● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هفدهم، شمارهٔ ۴، ص ۳۲۷-۳۱۶، ۱۳۸۹

مقالهٔ پژوهشی

تعیین درصد عصاره و گلیسریزین ریشه شیرین‌بیان نواحی مختلف استان کرمان و نمونه‌هایی از استان فارس با روش HPLC

ندا داعی‌پاریزی[1*]، امین باقی‌زاده[2]، میترا مهربانی[3]، غلامرضا بخشی‌خانیکی[4]

خلاصه

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

روش: ۲۶ نمونه از ریشه شیرین‌بیان 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 به‌عمل آمد و درصد گلیسریزین 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 (۱/۰۶±۱۸/۲۵٪)، سیرجان (۰/۹۰±۱۷/۲۹٪) و بردسیر (۵/۶۲±۱۶/۳۳) نسبت به سایر مناطق مورد بررسی بالاتر بود (P<۰/۰۵). میزان درصد گلیسریزین نمونه‌های بردسیر (۰/۰۲±۵/۱٪)، سیرجان (۰/۷۵±۴/۹٪) و زرند (۳/۳۴ ± ۴/۴۶٪) به میزان غیرمعنی‌داری بالاتر از نمونه‌های فارس (۰/۵۹±۳/۶۵٪) بود. میزان عصاره و درصد گلیسریزین حاصل از عصاره‌گیری با اتانول بیشتر از عصاره‌گیری با آب‌مقطر بود (P<۰/۰۵). نمونه‌هایی که پودر ریشه آنها زردرنگ بود نسبت به نمونه‌های قهوه‌ای و نیز نمونه‌های مربوط به مناطق با ارتفاع نسبتاً بالا و خنک درصد گلیسریزین بیشتری داشتند (به‌ترتیب P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: در مقایسه با سایر مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که میزان عصاره و درصد گلیسریزین موجود در ریشه شیرین‌بیان 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: شیرین‌بیان، عصاره، گلیسریزین، 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 فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات فارماسوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۴- دانشیار سیتوژنتیک گیاهی، دانشگاه پیام نور تهران

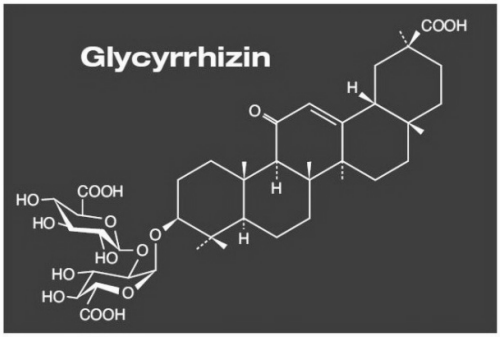
* **نویسنده مسؤول، آدرس:** مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان ● **آدرس پست الکترونیک:** neda.d.p@gmail.com

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

مقدمه

شیرین‌بیان (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. هرگیاه 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 صناعی 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 شیرین‌بیان 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. ریشهٔ شیرین‌بیان دارای ساپونین تری‌ترپنوئید، مخصوصا گلیسریزین و ۲۴ هیدروکسی گلیسریزین است که به ترتیب ۵۰ تا ۱۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز هستند و مادهٔ موثرهٔ اصلی ریشه این گیاه، گلیسریزین یا اسیدگلیسریزیک است. میزان مادهٔ 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 اسیدگلیسریزیک دو ملکول اسیدگلوکورونیک و یک مولکول اسیدگلیسرتیک به‌دست می‌آید. گلیسریزین، نمک‌های پتاسیم، کلسیم و منیزیم اسیدگلیسریزیک است. گلیسریزین تجارتی نمک آمونیوم اسیدگلیسریزیک می‌باشد. فرمول شیمیایی گستردهٔ گلیسریزین در شکل شماره یک آمده است. ریشه شیرین‌بیان حدود ۳٪ نشاسته، ۸٪ گلوکز و ۶/۵-۲/۴٪ ساکارز نیز دارد (۲،۴).



شکل ۱. *فرمول شیمیایی گلیسریزین (ساپونین تری‌ترپنوئیدی 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 ازاین 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 اسیدگلیسریزیک 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 (۱۳-۱۰).

