Archive of SID

نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۸ شماره ۲/ سال ۱۳۹۷/ صفحات ۸۵ تا ۱۰۰

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

محمد ملاویسی[۱] و کامبیز جهان بین[۲*]

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

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
[۲] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
* مسئول مکاتبه: Email: Jahanbin@shahroodut.ac.ir

چکیده

پلی‌ساکارید محلول در آب جدیدی با وزن مولکولی ۳۵/۲ کیلودالتون و درجهٔ چرخش نوری °۱۷۸/۵+ توسط آب داغ °۸۰C از ریشه‌های گیاه چوبک کرک غده‌ای استخراج شد. خالص‌سازی پلی‌ساکارید با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز و سفادکس جی-۵۰ انجام گرفت و فراکشن غالب (پلی‌ساکارید خالص) جمع آوری و به روش انجمادی خشک شد. راندمان استخراج پلی‌ساکارید ناخالص و خالص به ترتیب ۳/٤٪ و ۲/۳٪ بود. مقدار قند کل پلی‌ساکارید خالص ۹۸/۲٪ بود و جذبی در ناحیهٔ ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش نداشت که عدم حضور پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار آن را نشان داد. نتایج آنالیز واحدهای مونوساکاریدی سازندهٔ پلی‌ساکارید خالص با دستگاه کروماتوگرافی گازی نشان داد که از واحدهای مونومری گلوکز گالاکتوز، آرابینوز و مانوز به ترتیب با نسبت-های مولی ۲/۹، ٦/۱، ۰/۹ و ۱ تشکیل شده است. شناسایی ساختار پلی‌ساکارید 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 (۱→٦)α اسکلت اصلی ساختار پلی‌ساکارید خالص را تشکیل می‌دهند. واحدهای گالاکتوز در نقاطی از زنجیر اصلی از محل کربن‌های شمارهٔ ۲ و ۳ خود دارای انشعاب بوده و شاخه‌ها توسط واحدهای مونوساکاریدی گلوکز، آرابینوز و مانوز به انتها می‌رسند.

واژگان کلیدی: استخراج، پلی‌ساکارید، چوبک کرک *غده‌ای*، خالص‌سازی، شناسایی ساختار

مقدمه

پلی‌ساکاریدها دسته‌ای از هیدروکلوئیدها هستند که از اتصال واحدهای مونوساکاریدی به یکدیگر با پیوندهای گلیکوزیدی حاصل می‌شوند. این پلیمرهای زیستی در ساختار خود حاوی تعداد کم یا زیاد واحدهای مونوساکارید با ساختار خطی، منشعب یا حلقوی (سیکلوآمیلوزها) هستند. ممکن است پلی‌ساکاریدها در داخل سلول‌های زنده توسط اتصالات کووالانسی در

www.SID.ir

Archive of SID

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 چندهزار تا چندمیلیون دالتون متغییر است (استفن و همکاران ۲۰۰۶؛ فیلیپس و ویلیام ۲۰۰۹؛ ژانگ و همکاران ۲۰۱۵).

پلی‌ساکاریدهانقش اساسی در پایدارسازی و بهبود خواص جریانی و حسی مواد غذایی دارند لذا شناخت دقیق ساختار و ویژگی‌های آنها از هر دوجنبه 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 خالص سازی شوند. از این رو استخراج و خالص سازی پلی‌ساکاریدها از منابع جدید همیشه مورد توجه پژوهشگران مختلف بوده است. پلی-ساکاریدها از منابع مختلفی استحصال می‌شوند که می-توان 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 کم ضرر 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[1] به خانواده میخک[2] تعلق دارد و تا کنون ٦١ 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 گونهٔ ثبت شده از این گیاه متعلق به استان خراسان است (مظفریان ۱۳۷۵). چوبک کرک *غده‌ای* (نکائی)[3] 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 کف کننده 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 ٦١ 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 ٤ گونه تماشایی[4]، افغانستانی[5]، خراسانی[6] و نورینجیانوم[7] است (آریفخودژائف و همکاران ۱۹۹۹؛ آریفخودژائف و همکاران ۲۰۰۳؛ کوربانوا و همکاران ۲۰۰۳؛ جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱). در ارتباط با پلی-

[1] Acanthophyllum C. A. Mey
[2] Caryophyllaceae
[3] A. glandulosum
[4] Bracteatum
[5] Pungens
[6] Borszczowii
[7] Knorringianum

www.SID.ir

Archive of SID

ساکاریدهای موجود در ریشهٔ چوبک کرک *غده‌ای* مطالعه‌ای صورت نگرفته است و تنها ساپونین موجود در آن بررسی شده است (گایدی و همکاران ۲۰۰٤).
بعلت 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 هرنوع 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 ریشهٔ گیاه چوبک کرک *غده‌ای* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری ریشهٔ گیاه و مواد مورد استفاده

