

جداسازی و شناسایی ساختار گلوکومانان موجود در ریشه گیاه سریش ایرانی (*Eremurus persicus*)

کامبیز جهان بین^{۱*}، معصومه بیگی^۲

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۲۲)

چکیده

گیاه سریش با نام علمی *Eremurus*، متعلق به خانواده لاله است. سریش ایرانی از مهمترین گونه‌های جنس سریش است که در آسیای مرکزی شامل ایران، غرب پاکستان، افغانستان، عراق، ترکیه، فلسطین، لبنان، سوریه و قفقاز به خوبی رشد می‌کند. در این پژوهش پلی‌ساکارید خام محلول در آب از ریشه گیاه سریش ایرانی، توسط استخراج با آب گرم 70°C ، ترسیب با اتانول و پروتئین زدایی جدا شد. خالص‌سازی پلی‌ساکارید خام با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولوز و سفادکس جی-۱۰۰ انجام گرفت و جزء غالب (پلی‌ساکارید خالص) جمع‌آوری و به روش انجمادی خشک شد. راندمان تولید پلی‌ساکارید خالص از ریشه گیاه سریش ایرانی $4/5\%$ بود. وزن مولکولی، میزان قند کل و درجه چرخش نوری پلی‌ساکارید خالص به ترتیب $71/2$ کیلودالتون، $96/4\%$ و $-32/7^{\circ}$ محاسبه شد. نتایج حاصل از آنالیز واحدهای مونوساکاریدی سازنده نشان داد که پلی‌ساکارید خالص از واحدهای مونومری گلوکز و مانوز با نسبت‌های مولی ۱ به $1/98$ تشکیل شده است. ساختار پلی‌ساکارید خالص توسط ترکیبی از آزمون‌های آنالیز شیمیایی و دستگاهی مانند متیلاسیون، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، طیف سنج مادون قرمز و رزونانس مغناطیس هسته اتم‌های کربن و پروتون صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص حاصل از ریشه‌های سریش ایرانی از واحدهای مانوز و گلوکز با اتصال $\beta(1\rightarrow4)$ تشکیل شده است که در برخی از نقاط زنجیره اصلی از محل کربن شماره ۶ مانوز دارای انشعاب است و انشعابات توسط واحدهای مانوز به انتها می‌رسد.

کلید واژگان: پلی‌ساکارید، استخراج، خالص‌سازی، سریش ایرانی، تعیین ساختار

* مسئول مکاتبات: Jahanbin@shahroodut.ac.ir

۱- مقدمه

پلی ساکاریدها از فراوان ترین پلی مرهای زیستی هستند که از پیوستن بیش از ۱۰ واحد مونوساکاریدی با اتصالات گلیکوزیدی تشکیل شده اند [۱]. اهمیت آنها در صنعت مواد غذایی به دلیل نقش اساسی آنها در ایجاد قوام، تشکیل ژل، پایدارسازی امولسیون ها و کفها، ایجاد مانع در تشکیل بلورهای شکر و یخ، قابلیت در کنترل رهاسازی عطر و طعم مواد غذایی و غیره بر کسی پوشیده نیست. لذا مصرف آن ها در صنعت مواد غذایی و سایر صنایع وابسته به طور گسترده در حال افزایش است و تامین آنها به مقدار کافی از نیازهای ضروری است. با توجه به محدود بودن منابع در دسترس، معرفی منابع جدیدی از پلی ساکاریدها با قابلیت کاربرد در صنعت، می تواند بسیار با ارزش و سودمند باشد و تحقیقاتی که هر سال برای شناسایی پلی ساکاریدها از منابع جدید توسط محققین در سرتاسر دنیا صورت می گیرد این مطلب را تأیید می کند [۲-۴].

پلی ساکاریدها از منابع مختلفی تهیه می شوند که در بین منابع موجود، استفاده از منابع طبیعی مانند گیاهان، به دلیل دور بودن از مضرات حاصل از کاربرد سایر منابع، مقبولیت بیشتری دارد. ریشه گیاهان دارویی منبعی مهم از پلی ساکاریدهای زیست فعالی است که غالباً عملکردهای بیولوژیکی متفاوتی از خود نشان می دهند که برای مثال به افزایش فعالیت سیستم ایمنی، کاهنده قند خون، فعالیت ضد اکسندگی، درمان بیماری های کبد و معده و غیره اشاره کرد. وجود تفاوت های زیاد در عملکرد این ترکیبات ناشی از تفاوت در ساختار پلی ساکاریدهای حاصل از ریشه گیاهان مختلف است [۵-۸].

جنس سریش (*Eremurus M. B.*)، از جنس های مهم خانواده لاله (*Liliaceae*)، با پراکندگی حدود ۶۱ گونه بر روی کره زمین است [۹]. رویشگاه های طبیعی این جنس به طور گسترده در نواحی خشک و نیمه خشک دامنه کوه های سنگی به ویژه در آسیای مرکزی و خاورمیانه، از جمله ایران، افغانستان، تاجیکستان، لبنان، عراق، فلسطین، قفقاز، سوریه و ترکیه توزیع شده اند. در کشور ایران، جنس سریش دارای هفت گونه گیاه علفی چندساله است. گونه سریش ایرانی (*E. persicus*) از گونه های مهم این جنس است که در مناطق وسیعی از ایران شامل استان های اصفهان، مرکزی، قم، چهار

محال و بختیاری، فارس، کرمان، یزد، تهران، سمنان، خراسان شمالی و رضوی و سیستان و بلوچستان پراکنده است [۱۰]. از مشخصات ظاهری سریش ایرانی می توان به برگ های کشیده و باریک مجتمع در قاعده، گل های سفید رنگ، متمایل به صورتی و به حالت گل آذین خوشه ای و ریشه های متورم، به صورت برجستگی های ضخیم، گوشت دار و غده ای کشیده اشاره کرد [۱۱]. از ریشه گیاه سریش ایرانی در طب سنتی برای درمان اختلالات کبد، معده، یبوست و دیابت استفاده می شود [۱۲]. از کاربردهای دیگر ریشه های آن می توان به تهیه الکل و استفاده از آن به عنوان چسب طبیعی در صنایع نساجی، نجاری و صحافی به علت ایجاد لعاب غلیظ اشاره کرد که دلیل عمده خصوصیات ذکر شده را به وجود پلی ساکاریدهای ریشه آن نسبت می دهند [۱۱].