با توجه به ارزش بالای مواد موجود در ریشهٔ گیاه شیرین‌بیان 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 کرهٔ 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 ریشهٔ آن در نواحی مختلف شناسایی شوند. بدین

منظور این پژوهش برای مشخص شدن میزان عصاره تام و نیز تعیین غلظت گلیسریزین گیاه در نواحی مختلف استان کرمان طراحی و اجرا شد. از طرفی درصد عصاره و درصد گلیسریزین حاصل از نمونه‌های این گیاه در استان کرمان با نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان فارس (محل اصلی جمع‌آوری تجاری ریشهٔ این گیاه در ایران) مقایسه شد. هم‌چنین میزان عصاره و میزان گلیسریزین 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 ریشهٔ 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، امّا 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 ریشهٔ این گیاه در منطقه کاملاً احساس می‌شود.

روش بررسی

به‌منظور تهیهٔ نمونه‌های لازم و مناسب از گیاه شیرین‌بیان برای انجام تحقیق، چند کارشناس کشاورزی که شناخت کافی در مورد این گیاه داشتند، انتخاب شدند. بعد از توجیه آنها در مورد یکنواختی تهیهٔ 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 کیسهٔ 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 ۲۰°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 داده شدند تا خشک شوند و پس از آسیاب مجدد، به‌صورت تقریباً پودر در آمده و آمادهٔ عصاره‌گیری شدند. به‌منظور عصاره‌گیری با روش سوکسله ۲۰ گرم پودر خشک ریشه از هر نمونه به ۲۴۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه و با دستگاه سوکسله به مدت ۱/۵ ساعت عصاره‌گیری به عمل آمد. عصاره‌های حاصل از هر یک از نمونه‌ها در فالکون‌های مناسب ریخته و در یخچال جهت تغلیظ نگهداری شدند. سپس عصاره‌ها با استفاده از دستگاه Rotary در درجه حرارت ۵۰-۶۰°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 گلیسریزین 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

SHIM ADZA-10AVP بـــا ستونی از نـوع SHIM PACK-CLC-C8 به ابعاد ۴/۶mm ×۲۵cm و قطر ذرات ۵ میکرومتر بـوده و دتکتـــور مورد استفاده UV در طـول مـوج ۲۵۴ نـانومتر، دمای انجام آزمایش دمـای اتاق و سیستم ایزوکراتیک بود. فاز متحـرک، سـرعت جریـان حـلال و حجـم تزریـق بـــه‌ترتیب (اسـتونیتریل ۲۵٪، متـانول ۴۵٪ و آب ۲۸٪ و اسیداستیک گلاسیال ۲ درصد)، ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. در این روش از هر نمونـه ۳ بـار تزریـق شـد. دسـتگاه بـا ایندومتاسین استانداردسازی داخلی شد (۱۴،۱۵،۱۷).

روش کار با دستگاه HPLC

ابتدا غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از استاندارد گلیسریزین (مربوط به شرکت Sigma آمریکا، ملح آمونیوم، با درجهٔ خلوص ۷۵٪) در حلال آب و متانول به نسبت ۱:۱ تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شـد (از هر نمونه ۳ بار) و سپس با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری صاف و در بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریختـه شـد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر حلال آب و متانول به آن اضافه گردید و دقت به‌عمل آمد تا نمونه کاملاً از فیلترخـارج شـود. در نهایت حجم نمونه داخل بالن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شـد. سپس هر یک از نمونه‌ها به دستگاه HPLC تزریق گردیدند و با استفاده از سطح زیر منحنی هر کروماتوگرام و منحنی کالیبراسیون مقدار گلیسریزین هر نمونه محاسبه شد. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد اسیدگلیسریزیک تعیین شد (۲-۰۱۷، ۴):

$$\text{درصد اسید گلیسریزیک} = A \times \frac{5}{m} \times B \times \frac{۸۲۲}{۸۴۰}$$

A = غلظت مونوآمونیوم گلیسریزات بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه که با اسـتفاده از منحنـی کالیبراسـیون محاسبه شده است.

