

● مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره هفدهم، شماره ۴، ص ۳۲۷-۳۱۶، ۱۳۸۹

مقاله پژوهشی

تعیین درصد عصاره و گلیسرین ریشه شیرین بیان نواحی مختلف استان کرمان و نمونه‌هایی از

استان فارس با روش HPLC

ندا داعی پاریزی^{۱*}، امین باقی‌زاده^۲، میترا مهربانی^۳، غلامرضا بخشی‌خانیکی^۴

خلاصه

مقدمه: شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) از گیاهان دارویی مهمی است که از زمان‌های قدیم تا به امروز عصاره ریشه آن برای درمان بیماری‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ماده مؤثره اصلی ریشه این گیاه، گلیسرین است. این پژوهش به منظور تعیین درصد عصاره و نیز درصد گلیسرین موجود در ریشه شیرین بیان نواحی مختلف استان کرمان و مقایسه آن با نمونه‌هایی از استان فارس انجام شد.

روش: ۲۶ نمونه از ریشه شیرین بیان از نواحی مختلف استان کرمان و ۲ نمونه نیز از استان فارس (در مجموع ۲۸ نمونه از ۸ منطقه) جمع‌آوری شد و از ریشه‌های چند ساله آنها با روش سوکسله با استفاده از اتانول و در ۵ نمونه نیز با آب مقطر عصاره‌گیری به عمل آمد و درصد گلیسرین موجود در عصاره‌های حاصل با روش کروماتوگرافی مایع با عمل کرد بالا (HPLC) تعیین شد.

یافته‌ها: میانگین درصد عصاره حاصل از مناطق فسا و شیراز در فارس ($11.25 \pm 1.06\%$)، سیرجان ($17.29 \pm 0.90\%$) و بردسیر ($16.33 \pm 5.62\%$) نسبت به سایر مناطق مورد بررسی بالاتر بود ($P < 0.05$). میزان درصد گلیسرین نمونه‌های بردسیر ($5.1 \pm 0.02\%$)، سیرجان ($4.9 \pm 0.75\%$) و زرنند ($3.34 \pm 0.46\%$) به میزان غیرمعنی‌داری بالاتر از نمونه‌های فارس ($3.65 \pm 0.59\%$) بود. میزان عصاره و درصد گلیسرین حاصل از عصاره‌گیری با اتانول بیشتر از عصاره‌گیری با آب مقطر بود ($P < 0.05$). نمونه‌هایی که پودر ریشه آنها زردرنگ بود نسبت به نمونه‌های قهوه‌ای و نیز نمونه‌های مربوط به مناطق با ارتفاع نسبتاً بالا و خنک درصد گلیسرین بیشتری داشتند (به ترتیب $P < 0.01$ و $P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: در مقایسه با سایر مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که میزان عصاره و درصد گلیسرین موجود در ریشه شیرین بیان اکثر نواحی استان کرمان در حد نسبتاً بالایی است. توصیه می‌شود اقدامات مناسب برای برداشت از ریشه این گیاه برای استفاده داخلی و صادرات صورت گیرد و کشت صنعتی این گیاه در مناطق مناسب استان پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: شیرین بیان، عصاره، گلیسرین، کروماتوگرافی (HPLC)، استان کرمان، استان فارس

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان ۲- استادیار ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی، مرکز بین‌المللی علوم و

تکنولوژی پیشرفته علوم محیطی، کرمان ۳- دانشیار فارماکوتکونوزی، مرکز تحقیقات فارماسوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۴- دانشیار سیتوتنیک گیاهی، دانشگاه پیام نور تهران

* نویسنده مسؤل، آدرس: مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان • آدرس پست الکترونیک: neda.d.p@gmail.com

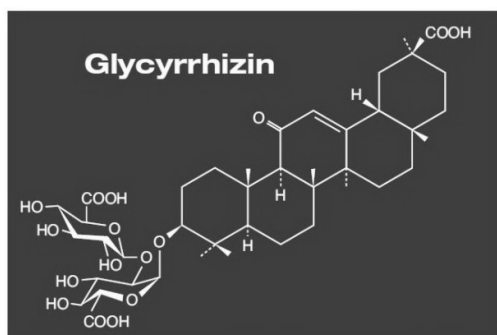
دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۱۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۹/۳/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۴/۲

مقدمه

شیرین بیان (Licorice) گیاهی دارویی با نام علمی *Glycyrrhiza glabra L.* است. ریشه این گیاه از زمان‌های قدیم در طب سنتی و هم‌چنین امروزه در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر گیاه دارویی حاوی ده‌ها ماده با اثراتی جالب و متفاوت می‌باشد. در حقیقت طبیعت بزرگ‌ترین آزمایشگاهی است که به‌عنوان منبعی بی‌انتها در اختیار بشر قرار دارد. داروهای گیاهی به علت سازگاری بهتر با بدن در اکثر موارد دارای عوارض جانبی کم‌تری نسبت به مواد صنعتی هستند. کمیت و کیفیت مواد مؤثر و در نتیجه آثار درمانی گیاهان دارویی بستگی زیادی به شرایط محیطی رشد گیاهان دارد. از مهم‌ترین این عوامل می‌توان به درجه حرارت محیط، میزان رطوبت، میزان نور، شرایط خاک و ارتفاع محل رشد اشاره کرد (۱،۲).