ریشهٔ گیاه چوبک کرک *غده‌ای* در خرداد ماه ۱۳۹۳ از منطقهٔ قوچان واقع در استان خراسان رضوی جمع آوری شد و شناسایی گونهٔ گیاه توسط دکتر ولی الله 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 پوستهٔ بیرونی آنها بوسیلهٔ 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)، از شرکت فارماسیا[1](اُپسالا[2] سوئد) خریداری شدند. دی‌متیل سولفوکساید[3] و استاندارد مونوساکاریدهای خالص، از شرکت سیگما (آمریکا) و سدیم ۲،۲ دی متیل، 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 پلی ساکاریدها از ریشه‌های گیاه، ابتدا ریشه‌های خُرد شده با استفاده از اتانول ۹۵٪ در دمای جوش به مدت ۹ ساعت تیمار شد و جهت افزایش کارآیی 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 ریشه-های گیاهی تیمار شده صاف و در مجاورت با هوا خُشک شدند.
پلی ساکاریدهای محلول در آب از ریشهٔ 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 کنندهٔ تحت خلأ تغلیظ گردید. در ادامه پروتئین‌ها از عصارهٔ آبی توسط روش سواگ (استفاده از ۱-بوتانول و کلروفرم و سانتریفیوژ کردن محلول نهایی) حذف شدند (استاب ۱۹٦۵). جداسازی پلی ساکاریدها با افزودن اتانول مطلق به عصارهٔ آبی پروتئین‌زدایی شده (۱:۳) و نگهداری در دمای یخچال به مدت ۲٤ ساعت و سپس سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون حاصل انجام شد. رسوبات حاصل (پلی‌ساکاریدهای محلول در آب) روی

[1] Pharmacia
[2] Uppsala
[3] Dimethyl sufoxide (DMSO)

www.SID.ir

Archive of SID

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 جداشده، 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 ۰/٤٥ میکرومتر عبور داده شد. سپس محلول پلی‌ساکاریدی خام وارد ستون کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز (۲/٦ سانتیمتر × ٤۰ 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 ۱۹٥٦).

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 (۱/٦ سانتیمتر × ۷۰ سانتیمتر) شدند. شستشوی ستون سفادکس جی-۵۰ توسط آب یون‌زدایی شده با سرعت جریان حجمی ۹ میلی لیتر 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 سازندهٔ پلی‌ساکارید خالص

مقدار پروتئین با استفاده از روش برادفورد (با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی) تعیین گردید (برادفورد ۱۹۷٦) و برای اندازه‌گیری قند کل از روش فنل- اسیدسولفوریک (با استفاده از استاندارد D-گلوکز در طول موج ٤۹۰ نانومتر) استفاده شد (دبویس و همکاران ۱۹٥٦). شناسایی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید خالص و تعیین کمی آنها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل واریان ۳٤۰۰ (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 ۱۲۰ °C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای ۲٥۰ °C (با نرخ ۸ °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 ۲٥۰ °C و ۳۰۰ °C بود. آماده‌سازی نمونه و تبدیل آن به استات‌های آلدیتول مونوساکاریدهای سازنده با استفاده از روش چاپلین و کندی (۱۹۹٤) انجام گرفت و از میواینوزیتول[1] 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 چرخش‌نوری با استفاده از دستگاه پلاریمتر پرکین المر[2] ۳٤۳ (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد و اندازه گیری وزن مولکولی پلی‌ساکارید خالص توسط دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوا با کارآیی بالا مدل شیمادزو[3] 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 ۰/٦ 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

[1] Myo-inositol
[2] Perkin-Elmer
[3] Shimadzu

www.SID.ir

Archive of SID

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

طیف فرابنفش و مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص

طیف فرابنفش جهت پی بردن به وجود پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید با اندازه-گیری جذب محلول پلی‌ساکارید خالص در ناحیه ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر واریان کری ۱۰۰- بیو[1](ساخت کشور آمریکا) و طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص جهت پی بردن به نوع گروه های عاملی با استفاده از طیف‌سنج مادون قرمز مدل نیکولت[2] ۵۷۰۰ (مدیسون،[3] آمریکا) پس از تشکیل قرص یک میلی‌متری از مخلوط پودر برومور پتاسیم با پلی-ساکارید خالص برحسب فرکانس در محدوده ۴۰۰۰- ۴۰۰ cm^{-1} حاصل شد (رای ۲۰۰۶).

هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی‌ساکارید خالص

از روش تانگ و همکاران (۲۰۰۸) برای انجام هیدرولیز ناقص اسیدی پلی‌ساکارید خالص استفاده شد. بطور خلاصه، ۸۰ میلی‌گرم پلی‌ساکارید خالص با ۳۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ مولار اسید تری‌فلورواستیک (دمای $^{\circ}C$ ۸۰ به مدت ۱۶ ساعت) هیدرولیز شد و پلی‌ساکارید هیدرولیز شده جهت حذف رسوبات سانتریفوژ گردید. رسوبات جداشده تحت عنوان پلی‌ساکارید ۱ نامگذاری شدند. سیال رویی به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد و در انتها فراکشن جداشده 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 پلی‌ساکارید ۲ و ۳ نامگذاری شدند. تمامی فراکشن‌ها پس از خشک‌شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مطابق آنچه در بخش شناسایی واحدهای مونومری سازندهٔ پلی‌ساکارید خالص عنوان شد، آنالیز شدند.

