هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت ۱/۱ mL/min جریان داشت. همچنین استانداردهای ال آرآبینوز، دی گالاکتوز، دی فروکتوز، دی مانوز، دی گلوکز، ال رامنوز و دی زایلوز مطابق با متد اعلام شده تحت آنالیز کروماتوگرافی گازی قرار گرفتند. نوع مونوساکاریدهای موجود در AEC-1 از طریق تجزیه و تحلیل داده‌های استاندارد، بررسی طیف‌های جرمی، اطلاعات موجود در پایگاه داده GMD²² و هم چنین داده‌های مقالات تعیین شد [۱۸].

۲-۶-۲ بررسی فعالیت‌های آنتی اکسیدانی

۱-۶-۲ مهار رادیکال DPPH

21 -Thermoquest-Finnigan Trace

22 -Golm Metabolome Database

18 -Trifluoroacetic acid

19 -N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide

20 -Thermo Fisher Scientific

۷-۲ تجزیه و تحلیل آماری

تمام داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس ($ANOVA^{23}$) یک طرفه در محیط Microsoft Excel ۲۰۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳-نتایج

۱-۳ جداسازی و خالص‌سازی AEC-1

کربوهیدرات خام موجود در ریشه *A. elaeagnifolia* با استفاده از آب گرم استخراج و با اتانول ۹۶٪ رسوب داده شد. پس از جداسازی رسوبات و خشک کردن آن‌ها، پروتئین‌ها با روش سواگ حذف شدند. راندمان کربوهیدرات خام ۲/۱٪ بود. جهت خالص‌سازی بیشتر از ستون DEAE-A52 (شکل ۱-۱) استفاده و فرکشن‌های شماره ۱۸ تا ۳۶ که حاوی یک بخش کربوهیدراتی بودند، جمع‌آوری و با هم مخلوط گردیدند. نمونه نهایی به ستون سفادکس G-100 (شکل ۱-۲) تزریق و فرکشن ۴۸ تا ۶۵ جمع‌آوری شد. در نهایت AEC-1 با راندمان حدود ۳ درصد بدست آمد.

با استفاده از همان معادله‌ای که برای رادیکال DPPH بکار رفته، محاسبه گردید.

۳-۶-۲ مهار رادیکال‌های OH

جهت بررسی عملکرد AEC-1 در مهار رادیکال‌های هیدروکسیل، ۱ میلی‌لیتر از نمونه کربوهیدراتی (با غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۳، ۵/۵، ۷، ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، ۱ میلی‌لیتر آهن (II) سولفات با غلظت (۶ میلی‌مولار) و ۱ میلی‌لیتر اسید سالیسیلیک اتانول (با غلظت ۶ میلی‌مولار) در یک لوله آزمایش هم زده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه استراحت داده شد. در نهایت ۱ میلی‌لیتر هیدروژن پراکسید (با غلظت ۲/۴ میلی‌مولار) به محلول اضافه و مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در مکانی تاریک انکوبه گردید. جذب نمونه در ۵۱۰ نانومتر همراه با ویتامین C به عنوان کنترل مثبت اندازه‌گیری شد [۲۶]. فعالیت جذب رادیکال هیدروکسیل با استفاده از معادله زیر قابل شرح است:

$$\text{درصد مهار رادیکال} = 1 - (A_2 - A_1) / A_0 \times 100$$

در این فرمول A_2 جذب محلول‌های نمونه با غلظت‌های مختلف، A_1 جذب محلول بدون اسید سالیسیلیک اتانول و A_0 مقدار جذب محلول بدون نمونه‌ها است.

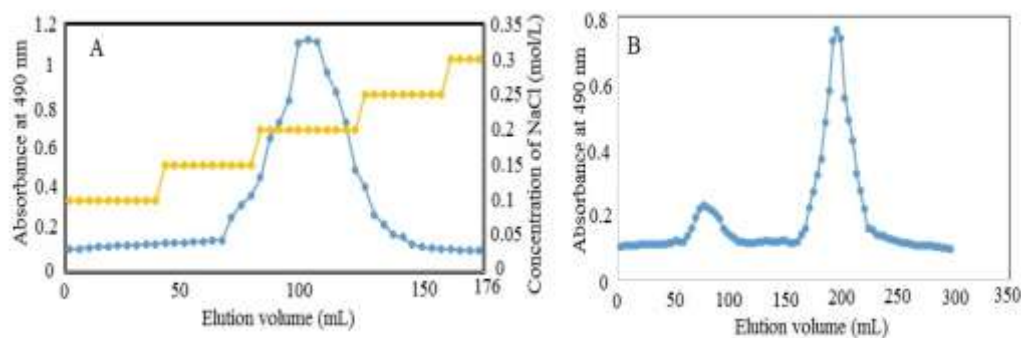


Fig 1. (A) Elution profile of the collected fractions from DEAE-A52-cellulose column (B) Elution profile of the collected fractions from Sephadex G-100

