DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2016.106563

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، صفحه ۳۰۰-۲۹۰ (۱۳۹۵)

بررسی مقایسه‌ای برخی مواد مؤثره پایه‌های نر و ماده گیاه افدرا (*Ephedra major* Host)

مرتضی مفید بجنوردی[۱]، مهناز اقدسی[۲*]، منیژه میان‌آبادی[۳] و محبت نداف[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران، پست الکترونیک: m.aghdasi@gu.ac.ir

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

۴- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده

افدرا (*Ephedra major* Host) درختچه‌ای دو پایه متعلق به خانواده افدراسه و از بازدانگان پیشرفته است که خواص دارویی متعددی از آن شناخته شده‌است. هدف از این تحقیق بررسی برخی مواد مؤثره در پایه‌های نر و ماده در طول ماه‌های مرداد تا مهر است. به این منظور پایه‌های نر و ماده به‌طور جداگانه از رویشگاه طبیعی آن واقع در ارتفاعات بجنورد جمع‌آوری و خشک شدند. سپس عصاره متانولی به روش خیسانیدن استخراج و میزان آلکالوئید کل، افدرین، فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل نمونه‌های گیاهی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان آلکالوئید کل و افدرین در طی ماه‌های مختلف و بین پایه‌های نر و ماده تفاوت معنی‌داری داشت. بیشترین میزان آلکالوئید کل در نمونه جمع‌آوری شده از پایه ماده در ماه مهر بود. همچنین نتایج بدست‌آمده از HPLC نشان داد که میزان افدرین در این گیاه از ۱/۵ تا ۱/۹۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در ماه‌های مورد بررسی متغیر بود. بیشترین میزان افدرین در نمونه‌های برداشت شده از پایه نر در ماه مرداد دیده شد. همچنین میزان فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل در طی ماه‌های مختلف به‌ترتیب بین ۴۱/۱۳-۳۱/۵، ۵/۸۱-۳/۵۱ و ۲۴/۴۶-۱۵/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود. این نتایج نشان داد که میزان فنل فقط در ماه مهر، میزان فلاونوئید کل، در ماه‌های شهریور و مهر و میزان تانن کل در ماه‌های مرداد و شهریور بین پایه‌های نر و ماده تفاوت معنی‌دار داشت.

واژه‌های کلیدی: افدرا (*Ephedra major* Host)، آلکالوئید، افدرین، پایه نر، پایه ماده.

مقدمه

گیاه افدرا با نام علمی *Ephedra major* متعلق به خانواده افدراسه و حدواسط بازدانگان و نهاندانگان است. خانواده افدراسه دارای یک جنس با نام افدرا و بیش از ۵۰ گونه است. تاکنون ۱۱ گونه از این جنس در ایران شناخته شده‌است (Ghahreman, 1993). گیاه *Ephedra major* درختچه‌ای دو پایه به ارتفاع ۲۰ تا ۱۵۰ سانتی‌متر است. این گونه اغلب در کوهستان‌های منطقه ایران و تورانی و در ارتفاع ۱۵۰۰ تا ۳۰۰۰ متر دیده می‌شود (Asadi, 2000). گیاه افدرا در طب سنتی چین در درمان بیماری‌هایی مثل سرماخوردگی، آنفولانزا، برونشیت، گرفتگی بینی، تب‌یونجه، آرتریت، کهیر، عدم تعریق، سردرد، دردهای استخوان و مفاصل و کاهش فشارخون توصیه می‌شود. علاوه‌بر کاربردهای سنتی، امروزه از این گیاه در تولید مکمل‌های غذایی برای کاهش وزن و تقویت ماهیچه‌ها در

ورزشکاران استفاده می‌شود. همچنین در طب جدید از افدرین در آسم و سرماخوردگی استفاده می‌شود (Fukushima, 2004). از طرفی دیگر، مصرف بالای این ترکیب در بیماران سبب عوارضی نظیر اضطراب، بی‌قراری، بی‌خوابی، مشکل در دفع ادرار و در برخی موارد جنون می‌شود (Roxanas & Spalding, 1977). بیشترین کاربرد دارویی گیاه افدرا مربوط به آلکالوئیدهای افدرین است که در ساقه‌های آن تجمع می‌یابند.