یکی از گیاهان دارویی مهم و قدیمی جهان شیرین بیان می‌باشد. این گیاه بیشتر در نواحی معتدل رشد می‌کند. درجه حرارت مناسب برای رشد این گیاه ۶ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. رویش این گیاه در اطراف دریای مدیترانه، جنوب و جنوب شرق آسیا از جمله ایران گسترش زیادی دارد. ریشه شیرین بیان دارای ساپونین تری‌ترپنویید، مخصوصاً گلیسریزین و ۲۴ هیدروکسی گلیسریزین است که به ترتیب ۵۰ تا ۱۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز هستند و ماده مؤثره اصلی ریشه این گیاه، گلیسریزین یا اسید گلیسریزیک است. میزان ماده مؤثره به خصوصیات ژنتیکی (واریته) و شرایط محیطی محل رویش بستگی دارد، چنانچه مقدار آن در واریته‌های اسپانیایی ۶ تا ۸ درصد و در واریته‌های روسی ۱۰ تا ۱۴ درصد می‌رسد (۳-۱). از هیدرولیز اسید گلیسریزیک دو ملکول اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیسرتیک به دست می‌آید. گلیسریزین، نمک‌های پتاسیم، کلسیم و منیزیم اسید گلیسریزیک است. گلیسریزین تجارتي نمک آمونیوم اسید گلیسریزیک می‌باشد. فرمول شیمیایی گسترده گلیسریزین در شکل

شماره یک آمده است. ریشه شیرین بیان حدود ۳٪ نشاسته، ۸٪ گلوکز و ۵/۶-۲/۴٪ ساکارز نیز دارد (۲،۴).



شکل ۱. فرمول شیمیایی گلیسریزین (ساپونین تری‌ترپنوییدی پنج‌حلقه‌ای)

بیش از ۶۰ سال است که در ژاپن از گلیسریزین برای درمان هپاتیت C مزمن استفاده می‌شود (۵) و بیش از ۲۰۰۰ سال است که در درمان زخم‌ها از این گیاه استفاده شده است. با اثری که این گیاه روی لایه‌های مخاطی دارد، از آن در درمان زخم معده و نیز برطرف کردن التهاب ناشی از مصرف آسپیرین (گاستریت) استفاده می‌شود. بررسی‌های انجام شده نشان داده است که گلیسریزین و اسید گلیسریزیک از رشد RNA و DNA تعدادی از ویروس‌ها از جمله ویروس هپاتیت A و C، هرپس، HIV و CMV جلوگیری می‌کنند (۷-۵). هم‌چنین عصاره این گیاه به‌عنوان ضدالتهاب (۸،۹)، ضدسرفه، ضدقارچ و ضدسرطان نیز استفاده می‌شود (۱۰-۱۳).

با توجه به ارزش بالای مواد موجود در ریشه گیاه شیرین بیان به منظور استفاده به‌عنوان دارو و نیز کاربرد آن در صنعت و شیرینی‌سازی و از طرفی با توجه به پراکندگی رویش طبیعی این گیاه در مناطق وسیعی از کره زمین و نیز کشت این گیاه در سال‌های اخیر در بعضی کشورها، لازم است انواع مختلف این گیاه به‌خصوص از نظر میزان مواد مؤثره در ریشه آن در نواحی مختلف شناسایی شوند. بدین

منظور این پژوهش برای مشخص شدن میزان عصاره تام و نیز تعیین غلظت گلیسرین گیاه در نواحی مختلف استان کرمان طراحی و اجرا شد. از طرفی درصد عصاره و درصد گلیسرین حاصل از نمونه‌های این گیاه در استان کرمان با نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان فارس (محل اصلی جمع‌آوری تجاری ریشه این گیاه در ایران) مقایسه شد. هم‌چنین میزان عصاره و میزان گلیسرین موجود در ریشه با توجه به شرایط زیستی گیاه (ارتفاع، وضعیت آب و هوا و...) نیز تعیین شد.

نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند برای تعیین ضرورت جمع‌آوری صنعتی و تجاری ریشه این گیاه در نواحی مختلف استان کرمان مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی چون امروزه این گیاه به‌عنوان یک گیاه دارویی و صنعتی در بسیاری از کشورها کشت می‌شود، می‌توان کشت آن را در شرایط مناسب‌تر با استفاده از نمونه‌های ژنتیکی مطلوب‌تری در ایران نیز ترویج و توصیه کرد. در مورد ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه و اثرات درمانی آن در نواحی مختلف دنیا از جمله ایران تحقیقاتی صورت گرفته است، اما با توجه به اینکه بررسی‌های انجام شده مربوط به استان کرمان به‌صورت پراکنده و با نمونه‌های محدودی انجام شده است (۵،۱۴،۱۵). ضرورت بررسی وضعیت شیمیایی ریشه این گیاه در منطقه کاملاً احساس می‌شود.

روش بررسی

به‌منظور تهیه نمونه‌های لازم و مناسب از گیاه شیرین بیان برای انجام تحقیق، چند کارشناس کشاورزی که شناخت کافی در مورد این گیاه داشتند، انتخاب شدند. بعد از توجیه آنها در مورد یکنواختی تهیه نمونه‌ها، این افراد برای جمع‌آوری گیاه به نواحی مختلف استان فرستاده شدند و نمونه‌ها در اوایل تابستان به‌صورت گیاه کامل (با برگ، ساقه و ریشه) پس از شناسایی، جمع‌آوری شدند. در موقع