جهت انجام آزمایش اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، ۲۰ میلی‌گرم پلی‌ساکارید خالص توسط محلول ۰/۰۴ مولار پریودات سدیم (۲۵ میلی‌لیتر) 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 پریودات‌سدیم مازاد با افزودن اتیلن‌گلیکول 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 میلی‌گرم بروهیدرید سدیم (دمای $^{\circ}C$ ۲۵ به مدت ۱۲ ساعت) خنثی گردید. در نهایت هیدرولیز کامل توسط محلول ۲ مولار اسید تری‌فلورواستیک انجام شد و محصولات حاصل پس از استیله شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی، مطابق آنچه در بخش شناسایی واحدهای مونومری سازندهٔ پلی‌ساکارید خالص عنوان شد، آنالیز شدند (جهان‌بین و همکاران ۲۰۱۱).

متیله کردن پلی‌ساکارید 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 تری‌فلورواستیک 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 $^{\circ}C$ 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 موئینه

[1] Varian Cary 100-Bio
[2] Nicolet
[3] Madison

www.SID.ir

Archive of SID

کوارتزی (۲۵ متر × ۰/۲۲ میلی‌متر × ۰/۲ میکرومتر) مجهز بود. دمای ستون در $^{\circ}C$ ۱۱۰ (مدت ۲ دقیقه) ثابت ماند و سپس تا $^{\circ}C$ ۲۷۰ (با نرخ $^{\circ}C$ ۱۵ بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ٤٠ 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-۱۳در دمای $^{\circ}C$ ۲۷ 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٪/۹) بین دو قطب مغناطیس دستگاه قرار گرفت و تغییرات ایجاد شده توسط دستگاه طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای، در مقاسیه 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 ($^{\circ}C$ ۸۰)، 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 خالص سازی و همگن شدن آن به ترتیب از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولز و سفادکس جی-۵۰ استفاده شد. در نهایت فراکشن 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 ۳/٤٪ و ۲/۳٪ بود. رنگ پلی‌ساکارید خالص کاملا سفید بود که به آزمون برادفورد پاسخ منفی داد و فاقد جذب در نواحی ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش بود که بیانگر عدم حضور پروتئین و اسیدنوکلئیک در ساختار پلی‌ساکارید خالص و کارآمد بودن روش خالص سازی مورد استفاده است. پودر پلی-ساکارید خالص حاصل در آنالیزهای شیمیایی و دستگاهی برای تعیین ساختار مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

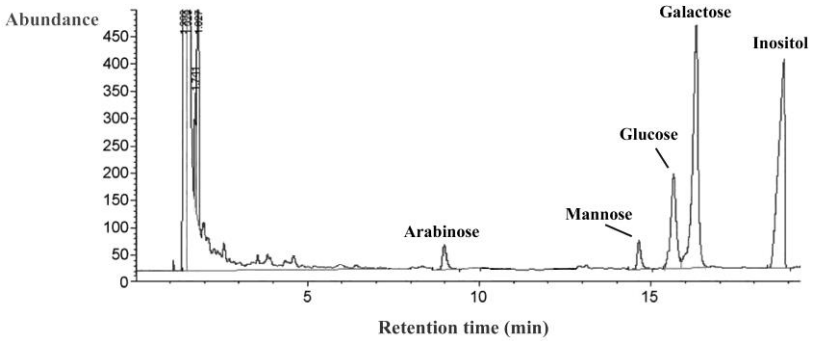
تعیین مقدار قند کل و شناسایی واحدهای سازندهٔ پلی‌ساکارید خالص

مقدار قند کل پلی‌ساکارید خالص پس از اندازه‌گیری با روش فنل- اسیدسولفوریک، ۹۸/۲٪ محاسبه شد که دلالت بر درجهٔ خلوص بسیار بالای پلی‌ساکارید حاصل از ریشه‌های گیاه چوبک کرک *غده‌ای* داشت. بمنظور شناسایی واحدهای مونوساکاریدی سازندهٔ پلی‌ساکارید خالص و تعیین کمی آنها، پلی‌ساکارید توسط اسید تری‌فلورواستیک به واحدهای مونوساکاریدی سازندهٔ 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 ٦/۱، ۲/۹، ۰/۹ و ۱ تشکیل شده است لذا پلی‌ساکارید خالص ریشهٔ گیاه چوبک کرک *غده‌ای* یک گلوکو گالاکتان است. مقایسه نتایج حاصل از نوع و نسبت‌های مولی واحدهای

www.SID.ir

Archive of SID

مونومری سازنده پلی‌ساکارید خالص چوبک *کرک غده‌ای* با سه گونه نورینجیانوم، تماشایی و خراسانی نشان می‌دهد که تنها گونهٔ حاوی مونوساکارید مانوز، گونهٔ کرک غده‌ای است و در چهار گونهٔ دیگر واحدهای مونومری گالاکتوز، گلوکز و آرابینوز با نسبت‌های مولی مختلف با گونهٔ کرک غده‌ای وجود دارند. چوبک *کرک غده‌ای* دارای نسبت بیشتری از گالاکتوز (٦/١) و گلوکز (٢/٩) نسبت به سه گونهٔ تماشایی با نسبت گالاکتوز (٥/٢) و گلوکز (١/٤)، خراسانی با نسبت گالاکتوز (٥/٣) و گلوکز (٢) و افغانستانی با نسبت گالاکتوز (٥/٣) و گلوکز (١/٣) و کمتر نسبت به گونهٔ نورینجیانوم با نسبت گالاکتوز (٣٥) و گلوکز (١٧) بود. نسبت مولی آرابینوز تقریباً در تمام گونه‌ها مشابه است (آریفخودژائف و همکاران ١٩٩٩؛ آریفخودژائف و همکاران ٢٠٠٣؛ کوربانوا و همکاران ٢٠٠٣؛ جهان‌بین و همکاران ٢٠١١).