مطالعات انجام شده برای شناسایی ساختار پلی ساکاریدهای موجود در ریشه گونه های مختلف سریش اندک است بطوریکه از ۶۱ گونه ذکر شده تنها ۱۱ گونه توسط محققین خارجی بررسی شده اند و از این تعداد نیز تنها ۴ گونه (*E. anisopterus*, *E. lactiflorus*, *E. altaicus*, *E. turkestanicus*) بطور نسبتاً کامل مطالعه شده و در مابقی مطالعات تنها به ذکر درصد ترکیبات واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید بسنده شده است [۶؛ ۱۳-۲۱]. تاکنون مطالعه ای در ارتباط با خالص سازی و شناسایی ساختار پلی ساکاریدهای ریشه گیاه سریش ایرانی صورت نگرفته است و تنها مطالعات انجام شده بر روی این گونه، به شناسایی اثرات ضد التهابی، ضدباکتریایی و مهارکنندگی عصاره متانولی و اتانولی بخش های مختلف آن محدود شده است [۱۲؛ ۲۲-۲۳]. با توجه به اینکه ویژگی های عملکردی پلی ساکاریدها در صنعت مواد غذایی و نیز سایر صنایع وابسته، ارتباطی بسیار تنگاتنگ با ساختار آنها دارد و مطالعه بسیاری از خصوصیات رفتاری و جریانی محلول های حاصل از آنها بدون برقراری ارتباط با ساختارشان فاقد توجیه علمی لازم است، بنابراین انجام هر گونه مطالعه تکمیلی مرتبط با شناسایی ساختار پلی ساکاریدها بسیار مهم و اساسی است. لذا در این پژوهش ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب موجود در ریشه گیاه سریش ایرانی، برای اولین بار بطور کامل و با ذکر جزئیات توسط تلفیقی از روش های شیمیایی و پیشرفته دستگاهی مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع آوری مواد گیاهی و شیمیایی

ریشه گیاه در مرداد ماه ۱۳۹۳ از منطقه میمه واقع در استان اصفهان جمع آوری شد. ریشه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، در مجاورت با هوا، خشک و در دمای اتاق نگهداری شدند. شناسایی گونه گیاه توسط دکتر ولی الله مظفریان، گیاه شناس معروف، انجام شد. پیش از انجام آزمایش، بمنظور حذف سایر مواد خارجی چسبیده به بخش بیرونی ریشه‌های گیاه، ابتدا پوسته بیرونی آنها توسط چاقو تمیز و سپس با استفاده از آب شستشو داده شد و در نهایت ریشه‌های پوست گیری شده در مجاورت با هوا خشک شدند.

دکستران با وزن‌های مولکولی متفاوت (۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون)، دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولوز و سفادکس جی-۱۰۰ از شرکت فارماسیا^۱ (آپسالا^۲، سوئد) خریداری شدند. استاندارد مونوساکاریدهای خالص و دی‌متیل سولفوکساید^۳ از شرکت سیگما^۴ (آمریکا) و DSS^۵ از شرکت مرک^۶ (آلمان) خریداری شدند. اسید تری‌فلورواستیک از شرکت فلوکا^۷ خریداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده، نظیر انواع اسیدها، بازها و ... از درجه خلوص آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۲- جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب

ابتدا ریشه‌های خرد شده گیاه توسط اتانول ۹۵٪ در دمای جوش به مدت ۹ ساعت تیمار شد. برای افزایش بهره‌وری در این مرحله، هر سه ساعت اتانول مصرفی با اتانول تازه جایگزین شد. این مرحله برای حذف رنگ‌ها، چربی‌ها، بخشی از ساپونین‌ها و مونوساکاریدها انجام شد. در نهایت ریشه‌های گیاهی تیمار شده از اتانول جدا و در مجاورت با هوا خشک شدند.

استخراج پلی‌ساکاریدها از ۱۰۰ گرم ریشه گیاه خشک شده توسط یک لیتر آب (۷۰ درجه سانتیگراد) به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. این مرحله ۳ بار تکرار شد و در نهایت عصاره‌های آبی حاصل تا رسیدن به یک سوم حجم اولیه

تغلیظ شدند. حذف پروتئین‌ها از عصاره آبی حاصل با استفاده از روش سواگ (استفاده از ۱-بوتانول و کلروفرم و سپس سانتریفیوژ کردن محلول نهایی) انجام شد [۲۴]. جداسازی پلی‌ساکاریدها پس از افزودن اتانول مطلق به عصاره آبی پروتئین‌زدایی شده (۱:۳) و نگهداری در دمای یخچال به مدت یک شبانه روز و در ادامه سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون حاصل انجام گرفت. در نهایت رسوبات حاصل (پلی‌ساکاریدهای محلول در آب) پس از شستشو روی کاغذ صافی توسط اتانول مطلق، استن و اتر، در آب یون‌زدایی شده حل و سپس توسط خشک کن انجمادی (Christ Alpha 1-2، ساخت کشور آلمان) خشک شدند.

۲-۳- خالص سازی پلی‌ساکاریدهای جدا شده

خالص سازی پلی‌ساکاریدهای جدا شده، به ترتیب توسط ستون‌های کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولوز و ژل تراوی سفادکس جی-۱۰۰ انجام گرفت. قبل از استفاده از ستون‌ها، پلی‌ساکاریدهای خام در حجم کمی از آب یون‌زدایی شده حل گردید و از صافی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. در ادامه محلول پلی‌ساکاریدی خام وارد ستون کروماتوگرافی دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولوز (۲/۶ سانتیمتر × ۴۰ سانتیمتر) شد. سپس ستون به ترتیب توسط آب و محلول آبی کلرید سدیم با گرادیان غلظتی صفر تا یک مولار شسته شد و تعیین غلظت پلی‌ساکاریدها در جزء‌های جمع آوری شده توسط روش فنل-اسید سولفوریک انجام گرفت [۲۵].

در ادامه فراکشن‌های جمع آوری شده از ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل-سلولوز وارد ستون کروماتوگرافی سفادکس جی-۱۰۰ (۱/۶ سانتیمتر × ۷۰ سانتیمتر) شدند. شستشوی ستون در این مرحله توسط آب یون‌زدایی شده با سرعت جریان حجمی ۱۰ میلی لیتر بر ساعت انجام شد و در نهایت جزء پلی‌ساکارید غالب (پلی‌ساکارید خالص) جمع آوری و با روش انجمادی خشک گردید.