در طیف UV-Vis هیچ پیکی در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر دیده نشد (شکل ۲-۲) در نتیجه در نمونه AEC-

۲-۳ آنالیز طیف‌های UV-Vis و FT-IR

ارتعاشات گروه C-H و جذب در 1046 cm^{-1} و 1082 cm^{-1} نشانگر ارتعاشات گروه الکلی C-O است. در ناحیه زیر 1000 cm^{-1} جذب‌های 833 cm^{-1} و 781 cm^{-1} به ترتیب نشان دهنده کربن آنومری آلفا و حلقه‌های پیرانوزی هستند [۲۸].

1 نوکلئیک اسید و پروتئین وجود ندارد [۲۷]. با توجه به طیف FT-IR (شکل ۲- A) جذب در 3399 cm^{-1} و 2927 cm^{-1} (شکل ۲- B) و محدوده 1600 cm^{-1} و 1669 cm^{-1} به ترتیب ارتعاشات کششی گروه هیدروکسیل، ارتعاشات کششی گروه C-H و ارتعاشات کششی گروه COO^- را نشان داد [۱۶]. همچنین جذب در 1362 cm^{-1} و 1455 cm^{-1} نمایانگر

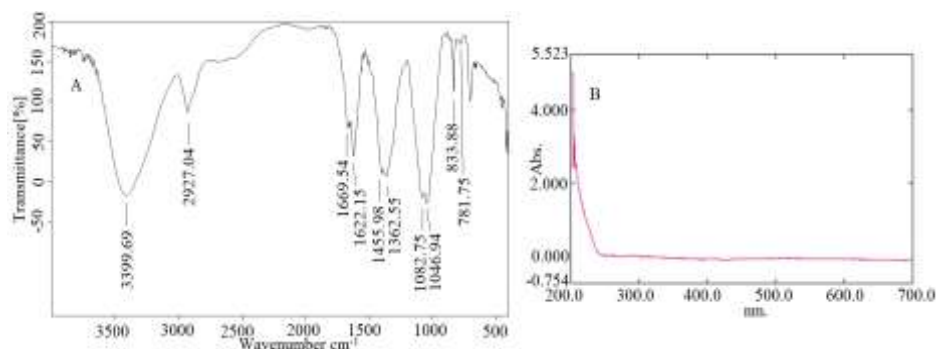


Fig 2. (A) FT-IR spectrum of AEC-1 (B) UV-Vis spectrum of AEC-1

۲۶/۱۰، ۱۹/۰۰، ۱۶/۱۷، ۴/۶۳ و ۲/۵۶ تعیین گردید (شکل ۳). گلوکرونیک اسید حدود ۲/۵ درصد ترکیب را تشکیل می‌دهد که نشان‌دهنده اسیدی بودن AEC-1 است. به علت متوکسیم شدن کربن آنومری حین مشتق‌سازی و امکان ایجاد دو حالت سین و آنتی برای آن، هر مونوساکارید در طیف می‌تواند دو پیک داشته باشد [۱۸]

۳-۴ تعیین نوع و درصد مونوساکاریدها

درصد خلوص AEC-1 با استفاده از روش فنل-سولفوریک اسید ارزیابی و مقدار آن $94/08 \pm 0.67$ درصد بدست آمد و هیچ قند احیایی با روش DNS شناسایی نشد. تعیین نوع و درصد مونوساکاریدها با استفاده از GC و GC-MS ارزیابی شد. بر این اساس، AEC-1 به عنوان یک هتروپلی ساکارید متشکل از آرابینوز، گالاکتوز، مانوز، گلوکز، فروکتوز و گلوکرونیک اسید به ترتیب با درصدهای حدودی ۳۱/۵۲،