گونه‌های مختلف افدرا دارای ۳/۴٪-۰/۰۱٪ آلکالوئیدهای افدرین هستند. افدرین ایزومر اصلی است که ۳۰٪ تا ۹۰٪ آلکالوئید کل را تشکیل می‌دهد (Abourashed *et al*., 2003). تاکنون شش ایزومر از افدرین با نام‌های نورافدرین، متیل‌افدرین، نورسودوافدرین، سودوافدرین و متیل‌سودوافدرین شناخته شده‌است. میزان و نوع آلکالوئیدهای افدرین بر حسب گونه، واریته، بخش‌های مختلف گیاه، فصل برداشت و ناحیه جغرافیایی و ارتفاعی که گیاه رشد می‌کند متفاوت است. اولین منبع تجاری آلکالوئیدهای افدرین *Ephedra sinica* (تا ۳/۴٪ وزن خشک) است که بومی کشور چین می‌باشد. میزان آلکالوئید کل در گونه‌های *E. equistina* و *E. monosperma* ۲/۵٪ و در گونه‌های *E. gerardiana*، *E. distachya*، *E. major* و *E. nebrodensis* ۱ تا ۲ درصد وزن خشک گیاه است (Fukushima, 2004؛ Schaneberg *et al*., 2003). علاوه‌بر آلکالوئیدها، انواع دیگری از متابولیت‌های ثانویه مانند فلاوون‌ها، فلاوونول‌ها، تانن‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک و ترپن‌های فرّار نیز در این گیاه گزارش شده‌است (Abourashed *et al*., 2003).

تاکنون مطالعات کمی در مورد گیاه افدرا در ایران انجام شده‌است. اطلاعات موجود نشان می‌دهد که در بین ۹ گونه مورد بررسی افدرا، گونه *E. major* بیشترین میزان افدرین (۱/۸٪-۰/۸٪ درصد وزن خشک) و گونه *E. brevifoliata* کمترین میزان افدرین را به مقدار ۰/۰۸-۰/۰۵ درصد وزن خشک دارا می‌باشد (Baher *et al*., 2000). Kashki (۲۰۰۰) نیز نشان داد که در بین ۴ گونه *E. intermedia*، *E. major*، *E .strobilacea* و *E. foliate* که در خراسان رویش دارند، گونه *E. major* بیشترین میزان آلکالوئید کل (۰/۹٪) را در خود داشته که می‌توان از آن به‌عنوان گونه‌ای ارزشمند برای استخراج صنعتی افدرین نام برد.

با توجه به اهمیت دارویی گیاه افدرا، در این تحقیق برای اولین بار در ایران سعی شده است تا ترکیب‌های سازنده پایه‌های نر و ماده در فاصله زمانی تشکیل مخروط‌های نر و ماده تا زمان تشکیل میوه آبدار به‌طور جداگانه مورد بررسی و مقایسه قرار گیرد. به این منظور گیاه افدرا در طی یک دوره سه ماهه مرداد تا مهر جمع‌آوری و ترکیب‌های سازنده پایه‌های نر و ماده مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

پایه‌های نر و ماده به‌طور جداگانه در فاصله مرداد تا مهرماه از رویشگاه خود واقع در ۴۵ کیلومتری جنوب‌شرقی بجنورد حدفاصل روستاهای اسفیدان و باداملق با طول و عرض جغرافیایی "۴۴ '۱۹ °۳۷ شمالی و "۳۰ '۳۸ °۵۷ شرقی جمع‌آوری شد. همه نمونه‌ها در تاریخ پنجم هر ماه و بین ساعت‌های ۱۰ تا ۱۲ صبح جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها به مدت دو هفته در دمای اتاق در سایه خشک و بعد آسیاب شدند؛ و تا زمان سنجش، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه نگه‌داری شدند.