۲-۴- تعیین پروتئین، قند کل و واحدهای

مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید

تعیین پروتئین توسط روش برادفورد^۸ (با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی) انجام شد [۲۶] و روش فنل-اسیدسولفوریک (با استفاده از استاندارد D-گلوکز در طول

1. Pharmacia
2. Uppsala
3. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
4. Sigma
5. 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid
6. Merck
7. Fluka

8. Bradford

۶-۲- تهیه طیف فرابنفش و مادون قرمز

پلی ساکارید

طیف فرابنفش نمونه با اندازه گیری جذب محلول پلی ساکارید خالص در ناحیه ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر واریان کری ۱۰۰-بیو^{۱۴} (ساخت کشور آمریکا) ثبت شد. طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص با استفاده از طیف سنج مادون قرمز مدل نیکولت^{۱۵} ۵۷۰۰ (مدیسون^{۱۶}، آمریکا) پس از تشکیل قرص یک میلی متری از مخلوط پلی ساکارید خالص با پودر برومور پتاسیم برحسب فرکانس در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰^{-۱} cm بدست آمد [۲۹].

۷-۲- هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید

هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید خالص بر اساس روش تانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت [۳۰]. بطور خلاصه، ۸۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۳۰ میلی لیتر محلول ۰/۰۵ مولار اسیدتری فلورواستیک در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت هیدرولیز شد و پلی ساکارید هیدرولیز شده به منظور حذف رسوبات سانتریفوژ 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 جمع آوری و تحت عنوان پلی ساکارید ۴ نامگذاری گردید. سیال باقی مانده در کیسه دیالیزی توسط اتانول رسوب داده شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب تحت عناوین پلی ساکارید ۲ و ۳ نامگذاری شدند. تمامی فراکشن ها پس از خشک شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (بخش ۲-۴) آنالیز شدند.

۸-۲- اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت

ابتدا ۲۰ میلی گرم پلی ساکارید خالص توسط محلول ۰/۰۴ مولار پرپودات سدیم (۲۵ میلی لیتر) اکسید شد و پس از نگهداری در تاریکی، هر ۴ ساعت میزان جذب آن در ۲۳۳ نانومتر ثبت گردید. پایان اکسیداسیون با ثابت شدن میزان جذب پس از ۹۶ ساعت تعیین شد و مازاد پرپودات سدیم با افزودن اتیلن گلیکول حذف گردید. مصرف پرپودات و تولید اسیدفرمیک به ترتیب توسط روش اسپکتروفوتومتری و تیتراسیون با محلول ۰/۰۵۳ مولار سود تعیین شد. محلول

موج ۴۹۰ نانومتر) برای تعیین قند کل مورد استفاده قرار گرفت [۲۵]. برای تعیین کمی و کیفی واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید، از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل واریان^۹ ۳۴۰۰ (ساخت آمریکا) استفاده شد. ستون دستگاه از نوع موئینه (۳۰ متر × ۰/۳۲ میلی متر × ۰/۲ میکرومتر) و آشکارساز مورد استفاده از نوع یونش شعله ای بود. دمای ستون در ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد (با نرخ ۸ درجه سانتی گراد بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۳ دقیقه در دمای نامبرده نگهداشته شد. ازت به عنوان گاز حامل با سرعت جریان حجمی ۱/۲ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت و دمای قسمت تزریق و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰ و ۳۰۰ درجه سانتی گراد بود. آماده سازی نمونه و تبدیل آن به استات های آلدیتول مونوساکاریدهای سازنده با استفاده از روش چاپلین و کندی (۱۹۹۴) انجام گرفت و از میواینوزیتول^{۱۰} به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد [۲۷].

۵-۲- تعیین درجه چرخش نوری و وزن

مولکولی پلی ساکارید

درجه چرخش نوری با استفاده از روش جهان بین و همکاران (۲۰۱۱) و توسط دستگاه پلاریمتر پرکین المر^{۱۱} ۳۴۳ (ساخت کشور آمریکا) و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص توسط دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوا با کارایی بالا (HPGPC) مدل شیمادزو^{۱۲} با ستون TSK-GEL PWXL ساخت توسو^{۱۳} ژاپن (۷/۸ × ۳۰۰ میلی متر) تعیین شد [۵]. شستشوی ستون توسط محلول ۰/۱ مولار سولفات سدیم با سرعت جریان حجمی ۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه انجام گرفت و آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست نور مدل RID-10A (شیمادزو، ژاپن) بود. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای دکستران بدست آمد و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب، توسط منحنی کالیبراسیون محاسبه شد [۲۸].

9. Varian
10. Myo-inositol
11. Perkin-Elmer
12. Shimadzu
13. Tosoh

14. Varian Cary 100-Bio
15. Nicolet
16. Madison

۳- نتایج و بحث

۳-۱- استخراج و خالص سازی

پلی ساکارید محلول در آب از ریشه گیاه سریش ایرانی توسط استخراج با آب گرم (۷۰ درجه سانتیگراد)، پروتئین زدایی و ترسیب با اتانول جدا شد و پس از شستشو با اتانول مطلق، استن و اتر، خشک گردید. پلی ساکارید ناخالص جدا شده قهوه‌ای رنگ بود که در ادامه توسط ستون‌های کروماتوگرافی دی اتیل آمینواتیل-سلولز و سفادکس جی-۱۰۰ خالص گردید. در نهایت فراکشن غالب (پلی ساکارید خالص)، جمع‌آوری و به روش انجمادی خشک شد. راندمان تولید پلی ساکارید ناخالص و خالص حاصل از ریشه گیاه سریش ایرانی به ترتیب ۸/۷٪ و ۴/۵٪ بود. پلی ساکارید خالص پودری سفید رنگ بود که به روش 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 پلی ساکارید خالص است. پودر پلی ساکارید خالص در آنالیزهای شیمیایی و دستگامی برای تعیین ساختار مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۲- قند کل و واحدهای مونوساکاریدی

