نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۶، صفحه ۱۰۰۱-۹۹۱ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2020.125165.2496
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.991.98.6.1576.1606

بررسی برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) در شرایط فصل پاییز و بهار در استان خوزستان

عاطفه خاکپور[۱]، مریم ذوالفقاری[۲*] و کریم سرخه[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، پست الکترونیک: M.zolfaghari@scu.ac.ir

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۸

چکیده

گیاه دارویی شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه مهم و طبیعی، مورد استفاده صنایع داروسازی قرار گرفته است. این تحقیق به‌منظور تعیین بهترین زمان برداشت برای بررسی بالاترین میزان عصاره، میزان گلیسیریزین، میزان فنل و فلاونوئید کل و ترکیب‌های فنلی در دو فصل پاییز و بهار بر روی ریزوم گیاه شیرین‌بیان منطقه بهبهان در استان خوزستان انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان عصاره استحصالی از ریزوم‌ها در فصل پاییز بیشتر از فصل بهار بوده است، همچنین از نظر تولید گلیسیریزین، فنل و فلاونوئید کل فصل پاییز مقادیر بیشتری را نسبت به فصل بهار به خود اختصاص داده است. آزمون T مستقل برای گلیسیریزین به‌عنوان ترکیب ثانویه مهم و با ارزش شیرین‌بیان اثر معنی‌داری را بین دو فصل پاییز و بهار نشان داد. در میان ترکیب‌های فنلی مورد بررسی فرولیک اسید و کوماریک اسید در فصل پاییز در رتبه بالاتر ترکیب‌ها قرار داشتند و کمترین مقدار در میان ترکیب‌های فنلی برای کافئیک اسید در فصل بهار اندازه‌گیری شد. با توجه به اهمیت این مواد مؤثره در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی و همچنین استفاده وسیع از ترکیب‌های فنلی، گلیسیریزین و فلاونوئیدهای شیرین‌بیان در داروهای گیاهی، نیاز است که بهترین و بیشترین زمان تولید و تجمع آن در ریزوم گیاه مشخص گردد تا با بهره‌برداری به‌موقع قدمی مؤثر به‌منظور غنی‌سازی صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی برداشته شود.

واژه‌های کلیدی: شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، متابولیت‌های ثانویه، گلیسیریزین، فلاونوئید، ترکیب‌های فنلی.

مقدمه

امروزه مقادیر فراوانی از داروهایی که جوامع بشری مصرف می‌کنند، منشأ طبیعی ازجمله گیاهی داشته و سنتز مستقل صنعتی ندارند. فلات وسیع ایران یکی از نواحی جغرافیایی روی کره زمین به‌شمار می‌رود که از اقلیم‌ها و شرایط آب و هوایی گوناگونی برخوردار است. در این فلات، پهنه اصلی انتشار جوامع گیاهی متعلق به کشور ایران است و در میان فلور غنی ایران که بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی را دربرمی‌گیرد، تعداد بسیار زیادی از آنها را گیاهانی تشکیل می‌دهند که به‌دلایلی دارویی نامیده می‌شوند (Omidbaigi, 2009).

گیاه شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L.، گیاهی علفی، چندساله و متعلق به تیره بقولات (Fabaceae) می‌باشد. این تیره در مجموع شامل ۴۳۰ جنس و بیش از ۱۴۰۰ گونه گیاهی است که در بین آن نمونه‌های فراوان دارویی می‌توان یافت. گیاه شیرین‌بیان با ارتفاع متفاوت، بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر و دارای شاخ و برگ‌های انبوه و فراوان است. طول ریشه شیرین‌بیان متفاوت و با توجه به نوع گیاه و شرایط اقلیمی محل رویش بین ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متر است (Khan Ahmadi *et al*., 2013). شیرین‌بیان جزو گیاهان سه کربنه (C_3) می‌باشد. اندام‌های هوایی گیاه در زمستان از بین می‌رود اما اندام‌های زیرزمینی آن سالم می‌ماند و با توجه به شرایط اقلیمی هر منطقه از این اندام‌ها جوانه‌هایی شروع به رشد می‌کنند و دوباره سبز می‌شوند (Shibata, 1994). شیرین‌بیان گیاه مدیترانه‌ای بوده و در جنوب‌غربی آسیا گسترش زیادی دارد. این گیاه از جنوب اروپا تا آسیای مرکزی در عرض جغرافیایی ۳۰ تا ۴۵ درجه نیمکره شمالی رویش دارد. این گیاه در سطوح وسیعی در کشورهای انگلیس، بلژیک، فرانسه، آلمان، ایتالیا، یونان و ترکیه کشت می‌شود. در ایران نیز تقریباً در شمال، شرق، غرب و مرکز کشور به فراوانی دیده می‌شود (Mirhaidar, 2011). شیرین‌بیان در استان خوزستان عمدتاً در حاشیه جاده‌ها، اراضی آیش، در اطراف شهرهای شوش، اندیمشک، شوشتر، مسجدسلیمان، رامهرمز، بهبهان و اهواز دیده می‌شود (Mozafarian, 2000).