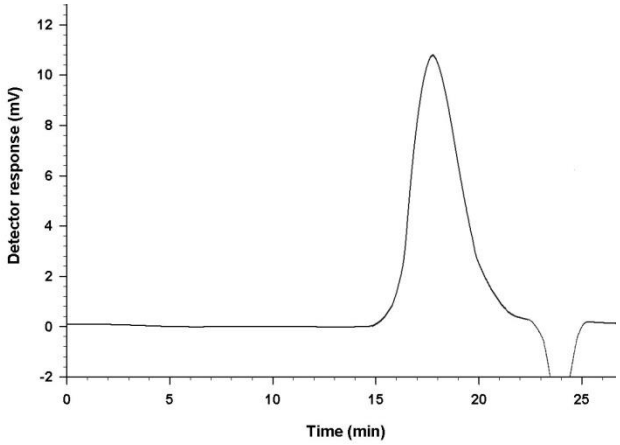
شکل ١- نتایج کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازندهٔ پلی‌ساکارید خالص ریشه گیاه چوبک *کرک غده‌ای*

وزن مولکولی پلی‌ساکارید خالص

شکل ٢ کروماتوگرام پلی‌ساکارید خالص با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوا با کارآیی بالا را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود منحنی حاصل از دستگاه، پیک متقارن و منحصربه‌فردی را نشان داد که بیانگر همگن بودن پلی‌ساکارید خالص بود. از مقایسه منحنی پلی‌ساکارید خالص با منحنی‌های استاندارد دکستران، میانگین وزن مولکولی پلی‌ساکارید خالص ٣٥/٢ کیلودالتون محاسبه شد که بیشتر از وزن مولکولی گونه تماشایی (٢٦ کیلودالتون) و کمتر از وزن مولکولی گونه‌های افغانستانی (٣٧ کیلودالتون) و نورینجیانوم (٣٨ کیلودالتون) بود (آریفخودژائف و همکاران ١٩٩٩؛ کوربانوا و همکاران ٢٠٠٣؛ جهان‌بین و همکاران ٢٠١١). انجام مقایسه وزن مولکولی چوبک *کرک غده‌ای* با گونهٔ خراسانی به علت عدم گزارش مقدار آن در مقالات چاپ شده امکان پذیر نبود.

www.SID.ir

Archive of SID



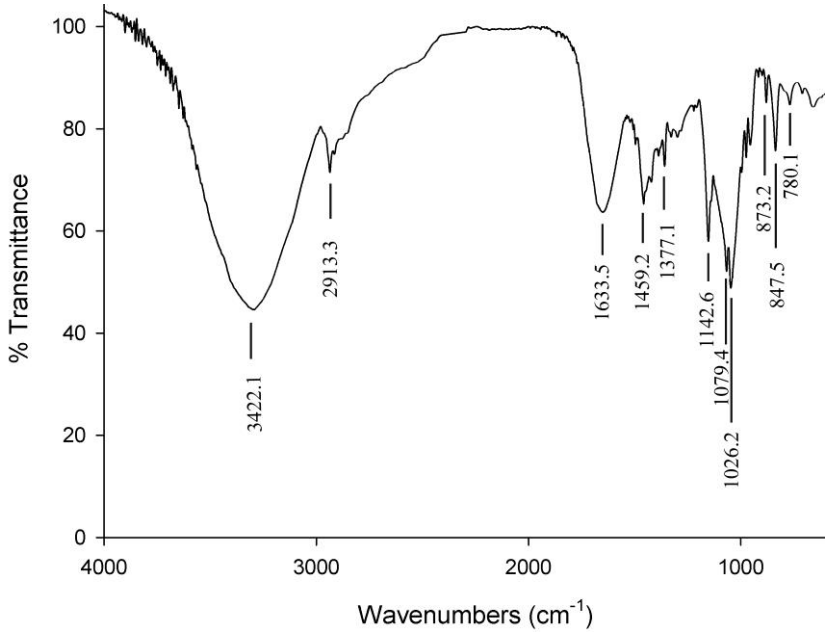
شکل ۲- کروماتوگرام پلی‌ساکارید خالص با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوا با کارآیی بالا