B = درصد خلوص استاندارد مونوآمونیوم گلیسریزات

m = وزن نمونه بر حسب گرم

۸۲۲= وزن مولکولی اسید گلیسریزیک

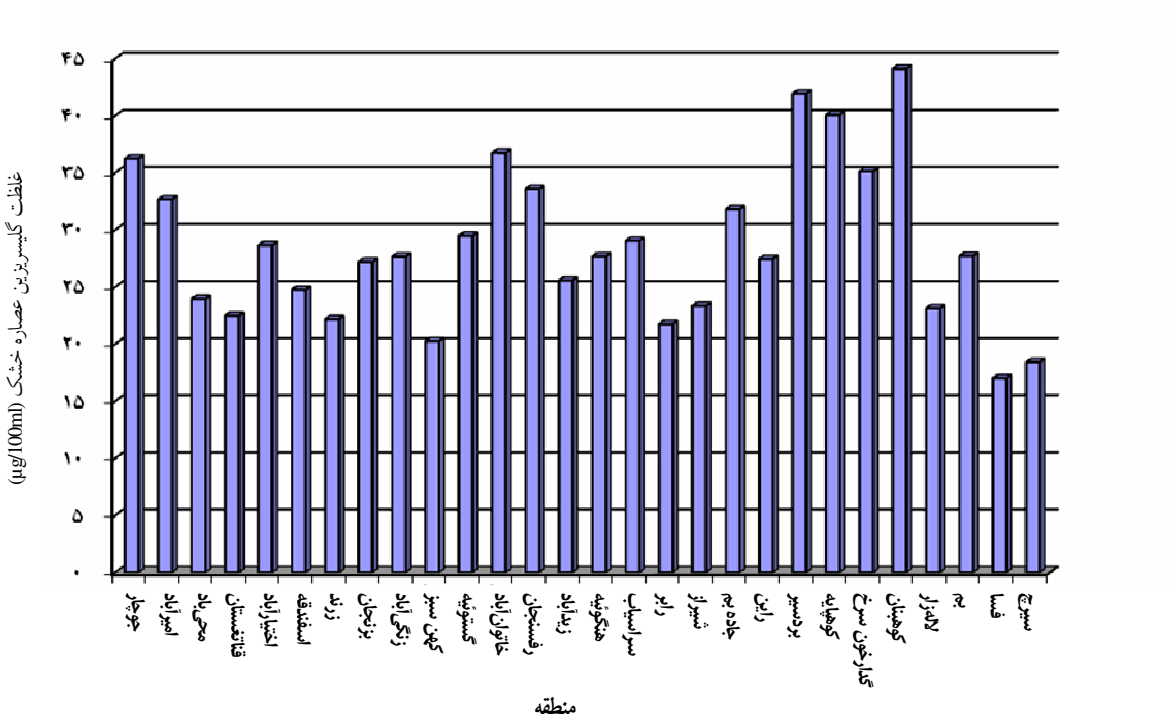
۸۴۰= وزن مولکولی مونوآمونیوم گلیسریزات بدون آب

برای تجزیه و تحلیل آماری نتـایج، از آزمـون آنـالیز واریانس یک طرفه و آزمون t دو نمونه‌ای استفاده شد.