جمع‌آوری دقت به عمل می‌آمد که ریشه‌های چندساله و حتی‌الامکان از عمق زمین در آورده شوند. پس از جداسازی خاک و مواد اضافی از ریشه (بدون شستن با آب)، هر نمونه در کیسه نایلونی جداگانه گذاشته می‌شد و محل و تاریخ برداشت بر روی آن ثبت و در همان روز به کرمان ارسال می‌شد. مجدداً پس از بررسی و تأیید نمونه، ریشه‌های چندساله پس از تمیز کردن مجدد به قطعات چند سانتی‌متری تقسیم و در کیسه‌های نایلونی با ثبت مشخصات قرار داده شد و سپس به فریزر 20°C - انتقال می‌یافتند. جمعاً ۲۶ نمونه از استان کرمان و ۲ نمونه از استان فارس (شیراز و فسا) جمع‌آوری شدند. برای عصاره‌گیری ریشه‌های هر نمونه به‌صورت جداگانه مجدداً تمیز و قسمت‌های سطحی آنها تراشیده و پس از خرد کردن آسیاب گردیدند. سپس نمونه‌ها به مدت چند ساعت در هوای اتاق دور از نور مستقیم خورشید قرار دادند تا خشک شوند و پس از آسیاب مجدد، به‌صورت تقریباً پودر در آمده و آماده عصاره‌گیری شدند. به‌منظور عصاره‌گیری با روش سوکسله 20°C گرم پودر خشک ریشه از هر نمونه به 240 میلی‌لیتر اتانول 80% اضافه و با دستگاه سوکسله به مدت $1/5$ ساعت عصاره‌گیری به عمل آمد. عصاره‌های حاصل از هر یک از نمونه‌ها در فالكون‌های مناسب ریخته و در یخچال جهت تغلیظ نگهداری شدند. سپس عصاره‌ها با استفاده از دستگاه Rotary در درجه حرارت $50-60^{\circ}\text{C}$ به مدت یک ساعت تغلیظ شدند. عصاره‌های غلیظ شده نیز برای تبدیل به نمونه کاملاً بدون آب و الکل با استفاده از دستگاه Oven خشک شده و به‌صورت جامد در آمدند. سپس وزن آنها تعیین و ثبت شد. برای تعیین میزان گلیسرین موجود در عصاره‌های خشک حاصل از نمونه‌های مورد بررسی، از روش کروماتوگرافی مایع با عمل کرد بالا (High Performance Liquid Chromatography=HPLC) استفاده شد (۴،۱۵،۱۸،۱۹). دستگاه مورد استفاده مدل

۸۴۰= وزن مولکولی مونوآمونوم گلیسرینات بدون آب
برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج، از آزمون آنالیز
واریانس یک طرفه و آزمون t دو نمونه‌ای استفاده شد.

نتایج

میزان غلظت گلیسرین در ۲۸ نمونه مورد بررسی در
شکل ۲ و یک نمونه از کروماتوگرام‌های حاصل از دستگاه
HPLC در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. میزان درصد عصاره
حاصل از عصاره‌گیری با اتانول و نیز درصد گلیسرین
عصاره تعیین شده به وسیله دستگاه HPLC مربوط به ۲۸
نمونه ریشه گیاه شیرین بیان مورد مطالعه و همچنین درصد
میزان عصاره خشک حاصل از عصاره‌گیری با روش
سوکسله و نیز درصد گلیسرین عصاره خشک نمونه‌ها در
جدول شماره ۱ آورده شده است.

میزان عصاره حاصل از روش عصاره‌گیری با اتانول
(سوکسله) با روش عصاره‌گیری با آب مقطر در شرایط
یکسان با استفاده از ۵ نمونه مشترک که به صورت تصادفی
انتخاب شدند، مقایسه شد. میانگین وزن عصاره در روش
عصاره‌گیری با اتانول $3/90 \pm 16/96$ گرم و در روش
عصاره‌گیری با آب مقطر $1/82 \pm 7/76$ گرم به دست آمد
(جدول ۲). بر این اساس میزان عصاره حاصل از روش
اتانولی بیشتر از روش استفاده از آب مقطر می‌باشد
($P < 0/01$). با توجه به اینکه شرایط آب و هوا و ارتفاع منطقه
در میزان گلیسرین موجود در ریشه شیرین بیان می‌تواند
اثر بگذارد، نمونه‌های جمع‌آوری شده با توجه به شرایط
محیطی و رنگ ریشه مورد مقایسه قرار گرفتند که نتایج
حاصل در جداول شماره ۳ و ۴ آمده است. در این بررسی
مناطق که ارتفاع آنها از سطح دریا کمتر از ۱۰۰۰ متر بود
به عنوان ارتفاع کم (*)، نواحی با ارتفاع ۱۰۰۰ تا ۱۸۰۰ متر
به عنوان ارتفاع متوسط (***) و نواحی ۱۸۰۰ تا ۲۵۰۰ متر
به عنوان ارتفاع نسبتاً بالا (****) در نظر گرفته شدند و
اختلاف مناطق از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/01$).

SHIMADZA-10AVP با ستونی از نوع SHIMPACK-CLC-C8
به ابعاد $25\text{cm} \times 4/6\text{mm}$ و قطر ذرات ۵ میکرومتر بوده و
دیتکتور مورد استفاده UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر،
دمای انجام آزمایش دمای اتاق و سیستم ایزوکراتیک بود.
فاز متحرک، سرعت جریان حلال و حجم تزریق
به ترتیب (استونیتریل ۲۵٪، متانول ۴۵٪ و آب ۲۸٪ و
اسیداستیک گلاسیال ۲ درصد)، ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. در
این روش از هر نمونه ۳ بار تزریق شد. دستگاه با
این دو متاسین استانداردسازی داخلی شد (۱۴، ۱۵، ۱۷).