اندام دارویی مورد استفاده شیرین‌بیان ریزوم و ریشه آن می‌باشد. ترکیب‌های متعددی در ریزوم شیرین‌بیان شناخته شده که ترکیب غالب آن یک ساپونین تری‌ترپنوئیدی به نام گلیسیریزین می‌باشد، همچنین ریزوم آن حاوی ترکیب‌های فنلی، فلاونوئیدی، ایزوفلاونوئیدی، کومارین‌ها و استیلبنوئیدها است (Biondi *et al*., 2005). رنگ زرد عصاره استخراج شده از ریزوم شیرین‌بیان به دلیل مقادیر بالای فلاونوئیدهای آن می‌باشد (Sharma & Agrawal, 2013).

شیرین‌بیان گیاهی است با خصوصیات دارویی متنوع که در داروسازی برای از بین بردن طعم ناپسند بعضی داروها مانند سولفات کینین، آلوئس، کاسیا و غیره بکار می‌رود (Ambavade *et al*., 2001). شربت ریشه شیرین‌بیان در پزشکی سنتی در درمان بیماری‌های قفسه سینه و ریه، برونشیت، آرتریت، آسم، بیماری‌های کلیوی، بیماری‌های قلبی، زخم معده، زخم دهان، سرفه، تورم، بزاق بیش از حد، فشار خون پایین، آلرژی‌ها، سمّیت کبدی، نفخ شکم، اختلالات جنسی، بیماری‌های پوستی و برخی از عفونت‌های ویروسی استفاده می‌شود (Mamedov & Egamberdieva, 2017). خواص دارویی مانند اثرهای ضدالتهابی، ضدویروسی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان، ضدآسم و نیز فعالیت‌های ضدسرطانی برای آن در نظر گرفته شده است (Hosseinzadeh & Nassiri-Asl, 2015).

به‌طور کلی گیاه در حالت تغییر ناگهانی عوامل محیطی به‌ویژه رطوبت، حرارت و ارتفاع از نظر تولید متابولیت ثانویه با یک تناقض رو به رو است. از یک‌سو ایجاد تنش شدید حیات گیاه را در معرض خطر قرار داده و گیاه را تضعیف می‌کند و از سوی دیگر همین تنش گیاه را به واکنش واداشته و باعث تولید ماده مؤثره به حد مطلوب می‌شود (Hemmati *et al*., 2016). از سویی دیگر برای شناخت قابلیت گیاهان دارویی بومی و انحصاری هر کشور و کاربردهای احتمالی در صنایع دارویی، آرایشی بهداشتی یا غذایی، نخستین تحقیق ضروری، استخراج، تجزیه و شناسایی مواد مؤثره گیاه است تا در صورت وجود ترکیب‌های ارزشمند با کاربردهای خاص بتوان اقدام به اهلی کردن، کشت و بهره‌برداری از گیاه کرد. بررسی کمّیت و کیفیت مواد مؤثره یک گیاه دارویی در رویشگاه‌های مختلف آن، اطلاعاتی در مورد وجود نمونه شیمیایی (کموتایپ) در گونه و همچنین اقلیم مناسب برای کاشت آن را فراهم می‌کند (Sarabi & Sefidkon, 2018).

تحقیقات نشان داده است که میزان مواد مؤثره در گیاهان و اندام‌های مختلف هیچ‌گاه ثابت نیست و تناسب با مراحل رشد گیاه و شرایط محیطی قابل تغییر است (Miranda *et al.*, 2012). رشد و عملکرد گیاهان در اکوسیستم‌ها، تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند نوع گونه، اقلیم منطقه، نوع خاک، ارتفاع از سطح دریا و موقعیت جغرافیایی قرار دارد. به‌طوری‌که هریک از این عوامل می‌توانند تأثیر به‌سزایی بر کمّیت و کیفیت اسانس و مواد مؤثره گیاهان دارویی داشته باشند (Somjen *et al.*, 2004).

با توجه به اینکه عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و کیفیت مواد مؤثره آنها می‌شوند، ازاین‌رو برداشت یک گیاه دارویی زمانی مقرون به صرفه است که مواد مؤثره آن به حد مطلوب رسیده باشد. برداشت گیاهان دارویی در زمان نامناسب نه تنها میزان محصول بدست‌آمده را کاهش می‌دهد بلکه محصول برداشت شده نیز از کیفیت خوبی برخوردار نخواهد بود، زیرا عملکرد اندام مورد نظر و همچنین میزان متابولیت‌های ثانویه یک گیاه دارویی در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه متفاوت است (Omidbaigi, 2008).

از نیمه دوم قرن گذشته، تحقیقات وسیعی روی گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای جهان انجام شده و در پی آن داروهای گیاهی فراوانی تهیه و به بازار عرضه شده است، بنابراین ضرورت مطالعه بر روی ترکیب‌های شیمیایی فلور غنی ایران حائز اهمیت است. با توجه به این موضوع، هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان عصاره و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، همچنین میزان گلیسیریزین به‌عنوان یک ماده مؤثره مهم گیاه شیرین‌بیان طی دو فصل پاییز و بهار در منطقه بهبهان استان خوزستان می‌باشد. این بررسی به‌منظور تعیین بهترین زمان برداشت برای بدست آوردن بالاترین میزان مواد مؤثره این گیاه انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۹۷-۱۳۹۶ در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید. جمع‌آوری نمونه‌های ریزوم شیرین‌بیان، در فصل پاییز در تاریخ ۲۱ آبان و در فصل بهار در تاریخ ۲۱ اردیبهشت، از شهرستان بهبهان واقع در استان خوزستان انجام شد. موقعیت و مشخصات جغرافیایی منطقه مورد تحقیق در جدول ۱ آمده است. ریزوم‌ها پس از خارج شدن از خاک با آب مقطر شستشو شده و به قطعات کوچک تقسیم شدند و بعد به مدت یک هفته در دمای اتاق خشک گردیدند. ریزوم‌های خشک شده توسط آسیاب برقی پودر شدند.