درجهٔ چرخش‌نوری و طیف مادون قرمز

درجهٔ چرخش‌نوری پلی‌ساکارید خالص با دستگاه پلاریمتر اندازه‌گیری و مقدار $[\alpha]_D^{20}$ +۱۷۸/۵° محاسبه شد که بیانگر وجود سهم زیاد اتصالات نوع α نسبت به نوع β 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 α به هم متصل شده‌اند. بمنظور شناسایی نوع گروه‌های عاملی موجود در ساختار پلی‌ساکارید خالص، طیف مادون قرمز آن در محدودهٔ ٤۰۰ تا ٤۰۰۰ 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 ۳٤۲۲/۱ cm^{-1} نشان داد که مربوط به گروه‌های هیدروکسیل (OH) است. پیک در محدودهٔ ۲۹۱۳/۳ cm^{-1} نشان‌دهندهٔ اتصالات (C-H) کربن شماره ٦ واحدهای قندی و پیک در محدودهٔ ۱٦۳۳/۵ cm^{-1} آب پیوسته را نشان می‌دهد. جذب‌های مربوط به ارتعاشات C-H در ساختار حلقه‌ها در محدودهٔ ۱٤۵۹/۲ cm^{-1} و ۱۳۷۷/۱ cm^{-1} به صورت دو پیک مجزا مشخص شده است. طیف در ناحیهٔ ۱۱٤۲/٦ cm^{-1} بیانگر اتصالات اتری یا گلیکوزیدی (C-O-C) است و وجود سیگنال در ناحیهٔ ۱۰۷۹/٤ cm^{-1} و ۱۰۲٦/۲ cm^{-1} بیانگر ارتعاشات کششی مربوط به اتصال الکلی (C-O-H) است. وجود سیگنال بزرگ‌تر در محدودهٔ ۸٤۷/۵ cm^{-1} (مربوط به اتصالات نوع α) نسبت به سیگنال کوچک‌تر در محدودهٔ ۸۷۳/۲ cm^{-1} (مربوط به اتصالات نوع β) بیانگر وجود سهم بیشتر اتصالات نوع α نسبت به نوع β در ساختار کل قندهاست که نتایج حاصل از درجهٔ چرخش‌نوری +۱۷۸/۵° را تایید می کرد. عدم مشاهدهٔ جذب در نواحی (۱۷٤۰-۱۷۰۰) cm^{-1} و (۲٤۰۰-۲۲۰۰) 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 ۷۸۰/۱ cm^{-1} بیانگر وجود حلقه‌های پیرانوزی در ساختار پلی-ساکارید خالص است لذا می توان نتیجه گرفت پلی-ساکارید خالص حاصل از ریشه‌های چوبک کرک غده-*ای* از واحدهای مونومری با حلقه‌های پیرانوزی و هر دو شکل آنومری α و β تشکیل شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- طیف مادون قرمز پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشهٔ گیاه چوبک کرک *غده‌ای*

جدول ۱- نتایج حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی‌ساکارید خالص

فراکشن ها	نسبت‌های مولی				
	گلیسرول	گلوکز	گالاکتوز	آرابینوز	مانوز
هیدرولیز ناقص اسیدی					
پلی‌ساکارید ۱	_____	_____	۱/۰۰	_____	_____
پلی‌ساکارید ۲	_____	_____	۱/۰۰	_____	_____
پلی‌ساکارید ۳	_____	۳/۱٤	_____	۱/۰۰	۰/۹۷
پلی‌ساکارید٤	_____	۳/۰۸	_____	۱/۰۰	۰/۹۹
محصولات اکسیداسیون پریودات					
هیدرولیز کامل اسیدی	۱۲/۸۲	۲/۹۸	٤/۰٤	۱/۰۰	_____
تجزیه اسمیت					
خارج از کیسه دیالیز	۱۳/۳۱	۳/۱۱	۳/۹٦	۱/۰۰	_____
رسوب در کیسه دیالیز	_____	_____	_____	_____	_____

پلی‌ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)

پلی‌ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)

پلی‌ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز)

پلی‌ساکارید ٤ (فراکنش بیرون از کیسه دیالیز)

www.SID.ir

Archive of SID

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 ٤ (فراکنش 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 و٤ 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 گرفته اند. نتایج حاصل از آزمون اکسیداسیون پریودات بیانگر مصرف ۱/۱۹ مول پریودات و تولید ۰/٥٤ مول اسید فرمیک بود لذا می‌توان استنباط کرد که سهم اتصالات نوع ← ۱ یا (٦←۱) در ساختار پلی‌ساکارید خالص بالاست. مقدار پریودات مصرف شده در حدود ۲ برابر تولید اسیدفرمیک بود لذا می توان نتیجه گرفت اتصالاتی مانند (٤←۱) یا (۲←۱) و مشتقات آن‌ها در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود ندارند یا مقدار آن‌ها کم است درحالیکه اتصالاتی مانند (۳←۱) و مشتقات آن مانند (٤،۳←۱) و (٦،۳←۱) با سهم نسبتاً بالایی در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود دارند. نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات پس از انجام هیدرولیز کامل (جدول۱)، نشان دهندهٔ 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، (٤←۱)، (٦←۱)، (۲←۱)، (٤،٦←۱)، و (۲،٦←۱) بوده و فاقد اتصالات (۳←۱) 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 (۳←۱)، (٦،۳←۱)، (٤،۳←۱) و (۳،۲←۱). وجود مقادیر قابل توجه گلیسرول بیانگر وجود تعداد زیاد اتصالات نوع ←۱ یا (٦←۱) در ساختار پلی‌ساکارید خالص است (ایشرود و همکاران ۲۰۰۱؛ جوشی و کاپور ۲۰۰۳؛ کائو و همکاران ۲۰۰٦).