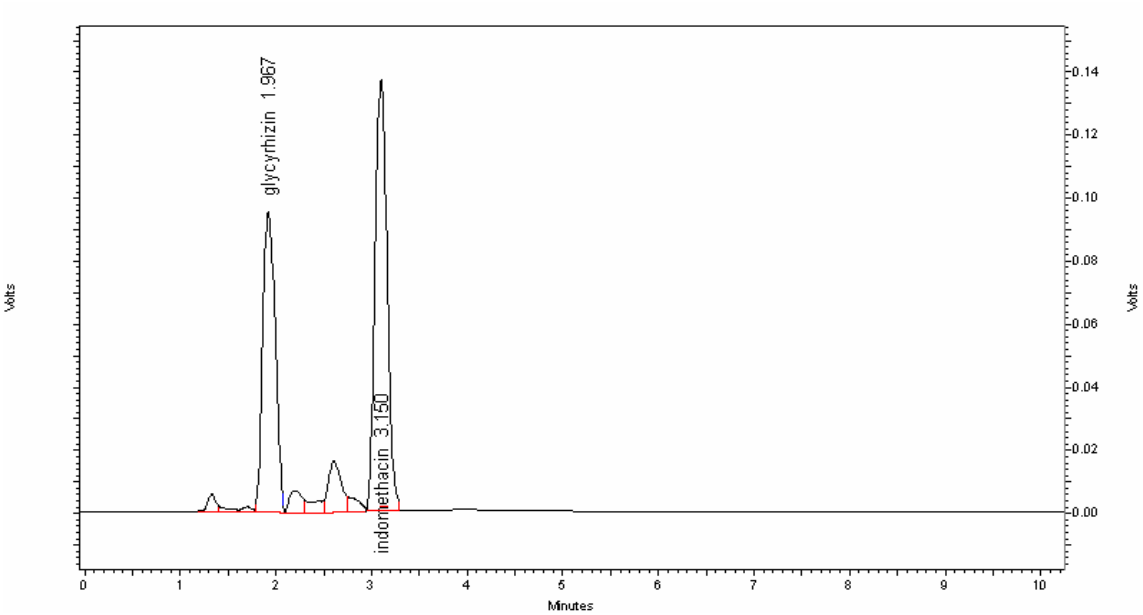
نتایج

میزان غلظت گلیسریزین 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 عـصاره حاصل از عصـاره‌گیری با اتانول و نیز درصدگلیـسریزین عصاره تعیین شده به‌وسیله دسـتگاه HPLC مربـوط بـه ۲۸ نمونه ریشه گیاه شیرین‌بیان مورد مطالعه و هم‌چنین درصد میزان عصاره خشک حاصـل از عـصاره‌گیـری بـا روش سوکسله و نیز درصد گلیسریزین عصاره خشک نمونه‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

میزان عصاره حاصل از روش عصاره‌گیری بـا اتـانول (سوکسله) با روش عصاره‌گیری با آب مقطـر در شـرایط یکسان با استفاده از ۵ نمونه مشترک که به‌صورت تصادفی انتخاب شدند، مقایسه شد. میـانگین وزن عـصاره در روش عصاره‌گیری بـا اتـانول ۳/۹۰ ± ۱۶/۹۶گـرم و در روش عصاره‌گیری با آب مقطر ۱/۸۲ ± ۷/۷۶ گرم به‌دست آمـد (جدول ۲). بر این اساس میـزان عـصاره حاصـل از روش اتانولی بیـشتر از روش اسـتفاده از آب مقطـر مـی‌باشـد (P<۰/۰۱). با توجه به اینکه شرایط آب‌وهوا و ارتفاع منطقه در میزان گلیسریزین موجود در ریشه شیرین‌بیان می‌توانـد اثر بگذارد، نمونه‌های جمع‌آوری شده با توجه بـه شـرایط محیطی و رنگ ریشه مورد مقایسه قرار گرفتند که نتـایج حاصل در جداول شماره ۳ و ۴ آمده است. در این بررسـی مناطقی که ارتفاع آنها از سطح دریا کمتر از ۱۰۰۰ متر بود به‌عنوان ارتفاع کم (*)، نواحی با ارتفاع ۱۰۰۰ تا ۱۸۰۰ متر به‌عنوان ارتفاع متوسط (**) و نواحی ۱۸۰۰ تا ۲۵۰۰ متـر به‌عنوان ارتفـاع نسبتـاً بالا (***) در نظـر گرفته شدند و اختلاف مناطق از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱).



شکل ۲. *غلظت گلیسریزین در ۲۸ نمونه مورد بررسی*



شکل ۳. *کروماتوگرام HPLC مربوط به نمونه شماره ۲٤ (بردسیر)، عصاره‌گیری با اتانول*

جدول ۱. *محل جمع‌آوری، شرایط اقلیمی و میزان درصد عصاره حاصل از عصاره‌گیری با اتانول و درصد گلیسریزین مربوط به ۲۸ نمونه پودر ریشهٔ گیاه شیرین‌بیان مورد بررسی*