سازنده پلی ساکارید

مقدار قند کل پلی ساکارید خالص ۹۶/۴٪ بود که بیانگر درجه خلوص بسیار بالای پلی ساکارید و انجام خوب مراحل خالص سازی است. برای تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده، ابتدا پلی ساکارید توسط اسید تری فلورواستیک به واحدهای مونوساکاریدی سازنده خود هیدرولیز گردید و پس از استیله شدن و تبدیل به استات‌های آلدیتول مربوطه، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد. نتایج حاصل (شکل ۱) نشان داد که پلی ساکارید کاملاً خالص از واحدهای مونوساکاریدی گلوکز و مانوز با نسبت‌های مولی ۱ به ۱/۹۸ تشکیل شده و یک گلوکومانان است. مطالعات انجام شده روی گونه‌های دیگر سریش مشخص کرد که نسبت مانوز به گلوکز در پلی ساکارید حاصل از گونه ایرانی کمتر از گونه‌های یابی^{۱۷} (۲/۴: ۱)، لاکتیفلوروس (۲/۵: ۱)، آلتائیکوس (۲/۶: ۱)،

حاصل از پریدوات به مدت ۴۸ ساعت دیالیز شد و سپس توسط ۵۰ میلی‌گرم بروهیدرید سدیم (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت) خنثی گردید. در نهایت هیدرولیز کامل توسط محلول ۲ مولار اسیدتری فلورواستیک انجام شد و محصولات حاصل پس از استیله شدن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (بخش ۲-۴) آنالیز شدند [۵].

۲-۹- متیله کردن پلی ساکارید

متیله کردن پلی ساکارید خالص و تشکیل محصولات حاصل از آن توسط روش چاپلین و کندی (۱۹۹۴) انجام شد [۲۷]. محصولات متیله شده توسط اسید فرمیک و محلول ۲ مولار اسیدتری فلورواستیک هیدرولیز و پس از حذف مازاد اسید با بروهیدرید سدیم خنثی شدند. آلدیتول‌های حاصل توسط مخلوط پیریدین-انیدرید استیک (۱:۱)، در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد (مدت ۱ ساعت) به استات‌های آلدیتول تبدیل و در نهایت استات‌های آلدیتول نیمه متیله شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی (GC-MS) آنالیز شدند. GC-MS مورد استفاده مجهز به ستون موئینه کوارتزی (۲۵ متر × ۰/۲۲ میلی‌متر × ۰/۲ میکرومتر) بود. دمای ستون در ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد (مدت ۲ دقیقه) ثابت و سپس تا ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد (با نرخ ۱۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۴۰ دقیقه در این دما نگهداشته شد.

۲-۱۰- تهیه طیف رزونانس مغناطیس هسته‌ای

(NMR) پلی ساکارید

طیف‌های NMR کربن-۱۳ و پروتون پلی ساکارید خالص، توسط دستگاه طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای در ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز برای NMR پروتون و ۱۲۵/۷۵ مگاهرتز برای NMR کربن-۱۳ در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد ثبت شدند. استاندارد مورد استفاده DSS و زمان بازداری ۲ ثانیه بود. پلی ساکارید خالص در حلال بی‌اثر D₂O (۹۹/۹٪) بصورت محلول درآمد و سپس در بین دو قطب مغناطیس دستگاه قرار گرفت. تغییرات ایجاد شده توسط دستگاه NMR، در مقایسه با جسم استاندارد، به صورت پیک‌هایی با ارتفاع متفاوت (جابجایی شیمیایی پیک‌ها بر حسب ppm نمایش داده شد) ثبت و مورد ارزیابی قرار گرفت.

زانگزوریکوس^{۱۸} (۱:۳/۳)، لوتوس^{۱۹} (۱:۳/۱)، تادشیکروم^{۲۰} (۱:۵)، کریستاتوس^{۲۱} (۱:۲/۹)، ترکستانیکوس (۱:۳/۴) و تقریباً مشابه با گونه رجلی^{۲۲} (۱:۲) است [۱۳-۱۸; ۲۱-۳۲]. نوع واحدهای مونومری گزارش شده برای پلی ساکارید حاصل از گونه آنیسوپتروس متفاوت با گونه ایرانی و سایر گونه‌های جنس سریش است زیرا پلی ساکارید آن از واحدهای مانوز و گالاکتوز با نسبت‌های مولی ۳ به ۱ تشکیل شده است [۶].

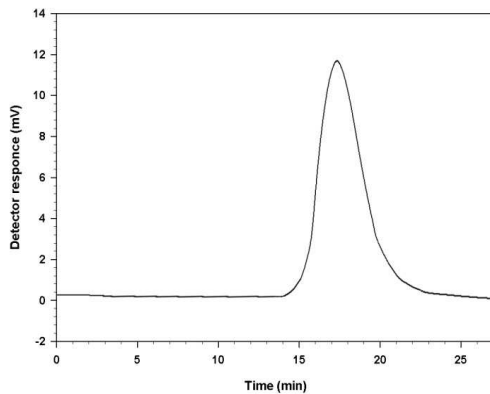


Fig 2 The profile of the polysaccharide fraction in HPGPC, with RI detection

۳-۴- طیف مادون قرمز

طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص، برای تعیین نوع گروه‌های شیمیایی موجود در ساختار آن در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). همانطور که در شکل دیده می‌شود طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص پیک کشیده بزرگی را در محدوده $3423/6 \text{ cm}^{-1}$ نشان داد که مربوط به گروه‌های هیدروکسیل (OH) است. وجود پیک در محدوده $2914/1 \text{ cm}^{-1}$ و $1639/3 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب نشان‌دهنده اتصالات (C-H) کرین شماره ۶ واحدهای قندی و آب پیوسته است. جذب‌های مربوط به ارتعاشات C-H در ساختار حلقه در محدوده $1468/2 \text{ cm}^{-1}$ و $1383/5 \text{ cm}^{-1}$ به صورت دو پیک مجزا مشخص شده است. وجود پیک در محدوده $1145/3 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده وجود اتصالات اتری (C-O-C) در ساختار پلی ساکارید و جذب در محدوده $1081/9 \text{ cm}^{-1}$ و $1027/3 \text{ cm}^{-1}$ ناشی از ارتعاشات کششی مربوط به اتصال الکلی (C-O-H) است. وجود پیک در محدوده $892/8 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده وجود قند مانوز با اتصال β و در محدوده $868/7 \text{ cm}^{-1}$ بیانگر وجود تعداد زیاد اتصالات آنومری نوع β در ساختار کل قندها است که نتایج حاصل از درجه چرخش نوری (بخش ۳-۳) را تایید می‌کند [۵-۶]. عدم مشاهده جذب در نواحی $(1740-1700) \text{ cm}^{-1}$ و $(1260-1220) \text{ cm}^{-1}$ بیانگر عدم وجود گروه استیل در ساختار پلی ساکارید خالص است. با توجه به اینکه در ساختار سایر گونه‌های سریش وجود گروه‌های استیل گزارش شده است لذا می‌توان اینطور نتیجه گرفت که ساختار پلی ساکارید خالص