جدول ۱- موقعیت و مشخصات جغرافیایی منطقه مورد تحقیق

موقعیت مکانی نسبت به استان خوزستان	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (m)	میانگین بارندگی سالانه (mm)	اقلیم (آب و هوا)
جنوب‌شرقی	۳۰ درجه و ۲۶ دقیقه عرض شمالی، ۵۰ درجه و ۱۶ دقیقه طول شرقی	۳۲۰	۳۵۴/۲	بیابانی، گرم و نیمه‌خشک

عصاره‌گیری و اندازه‌گیری میزان عصاره

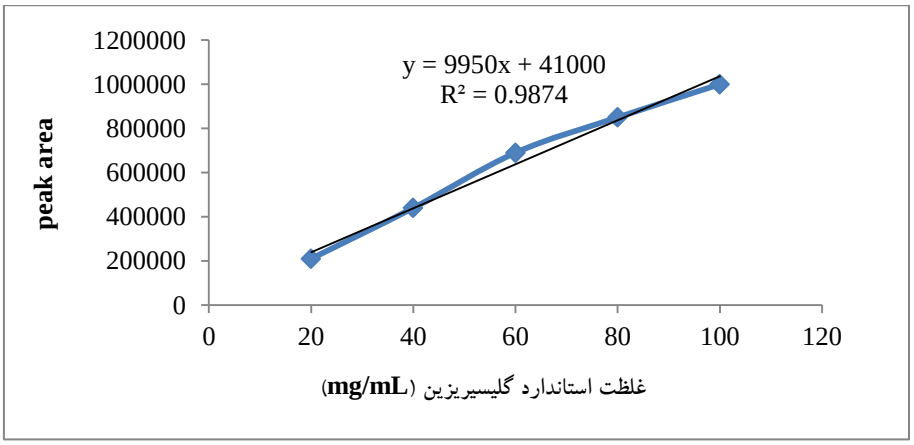
برای عصاره‌گیری از ریزوم‌های شیرین‌بیان، از روش خیساندن در حلال (ماسیراسیون) استفاده گردید. ابتدا سه گرم از نمونه‌های پودر شده را در ۳۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰٪ (۱:۱۰) حل کرده. سپس به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه قرار گرفتند و بعد از اتمام ۲۴ ساعت نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس فاز رویی بدست‌آمده از کاغذ صافی عبور داده شد. به‌منظور بدست آوردن میزان عصاره و حذف حلال، نمونه‌ها در آون تهویه‌دار با درجه حرارت ۵۰ درجه

سانتی‌گراد قرار گرفتند تا زمانی که کاملاً خشک شوند. میزان عصاره از طریق فرمول زیر تعیین گردید.

۱۰۰ × مقدار ماده گیاهی عصاره‌گیری شده (گرم)/وزن عصاره (گرم)=میزان عصاره (٪)

ارزیابی گلیسیریزین توسط دستگاه HPLC

عصاره‌های بدست‌آمده از ریزوم‌های شیرین‌بیان قبل از انجام آنالیز HPLC فیلتر شدند. محلول پایه استاندارد گلیسیریزین (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در حلال متانول آب (۵۰:۵۰٪) تهیه شد. محلول‌های استاندارد با غلظت‌های پایین‌تر با رقت مناسب از محلول پایه تهیه شدند (شکل ۱). آنالیز HPLC بر روی یک سیستم Unicam-Crystal-200 همراه با پمپ‌های Dionex 3000، یک دستگاه نمونه‌گیری خودکار و یک دتکتور Dionex PDA-3000 انجام شد. آنالیز نمونه‌ها با استفاده از یک ستون C18 به ابعاد ۱۰×۱۵۰ میلی‌متر و قطر ذرات ۱۰ میکرومتر در طول موج ۲۵۴ نانومتر و با سرعت شویش ۳ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای اتاق (۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) انجام گردید. حجم نمونه‌های تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود (Basar *et al.*, 2104).



شکل ۱– منحنی استاندارد گلیسیریزین

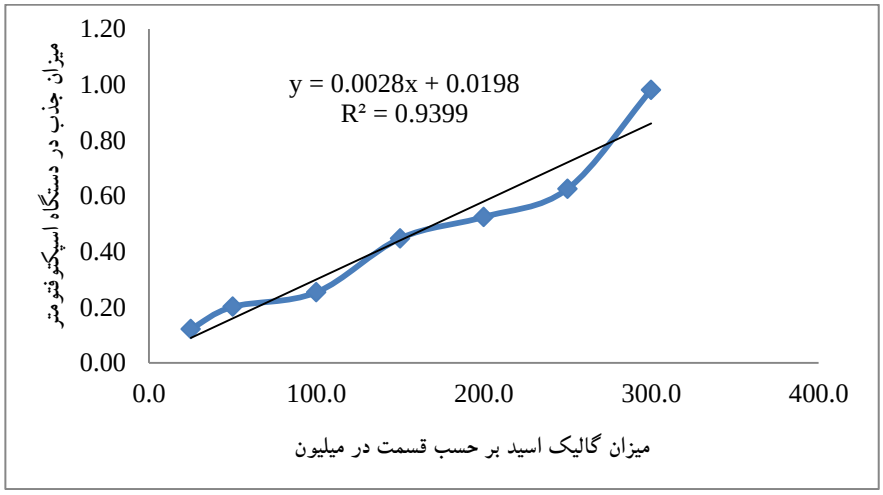
اندازه‌گیری ترکیب‌های فنلی توسط دستگاه HPLC