کد نمونه	محل جمع‌آوری نمونه‌ها	شهر	شرایط آب‌وهوا و ارتفاع منطقه نمونه‌برداری	درصد عصاره تام ریشه	میانگین مقدار گلیسریزین (میکروگرم درصد میلی‌گرم عصاره)	درصد گلیسریزین پودر ریشه
۱	جوپار	کرمان	**	۱۲/۲۵	۳۶/۲۳ ± ۰/۰۰۲۷	۴/۴۳
۲	امیرآباد	کرمان	*	۱۴	۳۲/۶۷ ± ۰/۰۱۳۴	۴/۵۸
۳	محی‌آباد	ماهان	**	۱۴/۵	۲۳/۹۶ ± ۰/۰۰۶۲	۳/۴۸
۴	قناتغستان	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	زرند	زرند	*	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	گستوئیه	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	هنگوئیه	پاریز سیرجان	***	۱۷/۵	۲۷/۶۸ ± ۰/۰۰۴۱	۴/۸۵
۱۸	سرآسیاب	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	کوه‌پنج	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	سیرچ	سیرچ	*	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 + اب و هوای خنک در فصل تابستان

جدول ۲. *درصد عصاره حاصل از ۱۰۰ گرم پودر ریشه شیرین‌بیان در ۵ نمونه با استفاده از عصاره‌گیری با آب مقطر*

نمونه	محل جمع‌آوری نمونه	درصد عصاره
۶	اسفندقه	۶/۵
۱۲	گستوئیه	۶/۵
۱۳	خاتون آباد	۱۰
۲۸	لاله زار	۹/۵
۲۹	بم	۶/۵

جدول ۳. *میانگین وزن عصاره خشک اتانولی ریشه شیرین‌بیان ۲۸ نمونه مورد بررسی بر اساس رنگ عصاره (P< ۰/۰۰۱)*

رنگ عصاره	تعداد نمونه	میانگین درصد عصارهٔ ریشه
زرد	۹	۱۷/۷۳۰ ± ۲/۴۴۵
قهوه‌ای	۱۹	۱۳/۲۳۰ ± ۲/۷۱۵

نتایج حاصل از بررسی درصد عصاره و گلیسریزین نمونه‌ها بر اساس منطقه جمع‌آوری گیاه (۸ منطقه شامل ۷ شهرستان از استان کرمان و منطقه فارس) در جدول شماره ۵ آمـده است.

جدول ٤. *میانگین درصد عصاره و درصد گلیسریزین عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان بر اساس ارتفاع و وضع آب و هوای منطقه*

منطقه آب و هوایی	تعداد نمونه	میانگین درصد عصاره	میانگین درصد گلیسریزین
*	۱۱	۱۳/۷۰ ± ۳/۶۲b	۳/۵۵ ±۱/۱۸ a
**	۹	۱۴/۷۸ ± ۲/۲۸ b	۴/۱۱ ± ۱/۳۰ a
***	۸	۱۶/۸۱ ± ۳/۳۸ b	۴/۹۵± ۰/۷۳ a

a. اختلاف بین مناطق از نظر آماری معنی دار است (P<۰/۰۵).
b. اختلاف بین مناطق از نظر آماری معنی دار نیست.

جدول۵. *میانگین درصد عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان و میانگین درصد گلیسریزین موجود در آنها بر اساس مناطق محل جمع‌آوری نمونه‌ها*

شماره منطقه	نام منطقه یا شهرستان	تعداد نمونه	میانگین درصد عصاره اتانولی	میانگین درصد گلیسریزین
۱	کرمان	۱۰	۱۳/۳۳±۲/۵۴	۳/۹۰±۱/۳۳
۲	بافت	۳	۱۴/۵۰±۲/۳۶	۳/۵۹±۰/۷۹
۳	زرند	۲	۱۲/۵۰±۲/۲۴	۴/۴۶±۳/۳۴
۴	سیرجان	۵	۱۷/۲۹±۰/۹۰	۴/۹۴±۰/۷۵
۵	رفسنجان	۱	۱۱/۵۰	۳/۸۶
۶	بردسیر	۳	۱۶/۳۳±۵/۶۲	۵/۰۹±۰/۰۲
۷	فارس	۲	۱۸/۲۵±۱/۰۶	۳/۶۵±۰/۵۹
۸	بم	۲	۱۱/۲۵±۰/۳۵	۳/۳۳±۰/۰۲