زانگزوریکوس^{۱۸} (۱:۳/۳)، لوتوس^{۱۹} (۱:۳/۱)، تادشیکروم^{۲۰} (۱:۵)، کریستاتوس^{۲۱} (۱:۲/۹)، ترکستانیکوس (۱:۳/۴) و تقریباً مشابه با گونه رجلی^{۲۲} (۱:۲) است [۱۳-۱۸; ۲۱-۳۲]. نوع واحدهای مونومری گزارش شده برای پلی ساکارید حاصل از گونه آنیسوپتروس متفاوت با گونه ایرانی و سایر گونه‌های جنس سریش است زیرا پلی ساکارید آن از واحدهای مانوز و گالاکتوز با نسبت‌های مولی ۳ به ۱ تشکیل شده است [۶].

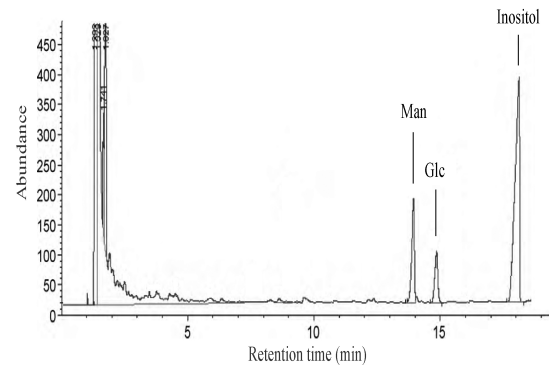


Fig 1 Gas chromatogram of the monosaccharide compositions of purified polysaccharide from *E. persicus* roots

۳-۳- درجه چرخش نوری و وزن مولکولی پلی ساکارید

درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص $[\alpha]_D^{20} = -32/7^{\circ}$ محاسبه شد، که نشان‌دهنده وجود سهم زیاد اتصالات نوع β نسبت به نوع α در ساختار پلی ساکارید خالص است. منحنی‌های حاصل از دستگاه HPGPC، پیک تنها و مقارنی را نشان داد (شکل ۲) که بیانگر همگن بودن پلی ساکارید خالص بود. از مقایسه منحنی پلی ساکارید با منحنی‌های استاندارد دکستران، میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص $71/2$ کیلوالتون محاسبه شد. در نتیجه می‌توان عنوان نمود وزن مولکولی گونه سریش ایرانی بیشتر از گونه‌های کریستاتوس (۶۹ کیلوالتون) و تادشیکروم (۶۳ کیلوالتون) و کمتر از گونه‌های یایی (۲۶۵/۵ کیلوالتون)، زانگزوریکوس (۲۳۳/۵ کیلوالتون)، لاکتیفلوروس (۷۹ کیلوالتون)، لوتوس

18. *Zangezuristicus*
19. *Luteus*
20. *Tadshicorum*
21. *Cristatus*
22. *Regelii*

همانطور که در بخش ۲-۷ اشاره شد چهار فراکششن پلی ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)، پلی ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)، پلی ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز) و پلی ساکارید ۴ (فراکشش بیرون از کیسه دیالیز) در نتیجه هیدرولیز ناقص اسیدی از پلی ساکارید خالص، بازیافت و پس از هیدرولیز کامل با اسید تری فلورواستیک توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج حاصل (جدول ۱) بیانگر وجود مانوز و گلوکز در پلی ساکارید ۱ و ۲ و مقدار کمی مانوز در پلی ساکارید ۳ و ۴ بود. لذا می توان استنباط کرد که مانوز و گلوکز مونوساکاریدهای سازنده اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص هستند و مقدار جزئی مانوز نیز در شاخه جانبی پلی ساکارید خالص قرار گرفته است.

حاصل از ریشه گیاه سریش ایرانی متمایز از سایر گونه‌های بررسی شده است [۱۳-۱۴; ۱۸-۲۱; ۳۱-۳۲].

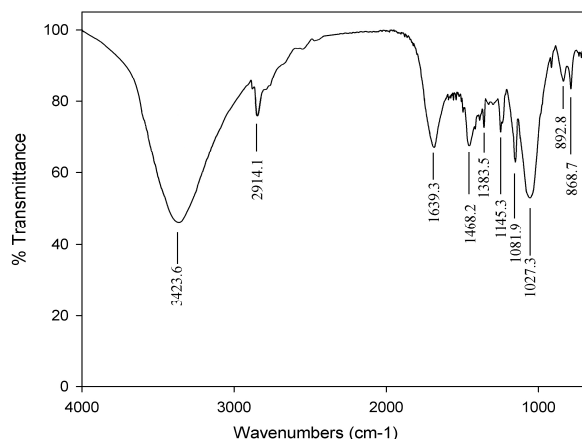


Fig 3 FT-IR spectra of the purified polysaccharide from *E. persicus* roots

۳-۵- هیدرولیز ناقص اسیدی

Table 1 The results of partial acid hydrolysis, periodate oxidation and Smith degradation of *E. persicus* polysaccharide

Molar ratios				Fractions
Glucose	Mannose	Glycerol	Erythritol	
Partial acid hydrolysis				
1.00	1.71	---	---	Polysaccharide 1 ^a
1.00	1.68	---	---	Polysaccharide 2 ^b
---	0.34	---	---	Polysaccharide 3 ^c
---	0.31	---	---	Polysaccharide 4 ^d
Periodate-oxidized products				
---	---	1.03	8.19	Full acid hydrolysis
Smith degradation				
---	---	0.99	7.97	Out of sack
---	---	---	---	Supernatant in sack
---	---	---	---	Precipitation in sack

a Precipitation after hydrolysis

b Precipitate in the sack

c Supernatant in the sack

d Fraction out of sack

گازی محصولات کاملاً هیدرولیز شده حاصل از پریودات (جدول ۱)، بیانگر عدم حضور مانوز و گلوکز و وجود مقادیر قابل توجهی اریتریتول و نیز مقداری گلیسرول بود. عدم حضور واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید بیانگر این است که تمامی واحدهای مانوز و گلوکز دارای اتصالاتی نظیر $1 \rightarrow 4$ ، $1 \rightarrow 6$ ، $1 \rightarrow 2$ ، $1 \rightarrow 3$ ، $1 \rightarrow 6$ ، $1 \rightarrow 4$ و $1 \rightarrow 6$ بوده و فاقد اتصالات $1 \rightarrow 3$ هستند و وجود مقادیر قابل توجه اریتریتول بیانگر وجود تعداد زیاد اتصالات $1 \rightarrow 4$ و $1 \rightarrow 6$ در ساختار پلی ساکارید خالص است [۳۳-۳۵].

