

## استخراج، خالص سازی و تعیین ساختار پلی ساکارید غالب جدا شده از ریشه های گیاه چوبک کرک (*Acanthophyllum glandulosum*) غده‌ای

محمد ملاویسی<sup>۱</sup> و کامبیز جهان بین<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۵

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

<sup>۲</sup> استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

\* مسئول مکاتبه: Email: Jahanbin@shahroodut.ac.ir

### چکیده

پلی ساکارید محلول در آب جدیدی با وزن مولکولی  $35/2$  کیلودالتون و درجه چرخش نوری  $+178/5^\circ$  توسط آب داغ  $80^\circ\text{C}$  از ریشه‌های گیاه چوبک کرک غده‌ای استخراج شد. خالص سازی پلی ساکارید با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی دی اتیل آمینواتیل-سلولوز و سفادکس جی-۵۰ انجام گرفت و فراکشن غالب (پلی ساکارید خالص) جمع آوری و به روش انجمادی خشک شد. راندمان استخراج پلی ساکارید ناخالص و خالص به ترتیب  $3/4\%$  و  $2/3\%$  بود. مقدار قند کل پلی ساکارید خالص  $98/2\%$  بود و جذب در ناحیه  $280$  نانومتر از طیف فرابنفش نداشت که عدم حضور پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار آن را نشان داد. نتایج آنالیز واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص با دستگاه کروماتوگرافی گازی نشان داد که از واحدهای مونومری گلوکز گالاکتوز، آرابینوز و مانوز به ترتیب با نسبت-های مولی  $2/9$ ،  $6/1$ ،  $0/9$  و  $1$  تشکیل شده است. شناسایی ساختار پلی ساکارید خالص توسط تلفیقی از آزمون‌های آنالیز شیمیایی و دستگاهی مانند متیلاسیون، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، مادون قرمز و رزونانس مغناطیس هسته اتم‌های کربن و پروتون صورت گرفت و نتایج حاصل نشان داد واحدهای گالاکتوز با اتصال  $\alpha(1\rightarrow6)$  اسکلت اصلی ساختار پلی ساکارید خالص را تشکیل می‌دهند. واحدهای گالاکتوز در نقاطی از زنجیر اصلی از محل کربن‌های شماره ۲ و ۳ خود دارای انشعاب بوده و شاخه‌ها توسط واحدهای مونوساکاریدی گلوکز، آرابینوز و مانوز به انتها می‌رسند.

واژگان کلیدی: استخراج، پلی ساکارید، چوبک کرک غده‌ای، خالص سازی، شناسایی ساختار

### مقدمه

ساختار خود حاوی تعداد کم یا زیاد واحدهای مونوساکارید با ساختار خطی، منشعب یا حلقوی (سیکلو آمیلوزها) هستند. ممکن است پلی ساکاریدها در داخل سلول‌های زنده توسط اتصالات کووالانسی در

پلی ساکاریدها دسته‌ای از هیدروکلوئیدها هستند که از اتصال واحدهای مونوساکاریدی به یکدیگر با پیوندهای گلیکوزیدی حاصل می‌شوند. این پلیمرهای زیستی در

ترکیب با سایر اجزا مانند پروتئین‌ها و چربی‌ها باشند که این دسته از پلی‌ساکاریدها به همراه پلی‌ساکاریدهای آزاد دارای کاربردهای بیولوژیکی مهمی هستند و به عنوان کربوهیدرات‌های مرکب شناخته می‌شوند. وزن مولکولی پلی‌ساکاریدها بطور طبیعی بسیار گسترده بوده بطوریکه وزن مولکولی آنها از چند هزار تا چند میلیون دالتون متغییر است (استفن و همکاران ۲۰۰۶؛ فیلیپس و ویلیام ۲۰۰۹؛ ژانگ و همکاران ۲۰۱۵).

پلی‌ساکاریدها نقش اساسی در پایدارسازی و بهبود خواص جریان‌ی و حسی مواد غذایی دارند لذا شناخت دقیق ساختار و ویژگی‌های آنها از هر دو جنبه علمی و صنعتی ضروری است. شناخت پلی‌ساکاریدها و بررسی ویژگی‌های ذکر شده میسر نیست مگر اینکه این ترکیبات تحت شرایط مناسب از منبع مشخص استخراج و سپس خالص‌سازی شوند. از این رو استخراج خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها از منابع جدید همیشه مورد توجه پژوهشگران مختلف بوده است. پلی-ساکاریدها از منابع مختلفی استحصال می‌شوند که می‌توان به منابع گیاهان خشکی، دریایی، میکروبی، سنتزی و غیره اشاره کرد که در بین منابع ذکر شده، استخراج پلی‌ساکاریدها از منابع گیاهی به علت طبیعی و کم‌ضرر بودن، دسترسی بیشتر و قیمت کمتر نسبت به سایر منابع ارجحیت دارد لذا پژوهشگران دائماً در حال بررسی گیاهان ناشناخته جهت شناسایی موارد احتمالی با کاربردهای مختلف در صنایع گوناگون هستند (جهان بین ۱۳۹۰؛ جهان بین و بیگی ۱۳۹۶؛ ژیانگ و همکاران ۲۰۱۳؛ یو و همکاران ۲۰۱۵).

جنس چوبک به خانواده میخک‌آلوده دارد و تا کنون ۶۱ گونه از این جنس شناسایی شده است. این جنس در ایران ۳۲ گونه گیاه بوته‌ای اغلب پشته‌ای دارد که در مناطق کوهستانی و بیابانی می‌رویند. زیستگاه‌های این گیاه علاوه بر ایران، ترکمنستان، پاکستان، عراق، تالش،

قفقاز، افغانستان و آسیای مرکزی گزارش شده است. در کشور ایران، بیشترین گونه ثبت شده از این گیاه متعلق به استان خراسان است (مظفریان ۱۳۷۵). چوبک کرک *غده‌ای* (نکائی)<sup>۳</sup> از گونه‌های مهم این جنس است. این گونه چوبی، چند ساله، دارای برگ‌های ایستاده-گسترده، درفشی، در سطح رو مسطح، در پشتی محدب، در انتها سخت و تیز و خاری شده است. موسم گل‌دهی آن خرداد و تیرماه است و در مناطق مختلفی از ایران از جمله البرز، شرق، شمال شرقی مانند شاهرود و غرب مانند الوند یافت می‌شود (قهرمان ۱۳۷۹). از ریشه‌های این گیاه در طب سنتی استفاده‌های زیادی می‌شود که از جمله می‌توان به درمان سکسکه، دفع سنگ مثانه، تسکین درد مفاصل و سیاتیک و ورم طحال اشاره کرد. از کاربردهای صنعتی آن می‌توان به استفاده از ریشه گیاه در کارخانجات صنایع غذایی بویژه کارخانجات حلواسازی بمنظور رنگ بری شربت قندی مورد استفاده و نیز استفاده به عنوان کف‌کننده در کارخانجات تولید محصولات بهداشتی و شوینده مانند شامپو و غیره اشاره کرد (جهان بین ۱۳۹۰).