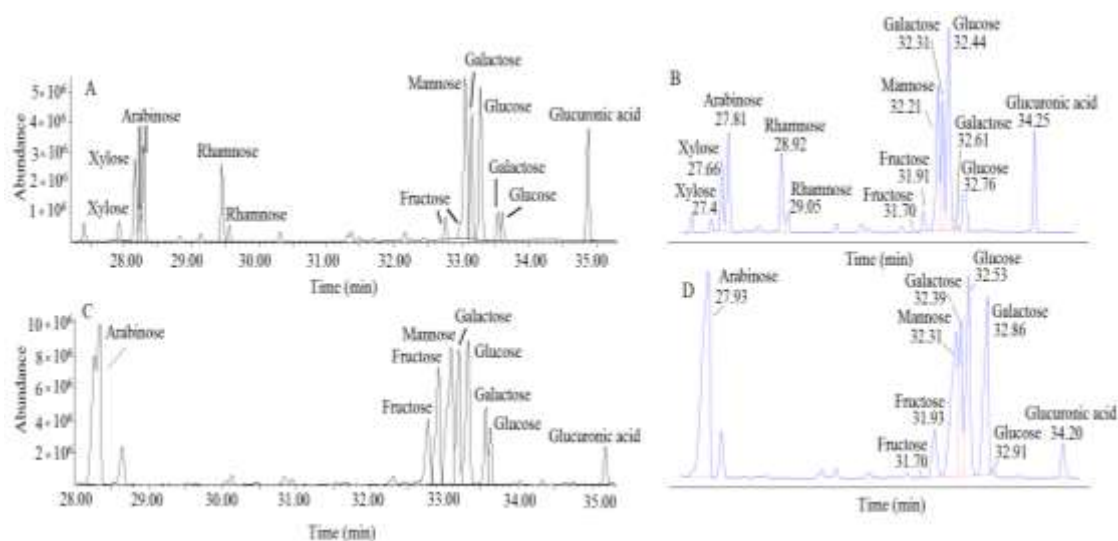


Fig 3. GC chromatograms. (A) GC-MS chromatogram of standard monosaccharides, (B) GC-FID chromatogram of standard monosaccharides, (C) GC-MS chromatogram of AEC-1 (D) GC-FID chromatogram of AEC-1

مهار کنندگی این رادیکال بیشتر می‌شود. در غلظت mg/mL ۳/۵ این کربوهیدرات توانایی مهار ۳۴/۰۵٪ از رادیکال ABTS را دارد و میزان IC₅₀ برابر با ۶/۶۲ ± ۰/۶۷ mg/mL است.

۳-۵-۳ مهار رادیکال OH

رادیکال‌های هیدروکسیل، از جمله رادیکال‌های آزاد قوی هستند که توانایی تخریب پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و نوکلئیک اسیدها را دارند و سبب مرگ سلول خواهند شد [۳۰ و ۲۶]. نتایج نشان داد که در غلظت mg/mL ۳/۵ کربوهیدرات AEC-1 توانایی مهار ۴۴/۱۳٪ از رادیکال هیدروکسیل را دارد و میزان IC₅₀ برابر با ۶/۶۲ ± ۰/۶۷ mg/mL است (شکل ۴-C).

۳-۵ بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی کربوهیدرات AEC-1

۳-۵-۱ مهار رادیکال DPPH

جهت ارزیابی قدرت کربوهیدرات AEC-1 در مهار کنندگی رادیکال DPPH، از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۱۷ نانومتر استفاده شد [۲۹]. این کربوهیدرات در غلظت mg/mL ۳/۵ توانایی مهار ۳۹/۴۸٪ از رادیکال DPPH را نشان می‌دهد. مطابق شکل ۴-A میزان IC₅₀ برابر با ۵/۵۸ ± ۰/۵۸ است.

۳-۵-۲ مهار رادیکال ABTS

یکی از روش‌ها جهت ارزیابی قدرت آنتی اکسیدانی ترکیبات، قدرت مهار کنندگی رادیکال ABTS است [۳۰]. باتوجه به شکل ۴-B با افزایش میزان غلظت AEC-1 فعالیت