۳-۶- اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت

نتایج اکسیداسیون پریودات نشان داد که ۱/۱۱ مول پریودات مصرف و ۰/۱۱ مول اسید فرمیک تولید شد لذا می توان نتیجه گرفت که مقادیر کمی از اتصالات نوع $1 \rightarrow 6$ یا $1 \rightarrow 4$ در ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارد. مقدار مصرف پریودات حدود ۱۰ برابر اسیدفرمیک تولید شده بود که نشان می دهد اتصالاتی مانند $1 \rightarrow 4$ یا $1 \rightarrow 2$ به مقدار نسبتاً زیاد در ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارند. نتایج کروماتوگرافی

۳- دی‌متیل مانوز، ۲، ۳، ۶- تری‌متیل مانوز و ۲، ۳، ۴، ۶- تترامتیل مانوز که به ترتیب با نسبت‌های مولی ۳/۲۴، ۱/۰۱، ۴/۳۳ و ۰/۹۸ در ساختار پلی‌ساکارید خالص وجود داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص سریش ایرانی دارای اتصالات (۱→۴) و (۱→۶) 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 پریدوات 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 پلی‌ساکارید خالص دارای اشکال پیرانوزی (۶ ضلعی) هستند [۳۶].

نتایج حاصل از تجزیه اسمیت (جدول ۱) رسوبی را در کیسه دیالیز نشان نداد که بیانگر اکسیدشدن کامل اسکلت اصلی پلی‌ساکارید توسط پریدوات است. بنابراین می‌توان استنباط کرد که اسکلت اصلی پلی‌ساکارید خالص سریش ایرانی، اتصالاتی نظیر (۱→۴)، (۱→۲)، (۱→۶)، (۱→۳)، (۱→۶) و (۱→۴،۶) دارد. وجود مقادیر زیاد اریتریتول بیانگر وجود مقادیر زیادی از اتصالات نوع (۱→۴) یا (۱→۴،۶) در ساختار اصلی پلی‌ساکارید خالص است و وجود گلیسرول نیز احتمالاً از اتصالات ۱→۳ مربوط به پایانه غیر احیاء کننده (نقطه انشعاب)، نشأت می‌گیرد [۲۸؛ ۳۰].

۳-۷- متیله کردن

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی، وجود چهار پیک متفاوت را نشان داد (جدول ۲). این پیک‌ها پس از شناسایی عبارت بودند از: ۲، ۳، ۶- تری‌متیل گلوکز، ۲

Table 2 GC-MS results of methylation analysis of *E. persicus* polysaccharide

Type of linkage	Mass fragments (m/z)	Molar ratio	Methylated sugar
→4)-Glc-(1→	43,45,71,87,99,101,113,117,129,161,173,233	3.24	2,3,6-Me ₃ -Glc
→4,6)-Man-(1→	43,85,87,101,117,127,142,159,161,201,261	1.01	2,3-Me ₂ -Man
→4)-Man-(1→	43,45,71,87,99,101,113,117,129,161,173,233	4.33	2,3,6-Me ₃ -Man
Man-(1→	43,45,71,87,101,117,129,145,161,205	0.98	2,3,4,6-Me ₄ -Man

لذا می‌توان عنوان نمود که گلوکومانان حاصل از ریشه گیاه سریش ایرانی دارای پیوند غالب (۱→۴)β در زنجیره اصلی است. سیگنال در ناحیه ppm ۴/۱۷ پروتون‌های متصل به کربن‌های شماره ۶ β-D-Manp را در نقطه اتصال نشان می‌دهد. عدم مشاهده سیگنال در محدوده ppm ۱/۸-۲/۲ بیانگر عدم وجود گروه استیل در ساختار پلی‌ساکارید خالص و تأیید کننده نتایج طیف مادون قرمز نمونه است [۲۱؛ ۳۷].

۳-۸- طیف رزونانس مغناطیس هسته‌ای

با توجه به جدول ۳، وجود سیگنال در نواحی ppm ۴/۷۲ و ppm ۴/۵۳ به ترتیب نشان‌دهنده پروتون‌های آنومری β-D-Manp و β-D-Glcp است. وجود سیگنال در ناحیه ppm ۳/۸۳ مربوط به پروتون‌های متصل به کربن‌های شماره ۴ β-D-Manp و وجود سیگنال در ناحیه ppm ۳/۴۵ مربوط به پروتون‌های متصل به کربن‌های شماره ۴ β-D-Glcp است؛

Table 3 ¹H NMR chemical shift data (δ, ppm) for purified polysaccharide

Chemical shifts, δ (ppm)						Sugar residues
H-6	H-5	H-4	H-3	H-2	H-1	
3.96	3.46	3.59	3.63	4.11	4.70	β-D-Manp-(1→
3.97	3.59	3.83	3.76	4.14	4.72	→4)-β-D-Manp -(1→
4.17	3.70	3.82	3.76	4.12	4.71	→4,6)-β-D-Manp-(1→
3.91	3.50	3.45	3.54	3.36	4.53	→4)-β-D-Glcp -(1→

که در تشکیل پیوند شرکت دارند. سیگنال در ناحیه ppm ۶۸ کربن ۶ مانوز در محل اتصال را نشان می‌دهد [۳۷-۳۸]. عدم مشاهده سیگنال در محدود ppm ۶۵-۶۴ بیانگر آن است که تمام واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده پلی‌ساکارید دارای اشکال پیرانوزی هستند که نتایج حاصل از آزمون

شکل ۴ طیف NMR کربن پلی‌ساکارید خالص را نشان می‌دهد. وجود سیگنال در نواحی ppm ۱۰۱ و ppm ۱۰۴ به ترتیب نشان‌دهنده کربن‌های آنومری β-D-Manp و β-D-Glcp است. وجود سیگنال در نواحی ppm ۸۰ و ppm ۷۸ به ترتیب مربوط به کربن‌های شماره ۴ گلوکز و مانوزی است

زیر برای پلی ساکارید خالص استحصال شده از ریشه گیاه سریش ایرانی پیشنهاد می شود (شکل ۵).