با وجود استفاده‌های سنتی و صنعتی اشاره شده از ریشه‌های گیاه چوبک مطالعات صورت گرفته بر روی شناسایی ترکیبات آن بسیار اندک است بطوریکه از ۶۱ گونه شناخته شده از این جنس تنها روی ۸ گونه مطالعه انجام شده که عمده مطالعات انجام شده نیز بر روی ساپونین‌های آن متمرکز بوده است و تنها بررسی‌های انجام شده روی پلی‌ساکاریدهای جنس چوبک محدود به ۴ گونه تماشایی<sup>۴</sup>، افغانستانی<sup>۵</sup>، خراسانی<sup>۶</sup> و نورینجیانوم<sup>۷</sup> است (آریفخودژائف و همکاران ۱۹۹۹؛ آریفخودژائف و همکاران ۲۰۰۳؛ کوربانوا و همکاران ۲۰۰۳؛ جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱). در ارتباط با پلی-

<sup>3</sup> A. glandulosum

<sup>4</sup> Bracteatum

<sup>5</sup> Pungens

<sup>6</sup> Borszczowii

<sup>7</sup> Knorringianum

<sup>1</sup> Acanthophyllum C. A. Mey

<sup>2</sup> Caryophyllaceae

از شرکت فارماسیا<sup>۱</sup> (اُپسالا<sup>۲</sup>؛ سوئد) خریداری شدند. دی‌متیل سولفوکساید<sup>۳</sup> و استاندارد مونوساکاریدهای خالص، از شرکت سیگما (آمریکا) و سدیم ۲،۲ دی‌متیل، سیلاپنتا سولفونات از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید. اسید تری‌فلورواستیک از شرکت فلوکا خریداری شد. اسیدها، بازها و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از درجه خلوص آزمایشگاهی برخوردار بودند.

#### استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب

بمنظور استخراج پلی‌ساکاریدها از ریشه‌های گیاه، ابتدا ریشه‌های خرد شده با استفاده از اتانول ۹۵٪ در دمای جوش به مدت ۹ ساعت تیمار شد و جهت افزایش کارایی این مرحله، هر سه ساعت اتانول مصرفی با اتانول تازه جایگزین گردید. هدف از انجام این مرحله، حذف رنگدانه‌ها، چربی‌ها، بخشی از ساپونین‌ها و مونوساکاریدها از ریشه‌های گیاه بود. در نهایت ریشه‌های گیاهی تیمار شده صاف و در مجاورت با هوا خشک شدند.

پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از ریشه گیاه خشک شده (۱۰۰ گرم) توسط یک لیتر آب (۸۰ °C) به صورت غوطه وری با دستگاه هات پلیت مگنت استیرر به مدت ۳ ساعت استخراج شدند. این مرحله ۳ بار تکرار شد و در نهایت عصاره‌های آبی حاصل تا رسیدن به یک سوم حجم اولیه با استفاده از دستگاه تغلیظ کننده تحت خلأ تغلیظ گردید. در ادامه پروتئین‌ها از عصاره آبی توسط روش سواگ (استفاده از ۱-بوتانول و کلروفرم و سانتریفیوژ کردن محلول نهایی) حذف شدند (استاب ۱۹۶۵). جداسازی پلی‌ساکاریدها با افزودن اتانول مطلق به عصاره آبی پروتئین‌زدایی شده (۱:۳) و نگهداری در دمای یخچال به مدت ۲۴ ساعت و سپس سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون حاصل انجام شد. رسوبات حاصل (پلی‌ساکاریدهای محلول در آب) روی

ساکاریدهای موجود در ریشه چوبک کرک غده‌ای مطالعه‌ای صورت نگرفته است و تنها ساپونین موجود در آن بررسی شده است (گایدی و همکاران ۲۰۰۴). بعلاوه ارتباط بسیار نزدیک بین ساختار پلی‌ساکاریدها و ویژگی‌های عملکردی آنها در صنعت بخصوص صنایع غذایی و نیز با توجه به اینکه توجیه رفتار جریانی و خصوصیات فیزیکی محلول‌های پلی‌ساکاریدی بدون شناخت ساختارشان از توجیه علمی لازم برخوردار نیست لذا انجام هر نوع مطالعه تکمیلی در شناسایی ساختار پلی‌ساکاریدها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در پژوهش پیش رو پلی‌ساکاریدهای موجود در ریشه‌های گیاه چوبک کرک غده‌ای استخراج و پس از خالص سازی، ساختار پلی‌ساکارید غالب موجود در آن با استفاده از روش‌های آنالیز شیمیایی و پیشرفته دستگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. این اولین پژوهش بر روی شناسایی پلی‌ساکاریدهای موجود در ریشه گیاه چوبک کرک غده‌ای می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع آوری ریشه گیاه و مواد مورد استفاده

ریشه گیاه چوبک کرک غده‌ای در خرداد ماه ۱۳۹۳ از منطقه قوچان واقع در استان خراسان رضوی جمع آوری شد و شناسایی گونه گیاه توسط دکتر ولی‌الله مظفریان، گیاه شناس مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع واقع در تهران، انجام گرفت. پس از انتقال ریشه‌ها به آزمایشگاه، بمنظور حذف سایر مواد خارجی چسبیده به بخش بیرونی ریشه‌های گیاه، ابتدا پوسته بیرونی آنها بوسیله چاقو تمیز و سپس توسط آب شستشو داده شد. در نهایت ریشه‌های پوست گیری شده در مجاورت با هوا خشک و تا زمان انجام آزمایشات در دمای اتاق نگهداری شدند.

دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز، سفادکس جی-۵۰ و دکستران با وزن‌های مولکولی مختلف (۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون)،

<sup>1</sup> Pharmacia

<sup>2</sup> Uppsala

<sup>3</sup> Dimethyl sulfoxide (DMSO)

و همکاران (۱۹۵۶). شناسایی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید خالص و تعیین کمی آنها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل واریان ۳۴۰۰ (ساخت آمریکا) صورت گرفت. ستون دستگاه از نوع موئینه (۳۰ متر × ۰/۳۲ میلی‌متر × ۰/۲ میکرومتر) و آشکارساز مورد استفاده از نوع یونش شعله‌ای بود. مراحل انجام کار به این صورت بود که دمای ستون در  $120^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای  $250^{\circ}\text{C}$  (با نرخ  $8^{\circ}\text{C}$  بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۳ دقیقه در این دما نگهداشته شد. ازت به عنوان گاز حامل با سرعت جریان حجمی ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت و دمای قسمت تزریق و آشکارساز به ترتیب  $250^{\circ}\text{C}$  و  $300^{\circ}\text{C}$  بود. آماده‌سازی نمونه و تبدیل آن به استات‌های آلدیتول مونوساکاریدهای سازنده با استفاده از روش چاپلین و کندی (۱۹۹۴) انجام گرفت و از میواینوزیتول<sup>۱</sup> به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد.

#### تعیین درجه چرخش نوری و وزن مولکولی پلی-ساکارید خالص

از روش ریس و همکاران (۱۹۷۰) برای تعیین درجه چرخش نوری با استفاده از دستگاه پلاریمتر پرکین المر<sup>۲</sup> ۳۴۳۲ (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد و اندازه گیری وزن مولکولی پلی‌ساکارید خالص توسط دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوا با کارایی بالا مدل شیمادزو<sup>۳</sup> با ستون TSK-GEL PWXL ساخت توسو ژاپن (۷/۸ × ۳۰۰ میلی‌متر) صورت گرفت (ریس و همکاران ۱۹۷۰). ستون با محلول ۰/۱ مولار سولفات سدیم و سرعت جریان حجمی ۰/۶ میلی‌لیتر بر دقیقه شسته شد و آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست نور مدل RID-10A (شیمادزو، ژاپن) بود. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای دکستران رسم

کاغذ صافی به ترتیب توسط اتانول مطلق، استن و اتر شستشو و پس از حل شدن در آب یون‌زدایی شده توسط خشک کن انجمادی (مارتین کریست، مدل آلفا ۱-۲، آلمان) خشک شدند.

#### خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب

بمنظور خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای جدا شده، از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز و ژل تراوای سفادکس جی-۵۰ استفاده شد. پلی‌ساکاریدهای خام پیش از ورود به ستون‌ها، در آب یون‌زدایی شده حل و از صافی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. سپس محلول پلی‌ساکاریدی خام وارد ستون کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز (۲/۶ سانتیمتر × ۴۰ سانتیمتر) شد و شستشوی ستون به ترتیب توسط آب و محلول آبی کلرید سدیم با گرادیان غلظت صفر تا یک مولار انجام گرفت. غلظت پلی‌ساکاریدها در فراکشن‌های جمع آوری شده از ستون توسط روش فنل-اسید سولفوریک تعیین شد (دبویس و همکاران ۱۹۵۶).

فراکشن‌های شسته شده با آب حاصل از ستون دی-اتیل‌آمینواتیل-سلولز (پلی‌ساکاریدهای خنثی) مقادیر بیشتری نسبت به انواع شسته شده با محلول آبی کلرید سدیم (پلی‌ساکارید اسیدی) داشتند و در ادامه وارد ستون کروماتوگرافی سفادکس جی-۵۰ (۱/۶ سانتیمتر × ۷۰ سانتیمتر) شدند. شستشوی ستون سفادکس جی-۵۰ توسط آب یون‌زدایی شده با سرعت جریان حجمی ۹ میلی‌لیتر بر ساعت انجام گرفت و در نهایت فراکشن پلی‌ساکارید غالب (پلی‌ساکارید خالص) جمع آوری و با روش انجمادی خشک شد.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین، قند کل و شناسایی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید خالص مقدار پروتئین با استفاده از روش برادفورد (با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی) تعیین گردید (برادفورد ۱۹۷۶) و برای اندازه‌گیری قند کل از روش فنل-اسیدسولفوریک (با استفاده از استاندارد D-گلوکز در طول موج ۴۹۰ نانومتر) استفاده شد (دبویس

<sup>1</sup> Myo-inositol

<sup>2</sup> Perkin-Elmer

<sup>3</sup> Shimadzu

مطابق آنچه در بخش شناسایی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص عنوان شد، آنالیز شدند. جهت انجام آزمایش اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، ۲۰ میلی گرم پلی ساکارید خالص توسط محلول ۰/۰۴ مولار پریودات سدیم (۲۵ میلی لیتر) اکسید شد و میزان جذب آن هر ۴ ساعت یکبار در طول موج ۲۳۳ نانومتر در شرایط نگهداری نمونه در تاریکی ثبت گردید. اتمام فرایند اکسیداسیون با ثابت شدن مقدار جذب پس از ۹۶ ساعت تعیین شد و پریودات سدیم مازاد با افزودن اتیلن گلیکول حذف گردید. مصرف پریودات و اسیدفرمیک تولیدی به ترتیب توسط روش‌های اسپکتروفتومتری و تیتراسیون با محلول ۰/۰۵۳ مولار سود تعیین شدند. محلول حاصل از آزمون اکسایش پریودات به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شد و در ادامه توسط ۵۰ میلی گرم بروهیدرید سدیم (دمای °C ۲۵ به مدت ۱۲ ساعت) خنثی گردید. در نهایت هیدرولیز کامل توسط محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک انجام شد و محصولات حاصل پس از استیله شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، مطابق آنچه در بخش شناسایی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص عنوان شد، آنالیز شدند (جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱).

#### متیله کردن پلی ساکارید خالص

از روش چاپلین و کندی (۱۹۹۴) برای متیله کردن پلی ساکارید خالص و تشکیل محصولات حاصل از آن استفاده شد. هیدرولیز کردن محصولات متیله شده با اسید فرمیک و محلول ۲ مولار اسید تری فلورواستیک و سپس خنثی شدن اسید مازاد توسط بروهیدرید سدیم انجام شد. تولید استات‌های آلدیتول نیز با تبدیل شدن آلدیتول‌های حاصل توسط مخلوط پیریدین-انیدرید استیک (۱:۱)، در حمام آب °C ۹۰ (مدت زمان ۱ ساعت) صورت گرفت و در نهایت استات‌های آلدیتول نیمه متیله شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی آنالیز شدند. دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی مورد استفاده به ستون مؤئینه

گردید و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص محلول در آب، توسط منحنی کالیبراسیون محاسبه شد (سون و همکاران ۲۰۱۰).

#### طیف فرابنفش و مادون قرمز پلی ساکارید خالص

طیف فرابنفش جهت پی بردن به وجود پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید با اندازه‌گیری جذب محلول پلی ساکارید خالص در ناحیه ۲۸۰-۱۰۰ بیو<sup>۱</sup> (ساخت کشور آمریکا) و طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص جهت پی بردن به نوع گروه‌های عاملی با استفاده از طیف‌سنج مادون قرمز مدل نیکولت<sup>۲</sup> ۵۷۰۰ (مدیسون<sup>۳</sup> آمریکا) پس از تشکیل قرص یک میلی متری از مخلوط پودر برومور پتاسیم با پلی-ساکارید خالص برحسب فرکانس در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰ cm<sup>-1</sup> حاصل شد (رای ۲۰۰۶).

#### هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص

از روش تانگ و همکاران (۲۰۰۸) برای انجام هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید خالص استفاده شد. بطور خلاصه، ۸۰ میلی گرم پلی ساکارید خالص با ۳۰ میلی لیتر محلول ۰/۰۵ مولار اسید تری فلورواستیک (دمای °C ۸۰ به مدت ۱۶ ساعت) هیدرولیز شد و پلی ساکارید هیدرولیز شده جهت حذف رسوبات سانتیریفوژ گردید. رسوبات جدا شده تحت عنوان پلی ساکارید ۱ نامگذاری شدند. سیال رویی به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد و در انتها فراکشن جدا شده جمع‌آوری و تحت عنوان پلی-ساکارید ۴ نامگذاری گردید. سیال باقی‌مانده در کیسه دیالیزی (cut off ۳/۵ کیلو دالتون) با اتانول رسوب داده شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب تحت عناوین پلی ساکارید ۲ و ۳ نامگذاری شدند. تمامی فراکشن‌ها پس از خشک‌شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی

<sup>1</sup> Varian Cary 100-Bio

<sup>2</sup> Nicolet

<sup>3</sup> Madison

غالب (پلی ساکارید خالص)، جمع‌آوری و به روش انجمادی خشک شد. راندمان تولید پلی‌ساکارید ناخالص و خالص حاصل از ریشه‌های گیاه چوبک کرک غده‌ای به ترتیب ۳/۴٪ و ۲/۳٪ بود. رنگ پلی‌ساکارید خالص کاملاً سفید بود که به آزمون برادفورد پاسخ منفی داد و فاقد جذب در نواحی ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش بود که بیانگر عدم حضور پروتئین و اسیدنوکلئیک در ساختار پلی‌ساکارید خالص و کارآمد بودن روش خالص‌سازی مورد استفاده است. پودر پلی-ساکارید خالص حاصل در آنالیزهای شیمیایی و دستگاهی برای تعیین ساختار مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