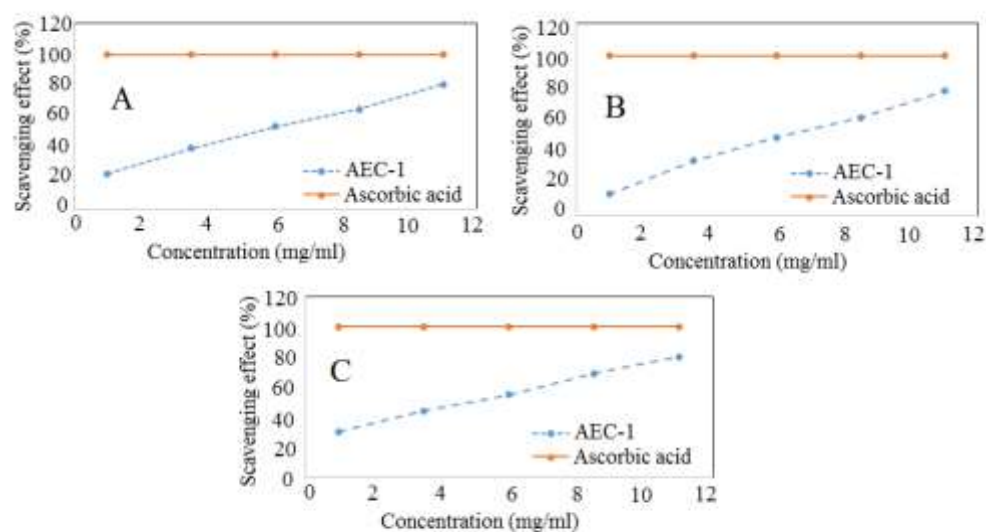


Fig 4. Scavenging effects AEC-1: (A) DPPH radical scavenging activity, (B) ABTS radical scavenging ability, (C) hydroxyl radical scavenging activity. Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3)

نتایج مشابه با کربوهیدرات استخراج شده از صمغ گونه *Prunus amygdalus scoparia Spach* و صمغ گونه *amygdalus* است [۱۲ و ۱۱]. همچنین انواع مونوساکاریدهای موجود در AEC-1 مشابه با مونوساکاریدهای خالص شده از صمغ *Amygdalus scoparia Spach* هستند، اگرچه نسبت‌های مولی تفاوت

۴- بحث

جنس *Amygdalus* گونه‌های متعددی دارد که تنها چند گونه به لحاظ فیتوشیمی کربوهیدرات مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نتایج بدست آمده در این مقاله گویای آن است که کربوهیدرات AEC-1 یک هتروپلی ساکارید است که مونوساکاریدهای آرابینوز و گالاکتوز در آن غالب هستند. این

زیستی مرتبط با آن تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته است. در این پژوهش، کربوهیدراتی با نام AEC-1 از ریشه این گونه جداسازی و خالص سازی شد. بررسی طیف های کروماتوگرافی نشان داد که AEC-1 دارای ۶ نوع مونوساکارید مختلف است که مونومرهای آرابینوز و گالاکتوز بیش از ۵۰ درصد این کربوهیدرات را تشکیل می دهند. علاوه بر آن مونوساکاریدهای دیگری مانند مانوز، گلوکز، فروکتوز و گلوکرونیک اسید نیز در ساختار کربوهیدرات حضور دارند. میزان درصد این مونوساکاریدها مطابق با اطلاعات حاصل از طیف GC-FID به ترتیب برابر با آرابینوز ۳۱/۵۲٪، گالاکتوز ۲۶/۱۰٪، مانوز ۱۹/۰۰٪، گلوکز ۱۶/۱۷٪، فروکتوز ۴/۶۳٪ و گلوکرونیک اسید ۲/۵۶٪ است. حضور مونومر گلوکرونیک اسید در این ترکیب نمایانگر آن است که AEC-1 یک کربوهیدرات اسیدی است. همچنین، فعالیت آنتی اکسیدانی این کربوهیدرات در برابر رادیکال های DPPH، ABTS و OH قابل قبول است. برای درک بهتر و کامل تر از کاربرد این کربوهیدرات در صنایع مختلف از جمله دارویی و غذایی، انجام مطالعات تکمیلی چون تعیین نوع پیوندهای بین مونوساکاریدها؛ مشخص کردن ساختار اسکلت و شاخه ها؛ بررسی فعالیت های بیولوژیکی مختلف ضروری به نظر می رسد.

۶- سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه های شهید بهشتی و گلستان انجام شده است. از دکتر مجتبی اسداللهی به خاطر جمع آوری و شناسایی گونه تشکر می گردد.