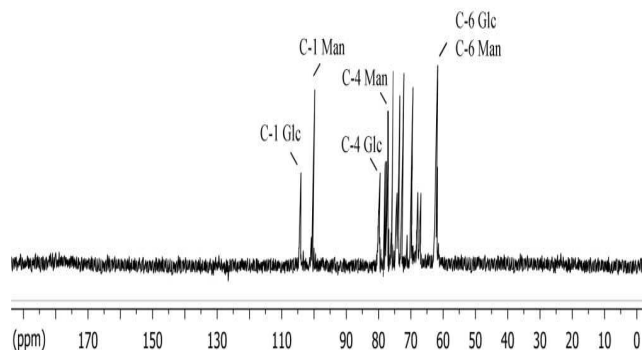


Fig 4 ^{13}C NMR spectrum of *E. persicus* polysaccharide

متیله کردن را تأیید کرد. نتایج NMR کربن پلی ساکارید خالص با نتایج حاصل از درجه چرخش نوری و طیف مادون قرمز که نشان می داد مقادیر زیادی از اتصالات نوع β در ساختار پلی ساکارید خالص وجود دارد، همخوانی داشت. در محدوده ۱۸-۲۲ ppm و ۱۷۰-۱۸۰ ppm از طیف NMR کربن، سیگنالی مشاهده نشد که می توان نتیجه گرفت پلی ساکارید خالص فاقد استر کربوکسیل (گروه استیل) است. این نتایج همراه با نتایج H-NMR در تطابق با نتایج حاصل از طیف مادون قرمز نمونه بود، لذا با اطمینان می توان بیان نمود که پلی ساکارید حاصل از ریشه گیاه سریش ایرانی از نوع استیله نیست.

با تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از طیف سنج مادون قرمز، تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پریدوات و تجزیه اسمیت، آنالیز متیله کردن همراه با نتایج حاصل از طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته، ساختار

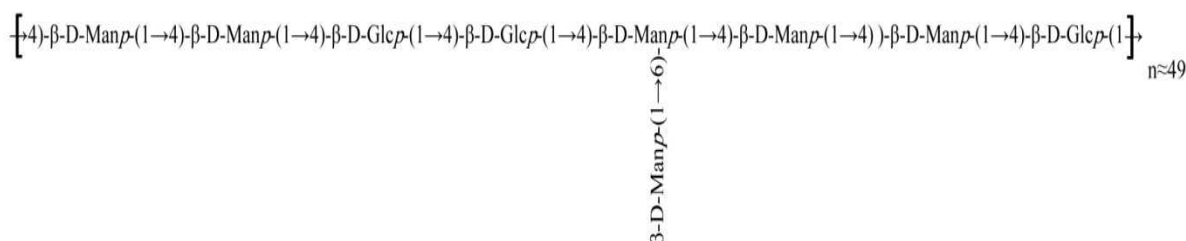


Fig 5 Predicted structure of purified polysaccharide from *E. persicus* roots

صنعت غذا و نیز صنایع دارویی و بهداشتی ضروری به نظر می رسد.

۵- سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه صنعتی شاهرود به علت کمک های مادی و معنوی صورت گرفته در راستای انجام طرح پژوهشی دانشجویی با کد ۴۶۴ تشکر و قدردانی می گردد.

۶- منابع

- [1] Stephen, A. M., Phillips, G. O., and Williams, P. A. 2006. Food polysaccharides and their applications. CRC press.
- [2] 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

۴- نتیجه گیری

با جمع بندی نتایج و مقایسه بین گونه سریش ایرانی با سایر گونه های مطالعه شده، می توان عنوان کرد که پلی ساکارید حاصل از ریشه گیاه سریش ایرانی یک گلوکومانان منشعب است که شاخه های فرعی آن روی اتم کربن شماره ۶ مانوز قرار دارد. این در حالی است که ساختارهای گزارش شده برای گلوکومانان سایر گونه های سریش از نوع خطی و یا بسیار کم شاخه است. همچنین گلوکومانان سریش ایرانی به علت نداشتن گروه استیل در ساختار، از سایر گونه های مطالعه شده متمایز است. با توجه به کاربرد گسترده گلوکومانان ها در صنایع مختلف، گلوکومانان حاصل از ریشه گیاه سریش ایرانی نیز می تواند به عنوان یک منبع جدید جهت استفاده در صنایع وابسته مورد استفاده قرار گیرد. لذا انجام مطالعات تکمیلی جهت کاربرد این گلوکومانان در صنایع مختلف از جمله