روش کار با دستگاه HPLC

ابتدا غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ میکروگرم بر
میلی‌لیتر از استاندارد گلیسرین (مربوط به شرکت Sigma
آمریکا، ملح آمونوم، با درجه خلوص ۷۵٪) در حلال آب
و متانول به نسبت ۱:۱ تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد
(از هر نمونه ۳ بار) و سپس با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲
میکرومتری صاف و در بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد.
سپس ۲۰ میلی‌لیتر حلال آب و متانول به آن اضافه گردید
و دقت به عمل آمد تا نمونه کاملاً از فیلتر خارج شود. در
نهایت حجم نمونه داخل بالن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.
سپس هر یک از نمونه‌ها به دستگاه HPLC تزریق گردیدند
و با استفاده از سطح زیر منحنی هر کروماتوگرام و منحنی
کالیبراسیون مقدار گلیسرین هر نمونه محاسبه شد. سپس
با استفاده از فرمول زیر درصد اسید گلیسرینیک تعیین شد
(۲-۱۷، ۴):

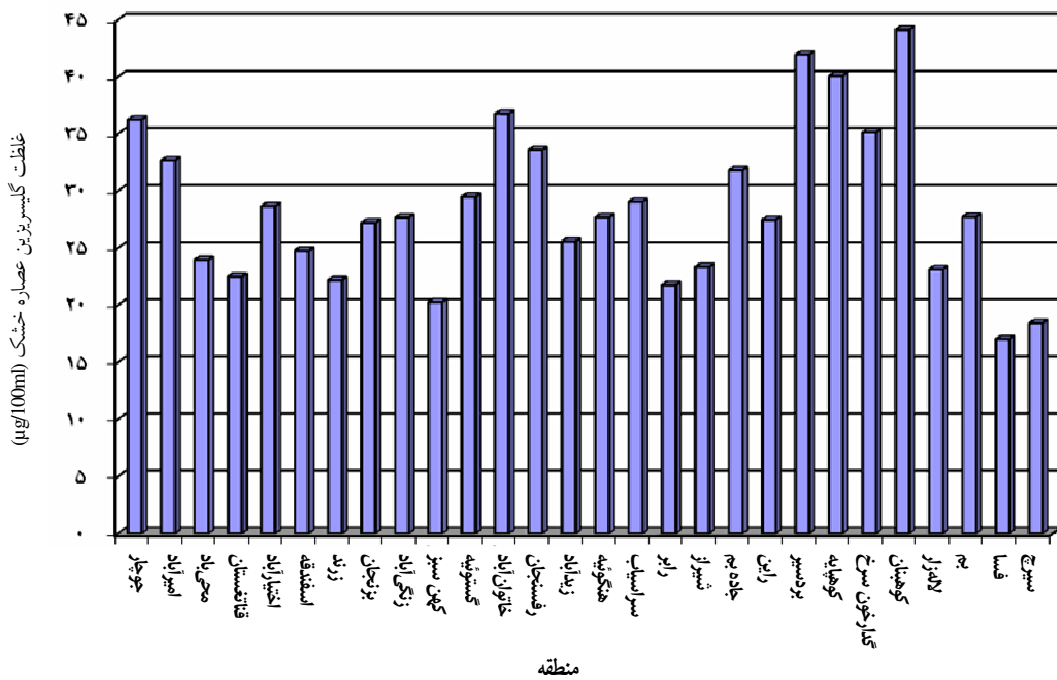
$$\text{درصد اسید گلیسرینیک} = A \times \frac{5}{m} \times B \times \frac{822}{840}$$

A = غلظت مونوآمونوم گلیسرینات بر حسب گرم در
۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه که با استفاده از منحنی کالیبراسیون
محاسبه شده است.

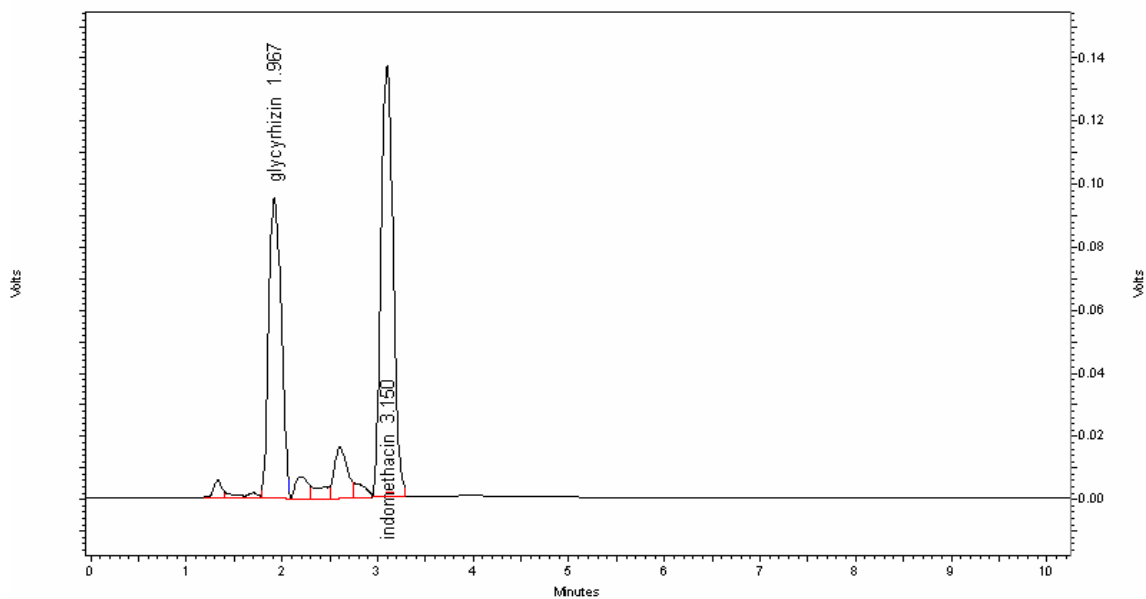
B = درصد خلوص استاندارد مونوآمونوم گلیسرینات

m = وزن نمونه بر حسب گرم

۸۲۲ = وزن مولکولی اسید گلیسرینیک



شکل ۲. غلظت گلیسرین در ۲۸ نمونه مورد بررسی



شکل ۳. کروماتوگرام HPLC مربوط به نمونه شماره ۲۴ (بردسیر)، عصاره‌گیری با اتانول

جدول ۱. محل جمع‌آوری، شرایط اقلیمی و میزان درصد عصاره حاصل از عصاره‌گیری با اتانول و درصد گلیسرین مرتبط به ۲۸ نمونه پودر