یک گرم از نمونه‌های پودر شده با ۲۵ میلی‌لیتر متانول به مدت ۱ ساعت به روش رفلاکسینگ عصاره‌گیری شد. پس از تصفیه و فیلتر اولیه، محلول فیلتر شده جمع‌آوری شد و مواد جامد دوباره با همان حجم حلال تازه عصاره‌گیری شد. برای جداسازی ترکیب‌های فنلی از طریق HPLC از ستون تجزیه‌ای Zorbax SB-C18 به طول ۳×۱۰۰ میلی‌لیتر و قطر ذرات ۳/۵ میکرومتر و در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم نمونه‌های تزریق شده ۵ میکرولیتر بود. ارزیابی ترکیب‌های فنلی در دو طول موج ۳۳۰ و ۳۷۰ نانومتر انجام گردید.

اندازه‌گیری فنل کل

میزان فنل کل ریزوم‌های شیرین‌بیان به روش McDonald و همکاران (۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد. در این روش با تهیه عصاره متانولی از ریزوم‌ها و با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو، میزان فنل نمونه‌ها با دستگاه اسپکتوفتومتر در

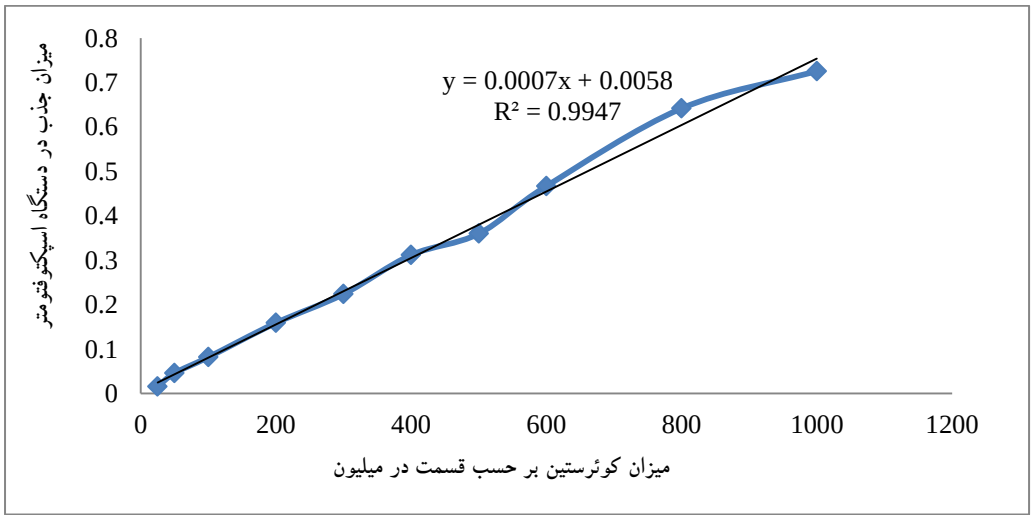
طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. برای تعیین میزان فنل کل از منحنی استاندارد استفاده شد. به این منظور غلظت‌های مختلفی از گالیک اسید تهیه و بعد از خوانده شدن عدد جذب، منحنی استاندارد رسم شد (شکل ۲). از رابطه خط بدست‌آمده از منحنی استاندارد برای تعیین میزان فنل کل استفاده گردید.



شکل ۲- منحنی استاندارد گالیک اسید برای ترکیب‌های فنلی کل

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

برای این منظور براساس روش Menichini و همکاران (۲۰۰۹)، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره رقیق شده را با ۲ میلی‌لیتر آب‌مقطر، ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵٪، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیم ۱۰٪ و ۱ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۱ نرمال مخلوط شد. در نهایت جذب نمونه‌ها بلافاصله در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد کوئرستین استفاده گردید (شکل ۳).



شکل ۳- منحنی استاندارد کوئرستین برای ترکیب‌های فلاونوئیدی کل

نتایج

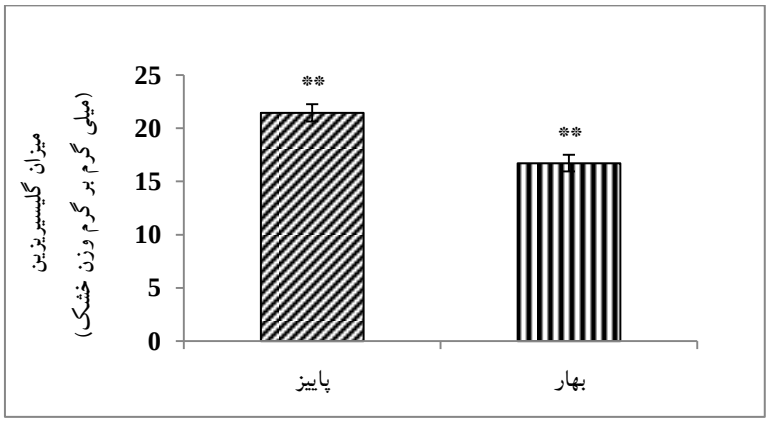
مقایسه میزان گلیسیریزین، میزان عصاره و میزان فنل و فلاونوئید کل شیرین‌بیان