#### تعیین مقدار قند کل و شناسایی واحدهای سازنده

##### پلی‌ساکارید خالص

مقدار قند کل پلی‌ساکارید خالص پس از اندازه‌گیری با روش فنل-اسیدسولفوریک، ۹۸/۲٪ محاسبه شد که دلالت بر درجه خلوص بسیار بالای پلی‌ساکارید حاصل از ریشه‌های گیاه چوبک کرک غده‌ای داشت. بمنظور شناسایی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید خالص و تعیین کمی آنها، پلی‌ساکارید توسط اسید تری‌فلورواستیک به واحدهای مونوساکاریدی سازنده خود هیدرولیز گردید و مونومرهای حاصل پس از استیله شدن به استات‌های آلدیتول مربوطه تبدیل و در نهایت با دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند. شکل ۱ طیف کروماتوگرام گازی محصولات حاصل از هیدرولیز کامل پلی‌ساکارید خالص را نشان می‌دهد. محاسبه سطح زیر منحنی‌های حاصل و مقایسه آنها با استانداردهای مورد استفاده نشان داد که پلی‌ساکارید خالص از واحدهای مونومری گالاکتوز، گلوکز، آرابینوز و مانوز به ترتیب با نسبت‌های مولی ۶/۱، ۲/۹، ۰/۹ و ۱ تشکیل شده است لذا پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه چوبک کرک غده‌ای یک گلوکو گالاکتان است. مقایسه نتایج حاصل از نوع و نسبت‌های مولی واحدهای

کوارتزی (۲۵ متر × ۰/۲۲ میلی‌متر × ۰/۲ میکرومتر) مجهز بود. دمای ستون در  $110^{\circ}\text{C}$  (مدت ۲ دقیقه) ثابت ماند و سپس تا  $270^{\circ}\text{C}$  (با نرخ  $15^{\circ}\text{C}$  بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۴۰ دقیقه در این دما نگهداشته شد.

#### طیف رزونانس مغناطیس هسته‌ای پلی‌ساکارید خالص

از دستگاه طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای جهت ثبت طیف‌های رزونانس مغناطیس هسته‌های کربن-۱۳ و پروتون پلی‌ساکارید خالص، در ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز برای هسته‌های پروتون و ۱۲۵/۷۵ مگاهرتز برای هسته‌های کربن-۱۳ در دمای  $27^{\circ}\text{C}$  استفاده شد. استاندارد مورد استفاده سدیم ۲،۲ دی متیل، سیلاپنتا سولفونات و زمان بازداری ۲ ثانیه بود. پلی‌ساکارید خالص پس از حل شدن در حلال بی‌اثر اکسید دوتریم (۹۹٪/۱٪) بین دو قطب مغناطیس دستگاه قرار گرفت و تغییرات ایجاد شده توسط دستگاه طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای، در مقایسه با جسم استاندارد، به صورت پیک‌هایی با ارتفاع متفاوت (جابجایی شیمیایی پیک‌ها بر حسب ppm نمایش داده شد) ثبت گردید.

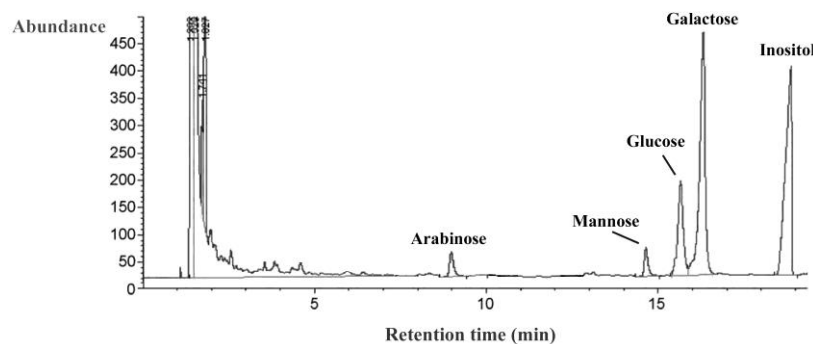
#### نتایج و بحث

##### استخراج و خالص‌سازی پلی‌ساکارید غالب

همانطور که در بخش مواد و روش‌ها اشاره شد پلی‌ساکارید محلول در آب موجود در ریشه‌های گیاه چوبک کرک غده‌ای توسط استخراج با آب داغ ( $80^{\circ}\text{C}$ )، پروتئین زدایی و در نهایت ترسیب با اتانول جدا شد و پس از شستشوی نهایی با اتانول مطلق، استن و اتر، خشک گردید. رنگ پلی-ساکارید خشک شده قهوه‌ای کم رنگ بود که دلالت بر ناخالص بودن آن داشت لذا جهت خالص‌سازی و همگن شدن آن به ترتیب از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز و سفادکس جی-۵۰ استفاده شد. در نهایت فراکشن

گالاکتوز (۵/۲) و گلوکز (۱/۴)، خراسانی با نسبت گالاکتوز (۵/۳) و گلوکز (۲) و افغانستانی با نسبت گالاکتوز (۵/۳) و گلوکز (۱/۳) و کمتر نسبت به گونه نوریجیانوم با نسبت گالاکتوز (۳۵) و گلوکز (۱۷) بود. نسبت مولی آرابینوز تقریباً در تمام گونه‌ها مشابه است (آریفخودژائف و همکاران ۱۹۹۹؛ آریفخودژائف و همکاران ۲۰۰۳؛ کوربانوا و همکاران ۲۰۰۳؛ جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱).

مونومری سازنده پلی ساکارید خالص چوبک کرک غده‌ای با سه گونه نوریجیانوم، تماشایی و خراسانی نشان می‌دهد که تنها گونه حاوی مونوساکارید مانوز، گونه کرک غده‌ای است و در چهار گونه دیگر واحدهای مونومری گالاکتوز، گلوکز و آرابینوز با نسبت‌های مولی مختلف با گونه کرک غده‌ای وجود دارند. چوبک کرک غده‌ای دارای نسبت بیشتری از گالاکتوز (۶/۱) و گلوکز (۲/۹) نسبت به سه گونه تماشایی با نسبت

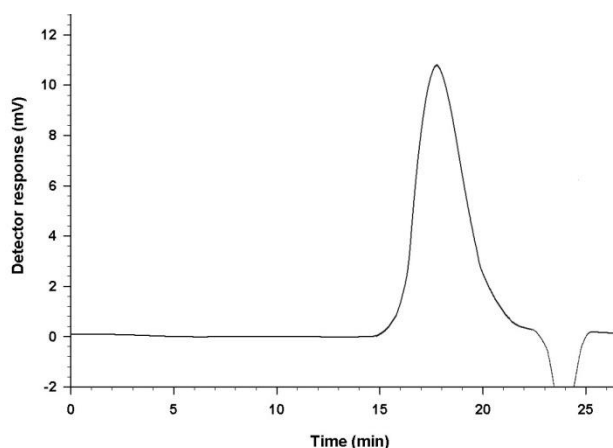


شکل ۱- نتایج کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص ریشه گیاه چوبک کرک غده‌ای

کرک غده‌ای با گونه خراسانی به علت عدم گزارش مقدار آن در مقالات چاپ شده امکان پذیر نبود.