- [14] Dzhumamuratova, A., Rakhimov, D. A., and Ismailov, Z. F. 1979. Polysaccharides of *Eremurus*. X. Characteristics of the polysaccharides of *Eremurus lactiflorus* and *E. luteus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 15(5), 526-529.
- [15] Dzhumamuratova, A., Rakhimov, D. A., and Kondratenko, E. S. 1982. Polysaccharides of *Eremurus*. XV. Structure of the glucomannan of *Eremurus lactiflorus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(6), 642-646.
- [16] Gudyushkina, O. G., Rakhimov, D. A., and Ismailov, Z. F. 1976. A study of the polysaccharides of *Eremurus robustus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 12(5), 582-582.
- [17] Igamberdieva, M. I., Rakhimov, D. A., and Ismailov, Z. F. 1977. The structure of the glucomannan from the tuberous roots of *Eremurus altaicus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 13(2), 162-167.
- [18] Rakhimov, D. A., and Ismailov, Z. F. 1982. Polysaccharides of *Eremurus*. XIV. Structure of the glucomannan from *E. turkestanicus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(1), 127-128.
- [19] Rakhimov, D. A., and Kondratenko, E. S. 1983. Polysaccharides of *Eremurus*. XVIII. A glucomannan from the tuberous roots of *Eremurus tadshicorum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 19(3), 361-362.
- [20] Rakhimov, D. A., and Yuldasheva, N. P. 1996. Polysaccharides of *Eremurus* XXIX. Isolation of a glucomannan. *Chemistry of Natural Compounds*, 32(4), 587-588.
- [21] Smirnova, N., Mestechkina, N., and Shcherbukhin, V. 2001. The Structure and Characteristics of Glucomannans from *Eremurus iae* and *E. zangezuristicus*: Assignment of Acetyl Group Localization in Macromolecules. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(3), 287-291.
- [22] Gaggeri, R., Rossi, D., Azzolina, O., Ahmed, K. M., Avanzini, A., Mantelli, M., Gozzini, D., Paolillo, M., and Collina, S. 2013. Anti-inflammatory properties of ethanolic root extract of *Eremurus persicus* (Jaub and Spach) Boiss, a Kurdish herbal remedy. *J. Med. Plants Res*, 7, 1730-1735.
- [23] Vala, M. H., Asgarpanah, J., Hedayati, M. H., Shirali, J., and Bejestani, F. B. 2011. Antibacterial and cytotoxic activity of *Eremurus persicus* (Jaub and Spach) Boiss. from *Actinidia Chinensis* roots. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 975-983.
- [3] Phillips, G. O., and Williams, P. A. 2009. *Handbook of hydrocolloids*. CRC press.
- [4] 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.
- [5] Jahanbin, K., Gohari, A. R., 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.
- [6] Hu, C., Kong, Q., Yang, D., and Pan, Y. 2011. Isolation and structural characterization of a novel galactomannan from *Eremurus anisopterus* (Ker. et Kir) Regel roots. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 402-406.
- [7] Jahanbin, K., Hedayati, A., Moini, S., Gohari, A. R., Emam-Djomeh, Z., Esposito, A., and Bagheri, T. 2011. The first application of a new polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* for the health improvement of Atlantic salmon exposed to mercury chloride. *Toxicology and Industrial Health*.
- [8] Mumivand, H., Rustaii, A.-R., Jahanbin, K., and Dastan, D. 2010. Essential oil composition of *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 717-720.
- [9] Mozaffarian, V. 2008. *A Dictionary of Iranian Plant Names*. Tehran: Farhang Moaser, 208-210.
- [10] Karimi, H. 1995. *Names of Iran plants*. Tehran: Nashre-Daneshgahi press, pp: 412. (In Persian).
- [11] Zargari, A. 1990. *Medicinal Plants*. Tehran: Tehran University press, 325-328.
- [12] Asgarpanah, J., Amin, G., and Parviz, M. 2013. In vitro antiglycation activity of *Eremurus persicus* (Jaub. Et Sp.) Boiss. *African Journal of Biotechnology*, 10(54), 11287-11289.
- [13] Berdikeev, A., Rakhimov, D. A., Plekhanova, N. V., and Kondratenko, E. S. 1982. Glucomannan of the tuberous roots of *Eremurus cristatus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(2), 226-227.

- method. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(1), 12-15.
- [32] Rakhimov, D. A., Igamberdieva, M. I., Arifkhodzhaev, K. A., and Ismailov, Z. F. 1974. Polysaccharides of *Eremurus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 10(4), 512-513.
- [33] 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.
- [34] Ishrud, O., Zahid, M., Ahmad, V. U., 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.
- [35] Joshi, H., and Kapoor, V. P. 2003. *Cassia grandis* Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. *Carbohydrate Research*, 338(18), 1907-1912.
- [36] Muralikrishna, G., and Rao, M. V. S. S. T. S. 2007. Cereal Non-Cellulosic Polysaccharides: Structure and Function Relationship—An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(6), 599 - 610.
- [37] Capek, P., Alföldi, J., and Lišková, D. 2002. An acetylated galactoglucomannan from *Picea abies* L. Karst. *Carbohydrate Research*, 337(11), 1033-1037.
- [38] Xue, B.-L., Wen, J.-L., Xu, F., and Sun, R.-C. 2012. Structural characterization of hemicelluloses fractionated by graded ethanol precipitation from *Pinus yunnanensis*. *Carbohydrate Research*, 352(0), 159-165.
- African Journal of Microbiology Research, 5(16), 2349-2352.
- [24] Staub, A. M. 1965. Removal of protein – Sevag method. *Methods in Carbohydrate Chemistry: Academic Press*.
- [25] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- [26] Bradford, M. M. 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.
- [27] Chaplin, M. F., and Kennedy, J. F. 1994. *Carbohydrate Analysis. A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- [28] 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.
- [29] Ray, B. 2006. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. *Carbohydrate Polymers*, 66(3), 408-416.
- [30] 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.
- [31] Dzhumamuratova, A., Rakhimov, D. A., Shashkov, S. S., and Kondratenko, E. S. 1982. Polysaccharides of *Eremurus*. XIII. Study of the structure of the partially acetylated glucomannans by the ¹³C NMR

Isolation and structural characterization of a glucomannan from *Eremurus persicus* roots

Jahanbin, K.^{1*}, Masoumeh Beigi²

1. Assistant Prof, Department of Food Science and Technology, School of Agricultural Engineering, Shahrood University of Technology

2. M Sc. Student, Department of Food Science and Technology, School of Agricultural Engineering, Shahrood University of Technology

(Received: 2015/12/05 Accepted: 2016/05/11)

The *Eremurus* plant, popularly called “serish” in Iran, belongs to the Liliaceae family. *Eremurus persicus* is one of the most important species from this genus. It grows very well in Central Asia, including Iran, West Pakistan, Afghanistan, Iraq, Turkey, Palestine, Lebanon, Syria and Caucasus. In current study a water-soluble crude polysaccharide (CESP) was obtained from the roots of *E. persicus* by warm-water extraction (70°C), ethanol precipitation and deproteinization. CESP was purified with DEAE-cellulose and Sephadex G-100 columns and the main fraction was collected and freeze-dried. The total yield of purified polysaccharide was 4.5% of the dried material. Molecular weight, total carbohydrate content and specific optical rotation of polysaccharide were 71.2 KDa, 96.4% and -32.7° respectively. Monosaccharide analysis showed that polysaccharide was composed of Glucose and Mannose with a relative molar ratio of 1.0: 1.98. Its structural features were elucidated by a combination of chemical and analytical methods such as Methylation, GC-MS analysis, Periodate Oxidation and Smith degradation, Partial acid hydrolysis, FT-IR and ¹³C and ¹H NMR Spectroscopy. The data obtained indicate that purified polysaccharide from *E. persicus* roots possessed a backbone of β-(1→4)-linked Glucose and Mannose with branched attached to O-6 by β-1→linked Mannose.

Keywords: Polysaccharide, Extraction, Purification, *Eremurus persicus*, Structural Characterization

* Corresponding Author E-Mail Address: Jahanbin@shahroodut.ac.ir