نتایج بدست‌آمده از بررسی نمونه‌های ریزوم شیرین‌بیان در فصل پاییز و بهار از نظر تولید میزان گلیسیریزین، میزان فنل و فلاونوئید کل و همچنین از نظر میزان عصاره، با یکدیگر تفاوت قابل ملاحظه‌ای داشتند. جدول ۲ نشان می‌دهد که بازدهی عصاره استحصالی از ریزوم‌ها در فصل پاییز (۱۱/۶۲٪) بیشتر از فصل بهار بوده است، همچنین از نظر تولید گلیسیریزین، فنل و فلاونوئید کل فصل پاییز مقادیر بیشتری را نسبت به فصل بهار به خود اختصاص داده است. این مقادیر به‌ترتیب ۲۱/۴۶، ۱۵/۰۸ و ۶/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک اندازه‌گیری شدند.

با توجه به اینکه در میان ترکیب‌های شیمیایی موجود در عصاره شیرین‌بیان، ماده شیمیایی گلیسیریزین از ارزش و اهمیت زیادی در صنایع دارویی و مواد آرایشی و غذایی برخوردار است و مقدار این ترکیب شیمیایی ارزش و اهمیت شیرین‌بیان را تعیین می‌کند. ازاین‌رو اقدام به انجام آزمون T مستقل بین دو گروه فصل پاییز و بهار از نظر میزان تولیدی گلیسیریزین شد. نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌دار بین دو فصل پاییز و بهار از مقدار گلیسیریزین در سطح احتمال ۵٪ دیده شد (شکل ۴).

جدول ۲- میزان گلیسیریزین، میزان عصاره و میزان فنل و فلاونوئید کل مورد بررسی در فصل پاییز و بهار

	نام فصل	
	پاییز	بهار
میزان عصاره (٪)	۱۱/۶۲	۷/۲۶
گلیسیریزین (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	۲۱/۴۶	۱۶/۷۲
فنل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	۱۵/۰۸	۹/۰۵
فلاونوئید کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	۶/۱۵	۳/۶۴



شکل ۴- مقایسه مقدار گلیسیریزین در فصل پاییز و بهار (: معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪)**

ترکیب‌های فنلی موجود در عصاره

نتایج حاصل از بررسی ترکیب‌های فنلی عصاره ریزوم شیرین‌بیان با دستگاه HPLC و میزان ترکیب‌های فنلی در این مطالعه در جدول ۳ بیان شده است. بررسی نتایج نشان داد که در میان این ترکیب‌ها فرولیک اسید با مقدار ۳/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و کوماریک اسید با مقدار ۲/۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در فصل پاییز در رتبه اول ترکیب‌ها قرار داشتند. کمترین مقدار در میان ترکیب‌های فنلی اندازه‌گیری شده برای کافئیک اسید مقدار ۰/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در فصل بهار برآورد شد. به‌طور کلی تمام ترکیب‌های فنلی در فصل پاییز مقدار بیشتری را نسبت به فصل بهار به خود اختصاص دادند.

جدول ۳- میزان ترکیب‌های فنلی مورد بررسی در فصل بهار و پاییز

نام ترکیب فنلی (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	پاییز	بهار
Gentisic acid	۰/۵۳	۰/۳۵
Caffeic acid	۰/۲۴	۰/۱۲
p-coumaric acid	۲/۹۶	۲/۳۳
Ferulic acid	۳/۱۴	۲/۳۷
Sinapic acid	۲/۱۸	۱/۷۷
Luteolin	۱/۳۸	۰/۸۶
Apigenin	۲/۰۱	۱/۶۲

بحث

تولید مواد مؤثره گیاهان دارویی معمولاً تحت تأثیر ژنوتیپ و عوامل محیطی قرار دارد (Filippo *et al.*, 2002). با توجه به نتایج بدست‌آمده فصل پاییز نسبت به فصل بهار مقدار گلیسیریزین بیشتری را برای ریزوم‌های شیرین‌بیان نشان داد. بنابراین به نظر می‌رسد که در پایان فصل به‌دلیل استراحت گیاه، مواد ذخیره‌ای از قسمت‌های هوایی گیاه به سمت ریشه مهاجرت می‌نمایند و در درون ریشه جمع می‌شوند. Andoskina و همکاران (۱۹۷۹) و Kuzmin و همکاران (۱۹۷۵) در بررسی‌های خود به این نتیجه رسیدند که اندام‌های زیرزمینی شیرین‌بیان در گونه‌های گلابرا و اورالنسیس در تمامی مراحل رشد و نیز در زمستان که گیاهان کاملاً در خواب هستند، دارای گلیسیریزین می‌باشند و این مقدار در پایان فصل رشد به بالاترین مقدار خود می‌رسد. Marui و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیق میدانی خود گزارش کردند که مقدار گلیسیریزین در شیرین‌بیان‌های کشت شده در دمای پایین برای هفت روز دو برابر نسبت به شرایط ثابت ۲۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. اگرچه قطر ریشه برای هر دو شرایط کشت تقریباً برابر بود و آنان بیان کردند که تنش‌های محیطی، به‌ویژه درجه حرارت پایین برای افزایش گلیسیریزین مؤثر است.