#### وزن مولکولی پلی ساکارید خالص

شکل ۲ کروماتوگرام پلی ساکارید خالص با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوا با کارایی بالا را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود منحنی حاصل از دستگاه، پیک متقارن و منحصربه‌فردی را نشان داد که بیانگر همگن بودن پلی ساکارید خالص بود. از مقایسه منحنی پلی ساکارید خالص با منحنی‌های استاندارد دکستران، میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص ۳۵/۲ کیلودالتون محاسبه شد که بیشتر از وزن مولکولی گونه تماشایی (۲۶ کیلودالتون) و کمتر از وزن مولکولی گونه‌های افغانستانی (۳۷ کیلودالتون) و نوریجیانوم (۳۸ کیلودالتون) بود (آریفخودژائف و همکاران ۱۹۹۹؛ کوربانوا و همکاران ۲۰۰۳؛ جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱). انجام مقایسه وزن مولکولی چوبک



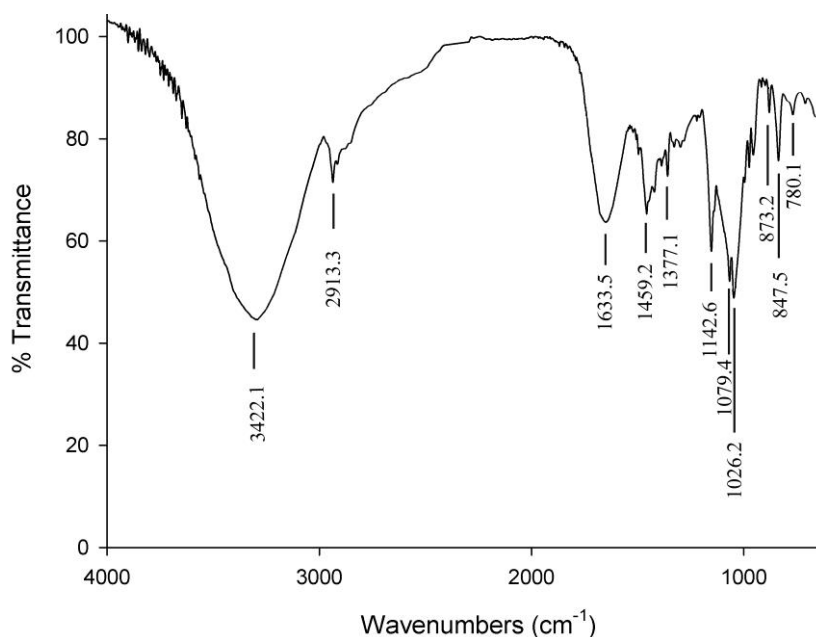
شکل ۲- کروماتوگرام پلی‌ساکارید خالص با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوا با کارایی بالا

### درجهٔ چرخش نوری و طیف مادون قرمز

درجهٔ چرخش نوری پلی‌ساکارید خالص با دستگاه پلاریومتر اندازه‌گیری و مقدار  $[\alpha]_D^{20} + 178/5^\circ$  محاسبه شد که بیانگر وجود سهم زیاد اتصالات نوع  $\alpha$  نسبت به نوع  $\beta$  در ساختار پلی‌ساکارید خالص است. لذا می‌توان اینطور استنباط کرد که واحدهای مونومری گالاکتوز که بخش اعظم اسکلت ساختاری پلی‌ساکارید خالص را تشکیل می‌دهند اغلب از طریق اتصالات نوع  $\alpha$  به هم متصل شده‌اند. بمنظور شناسایی نوع گروه‌های عاملی موجود در ساختار پلی‌ساکارید خالص، طیف مادون قرمز آن در محدودهٔ ۴۰۰ تا ۴۰۰۰  $\text{cm}^{-1}$  مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص پیک کشیدهٔ بزرگی را در محدودهٔ  $3422/1 \text{ cm}^{-1}$  نشان داد که مربوط به گروه‌های هیدروکسیل (OH) است. پیک در محدودهٔ  $2913/3 \text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهندهٔ اتصالات (C-H) کربن شماره ۶ واحدهای قندی و پیک در محدودهٔ  $1633/5 \text{ cm}^{-1}$  آب پیوسته را نشان می‌دهد. جذب‌های مربوط به ارتعاشات C-H در ساختار حلقه‌ها در محدودهٔ  $1459/2 \text{ cm}^{-1}$  و  $1377/1 \text{ cm}^{-1}$  به صورت دو پیک مجزا مشخص

شده است. طیف در ناحیهٔ  $1142/6 \text{ cm}^{-1}$  بیانگر اتصالات اتری یا گلیکوزیدی (C-O-C) است و وجود سیگنال در ناحیهٔ  $1079/4 \text{ cm}^{-1}$  و  $1026/2 \text{ cm}^{-1}$  بیانگر ارتعاشات کششی مربوط به اتصال الکی (C-O-H) است. وجود سیگنال بزرگ‌تر در محدودهٔ  $847/5 \text{ cm}^{-1}$  (مربوط به اتصالات نوع  $\alpha$ ) نسبت به سیگنال کوچک‌تر در محدودهٔ  $873/2 \text{ cm}^{-1}$  (مربوط به اتصالات نوع  $\beta$ ) بیانگر وجود سهم بیشتر اتصالات نوع  $\alpha$  نسبت به نوع  $\beta$  در ساختار کل قندهاست که نتایج حاصل از درجهٔ چرخش نوری  $+178/5^\circ$  را تایید می‌کرد. عدم مشاهدهٔ جذب در نواحی  $(1740-1700) \text{ cm}^{-1}$  و  $(2400-2200) \text{ cm}^{-1}$  بیانگر عدم وجود پروتئین (اسیدهای نوکلئیک) در ساختار پلی‌ساکارید خالص بود که با نتایج حاصل از آزمون فرابنفش مطابقت داشت. پیک در ناحیهٔ  $780/1 \text{ cm}^{-1}$  بیانگر وجود حلقه‌های پیرانوزی در ساختار پلی‌ساکارید خالص است لذا می‌توان نتیجه گرفت پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه‌های چوبک کرک غده-ی از واحدهای مونومری با حلقه‌های پیرانوزی و هر دو شکل آنومری  $\alpha$  و  $\beta$  تشکیل شده است.





شکل ۳- طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه گیاه چوبک کرک غده‌ای

جدول ۱- نتایج حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص

نسبت‌های مولی					فراکشن ها
مانوز	آرابینوز	گالاکتوز	گلوکز	گلیسرول	
		۱/۰۰			هیدرولیز ناقص اسیدی
		۱/۰۰			پلی ساکارید ۱
		۱/۰۰			پلی ساکارید ۲
۰/۹۷	۱/۰۰		۳/۱۴		پلی ساکارید ۳
۰/۹۹	۱/۰۰		۳/۰۸		پلی ساکارید ۴
					محصولات اکسیداسیون پرپودات
	۱/۰۰	۴/۰۴	۲/۹۸	۱۲/۸۲	هیدرولیز کامل اسیدی
					تجزیه اسمیت
	۱/۰۰	۳/۹۶	۳/۱۱	۱۲/۳۱	خارج از کیسه دیالیز
					رسوب در کیسه دیالیز

پلی ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)

پلی ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)

پلی ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز)

پلی ساکارید ۴ (فراکشن بیرون از کیسه دیالیز)

## هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت

چهار فراکشن پلی‌ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)، پلی‌ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)، پلی‌ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز) و پلی‌ساکارید ۴ (فراکشن بیرون از کیسه دیالیز) پس از انجام هیدرولیز ناقص اسیدی از پلی‌ساکارید خالص، بازیافت شدند و در ادامه پس از هیدرولیز کامل با اسید تری فلورواستیک توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی جهت شناسایی واحدهای مونومری سازنده مورد آنالیز قرار گرفتند. جدول ۱ نشان می‌دهد که واحدهای مونومری گالاکتوز در پلی-ساکاریدهای ۱ و ۲ و واحدهای مونومری مانوز، گلوکز و آرابینوز در پلی‌ساکاریدهای ۳ و ۴ وجود دارند. با تکیه بر این نتایج می‌توان استنباط کرد که واحدهای گالاکتوز سازنده اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص هستند و واحدهای مونومری مانوز، گلوکز و آرابینوز در شاخه‌های جانبی پلی‌ساکارید خالص قرار گرفته‌اند. نتایج حاصل از آزمون اکسیداسیون پریودات بیانگر مصرف ۱/۱۹ مول پریودات و تولید ۰/۵۴ مول اسید فرمیک بود لذا می‌توان استنباط کرد که سهم اتصالات نوع ۱ → ۱ یا (۱ → ۶) در ساختار پلی‌ساکارید خالص بالاست. مقدار پریودات مصرف شده در حدود ۲ برابر تولید اسیدفرمیک بود لذا می‌توان نتیجه گرفت اتصالاتی مانند (۱ → ۴) یا (۱ → ۲) و مشتقات آن‌ها در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود ندارند یا مقدار آن‌ها کم است درحالی‌که اتصالاتی مانند (۱ → ۳) و مشتقات آن مانند (۱ → ۴، ۳) و (۱ → ۶، ۳) با سهم نسبتاً بالایی در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود دارند. نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات پس از انجام هیدرولیز کامل (جدول ۱)، نشان دهنده حضور گلوکز، گالاکتوز، آرابینوز، وجود مقادیر قابل توجهی گلیسرول و عدم حضور مانوز بود. عدم حضور مانوز بیانگر این واقعیت است که تمامی واحدهای مانوز دارای اتصالاتی نظیر ۱ → ۱، (۱ → ۴)،

(۱ → ۶)، (۱ → ۲)، (۱ → ۴، ۶)، (۱ → ۶، ۳) و (۱ → ۲، ۶) بوده و فاقد اتصالات (۱ → ۳) هستند. از طرف دیگر حضور گلوکز، گالاکتوز، آرابینوز نشان می‌دهد که برخی از واحدهای مونومری نامبرده دارای اتصالاتی هستند که نمی‌توانند توسط پریودات اکسید شوند مانند (۱ → ۳)، (۱ → ۶، ۳)، (۱ → ۴، ۳) و (۱ → ۲، ۲). وجود مقادیر قابل توجه گلیسرول بیانگر وجود تعداد زیاد اتصالات نوع ۱ → ۱ یا (۱ → ۶) در ساختار پلی‌ساکارید خالص است (ایشروود و همکاران ۲۰۰۱؛ جوشی و کاپور ۲۰۰۳؛ کائو و همکاران ۲۰۰۶).

عدم مشاهده رسوب در کیسه دیالیزی نتایج حاصل از تجزیه اسمیت (جدول ۱) بیانگر اکسیدشدن کامل اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص توسط پریودات است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اسکلت اصلی پلی-ساکارید خالص چوبک کرک غده‌ای، اتصالاتی نظیر (۱ → ۴)، (۱ → ۲)، (۱ → ۶)، (۱ → ۶)، ۱ → ۱، (۱ → ۲، ۶) و (۱ → ۴، ۶) دارد (تانگ و همکاران ۲۰۰۸؛ سون و همکاران ۲۰۱۰).

### متیله کردن پلی‌ساکارید خالص

جدول ۲، هشت ترکیب متفاوت حاصل از نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی پلی‌ساکارید خالص را نشان می‌دهد. این ترکیبات پس از شناسایی عبارت بودند از: ۲، ۳، ۴، ۶- تترا متیل مانوز، ۲، ۳، ۴، ۶- تترا متیل گلوکز، ۲، ۳، ۴، ۶- تری متیل گالاکتوز، ۲، ۳، ۴- دی متیل گالاکتوز، ۲، ۳، ۴- تری متیل آرابینوز و ۲، ۳، ۴- دی متیل آرابینوز که به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱/۹۶، ۳/۰۵، ۳/۱۳، ۶/۲۴، ۱/۹۲، ۴/۰۱، ۱/۱۲ و ۱/۳۱ در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص چوبک کرک غده‌ای از واحدهای گالاکتوز با اتصالات (۱ → ۶)، (۱ → ۶، ۳) و (۱ → ۶، ۲) تشکیل شده است. نتایج حاصل از متیله کردن، نتایج قبلی حاصل از نسبت واحدهای مونومری سازنده پلی‌ساکارید خالص و نیز نتایج حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون

مولی واحدهای مانوز، گلوکز و آرابینوز با اتصال  $1 \rightarrow$  برابر است لذا می توان نتیجه گرفت شاخه‌های فرعی پلی ساکارید خالص تماماً توسط واحدهای مانوز، گلوکز و آرابینوز به انتها می‌رسند. مقدار درصد انشعاب پلی- ساکارید چوبک کرک غده‌ای با مراجعه به جدول ۲ حدود ۲۶٪ برآورد شد.

پریودات و تجزیه اسمیت را تأیید کرد. این نتایج همچنین نشان داد که اشکال حلقوی فورانوزی (۵ ضلعی) در ساختار وجود ندارد و تمامی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص دارای اشکال پیرانوزی (۶ ضلعی) هستند (مورالیک ریشنا و راثو ۲۰۰۷). مجموع نسبت‌های مولی واحدهای گالاکتوز با اتصالات (۱ $\rightarrow$ ۶،۳) و (۱ $\rightarrow$ ۶،۲) با مجموع نسبت‌های

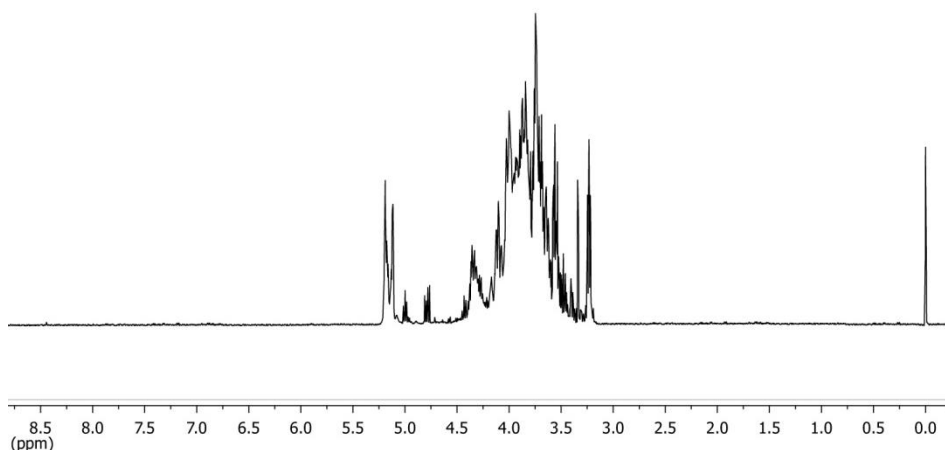
جدول ۲- نتایج GC-MS آنالیز متیلاسیون پلی ساکارید خالص