دارند و در ریشه گیاه *Amygdalus elaeagnifolia* رامنوز و گالاکترونیک اسید یافت نشد [۱۲]. نتایج فعالیت های آنتی اکسیدانی AEC-1 نشان داد که با افزایش غلظت این کربوهیدرات میزان مهار رادیکال های DPPH، ABTS و OH افزایش می یابد. فعالیت آنتی اکسیدانی AEC-1 در مهار رادیکال های DPPH با $IC_{50} = 0.58 \pm 0.59$ mg/mL قابل قبول تر از کربوهیدرات خالص شده از صمغ گونه *Prunus amygdalus* با $IC_{50} = 6.6$ mg/mL است [۱۱]. اگرچه در مقایسه با کربوهیدرات استخراجی از پوسته گونه *Prunus amygdalus* که رادیکال های DPPH و ABTS را به ترتیب به میزان $1/25$ mg/ml (درصد مهار $2/3 \pm 61/58$) و $1/25$ mg/ml (درصد مهار $1/1 \pm 44$) مهار می کند، AEC-1 ضعیف تر عمل می کند (ABTS با IC_{50} $0.62 \pm 6/47$) [۱۳]. این کربوهیدرات رادیکال های DPPH، ABTS و OH را در مقایسه با کربوهیدرات استخراج شده از گونه *Amygdalus persica* L. که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی به ترتیب 400 μ g/ml (درصد مهار 12 ± 0) و 60 μ g/ml (درصد مهار $66 \pm 0/96$) و 10 μ g/ml (درصد مهار $42 \pm 0/64$) هستند، ضعیف تر مهار می کند [۲]. علت اختلاف در قدرت مهار رادیکال ها وابسته به نوع مونوساکاریدها، وزن مولکولی، درصد اورونیک اسیدها و نوع ساختار کربوهیدرات است [۳۱]. مونوساکاریدهایی چون آرابینوز، گلوکز و مانوز عواملی هستند که موفقیت کربوهیدرات را در مهار رادیکال ها افزایش می دهند [۳۲-۳۳].

۵- نتیجه گیری

گیاه *Amygdalus elaeagnifolia* Spach یکی از گونه های بومی ایران است که کربوهیدرات های این گونه و فعالیت

۷- منابع

- [1] Lu, X., Jing, Y., Zhang, N., Chen, L., Tai, J. and Cao, Y., 2025. Structural characterization and anti-obesity effect of a novel water-soluble galactomannan isolated from *Eurotium cristatum*. Carbohydrate Polymers, 348(Part B): 122870.
- [2] Yu, Q., Li, W., Liang, M., Li, G.,

- Wu, Z., Long, J., Yuan, C., Mei, W. and Xia, X., 2024. Preparation, Characterization, and Antioxidant Activities of Extracts from *Amygdalus persica* L. Flowers. Molecules, 29(3): 633.
- [3] Ji, C., Ma, Y., Xie, Y., Guo, J., Ba, H., Zhou, Z., Zhao, K., Yang, M., He, X. and Zheng,