ترکیب‌های فنلی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که اغلب فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. این ترکیب‌ها جزء آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی محسوب می‌شوند و خواص ارزشمند ضدمیکروبی، ضدویروس، ضدجهش و ضدسرطان دارند. میزان فنل کل یکی از شاخص‌های فارماکولوژیک گیاه است. براساس مطالعات فراوانی که توسط محققان انجام شده میزان ترکیب‌های پلی‌فنلی با توجه به ژنوتیپ گیاه، شرایط خاکی و مرحله رشد گیاه متفاوت است. همچنین عوامل محیطی مانند نور،

دما و شرایط تغذیه‌ای خاکی گیاه می‌تواند بر متابولیسم فنیل پروپانوئیدها اثرگذار باشد (Hormozinejad *et al*., 2018).

در این مطالعه، مشاهده گردید که ریزوم‌های شیرین‌بیان در فصل پاییز در مقایسه با فصل بهار دارای مقادیر بیشتری از فنل و فلاونوئید کل و ترکیب‌های فنلی بود، همچنین میزان عصاره کل ریزوم‌ها در فصل پاییز درصد بیشتری را نسبت به فصل بهار نشان داد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که در فصل‌های پایان رشد مانند پاییز و زمستان به دلیل دمای پایین و استراحت گیاه، مواد معدنی و ذخیره‌ای از قسمت هوایی به سمت ریشه و ریزوم گیاه انتقال می‌یابند و در درون آنها ذخیره می‌شوند. این احتمال داده می‌شود که ترکیب‌های مؤثره گیاه در این مرحله از رشد و نمو گیاه به دلیل تغذیه ریشه و ریزوم گیاه افزایش یابند. تفاوت بیوشیمیایی و مورفولوژیکی بین گیاهان دارویی با شرایط محیطی متفاوت به اثبات رسیده است و این اختلافات می‌تواند به‌دلیل در دسترس بودن مواد مغذی برای گیاهان دارویی باشد که بر روی کمّیت و کیفیت ترکیب‌های بیوشیمیایی اثر می‌گذارد (Sato *et al*., 2004). تأثیر اوضاع اقلیمی بر گیاهان مختلف متفاوت است و همواره باید با تحقیقات مناسب به بررسی نقش عوامل اقلیمی به مواد مؤثره گیاهان دارویی پرداخت. مهمترین عامل محیطی رویش گیاهان دارویی که تأثیر عمده‌ای بر کیفیت و کمّیت مواد مؤثره آنها می‌گذارد، درجه حرارت، بارندگی، عرض جغرافیایی، طول روز، خصوصیات خاک و تغذیه می‌باشد (Hemmati *et al*., 2016).

یکی از مهمترین عواملی که در میزان ماده مؤثره گیاهان دارویی مؤثر است و در هنگام جمع‌آوری و بهره‌برداری از اندام‌های گیاهی باید به آنها توجه نمود، زمان جمع‌آوری گیاه است. تغییراتی که در میزان مواد مؤثره در طول سال و حتی ساعات یک روز وجود دارد، اهمیت جمع‌آوری گیاه دارویی را در زمان مناسب نمایان می‌سازد (Bolouri Moghaddam *et al*., 2009). به‌عنوان مثال، ریشه و ریزوم را در اواخر پاییز برداشت می‌کنند، زیرا در بهار ریشه‌ها معمولاً گوشتی و اسفنجی شکل هستند و در اثر خشک شدن به سرعت خرد شده و کیفیت خود را از دست می‌دهند (Septak, 1999). برداشت اندام‌های زیرزمینی شیرین‌بیان در فصلی که برگ‌ها در زمان خزان برگ‌ها و در انتهای فصل رویشی (پاییز و زمستان) باید انجام شود، زیرا در این دوره از رشد گیاه، ریشه دارای حداکثر مقدار ماده مؤثره گلیسیریزین است (Mirhaidar, 2013). نتایج حاصل از این تحقیق در بررسی ریزوم‌های شیرین‌بیان نیز با نتایج سایر تحقیقات همخوانی دارد.

در تحقیق Vlaisavljević و همکاران (۲۰۱۸) در فصل بهار ریشه و برگ شیرین‌بیان از کشور صربستان جمع‌آوری شد و از نمونه‌هایی به صورت ریشه خشک، ریشه تازه، برگ خشک و برگ تازه عصاره‌گیری کردند. آنان گزارش کردند که بیشترین محتوای فنل کل (۳۷/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در عصاره ریشه تازه دیده شد و نیز همان عصاره دارای بالاترین فلاونوئید کل (۵/۹۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود. براساس یافته‌های این مطالعه می‌توان چنین بیان کرد که در مناطق مختلف از جهان، با توجه به وجود اختلاف در شرایط محیطی و دمای فصول مختلف و نیز تفاوت در میزان نور دریافتی، بارندگی در فصل رشد و تغذیه گیاهان دارویی به نوبه خود باعث تفاوت در تولید ماده مؤثره می‌شود (Zobayed *et al*., 2005).