عدم مشاهدهٔ رسوب در کیسهٔ دیالیزی نتایج حاصل از تجزیه اسمیت (جدول۱) 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 (٤←۱)، (۲←۱)، (٦←۱)، ←۱، (۲،٦←۱) و (٤،٦←۱) دارد (تانگ و همکاران ۲۰۰۸؛ سون و همکاران ۲۰۱۰).

متیله کردن پلی ساکارید 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، ٤، ٦- تترا متیل مانوز، ۲، ۳، ٤، ٦- تترا متیل گلوکز، ۲، ٤، ٦- تری متیل گلوکز، ۲، ۳، ٤- تری متیل گالاکتوز، ۳، ٤- دی متیل گالاکتوز، ۲، ٤- دی متیل گالاکتوز، ۲، ۳، ٤- تری متیل آرابینوز و ۲، ٤- دی متیل آرابینوز که به ترتیب با نسبت‌های مولی ۱/۹٦، ۳/۰٥، ۳/۱۳، ٦/۲٤، ۱/۹۲، ٤/۰۱، ۱/۱۲ و ۱/۳۱ در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود داشتند. بنابراین می-توان نتیجه گرفت که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص چوبک *کرک غده‌ای* از واحدهای گالاکتوز با اتصالات (٦←۱)، (٦،۳←۱) و (٦،۲←۱) 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

www.SID.ir

Archive of SID

پریودات و تجزیه اسمیت را تائید کرد. این نتایج همچنین نشان داد که اشکال حلقوی فورانوزی (٥ ضلعی) در ساختار وجود ندارد و تمامی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید خالص دارای اشکال پیرانوزی (٦ ضلعی) هستند (مورالیک ریشنا و رائو ۲۰۰۷). مجموع نسبت‌های مولی واحدهای گالاکتوز با اتصالات (٦،۳→۱) و (٦،۲→۱) با مجموع نسبت‌های مولی واحدهای مانوز، گلوکز و آرابینوز با اتصال ۱→ برابر است لذا می توان نتیجه گرفت شاخه‌های فرعی پلی‌ساکارید 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 ۲٦٪ برآورد شد.

جدول ۲- نتایج GC-MS آنالیز متیلاسیون پلی‌ساکارید خالص

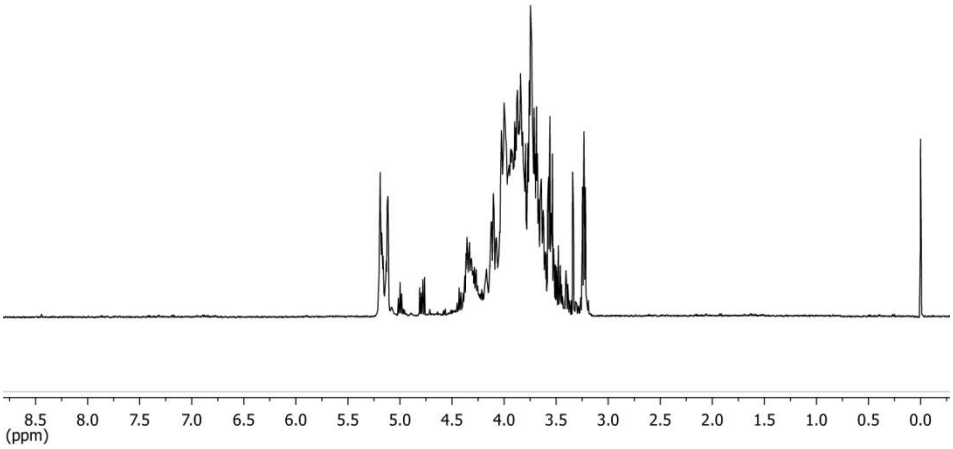
قند متیله شده	نسبت مولی	فراگمنت‌های جرمی(m/z)	نوع اتصال
۲، ۳، ٤، ٦- تترا متیل مانوز	۱/۹٦	٤۳،٤٥،۷۱،۸۷،۱۰۱،۱۱۷،۱۲۹،۱٤٥،۱٦۱،۲۰٥	Man*p*-(1→
۲، ۳، ٤، ٦- تترا متیل گلوکز	۳/۰٥	۲۰٥،۱٦۱،۱٤٥،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۷۱،٤٥،٤۳	Glc*p*-(1→
۲، ٤، ٦- تری متیل گلوکز	۳/۱۳	۲۷۷،۲۳۳،۱٦۱،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،۷۱،٤٥،٤۳	→3)-Glc*p*-(1→
۲، ۳، ٤- تری متیل گالاکتوز	٦/۲٤	۲۳۳،۱۸۹،۱٦۱،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،۹۹،۸۷،٤۳	→6)-Gal*p*-(1→
۳، ٤- دی متیل گالاکتوز	۱/۹۲	۲۳۳،۱۸۹،۱۲۹،۹۹،۸۷،٤۳	→2,6)-Gal*p*-(1→
۲، ٤- دی متیل گالاکتوز	٤/۰۱	۱۸۹،۱۲۹،۱۱۷،۸۷،٤۳	→3,6)-Gal*p*-(1→
۲، ۳، ٤- تری متیل آرابینوز	۱/۱۲	۱٦۱،۱۱۷،۱۰۱،۸۷،٤۳	Ara*p*-(1→
۲، ٤- دی متیل آرابینوز	۱/۳۱	۲۳۳،۲۰۱،۱۷٤،۱۲۹،۱۱۷،۱۰۱،٥۹،٤۳	→3)-Ara*p*-(1→