ریشه گیاه شیرین بیان مورد بررسی

کد نمونه	محل جمع‌آوری نمونه‌ها	شهر	شرایط آب‌وهوا و ارتفاع منطقه نمونه‌برداری	درصد عصاره تام ریشه	میانگین مقدار گلیسرین (میکروگرم درصد میلی‌گرم عصاره)	درصد گلیسرین پودر ریشه
۱	جو پار	کرمان	**	۱۲/۲۵	۳۶/۲۳ ± ۰/۰۰۲۷	۴/۴۳
۲	امیرآباد	کرمان	*	۱۴	۳۲/۶۷ ± ۰/۰۱۳۴	۴/۵۸
۳	محمی‌آباد	ماهان	**	۱۴/۵	۲۳/۹۶ ± ۰/۰۰۶۲	۳/۴۸
۴	قناتخستان	ماهان	**	۱۳	۲۲/۵۰ ± ۰/۰۰۸۴	۲/۹۱
۵	اختیارآباد	کرمان	*	۱۲/۵	۲۸/۶۶ ± ۰/۰۰۳۸	۳/۵۹
۶	اسفندقه	بافت	***	۱۷	۲۴/۷۶ ± ۰/۰۰۰۳	۴/۲
۷	زرنند	زرنند	*	۹/۵	۲۲/۱۸ ± ۰/۰۰۰۴	۲/۱
۸	بزنجان	بافت	**	۱۴/۲	۲۷/۲۰ ± ۰/۰۱۳۰	۳/۸۸
۹	زنگی‌آباد	کرمان	*	۱۰	۲۷/۶۵ ± ۰/۰۰۶۰	۲/۷۶
۱۱	کهن سبز	پاریز سیرجان	***	۱۶/۵	۲۰/۲۷ ± ۰/۰۲۰۸	۳/۹۶
۱۲	گستویه	پاریز سیرجان	**	۱۷/۲۵	۲۹/۴۹ ± ۰/۰۰۹۴	۵/۰۸
۱۳	خاتون‌آباد	شهر بابک	*	۱۶/۵	۳۶/۷۶ ± ۰/۰۰۶۴	۶/۰۷
۱۴	رفسنجان	رفسنجان	*	۱۱/۵	۳۳/۵۹ ± ۰/۰۰۷۷	۳/۸۶
۱۵	زیدآباد	سیرجان	*	۱۸/۷	۲۵/۵۹ ± ۰/۰۰۲۶	۴/۷۷
۱۶	هنگویه	پاریز سیرجان	***	۱۷/۵	۲۷/۶۸ ± ۰/۰۰۴۱	۴/۸۵
۱۸	سر آسیاب	کرمان	**	۱۷/۶	۲۹/۰۵ ± ۰/۰۰۳۸	۵/۱۱
۱۹	رابر	بافت	**	۱۲/۳	۲۱/۷۶ ± ۰/۰۰۲۸	۲/۶۹
۲۰	شیراز	شیراز	*	۱۷/۵	۲۳/۳۶ ± ۰/۰۰۱۸	۴/۰۷
۲۲	اول جاده بم	بم	**	۱۱	۳۱/۸۱ ± ۰/۰۰۸۳	۳/۴۹
۲۳	راین	راین	***	۱۷	۳۷/۴۶ ± ۰/۰۰۳۵	۶/۳۷
۲۴	بردسیر	بردسیر	***	۱۱/۵	۴۱/۹۴ ± ۰/۰۰۳۴	۴/۸۱
۲۵	کوهپایه	کوهپایه	***	۱۲/۵	۴۰/۰۷ ± ۰/۰۰۵۴	۵
۲۶	کوه پنچ	بردسیر	***	۱۵	۳۵/۱۳ ± ۰/۰۰۳۰	۵/۲۶
۲۷	کوهبنان	کوهبنان	**	۱۵/۵	۴۴/۱۱ ± ۰/۰۱۸۴	۶/۸۳
۲۸	لاله‌زار	بردسیر	***	۲۲/۵	۲۳/۱۴ ± ۰/۰۵۶۳	۵/۲
۲۹	بم	بم	*	۱۱/۵	۲۷/۷۲ ± ۰/۰۱۰۵	۳/۱۸
۳۲	فسا	فسا	*	۱۹	۱۷/۰۳ ± ۰/۰۱۲۴	۳/۲۳
۳۴	سیرج	سیرج	*	۱۰	۱۸/۴۳ ± ۰/۰۰۹۶	۱/۸۵

* ارتفاع نسبتاً پایین + آب و هوا در فصل تابستان گرم ** ارتفاع متوسط + آب و هوای معتدل در فصل تابستان

*** ارتفاع نسبتاً بالا + آب و هوای خنک در فصل تابستان

جدول ۲. درصد عصاره حاصل از ۱۰۰ گرم پودر ریشه شیرین بیان

در ۵ نمونه با استفاده از عصاره گیری با آب مقطر

نمونه	محل جمع آوری نمونه	درصد عصاره
۶	اسفندقه	۶/۵
۱۲	گستویه	۶/۵
۱۳	خاتون آباد	۱۰
۲۸	لاله زار	۹/۵
۲۹	بم	۶/۵

جدول ۳. میانگین وزن عصاره خشک اتانولی ریشه شیرین بیان ۲۸نمونه مورد بررسی بر اساس رنگ عصاره ($P < 0.001$)

رنگ عصاره	تعداد نمونه	میانگین درصد عصاره ریشه
زرد	۹	17.730 ± 2.445
قهوه‌ای	۱۹	13.230 ± 2.715

نتایج حاصل از بررسی درصد عصاره و گلیسرین نمونه‌ها بر اساس منطقه جمع آوری گیاه (۸ منطقه شامل ۷ شهرستان از استان کرمان و منطقه فارس) در جدول شماره ۵ آمده است.