به‌طور کلی، براساس نتایج بدست آمده می‌توان بیان کرد که احتمالاً در گیاه شیرین‌بیان تولید متابولیت‌های ثانویه به سمت تولید گلیسیریزین و فنل و فلاونوئیدها به‌عنوان مواد مؤثره با ارزش و دارویی این گیاه می‌رود که در فصل‌های مختلف نیز تفاوت در مقدار آنها مشهود است. بر این اساس در شرایط محیطی پاییز نسبت به بهار، تولید گلیسیریزین بیشتر بود، به‌طوری که در فصل پاییز بیشترین میزان آن ۲۱/۴۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود. همچنین میزان فنل و فلاونوئید کل در فصل پاییز افزایش چشمگیری نشان داد که مقادیر آنها به‌ترتیب ۱۵/۰۸ و ۶/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود و نیز در میان ترکیب‌های فنلی بالاترین مقدار مربوط به ترکیب فرولیک اسید ۳/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برآورد شده است. این نتایج نشان می‌دهد که

الگوی تولید این متابولیت‌ها در شرایط متفاوت محیطی در گیاه شیرین‌بیان تفاوت دارد (Oloumi & Hasibi, 2011). Hayashi و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که بیشترین محتوای گلیسیریزین در فصل پاییز بعد از پیری و ریزش برگ‌های گیاهان ۱تا ۳ ساله حاصل شد. از سوی دیگر، آنان بیان کردند که در مقادیر ایزولیکوریتجنین و گلابریدین به‌عنوان دو فلاونوئید مهم در شیرین‌بیان در ماه‌های جولای و ژوئن افزایش دیده شده است، در حالیکه در محتوای گلیسیریزین در این دوره افزایشی دیده نشده است.

به‌عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که مواد مؤثره گیاهان دارویی از نظر کمّی و کیفی تحت تأثیر عوامل محیطی و ژنتیکی قرار می‌گیرند. عوامل محیطی مانند فصل برداشت در این پژوهش روی مواد مؤثره گیاه شیرین‌بیان اثر معنی‌دار داشت، به‌طوری که بیشترین میزان عصاره، میزان گلیسیریزین، تولید فنل و فلاونوئید کل و ترکیب‌های فنلی در شرایط آب و هوایی پاییز انجام شد. با توجه به اهمیت این مواد مؤثره در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی و همچنین استفاده وسیع از ترکیب‌های فنلی، گلیسیریزین و فلاونوئیدهای مهم شیرین‌بیان در داروهای گیاهی، نیاز است که بهترین زمان برای بیشترین تولید و تجمع میزان آنها در این گیاه مشخص گردد تا با بهره‌برداری به‌موقع قدمی مؤثر به‌منظور غنی‌سازی صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی برداشته شود.

منابع مورد استفاده

- Ambavade, S.D., Kasture, V.S. and Kasture, S.B., 2001. Anxiolytic activity of *Glycyrrhiza glabra* L. Journal of Natural Remedies, 1(2): 130-134.
- Andoskina, L.E., Muinova, S.S. and Pauzner, L.E., 1979. Effect of the time of mowing on the productivity and quality of licorice roots. Horticultural Abstract, 49: 539.
- Basar, N., Talukdar, A.D., Nahar, L., Stafford, A., Kushiev, H., Kan, A. and Sarker, S.D., 2014. A simple semi-preparative reversed-phase HPLC/PDA method for separation and quantification of glycyrrhizin in nine samples of *Glycyrrhiza glabra* root collected from different geographical origins. Phytochemical analysis, 25(5): 399-404.
- Biondi, D.M., Rocco, C. and Ruberto, G., 2005. Dihydrostilbene derivatives from *Glycyrrhiza glabra* Leaves. Journal of Natural Products, 68(7): 1099-1102.
- Bolouri Moghaddam, E., Hemmati, Kh., Bashiri Sadr, Z. and Mashayekhi, K., 2009. Effect of harvest time and root diameter on glycyrrhizin content in *Glycyrrhiza glabra*. Journal of Plant Production, 16(2): 29-45.
- Filippo, L., Marreti, A. and Lovat, A., 2002. Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascene* L. Industrial Crop Product, 15: 59-69.
- Hayashi, H., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Yamamto, H. and Yoshikawa, T., 1998. Seasonal variation of glycyrrhizin and isoliquiritigenin glycosides in the root of *Glycyrrhiza glabra* L. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 21(9): 987-989.
- Hemmati, K.H., Hemati, N. and Ghaedi, A., 2016. The effect of habitat, root diameter and tissue type on the amount of some secondary *Glycyrrhiza glabra* In Khorasan Razavi (Quchan). Journal of Plant environment Physiology, 39: 1-10.
- Hormozinejad, E., Zolfaghari, M., Mahmoodi Sourestani, M. and Enayati Zamir, N., 2018. Effects of plant growth promoting rhizobactria and chemical fertilizer on growth, yield, flowering, physiological properties, and total phenolic content of *Calendula officinalis* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 34(4): 684-696.
- Hosseinzadeh, H. and Nassiri-Asl, M., 2015. Pharmacological effects of *Glycyrrhiza* spp. and its bioactive constituents: update and review. Phytotherapy Research, 29(12): 1868-1886.
- Khan Ahmadi, S., Naghdi badi, H., Akhundzadeh, Sh., Khalighi Sigadri, F., MehrArfin, A., Shahriari, S. and Haji Aghaei, R., 2013. A review of the licorice. Journal of Medicinal Plants, 12(2): 1-12.
- Kuzmin, E.V., Kashkavar, N.F. and Golovenko, K.A., 1975. The glycyrrhizic acid content in the roots of licorice from the valley of the river Ural. Horticultural Abstract, 47: 1893.
- Mamedov, N.A. and Egamberdieva, D., 2017. Phytochemical constituents and pharmacological effects of liquorice: a review: pharmacology and therapeutic uses: 1-21. In: Oztürk, M. and Hakeem, K.R., (Eds.). Plant and Human Health (Vol. 3). Springer Nature Publishers, 385p.
- Marui, A., Nagafuchi, T., Shinogi, Y., Yasufuku, N., Omine, K., Kobayashi, T. and Shinkai, A., 2011.