اختلاف وزن نهایی عصاره درمناطق مختلف معنی‌دار (P<۰/۰۵) و اختلاف میزان درصد گلیسریزین معنی‌دار نبود

جدول ٦. *مقایسه میزان درصد گلیسریزین نمونه‌های برتر در بررسی حاضر با بررسی انجام شده به‌وسیله حاجی مهدی‌پور و همکاران (۲) (P<۰/۰۵)*

نام منطقه (در بررسی حاضر)	میانگین درصد گلیسریزین	نام منطقه (در بررسی رفرنس ۲)	میانگین درصد گلیسریزین
بردسیر	۵/۹±۰/۰۲	کرمانشاه	۴/۱۴±۰/۵۹
سیرجان	۴/۴۹±۰/۷۵	سرحد فارس	۴/۰۰±۰/۵۱
زرند	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 به‌دست آمده از بررسی ۲۶ نمونه ریشه گیاه شیرین‌بیان جمع‌آوری شده از نواحی مختلف استان کرمان و دو نمونه از استان فارس از نظر میزان عصاره و نیز مقدار گلیسریزین (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 شیرین‌بیان 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، کوه‌پنج، بردسیر، پاریز و اسفندقه بافت). با توجه به جدول شماره ۵ بالاترین میانگین درصد عصاره اتانولی به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های منطقه فارس (۱/۰۶±۱۸/۲۵٪)، سیرجان (۰/۹۰±۱۷/۲۹٪) و بردسیر (۵/۶۳±۱۶/۳۳٪) می‌شود. میانگین مقدار عصاره نمونه بم کمترین مقدار (۰/۳۵±۱۱/۲۵٪) را شامل می‌شد (P<۰/۰۵). 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 جمع‌آوری شده از زرند، سیرچ و زنگی‌آباد (اطراف شهر کرمان) به میزان حدود ۱۰٪ می‌باشد. درصد عصاره در بررسی Lauren ۵ تا ۱۵٪ با متوسط ۳/۲٪ بوده‌است (۲۱). نواحی با آب و هوای گرم اغلب مقدار عصاره کمتری داشته‌اند.

از نظر میزان گلیسریزین با توجه به مناطق ۸گانه، میزان گلیسریزین 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 گلیسریزین در نمونه‌های فارس در رتبه‌های پایین‌تر (۳/۶۵±۰/۵۹) قرار می‌گیرند. البته از نظر آماری این اختلاف معنی‌دار نیست. غلظت گلیسریزین موجود در عصاره ریشه شیرین‌بیان نمونه‌های مربوط به کوهبنان (۶/۸۳٪) و لاله‌زار بردسیر (۵/۲۶٪) در حد بالا و نمونه‌های مربوط به سیرچ و زرند (۱/۸ و ۲/۱ ٪) کمترین مقدار را شامل می‌شود (نمودار ۲). به‌طورکلی در ۱۴ مورد از ۲۶ نمونه مربوط به استان کرمان میزان گلیسریزین ریشه شیرین‌بیان بین ۴ تا ۶/۸٪ و در ۱۲ مورد بین ۱/۸۵ تا ۴٪ به‌دست 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 به‌عمل آمده به‌وسیله داورپناه و همکاران میزان گلیسریزین حاصل از ۵ نمونه مربوط به

نـواحی مختلـف ایـران بـین ۶/۲ تـا ۱۰/۲٪ گـزارش شده است (۱۵). در گـزارش Lauren مقـدار گلیـسریزین به‌دست آمده بین ۱/۳ تا ۷/۱٪ (متوسط ۶/۷٪) ذکـر شـده است (۲۱).