- W., 2024. Isolation and purification of carbohydrate components in functional food: a review. *RSC Advances*, 14(32): 23204–23214.
- [4] [4] Wang, X., Lu, Y., Li, M., Xia, X., Jin, C., Ding, K. and Chen, D., 2024. Structural characterization and Bacteroides proliferation promotion activity of a novel homogeneous arabinoglucuronoxylan from *Commelina communis* L. *Bioorganic Chemistry*, 153: 107790.
- [5] [5] Hao, J., Zhu, Y., Zhang, Y., Li, L., Li, Z., Wang, L., Qu, Y., Qi, L., Yu, H. and Wang, D., 2025. Structural characterization and hypolipidemic activity of a hetero-galactan purified from *Sanghuangporus vaninii* based on modulation of TLR4/NF-κB pathway. *Carbohydrate Polymers*, 347(1): 122702.
- [6] [6] Cao, L., Liu, W., Jing, H., Yasen, A., Wang, J., Wang, Y., Yang, Z., Yili, A., Nuerxiati, R. and Weng, Z., 2024. Ultrasound-assisted low-temperature extraction of polysaccharides from *Lavandula angustifolia* Mill.: optimization, structure characterization, and anti-inflammatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 282(2): 136764.
- [7] [7] Saberi, F., Kiani, B., Omidvar, E., Azimzadeh, H. and Esmailpour, M., 2023. Evaluating the plantation success by mountain almond (*Amygdalus scoparia* Spach.) and its effect on vegetation and soil in Arjan habitats of Jamal Beyg region, Fars province. *Water and Soil Management and Modeling*, 3(4): 227–241.
- [8] [8] Kianbakht, S., Nabati, F. and Hashem Dabaghian, F., 2023. Effects of topical Persian medicine *Amygdalus communis* L. var. Amara kernel oil on the symptoms of knee osteoarthritis: a randomized, triple-blind, active, and placebo-controlled clinical trial. *Journal of Medicinal Plants*, 22(87): 89–96.
- [9] [9] Sharifpoor, R., Jafari, A. and Jhanbazi Gojani, H. 2016. Effects of aspect on age dependent quality and quantity of mountain almond (*Amygdalus arabica* Olivier) oil (case study: Karebas, Cheharmahal-va-Bakhtiary). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32(4): 688–697.
- [10] [10] Shalayel, M. H. F., Al-Mazaideh, G. M., Alanezi, A. A., Almuqati, A. F. and Alotaibi, M., 2023. The Potential Anti-Cancerous Activity of *Prunus amygdalus* var. amara Extract. *Processes*, 11(4): 1277.
- [11] [11] Bouaziz, F., Koubaa, M., Helbert, C. B., Kallel, F., Driss, D., Kacem, I., Ghorbel, R. and Chaabouni, S. E., 2015. Purification, structural data and biological properties of polysaccharide from *Prunus amygdalus* gum. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(3): 578–584.
- [12] [12] Seyfi, R., Kasaa, M. R. and Chaichi, M. J., 2019. Isolation and structural characterization of a polysaccharide derived from a local gum: Zedo (*Amygdalus scoparia* Spach). *Food Hydrocolloids*, 87: 915–924.
- [13] [13] Dammak, M. I., Chakroun, I., Mzoughi, Z., Amamou, S., Mansour, H. Ben, Le Cerf, D. and Majdoub, H., 2018. Characterization of polysaccharides from *Prunus amygdalus* peels: Antioxidant and antiproliferative activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119: 198–206.
- [14] [14] Hassanpouraghdam, M. B., Ghorbani, H., Esmailpour, M., Alford, M. H., Strzemiński, M. and Dresler, S., 2022. Diversity and Distribution Patterns of Endemic Medicinal and Aromatic Plants of Iran: Implications for Conservation and Habitat Management. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3): 1552.
- [15] [15] Iranmanesh, Y. and Jahanbazi Goujani, H., 2017. Comparison of fatty acid composition of fruit oil from acorn (Persian oak), *Pistacia atlantica* Desf. and four wild almond species. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33(2): 325–337.
- [16] [16] Cai, L., Zou, S., Liang, D. and Luan, L., 2018. Structural characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Sophora tonkinensis* Radix. *Carbohydrate Polymers*, 184(15): 354–365.
- [17] [17] Zheng, X., Liu, Z., Li, S., Wang, L., Lv, J., Li, J., Ma, X., Fan, L. and Qian, F., 2016. Identification and characterization of a cytotoxic polysaccharide from the flower of *Abelmoschus manihot*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82: 284–290.
- [18] [18] Ahmadi, E., Rezadoost, H., Alilou, M., Stuppner, H. and Moridi Farimani, M., 2022. Purification, structural characterization and antioxidant activity of a new arabinogalactan from *Dorema ammoniacum* gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194: 1019–1028.
- [19] [19] Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426–428.
- [20] [20] Blois, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617): 1199–1200.
- [21] [21] Asghari, B., Mafakheri, S. and Zarabi, M., 2019. Study of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Date Seed Extract and its Effects on Physicochemical, Microbial and Sensory Properties of Cupcake. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(88): 327–342.
- [22] [22] Ghorbani, Sh., Jafarian, S., Sharifi Soltani, M. and Roozbeh nasiraie, L., 2025. Evaluation of Some Physicochemical and Sensory Properties of Beef Sausage Containing Sour Tea (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Extract. *Journal of food science and technology (Iran)*, 22(58): 63–79.
- [23] [23] Yang, C., Hu, C., Zhang, H., Chen, W.,