آزمون رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون و کربن

از طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون و کربن پلی‌ساکارید خالص برای تکمیل فرایند تعیین ساختار پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه‌های چوبک کرک *غده‌ای* استفاده شد. شکل ٤ طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون پلی‌ساکارید خالص را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، وجود سیگنال در نواحی ٤/۸٥، ٥/۰٥، ٥/۱٦ و ٥/۲۱ ppm به ترتیب نشان‌دهندهٔ پروتون‌های آنومری β-L-آرابینوپیرانوز، α-D-مانوپیرانوز، α-D-گلوکوپیرانوز و α-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 α و β در ساختار پلی‌ساکارید خالص بود مطابقت داشت.

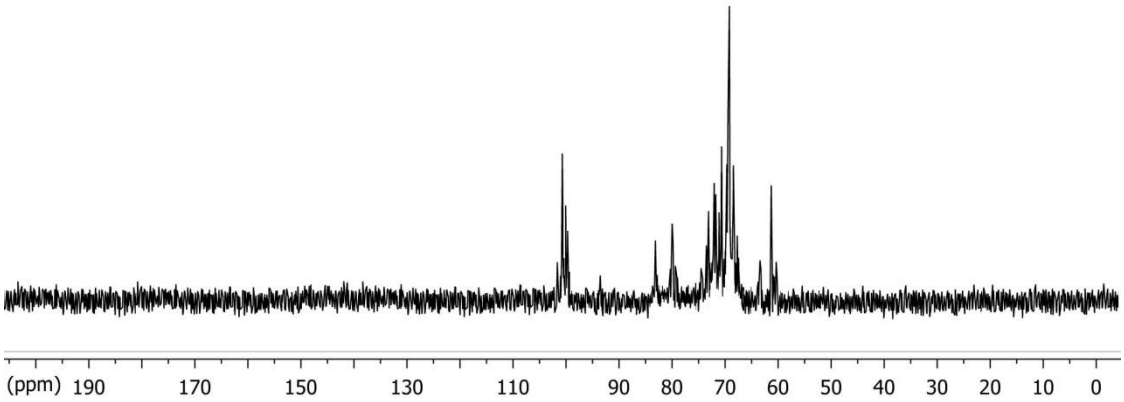
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های پروتون پلی‌ساکارید خالص

شکل ٥ طیف رزونانس مغناطیس هسته‌های کربن پلی-ساکارید خالص را نشان می‌دهد. وجود سیگنال در نواحی ۹٤، ۱۰۰، ۱۰۱ و ۱۰۲ ppm به ترتیب نشان‌دهنده کربن‌های آنومری β-L-آرابینوپیرانوز، α-D-گلوکوپیرانوز، α-D-گالاکتوپیرانوز و α-D-مانوپیرانوز است. سیگنال‌های ذکر شده بیانگر وجود اشکال حلقوی پیرانوزی در ساختار تمام واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهندهٔ 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 پلی ساکارید 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-۱۳ پلی‌ساکارید خالص

سیگنال در ناحیه ٦۹/٦ ppm کربن شمارهٔ ٦ 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 ۷٤/٥ و ۸۳/۸ ppm به ترتیب کربن-های شمارهٔ ۳ آرابینوز و گلوکز را در محل اتصال 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 درجهٔ چرخش‌نوری و طیف مادون قرمز که نشان می‌داد مقادیر زیادی از

www.SID.ir

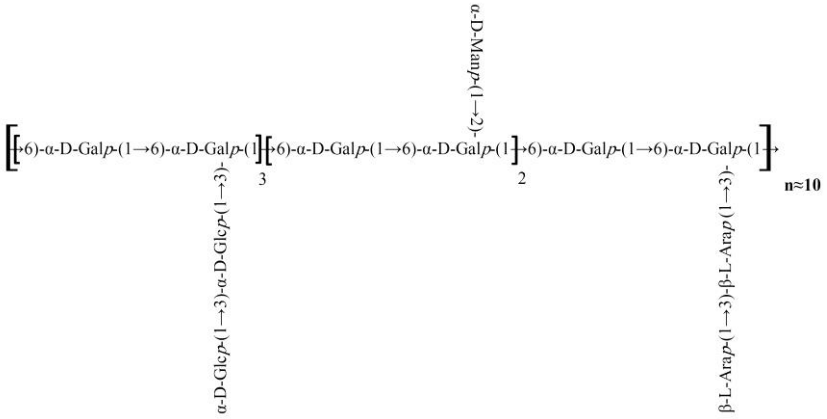
Archive of SID

اتصالات نوع α در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود دارد، همخوانی داشت.

با تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از طیف‌سنج مادون قرمز، تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، آنالیز متیله کردن همراه با نتایج حاصل از طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته، ساختار آمده در شکل ٦ برای پلی‌ساکارید خالص استحصال شده از ریشه گیاه چوبک کرک *غده‌ای* پیشنهاد می‌شود.

جدول ۳- مقادیر جابجایی شیمیایی رزونانس مغناطیس هسته‌های کربن-۱۳ پلی‌ساکارید خالص

واحدهای قندی	جابه‌جایی شیمیایی، δ (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
→2,6)-α-D-Gal*p*-(1→	۱۰۱/۱	۷۹/۸	۷۳/۶	۶۹/۳	۷۱/۵	۶۹/۷
→3,6)-α-D-Gal*p*-(1→	۱۰۱/۰	۷۲/۱	۸۰/۲	۷۱/۶	۷۱/۵	۶۹/۶
α-D-Glc*p*-(1→	۱۰۰/۲	۷۲/۰	۷۳/۹	۷۰/۲	۷۲/۶	۶۱/۸
→6)-α-D-Gal*p*-(1→	۱۰۱/۱	۶۹/۵	۷۰/۶	۷۰/۱	۷۱/۳	۶۹/۶
α-D-Man*p*-(1→	۱۰۲/۲	۷۰/۶	۷۱/۳	۶۸/۸	۷۳/۲	۶۱/۵
→3)-β-L-Ara*p*-(1→	۹۳/۷	۶۹/۵	۷۴/۵	۶۹/۹	۶۳/۷	_____
β-L-Ara*p*-(1→	۹۳/۹	۶۹/۶	۷۰/۰	۷۰/۳	۶۳/۷	_____
→3)-α-D-Glc*p*-(1→	۱۰۰/۳	۷۱/۹	۸۳/۸	۷۱/۱	۷۳/۲	۶۱/۹



شکل ۶- ساختار پیشنهادشده برای پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه‌های گیاه چوبک کرک غده‌ای

مقایسه نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج حاصل از تحقیقات سایر محققین بر روی سایر گونه‌های چوبک نشان می‌دهد که تعداد انشعابات چوبک کرک *غده‌ای* (٦ عدد) در مقایسه با چوبک *افغانستانی* (۷ عدد)، *تماشایی* (۷ عدد) و *خراسانی* (۹ عدد) کمتر است. نوع واحدهای مونومری سازندهٔ سه گونهٔ *خراسانی*، *افغانستانی* و *تماشایی* مشابه و شامل گلوکز، گالاکتوز و آرابینوز است درحالیکه چوبک کرک *غده‌ای* علاوه بر واحدهای مونومری نامبرده حاوی مانوز نیز می‌باشد. از نظر تعداد واحدهای مونومری موجود در شاخه‌ها در چوبک *خراسانی* و کرک *غده‌ای* ۱۰، در چوبک *افغانستانی* ۹ و در چوبک *تماشایی* ۸ است لذا چوبک کرک *غده‌ای* از نظر تعداد واحدهای مونومری در شاخه‌ها مشابه با کونهٔ *خراسانی* و بیشتر از دو کونهٔ دیگر است. برخلاف

www.SID.ir

Archive of SID

سه گونهٔ *خراسانی*، *افغانستانی* و *تماشایی* که اتصال گلوکز به زنجیر اصلی از نوع (۲←۱) است در چوبک کرک *غده‌ای* اتصال واحدهای گلوکز به یکدیگر و نیز به زنجیر اصلی پلی‌ساکارید از نوع (۳←۱) است. در تمام گونه‌های مورد بررسی گالاکتوز سازندهٔ 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 سازندهٔ آن گالاکتوز است. ساختار پلی-ساکارید خالص توسط تلفیقی از روش‌های آنالیز شیمیایی و دستگاهی مانند هیدرولیز ناقص اسیدی، 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 سازندهٔ 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 گستردهٔ 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 ٦٢٠٣ تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

جهان بین ک، ۱۳۹۰. استخراج، شناسایی و تعیین ساختار پلی‌ساکاریدهای محلول در آب حاصل از ریشهٔ گیاه چوبک تماشایی. پایان نامه دکتری تخصصی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

جهان بین ک و بیگی م، ۱۳۹٦. جداسازی و شناسایی ساختار گلوکومانان موجود در ریشهٔ گیاه سریش ایرانی (Eremurus persicus). مجله علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ١٤، شماره ٦٣. صفحه‌های ۲۷۷ تا ۲۸۸.

قهرمان ا، ۱۳۷۹. فلور رنگی ایران. انتشارات موسسهٔ 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 knorringianum. Chemistry of Natural Compounds 35(2): 150-151.

www.SID.ir

Archive of SID

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 Glucomannan 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 Duchesneae 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 Acantophyllum 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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

M Molaveisi[1] and K Jahanbin[2*]

Received: April 12, 2017 Accepted: January 5, 2018
[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
[2]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 ^{13}C and ^{1}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

www.SID.ir