جدول ۴. میانگین درصد عصاره و درصد گلیسرین عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان

بر اساس ارتفاع و وضع آب و هوای منطقه

منطقه آب و هوایی	تعداد نمونه	میانگین درصد عصاره	میانگین درصد گلیسرین
*	۱۱	$13.70 \pm 3.62b$	$3.55 \pm 1.18a$
**	۹	$14.78 \pm 2.28b$	$4.11 \pm 1.30a$
***	۸	$16.81 \pm 3.38b$	$4.95 \pm 0.73a$

a اختلاف بین مناطق از نظر آماری معنی دار است ($P < 0.05$).

b اختلاف بین مناطق از نظر آماری معنی دار نیست.

جدول ۵. میانگین درصد عصاره اتانولی ریشه شیرین بیان و میانگین درصد گلیسرین موجود در آنها

بر اساس مناطق محل جمع آوری نمونه‌ها

شماره منطقه	نام منطقه یا شهرستان	تعداد نمونه	میانگین درصد عصاره اتانولی	میانگین درصد گلیسرین
۱	کرمان	۱۰	13.33 ± 2.54	3.90 ± 1.33
۲	بافت	۳	14.50 ± 2.36	3.59 ± 0.79
۳	زرنند	۲	12.50 ± 2.24	4.46 ± 3.34
۴	سیرجان	۵	17.29 ± 0.90	4.94 ± 0.75
۵	رفسنجان	۱	۱۱/۵۰	۳/۸۶
۶	پردیس	۳	16.33 ± 5.62	5.09 ± 0.102
۷	فارس	۲	18.25 ± 1.06	3.65 ± 0.59
۸	بم	۲	11.25 ± 0.35	3.33 ± 0.102

اختلاف وزن نهایی عصاره در مناطق مختلف معنی دار ($P < 0.05$) و اختلاف میزان درصد گلیسرین معنی دار نبود

جدول ۶. مقایسه میزان درصد گلیسرین نمونه‌های برتر در بررسی حاضر با بررسی انجام شده

به وسیله حاجی مهدی پور و همکاران (۲) ($P < 0.05$)

نام منطقه (در بررسی حاضر)	میانگین درصد گلیسرین	نام منطقه (در بررسی رفرنس ۲)	میانگین درصد گلیسرین
بردسیر	۵/۹±۰/۰۲	کرمانشاه	۴/۱۴±۰/۵۹
سیرجان	۴/۴۹±۰/۷۵	سرحد فارس	۴/۰۰±۰/۵۱
زرنند	۴/۴±۳/۳۰	کرمان	۲/۸۰±۰/۳۰
کرمان	۳/۹۰±۱/۳۳	مهاباد	۲/۴۳±۰/۳۲
شیراز	۳/۶۵±۰/۵۹	سیرجان	۱/۶۰±۰/۲۹

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی ۲۶ نمونه ریشه گیاه شیرین بیان جمع آوری شده از نواحی مختلف استان کرمان و دو نمونه از استان فارس از نظر میزان عصاره و نیز مقدار گلیسرین (ماده مؤثره اصلی عصاره) موجود در نمونه‌ها، ریشه چند ساله نمونه‌هایی که پودر آنها زردرنگ بود مقدار عصاره بیشتری نسبت به ریشه‌هایی با پودر قهوه‌ای رنگ داشتند (جدول ۳). رنگ زرد ریشه شیرین بیان مربوط به فلاونوئید موجود در آن می‌باشد (۳). از طرفی ریشه‌هایی که زرد رنگ بودند اغلب مربوط به نمونه‌های نواحی با ارتفاع نسبتاً بالا و با آب و هوای خنک می‌باشد (مثل لاله‌زار، کوه پنج، بردسیر، پاریز و اسفندقه بافت). با توجه به جدول شماره ۵ بالاترین میانگین درصد عصاره اتانولی به ترتیب مربوط به نمونه‌های منطقه فارس (۱۸/۲۵±۱/۰۶)٪، سیرجان (۱۷/۲۹±۰/۹۰)٪ و بردسیر (۱۶/۳۳±۵/۶۳)٪ می‌شود. میانگین مقدار عصاره نمونه بم کمترین مقدار (۱۱/۲۵±۰/۳۵)٪ را شامل می‌شد ($P < 0.05$). از نظر مقدار عصاره اتانولی حداکثر مقدار عصاره تام استخراج شده در درجه اول به لاله‌زار بردسیر (۲۲/۵)٪ و سپس به فسا (۱۹)٪ مربوط می‌شود. کمترین مقدار مربوط به نمونه جمع آوری شده از زرنند، سیرچ و