- Deng, Q., Tang, H. and Huang, F., 2020. Optimation for preparation of oligosaccharides from flaxseed gum and evaluation of antioxidant and antitumor activities in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153:1107–1116.
- [24] [24] Jing, C., Yuan, Y., Tang, Q., Zou, P., Li, Y. and Zhang, C., 2017. Extraction optimization, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Glycine soja*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103: 1207–1216.
- [25] [25] Salmanian, Sh., Sadeghi Mahoonak, A.R. and Jamson, M., 2018. Determination of amounts, antioxidant properties and identification of main phenolic compound in Enarijeh (*Froriepiasubpinnata*) extract by RP-HPLC method. *Journal of food science and technology(Iran)*, 15(81): 287-297.
- [26] [26] Liu, Q., Ge, X., Chen, L., Cheng, D., Yun, Z., Xu, W. and Shao, R., 2018. Purification and analysis of the composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Helicteres angustifolia* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(Part B): 2262–2268.
- [27] [27] Jahanbin, K., 2018. Structural characterization of a new water-soluble polysaccharide isolated from *Acanthophyllum acerosum* roots and its antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(Part A): 1227–1234.
- [28] [28] Mathlouthi, M. and Koenig, J. L., 1987. *Vibrational Spectra of Carbohydrates. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 44: 7-89
- [29] [29] Hou, Y., Ding, X. and Hou, W., 2015. Composition and antioxidant activity of water-soluble oligosaccharides from *Hericium erinaceus*. *Molecular Medicine Reports*, 11(5): 3794–3799.
- [30] [30] Fan, H., Meng, Q., Xiao, T. and Zhang, L., 2018. Partial characterization and antioxidant activities of polysaccharides sequentially extracted from *Dendrobium officinale*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(2): 1054–1064.
- [31] [31] Zeng, C., Chen, X., Jiang, W., Liu, L. and Fanga, C., 2020. Isolation, Purification and Antioxidant Activity of The Polysaccharides from Chinese Truffle *Tuber sinense*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 19(1): 436–447.
- [32] [32] Lo, T. C.-T., Chang, C. A., Chiu, K.-H., Tsay, P.-K. and Jen, J.-F., 2011. Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers*, 86(1): 320–327.
- [33] [33] Wang, Y., Mao, F. and Wei, X., 2012. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from leaves, flowers and seeds of green tea. *Carbohydrate Polymers*, 88(1): 146–153.



Scientific Research

Structural Investigation and Antioxidant Activity of Purified Carbohydrate from the Roots of *Amygdalus elaeagnifolia* Spach

Mahdi Moridi Farimani ^a, Elham Ahmadi Juybari ^{b, *}

1- Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2- ^{b*}- Corresponding author, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received: 2025/2/8 Accepted: 2025/5/18	Carbohydrates play a crucial role in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries, with their applications being closely linked to their specific phytochemical composition. However, a significant knowledge gap exists regarding the phytochemistry of carbohydrates derived from Iran's native and endemic plant species. This study investigates the phytochemical profile and antioxidant activities of purified carbohydrate extracted from the roots of the native Iranian plant, <i>Amygdalus elaeagnifolia</i>. were collected from the village of Barshneh, Fars Province, Iran. The roots were first thoroughly cleaned and then subjected to pre-extraction with 96% ethanol. The main carbohydrate extraction was performed using hot water. The extract was subjected to a series of purification steps, including precipitation with 96% ethanol, protein removal using Sevag method, ion-exchange chromatography with DEAE cellulose as the stationary phase, and gel filtration chromatography using Sephadex G-100. Following these steps the purified carbohydrate, designated as AEC-1, was successfully obtained. The functional group of AEC-1 were analyzed using Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. The monosaccharide composition was determined using gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID), while monomer identification was conducted using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Finally, the antioxidant capacity of AEC-1 was evaluated against three free radicals: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and hydroxyl radical. The purity of AEC-1 was determined to be 94.08 ± 0.67%. FT-IR analysis demonstrated functional groups such as an acid group, α-anomeric carbons and the pyranose ring structures. Chromatographic studies demonstrated the following monosaccharide profile: arabinose (31.52%), galactose (26.10%), mannose (19.00%), glucose (16.17%), fructose (4.63%), and glucuronic acid (2.56%). Antioxidant assays demonstrated significant, concentration-dependent inhibitory effect of AEC-1 on DPPH, ABTS, and hydroxyl radicals. The results indicate that the purified carbohydrate from <i>A. elaeagnifolia</i> species is an acidic heteropolysaccharide with moderate antioxidant activity against DPPH, ABTS, and hydroxyl radicals.
Keywords: Almond, Biological properties, Extraction, Purification, Identification	
DOI: 10.22034/FSCT.22.166.180.	
*Corresponding Author E- e.ahmadi@gu.ac.ir	