مقایسه درصـد گلیـسریـزین حاصـل از نمونـه‌هـای جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایـران کـه در بررسـی حاجی مهدی‌پور به‌دست آمده است (۵) با درصد حاصل از بررسی حاضر مقدار گلیسریزین نشان می‌دهـد کـه اکثـر نواحی استان کرمان نسبت به سایر نقاط ایران درصد بالایی را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). هرچند بـه‌علـت اخـتلاف در روش عصاره‌گیری در این دو بررسـی (اتـانولی و آبـی) مقایسه دقیق ممکن نیست. البته اختلاف مقدار گلیسریزین نمونه‌های مناطق مشترک در این دو تحقیـق بـا اخـتلاف روش عصاره‌گیری و اینکه ما از چند ناحیـه یـک منطقـه نمونه‌برداری کرده‌ایم قابل توجیه است. همان‌طـور کـه در جدول ۴ دیده‌می‌شود اختلاف مقدار عصاره تام حاصـل از نمونه‌های به‌دست آمده از نواحی با ارتفاع نسبتاً بالا و با آب و هوای خنک به‌طور غیرمعنی‌دار بیشتر از نواحی با ارتفاع پست و آب‌وهوای گرم مـی‌باشـد. غلظـت گلیـسریزین نمونه‌های نواحی نسبتاً مرتفع و با آب و هوای خنک به‌طور معنـی‌داری بیـشتر از نـواحی کـم‌ارتفـاع و گـرم می‌باشد (P<۰/۰۵).

میانگین وزن عصاره در روش عصاره‌گیری با اتـانول ۳/۹۰±۱۶/۹۶گرم ولی در روش عصاره‌گیری با آب مقطر ۱/۸۲±۷/۷۶ گرم به‌دست آمـد و بـدین ترتیـب بـازدهی عـصاره‌گیـری بـا اسـتفاده از اتانـل خیلـی بیـشتر از عصاـره‌گیری بـا آب مقطـر اسـت (P<۰/۰۱). چـون اختلاف وزن عصاره تام در دو روش زیاد بود نیـازی بـه اندازه‌گیری گلیسریزین با روش آب مقطر احساس نشد. با توجه به جدول شماره ۱ مشخص می‌شود که مقدار عصاره و غلظـت گلیـسریزین موجـود در عـصـاره در اکثـر نمونـه‌های مـورد بـررسـی در یـک جهـت افزایش و کاهش را نشان می‌دهد. به‌جز نمونه‌های مربوط بـه اسـتان فارس به‌ویژه نمونه فسا با وجود بـالابودن مقـدار عـصاره غلظت و مقدار کلی گلیـسریزین حاصـله از آن کمتـر از نمونه‌های دیگر می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق عـلاوه بر اینکه نشان می‌دهد ریشه شیرین‌بیان استان کرمان دارای درصد بالایی از گلیسریزین اسـت، توجیـه خـوبی بـرای جمع‌آوری صنعتی و تجاری ریـشهٔ ایـن گیـاه از نـواحی مختلف استان، خواهد بود. از طرفی چون امروزه این گیـاه به‌عنوان یک گیاه دارویی و صنعتـی در بسیاری از کشورها کشت داده می‌شود، مـی‌تـوان کـشت آن را در شـرایط مناسب‌تر با استفاده از نمونه‌های مرغوب تـر در اسـتان و سایر نقاط ایران ترویج و توصیه کرد.

The Percent of Extract and Glycyrrhizin Content of Glycyrrhia 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 (*Glycyrrhia 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 *Glycyrrhiz glabra* grown in different areas of Kerman province and some samples in Fars province.

Methods: Twenty six samples from the roots of *Glycyrrhia 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 ± 1.06%), Sirjan (17.29 ± 0.90%) and Bardsir (16.33 ± 5.62%) were higher than other areas ($P<0.05$). Glycyrrhizin contents of samples of Bardsir (5.09 ± 0.02%), Sirjan (4.94 ± 0.75%), Zarand (4.46 ± 3.34%) were non significantly higher than Glycyrrhizin content of Fars samples (3.65 ± 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: *Glycyrrhia glabra,* Extract, Glycyrrhizin, HPLC, Kerman province, Fars province

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2010; 17(4): 316-327

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 Phylothrapy. Tehran, Donyayeh Taghziyeh, 2006; pp257-26 [Persian].
4. Tavasoly V. Persian translation of High Perfermance 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 immuno-deficiency 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 liquorice 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, 18β-glycyrrhetic acid and 18α-glycyrrhetic acid in liquorice 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 liquorice 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.