زنگی آباد (اطراف شهر کرمان) به میزان حدود ۱۰٪ می‌باشد. درصد عصاره در بررسی Lauren ۵ تا ۱۵٪ با متوسط ۳/۲٪ بوده است (۲۱). نواحی با آب و هوای گرم اغلب مقدار عصاره کمتری داشته‌اند. از نظر میزان گلیسرین با توجه به مناطق ۸ گانه، میزان گلیسرین نمونه‌های منطقه بردسیر در درجه اول (۵/۹±۰/۰۲) و سیرجان در رتبه دوم (۴/۹۴±۰/۷۵) قرار دارند (جدول ۶). در حالی که مقدار گلیسرین در نمونه‌های فارس در رتبه‌های پایین تر (۳/۶۵±۰/۵۹) قرار می‌گیرند. البته از نظر آماری این اختلاف معنی دار نیست. غلظت گلیسرین موجود در عصاره ریشه شیرین بیان نمونه‌های مربوط به کوهبنان (۶/۸۳)٪ و لاله‌زار بردسیر (۵/۲۶)٪ در حد بالا و نمونه‌های مربوط به سیرچ و زرنند (۱/۸ و ۲/۱)٪ کمترین مقدار را شامل می‌شود (نمودار ۲). به طور کلی در ۱۴ مورد از ۲۶ نمونه مربوط به استان کرمان میزان گلیسرین ریشه شیرین بیان بین ۴ تا ۶/۸٪ و در ۱۲ مورد بین ۱/۸۵ تا ۴٪ به دست آمد که مقدار متوسط مربوط به دو نمونه شیراز در حدود ۴٪ می‌باشد. در بررسی انجام شده در ایتالیا این مقدار بین ۰/۴۲ تا ۲/۰۸٪ گزارش شده است (۲۱). در بررسی به عمل آمده به وسیله داورپناه و همکاران میزان گلیسرین حاصل از ۵ نمونه مربوط به

میانگین وزن عصاره در روش عصاره گیری با اتانول $16/96 \pm 3/90$ گرم ولی در روش عصاره گیری با آب مقطر $7/76 \pm 1/82$ گرم به دست آمد و بدین ترتیب بازدهی عصاره گیری با استفاده از اتانول خیلی بیشتر از عصاره گیری با آب مقطر است ($P < 0/01$). چون اختلاف وزن عصاره تام در دو روش زیاد بود نیازی به اندازه گیری گلیسرین با روش آب مقطر احساس نشد. با توجه به جدول شماره ۱ مشخص می شود که مقدار عصاره و غلظت گلیسرین موجود در عصاره در اکثر نمونه های مورد بررسی در یک جهت افزایش و کاهش را نشان می دهد. به جز نمونه های مربوط به استان فارس به ویژه نمونه فسا با وجود بالابودن مقدار عصاره غلظت و مقدار کلی گلیسرین حاصله از آن کمتر از نمونه های دیگر می باشد. نتایج حاصل از این تحقیق علاوه بر اینکه نشان می دهد ریشه شیرین بیان استان کرمان دارای درصد بالایی از گلیسرین است، توجیه خوبی برای جمع آوری صنعتی و تجاری ریشه این گیاه از نواحی مختلف استان، خواهد بود. از طرفی چون امروزه این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی و صنعتی در بسیاری از کشورها کشت داده می شود، می توان کشت آن را در شرایط مناسب تر با استفاده از نمونه های مرغوب تر در استان و سایر نقاط ایران ترویج و توصیه کرد.

نواحی مختلف ایران بین $6/2$ تا $10/2$ ٪ گزارش شده است (۱۵). در گزارش Lauren مقدار گلیسرین به دست آمده بین $1/3$ تا $7/1$ ٪ (متوسط $6/7$ ٪) ذکر شده است (۲۱).

مقایسه درصد گلیسرین حاصل از نمونه های جمع آوری شده از نواحی مختلف ایران که در بررسی حاجی مهدی پور به دست آمده است (۵) با درصد حاصل از بررسی حاضر مقدار گلیسرین نشان می دهد که اکثر نواحی استان کرمان نسبت به سایر نقاط ایران درصد بالایی را نشان می دهد ($P < 0/05$). هرچند به علت اختلاف در روش عصاره گیری در این دو بررسی (اتانولی و آبی) مقایسه دقیق ممکن نیست. البته اختلاف مقدار گلیسرین نمونه های مناطق مشترک در این دو تحقیق با اختلاف روش عصاره گیری و اینکه ما از چند ناحیه یک منطقه نمونه برداری کرده ایم قابل توجیه است. همان طور که در جدول ۴ دیده می شود اختلاف مقدار عصاره تام حاصل از نمونه های به دست آمده از نواحی با ارتفاع نسبتاً بالا و با آب و هوای خنک به طور غیرمعنی دار بیشتر از نواحی با ارتفاع پست و آب و هوای گرم می باشد. غلظت گلیسرین نمونه های نواحی نسبتاً مرتفع و با آب و هوای خنک به طور معنی داری بیشتر از نواحی کم ارتفاع و گرم می باشد ($P < 0/05$).

The Percent of Extract and Glycyrrhizin Content of *Glycyrrhiza glabra* Root Grown in Kerman Province and Some Samples from Fars Province by HPLC Method

Daie Parizi N., B.Sc.¹, Baghizadeh A., Ph.D.², Mehrabani M., Ph.D.³, Bakhshi Khaniki Gh., Ph.D.⁴

1. M.Sc. student of Plant Biotechnology, International Center for Science & High technology & Environmental Sciences, Kerman, Iran
2. Associate professor of Genetics & Plant Biotechnology, International Center for Science & High technology & Environmental Sciences, Kerman, Iran
3. Associate professor of Pharmacognosy, Pharmaceutics Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
4. Associate professor of Plant Cytogenetic, Tehran Payame Noor University, Tehran, Iran

* Corresponding author, e-mail: neda.d.p@gmail.com

(Received: 10 March, 2010 Accepted: 23 June, 2010)

Abstract

Background & Aims: Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) is an important herbal medicine that its root extract has long been used for the treatment of various diseases. The essential component of its root is glycyrrhizin. This study was performed to determine the percentage of the extract and glycyrrhizin content of the roots of *Glycyrrhiza glabra* grown in different areas of Kerman province and some samples in Fars province.

Methods: Twenty six samples from the roots of *Glycyrrhiza glabra* grown in various areas of Kerman province and 2 samples from Fars Province (a total of 28 samples from 8 regions) were collected and extracted by using ethanol and distilled water (for 5 samples). The percentage of glycyrrhizin in the extracts was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique.