Mashhad, 397p.
- Sarabi, S. and Sefidkon, F., 2018. Essential oil content and composition of *Ziziphora persica* Bunge from different habitats. Iranian Journal of Horticultural Science, 48(3): 613-621.
- Sato, S., Ikeda, H., Furukawa, H., Murata, Y. and Tomoda, M., 2004. Effects of nutrient solution concentration on inorganic and glycyrrhizin contents of *Glycyrrhiza glabra* L. Yakugaku Zasshi (Journal of the Pharmaceutical Society of Japan), 124(10): 705-709.
- Septak, M., 1999. Comparison study of antimicrobial effects of root and leaf pure extract of licorice and licorice powder in market. Ph.D. Thesis Pharmaceutics Faculty, Ferdowsi University, Mashhad, 102p.
- Sharma, V. and Agrawal, R.C., 2013. *Glycyrrhiza glabra*: a plant for the future. Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences, 2(3): 15-20.
- Shibata, S., 1994. Chemical investigation of the crude drugs stored in Shosoin for over twelve hundred years. International Journal of Pharmacognosy, 32(1): 75-89.
- Somjen, D., Knoll, E. and Vaya, J., 2004. Estrogen-like activity of Licorice root constituents: glabridin and glabrene, in *vascular tissues* in vitro and in vivo. Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology, 91: 147-155.
- Vlaisavljević, S., Šibul, F., Sinka, I., Zupko, I., Ocsovszki, I. and Jovanović-Šanta, S., 2018. Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. Industrial Crops and Products, 112: 217-224.
- Zobayed, S.M., Afreen, F. and Kozai, T., 2005. Necessity and production of medicinal plants under controlled environments. Environmental Control in Biology, 43(4): 243-252.

Cultivation research for high-glycyrrhizin Licorice by applying low temperature and Ca^{2+} ion as environmental stress based on field investigation. Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 56(2): 367-371.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M. and Robards, K., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73: 73-84.
- Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G. and Menichini, F., 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. Cv. Habanero. Food Chemistry, 114(2): 553-560.
- Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Rodríguez, M.J., Maureira, H. and Martínez, E.A., 2012. Nutritional aspects of six quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*.) ecotypes from three geographical areas of Chile. Chilean Journal of Agricultural Research, 72(2): 175-181.
- Mirhaidar, H., 2011. Application of Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Diseases. Islamic Culture Publishing Office, 538p.
- Mirhaidar, H., 2013. Herbal Education with the Use of Plants in the Prevention and Treatment of Diseases. Islamic Culture Publishing Office, 532p.
- Mozafarian, V., 2000. Flora of Khuzestan Province. Natural Sources Research Center, 670p.
- Oloumi, H. and Hasibi, N., 2011. Investigating the content of secondary metabolites of *Glycyrrhiza glabra* in some natural habitats of Kerman province. Journal of Medicinal Plants, 11(2): 137-144.
- Omidbaigi, R., 2008. Production and Processing of Medicinal Plants (Vol. 2). Astan Quds Razavi Publishing, 347p.
- Omidbaigi, R., 2009. Production and Processing of Medicinal Plants (Vol. 1). Behnashr Pubilcation,

A study on some secondary metabolites of *Glycyrrhiza glabra* L. in autumn and spring conditions in Khuzestan province

A. Khakpour[1], M. Zolfaghari[2*] and K. Sorkheh[3]

1- M.Sc. student of Medicinal Plants, Horticulture Department of Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2*- Corresponding author, Horticulture Department of Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran E-mail: m.zolfaghari@scu.ac.ir
3- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahwaz, Iran

Received: January 2019 Revised: September 2019 Accepted: November 2019

Abstract

Medicinal plant licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) has been used by the pharmaceutical industries for its important secondary metabolites. This study was carried out to determine the best harvest time for obtaining the highest content of extract, glycyrrhizin, total phenols, total flavonoids, and phenolic compounds of licorice rhizome of the Behbahan area in Khuzestan province in two seasons of autumn and spring. The results of this study showed that the extract content of rhizomes and also glycyrrhizin, total phenols, and flavonoids content in autumn were higher than those in spring. The results of the independent T-test for glycyrrhizin, as an important and valuable secondary metabolite of licorice, showed a significant difference between autumn and spring seasons. Among the phenolic compounds studied, the highest amount was given to ferulic and coumaric acids in autumn, and the lowest one to caffeic acid in spring. Considering the importance of these secondary metabolites in the pharmaceutical, health and food industries, as well as the widespread use of phenolics, glycyrrhizin, and flavonoids of licorice in herbal drugs, it is necessary to determine the best time for the highest production and accumulation of these metabolites in the licorice rhizomes to take an effective step to enrich the industries mentioned.

Keywords: Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), secondary metabolites, glycyrrhizin, flavonoid, phenolic compounds.