نوع اتصال	فراگمت‌های جرمی (m/z)	نسبت مولی	قند متیله شده
Manp-(1 $\rightarrow$ )	۴۳،۴۵،۷۱،۸۷،۱۰۱،۱۱۷،۱۲۹،۱۴۵،۱۶۱،۲۰۵	۱/۹۶	۳، ۴، ۶- تترا متیل مانوز
GlcP-(1 $\rightarrow$ )	۲۰۵،۱۶۱،۱۴۵،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۷۱،۴۵،۴۳	۳/۰۵	۳، ۴، ۶- تترا متیل گلوکز
GlcP-(1 $\rightarrow$ )-3 $\rightarrow$	۲۷۷،۲۳۳،۱۶۱،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۷۱،۴۵،۴۳	۳/۱۳	۲، ۴، ۶- تری متیل گلوکز
Galp-(1 $\rightarrow$ )-6 $\rightarrow$	۲۳۳،۱۸۹،۱۶۱،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۹۹،۸۷،۴۳	۶/۲۴	۲، ۳، ۴- تری متیل گالاکتوز
Galp-(1 $\rightarrow$ )-2,6 $\rightarrow$	۲۳۳،۱۸۹،۱۲۹،۹۹،۸۷،۴۳	۱/۹۲	۳، ۴- دی متیل گالاکتوز
Galp-(1 $\rightarrow$ )-3,6 $\rightarrow$	۱۸۹،۱۲۹،۱۱۷،۸۷،۴۳	۴/۰۱	۲، ۴- دی متیل گالاکتوز
Arap-(1 $\rightarrow$ )	۱۶۱،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۴۳	۱/۱۲	۲، ۳، ۴- تری متیل آرابینوز
Arap-(1 $\rightarrow$ )-3 $\rightarrow$	۲۳۳،۲۰۱،۱۷۴،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۵۹،۴۳	۱/۳۱	۲، ۴- دی متیل آرابینوز

آنومری  $\beta$ -L-آرابینوپیرانوز،  $\alpha$ -D-مانوپیرانوز،  $\alpha$ -D-گلوکوپیرانوز و  $\alpha$ -D-گالاکتوپیرانوز است (آریفخودژائف و همکاران ۱۹۹۹؛ آریفخودژائف و همکاران ۲۰۰۳؛ کوربانوا و همکاران ۲۰۰۳؛ جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱). این نتایج با نتایج حاصل از طیف مادون قرمز نمونه‌ها که بیانگر وجود هر دو نوع اتصالات  $\alpha$  و  $\beta$  در ساختار پلی ساکارید خالص بود مطابقت داشت.

### آزمون رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون و کربن

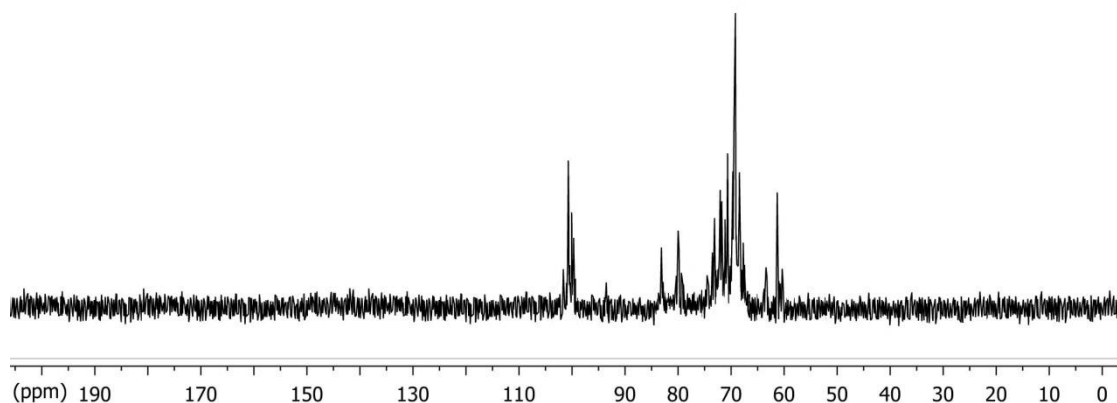
از طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون و کربن پلی ساکارید خالص برای تکمیل فرایند تعیین ساختار پلی ساکارید خالص حاصل از ریشه‌های چوبک کرک غده‌ای استفاده شد. شکل ۴ طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون پلی ساکارید خالص را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، وجود سیگنال در نواحی ۸۵/۴، ۵/۰۵، ۵/۱۶ و ۵/۲۱ ppm به ترتیب نشان‌دهنده پروتون‌های



شکل ۴- طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون پلی‌ساکارید خالص

مونوساکاریدی تشکیل دهنده پلی‌ساکارید خالص است زیرا حلقه‌های فورانوزی واحدهای مونومری نامبرده در نواحی بالاتر از ۱۰۵ ppm ظاهر می‌شود. این نتایج با نتایج حاصل از طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص و نیز آزمون متیله کردن مطابقت داشت. سیگنال‌های مربوط به سایر کربن‌ها در جدول ۳ آمده است.

شکل ۵ طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های کربن پلی-ساکارید خالص را نشان می‌دهد. وجود سیگنال در نواحی ۹۴، ۱۰۰، ۱۰۱ و ۱۰۲ ppm به ترتیب نشان‌دهنده کربن‌های آنومری  $L-\beta$ -آرابینوپیرانوز،  $D-\alpha$ -گلوکوپیرانوز،  $D-\alpha$ -گالاکتوپیرانوز و  $D-\alpha$ -مانوپیرانوز است. سیگنال‌های ذکر شده بیانگر وجود اشکال حلقوی پیرانوزی در ساختار تمام واحدهای



شکل ۵- طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های کربن-۱۳ پلی‌ساکارید خالص

نشان می‌دهند (آریفخودژائف و همکاران ۱۹۹۹؛ آریفخودژائف و همکاران ۲۰۰۳؛ کوربانوا و همکاران ۲۰۰۳؛ جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱). نتایج حاصل از این بخش با نتایج حاصل از تعیین درجه چرخش‌نوری و طیف مادون قرمز که نشان می‌داد مقادیر زیادی از

سیگنال در ناحیه ۶۹/۶ ppm کربن شماره ۶ گالاکتوز را در محل اتصال و سیگنال در نواحی ۷۹/۸ و ۸۰/۲ ppm به ترتیب کربن‌های شماره ۲ و ۳ گالاکتوز را در محل اتصال به شاخه‌های فرعی نشان می‌دهند. بعلاوه وجود سیگنال در نواحی ۷۴/۵ و ۸۲/۸ ppm به ترتیب کربن-های شماره ۳ آرابینوز و گلوکز را در محل اتصال



اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، آنالیز متیله کردن، طیف مادون قرمز و طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون و کربن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که واحدهای مونومری گالاکتوز سازنده اسکلت اصلی ساختار پلی‌ساکارید خالص هستند و واحدهای مونومری گلوکز، آرابینوز و مانوز در شاخه‌های فرعی قرار گرفته‌اند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که پلی‌ساکارید غالب حاصل از ریشه‌های چوبک کرک غده‌ای یک پلی‌ساکارید منشعب است. با توجه به کاربرد گسترده پلی‌ساکاریدها در صنایع مختلف، پلی‌ساکارید حاصل از ریشه گیاه چوبک کرک غده‌ای نیز می‌تواند به عنوان یک منبع جدید جهت استفاده در صنایع وابسته مورد استفاده قرار گیرد. لذا انجام مطالعات تکمیلی جهت کاربرد این پلی‌ساکارید در صنایع مختلف از جمله صنعت غذا و نیز صنایع دارویی و بهداشتی ضروری به نظر می‌رسد.

#### تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه صنعتی شاهرود به علت کمک‌های مادی و معنوی صورت گرفته در راستای انجام پایان نامه کارشناسی ارشد با کد ۶۲۰۳ تشکر و قدردانی می‌گردد.

سه گونه خراسانی، افغانستانی و تماشایی که اتصال گلوکز به زنجیر اصلی از نوع (۱→۲) است در چوبک کرک غده‌ای اتصال واحدهای گلوکز به یکدیگر و نیز به زنجیر اصلی پلی‌ساکارید از نوع (۱→۳) است. در تمام گونه‌های مورد بررسی گالاکتوز سازنده اسکلت اصلی پلی‌ساکارید است و سایر واحدهای مونومری به آن متصلند (آریفخودژائف و همکاران ۱۹۹۹؛ آریفخودژائف و همکاران ۲۰۰۳؛ کوربانوا و همکاران ۲۰۰۳؛ جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱).