Results: Mean percent of extracts from the samples of Fasa and Shiraz in Fars province ($18.25 \pm 1.06\%$), Sirjan ($17.29 \pm 0.90\%$) and Bardsir ($16.33 \pm 5.62\%$) were higher than other areas ($P < 0.05$). Glycyrrhizin contents of samples of Bardsir ($5.09 \pm 0.02\%$), Sirjan ($4.94 \pm 0.75\%$), Zarand ($4.46 \pm 3.34\%$) were non significantly higher than Glycyrrhizin content of Fars samples ($3.65 \pm 0.59\%$). The percentage of the extract and glycyrrhizin were higher in ethanol extract compared to the aqueous extract ($P < 0.05$). Samples with yellow root color had higher percentage of glycyrrhizin than those with brown color and samples of relatively cold and high altitude areas had higher glycyrrhizin content ($P < 0.001$, $P < 0.05$ respectively).

Conclusion: Overall, it is concluded that the percent of extract and glycyrrhizin content of licorice root in the most areas of Kerman is relatively high. Appropriate measures for using this root in the country and for exporting purposes and also industrial growing in potential areas of the Province are recommended.

Keywords: *Glycyrrhiza glabra*, Extract, Glycyrrhizin, HPLC, Kerman province, Fars province

References

1. Majnoon Hosseini N, Emami S.D. Cultivation and Production of Certain Herbs and Spices. Tehran, University of Tehran Press, 2007; pp232-5 [Persian].
2. Omidbaigi R. Production and Processing of Medical Plants. Mashhad, Behnashr Co. 2005; pp267-75 [Persian].
3. Salehi Surmaghi M.H. Medical Plants and Phylotherapy. Tehran, Donyayeh Taghziyeh, 2006; pp257-26 [Persian].
4. Tavasoly V. Persian translation of High Performance Liquid Chromatography by Mayer V.A. Tehran, University Center Press, 2006 [Persian].
5. Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [Stronger Neo-Minophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002; 62: 94-100.
6. Hirabayashi K, Iwata S, Matsumoto H, Mori T, Shibata S, Baba M, et al. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) *in vitro*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 1991; 39(1): 112-5.
7. Su XS, Chen HM, Wang LH, Jiang CF, Liu JH, Zhao MQ, et al. Clinical and laboratory observation on the effect of glycyrrhizin in acute and chronic viral hepatitis. *J Tradit Chin Med* 1984; 4(2): 127-32.
8. Akamatsu H, Komura J, Asada Y, Niwa Y. Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Med* 1991; 57(2): 119-21.
9. Tanaka A, Horiuchi M, Katsummi U, Shibamoto T. Antioxidant and anti-inflammatory activities of water distillate and its dichloromethane extract from licorice root (*Glycyrrhiza uralensis*) and chemical composition of dichloromethane extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008; 88(7): 1158-65.
10. Nishino H, Kitagawa K, Iwashima A. Antitumor promoting activity of glycyrrhetic acid in mouse skin tumor formation induced by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene plus teleocidin. *Carcinogenesis* 1984; 5(11): 1529-30.
11. Liu W, Kato M, Akhand A, Hayakawa A, Takemura M, Yoshida S, et al. The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits the growth of malignant melanoma cells by up-regulating Fas mediated apoptosis and arresting cell cycle through downregulating of cyclin dependent kinases. *Int J Oncol* 1998; 12: 1321-6.
12. Nassiri Asl M, Hosseinzadeh H.M. Review of the Pharmacological Effects of *Glycyrrhiza* sp, and its Bioactive Compounds. *Phytother Res* 2008; 22(6): 709-24.
13. Ploeger B, Mensinga T, Sips A, Seinen W, Meulenbelt J, DeJongh J. The pharmacokinetics of glycyrrhizic acid evaluated by physiologically based pharmacokinetic modeling. *Drug Metab Rev* 2001; 33(2): 125-47.
14. Hagimahdipoor H, Ahanzadeh Y, Hassanlow T, Shakarchy M, Abedi Z, Pirali M. Study of the liquorice roots that have been collected from different areas of Iran. *J Herb Med* 2008; 27(3): 106-14 [Persian].
15. Davarpanah Z, Sheikh-Zeinodin M, Dokhani SH, Saeidi GH. Effects of harvesting season and location on the suger, ash and Glycyrrhizic acid content of Licorice root. *J*

- Sci Technol Agric Natur Resour* 2008; 13(47): 27-35 [Persian].
16. Sheidai M, Cyto-morphological Studies of the Genus *Glycyrrhiza* in Iran. *Cytologia* 2008; 73(3): 333-9.
 17. Jiang Y, Lu H.T, Chen F. Preparative purification of glycyrrhizin extracted from the root of licorice using High-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 2004; 1033(1), 183-6.
 18. Sabbioni C, Mandrioli R, Ferranti A, Bugamelli F, Saracino M.A, Forti G.C, et al. Separation and analysis of glycyrrhizin, 18 β -glycyrrhetic acid and 18 α -glycyrrhetic acid in licorice roots by means of capillary zone electrophoresis, *J Chromatogr A* 2005; 1081(1): 65-71.
 19. Sabbioni C, Ferranti A, Bugamelli F, Forti G.C, Raggi M.A. Simultaneous HPLC analysis, with isocratic elution, of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in licorice roots and confectionery products *Phytochemical Anal* 2006; 17(1): 25-31.
 20. Tian M, Yan H, Row K.H. Extraction of Glycyrrhizic Acid and Glabridin from Licorice. *Int J Mol Sci* 2008, 9(4): 571-7.
 21. Lauren D.R, Jensen D.J, Douglas J.A, Follett J.M. Efficient method for determining the Glycyrrhizin content of fresh and dried roots, and roots extract of *Glycyrrhiza* species. *Phytochem Anal* 2001; 12(5): 332-5.