#### نتیجه گیری

در این پژوهش جداسازی و تعیین ساختار پلی‌ساکارید غالب موجود در ریشه‌های گیاه چوبک کرک غده‌ای مورد بررسی قرار گرفت. استخراج پلی‌ساکارید با آب داغ صورت گرفت و از ستون‌های کروماتوگرافی سلولزی و سفادکس برای خالص سازی پلی‌ساکارید استفاده شد و در نهایت پلی‌ساکارید خالص جدا گردید. پلی‌ساکارید خالص فاقد پروتئین و اسیدهای نوکلئیک بود و درصد قند بالایی داشت. نتایج آنالیز شناسایی واحدهای مونومری سازنده نشان داد که از واحدهای گالاکتوز، گلوکز، آرابینوز و مانوز تشکیل شده است و مونومر غالب سازنده آن گالاکتوز است. ساختار پلی-ساکارید خالص توسط تلفیقی از روش‌های آنالیز شیمیایی و دستگاهی مانند هیدرولیز ناقص اسیدی،

#### منابع مورد استفاده

- جهان بین ک، ۱۳۹۰. استخراج، شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکاریدهای محلول در آب حاصل از ریشه گیاه چوبک تماشایی. پایان نامه دکتری تخصصی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.
- جهان بین ک و بیگی م، ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی ساختار گلوکومانان موجود در ریشه گیاه سریش ایرانی ( *Eremurus persicus*). مجله علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۱۴، شماره ۶۳. صفحه‌های ۲۷۷ تا ۲۸۸.
- قهرمان ا، ۱۳۷۹. فلور رنگی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.
- مظفریان و، ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر.
- Arifkhodzhaev A, Kurbanova A and Rakhimov D, 1999. Polysaccharides of saponin-bearing plants XI. An investigation of the polysaccharides of *Acanthophyllum knorringtonianum*. *Chemistry of Natural Compounds* 35(2): 150-151.

- Arifkhodzhaev AO, Kurbanova AD, Rakhimov DA and Shashkov AS, 2003. Polysaccharides of Saponin-Bearing Plants. XIV. Structural Study of Glucoarabinogalactan from *Acanthophyllum pungens* Roots. *Chemistry of Natural Compounds* 39(2): 154-157.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Cao W, Li X-Q, Liu L, Wang M, Fan H-T, Li C, Lv Z, Wang X and Mei Q, 2006. Structural analysis of water-soluble glucans from the root of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Carbohydrate Research* 341(11): 1870-1877.
- Chaplin MF and Kennedy JF, 1994. *Carbohydrate Analysis. A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F, 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Gaidi G, Miyamoto T, Ramezani M and Lacaille-Dubois M-A, 2004. Glandulosides A–D, Triterpene Saponins from *Acanthophyllum glandulosum*. *Journal of Natural Products* 67(7): 1114-1118.
- Ishrud O, Zahid M, Ahmad VU and Pan Y, 2001. Isolation and Structure Analysis of a Glucomanan from the Seeds of Libyan Dates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 3772-3774.
- Jahanbin K, Gohari AR, Moini S, Emam-Djomeh Z and Masi P, 2011. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* roots. *International Journal of Biological Macromolecules* 49(4): 567-572.
- Jiang H, Wang J, Zhou A, Xie G, Yan L, Jiang Y, Chen J, Shen Y and Chen J, 2013. Purification, characterization and antiviral activity of two heteropolysaccharides from *Duchesnea Indicae*. *International Journal of Biological Macromolecules* 58: 287-295.
- Joshi H and Kapoor VP, 2003. *Cassia grandis* Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. *Carbohydrate Research* 338(18): 1907-1912.
- Kurbanova AD, Arifkhodzhaev AO, Rakhimov DA and Shashkov AS, 2003. Polysaccharides of Saponin-Bearing Plants. XV. Structure of Glucoarabinogalactan from *Acanthophyllum Borszczowii* Roots. *Chemistry of Natural Compounds* 39(5): 438-441.
- Muralikrishna G and Rao MVSSTS, 2007. Cereal Non-Cellulosic Polysaccharides: Structure and Function Relationship—An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(6): 599 - 610.
- Phillips GO and Williams PA, 2009. *Handbook of hydrocolloids* (2 edition ed.). CRC press.
- Ray B, 2006. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. *Carbohydrate Polymers* 66(3): 408-416.
- Rees DA, Scott WE and Williamson FB, 1970. Correlation of Optical Activity with Polysaccharide Conformation. *Nature* 227: 390.
- Staub AM, 1965. Removal of protein – Sevag method. Pp. 5-6. In: Whistler RL, Bemiller JN and Wolfrom ML (eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*: Academic Press.
- Stephen AM, Phillips GO and Williams PA, 2006. *Food polysaccharides and their applications* (Second edition ed.). CRC press.
- Sun L, Feng K, Jiang R, Chen J, Zhao Y, Ma R and Tong H, 2010. Water-soluble polysaccharide from *Bupleurum chinense* DC: Isolation, structural features and antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers* 79(1): 180-183.
- Tong H, Liang Z and Wang G, 2008. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. *Carbohydrate Polymers* 71(2): 316-323.
- Yu Z, Liu L, Xu Y, Wang L, Teng X, Li X and Dai J, 2015. Characterization and biological activities of a novel polysaccharide isolated from raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruits. *Carbohydrate Polymers* 132: 180-186.
- Zhang L, Zhang W, Wang Q, Wang D, Dong D, Mu H, Ye X-S and Duan J, 2015. Purification, antioxidant and immunological activities of polysaccharides from *Actinidia Chinensis* roots. *International Journal of Biological Macromolecules* 72: 975-983.

## Extraction, purification and structural elucidation of the main water-soluble polysaccharide isolated from *Acanthophyllum glandulosum* roots

M Molaveisi<sup>1</sup> and K Jahanbin<sup>2\*</sup>

Received: April 12, 2017 Accepted: January 5, 2018

<sup>1</sup>MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

\*Corresponding author: E mail: Jahanbin@shahroodut.ac.ir

### Abstract

A new water-soluble polysaccharide with molecular weight of 35.2 KDa and a specific optical rotation of +178.5° was extract by hot water (80°C) from the roots of *Acanthophyllum glandulosum*. The polysaccharide purified through DEAE-cellulose and Sephadex G-50 columns and the main fraction was collected and freeze-dried. Total yields of purified polysaccharide were 3.4% and %2.3 respectively. The purified polysaccharide had no absorption at 280 nm (Detected by UV spectrum), indicating the absence of protein and nucleic acid. Total carbohydrate content of purified polysaccharide was 98.2%. Monosaccharide analysis by GC revealed that polysaccharide was composed of Glucose, Galactose, Arabinose and Mannose with a relative molar ratio of 2.9:6.1:0.9:1.0 respectively. Its structural features were elucidated by a combination of chemical and analytical methods such as Methylation, Periodate Oxidation and Smith degradation, Partial acid hydrolysis, FT-IR and <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. The data obtained indicate that purified polysaccharide possessed a backbone of α-(1→6)-linked Galactose with branched attached to O-2 by α-1→linked Mannose and at O-3 by α-(1→3)-linked Glucose and α-(1→3)-linked Arabinose.

**Keywords:** Extraction, Polysaccharide, *Acanthophyllum glandulosum*, Purification, Structural Characterization