اطلاعات هواشناسی

اطلاعات مربوط به دما، رطوبت و بارندگی منطقه نمونه‌برداری از اداره هواشناسی شهرستان بجنورد بدست آمد. از آنجا که ایستگاه‌های سازمان هواشناسی دقیقاً در طول و عرض جغرافیایی مربوط به منطقه نمونه‌برداری مورد نظر وجود نداشت، اطلاعات مربوط به نزدیکترین ایستگاه هواشناسی (ایستگاه بجنورد) استخراج و برای رسم منحنی آمبروترومیک استفاده شد.

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری به روش خیسانیدن انجام شد. در این روش ۰/۱ گرم بافت گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به مدت

۲۴ ساعت خیسانیده و بعد عصاره بدست آمده صاف شد. عملیات عصاره‌گیری سه بار تکرار و در نهایت عصاره‌ها با هم ترکیب شده و حجم نهایی عصاره‌ها با متانول ۸۰٪ به ۳۰ میلی‌لیتر رسانیده شد.

سنجش آلکالوئید کل

سنجش آلکالوئید کل به روش اسپکتروفتومتری انجام شد (Shamsa *et al*., 2008). در این روش ۵/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی بدست آمده در ۱ میلی‌لیتر اسیدهیدروکلریک غلیظ حل و پس از ۳۰ دقیقه صاف شد. سپس عصاره صاف‌شده سه بار با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شده و فاز آبی جدا شد. فاز آبی حاصل با سود ۰/۱ نرمال خنثی شد (pH:۷). سپس عصاره با ۵ میلی‌لیتر معرف بروموکرزول گرین و ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات pH:۴/۷ مخلوط و فاز کلروفرمی زرد رنگ حاوی آلکالوئیدها در لوله آزمایش جمع‌آوری و حجم آن با کلروفرم به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار جذب عصاره در طول موج ۴۷۰nm نانومتر خوانده شده و با استفاده از منحنی استاندارد میزان آلکالوئید کل عصاره‌ها تعیین گردید. برای رسم منحنی استاندارد، ۱ میلی‌گرم افدرین خالص در ۱۰ میلی‌لیترآب مقطر حل شد. منحنی استاندارد براساس مقادیر مختلف افدرین رسم شد.

سنجش افدرین به روش HPLC

ابتدا ۱ گرم بافت گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۵۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه توسط شیکر و در دمای اتاق عصاره‌گیری و بعد در ۱۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. آنگاه روش استخراج سه مرتبه تکرار و در نهایت حجم عصاره‌ها با متانول ۵۰٪ به ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. پس از فیلتر شدن (۰/۴۵ میکرون) عصاره به دستگاه HPLC تزریق شد. به‌منظور سنجش افدرین از دستگاه HPLC با آشکارساز UV/VIS، دتکتور Diod Array، پمپ L-Merck Hitachi7100 با نرم‌افزار EZ chrome (Hitachi-Japon) به روش ایزوکراتیک استفاده شد. فاز متحرک شامل محلول ۰/۱٪ اسیدفسفریک، محلول ۲۵ میلی‌مولار سدیم دودسیل سولفات (SDS) و استونیتریل ۴۰v/v٪ بود. فاز تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا حباب‌های هوا از آن خارج شود. سپس فاز تهیه شده در دستگاه فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف شد. مقدار جریان CC ۰/۸ بر دقیقه و طول موج ۲۱۰nm بود. مدت زمان خروج نمونه‌ها از ستون ۴۵ دقیقه بود.

به‌منظور رسم منحنی استاندارد، محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۰/۰۰۰۴، ۰/۰۰۰۸، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱۴ میلی‌گرم از افدرین تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد. منحنی استاندارد براساس مقادیر مختلف افدرین رسم گردید.

سنجش فنل، فلاونویید و تانن کل

برای تعیین مقادیر فنول کل از استاندارد گالیک اسید استفاده شد و مقادیر فنول کل به‌صورت اکی‌والان میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد. میزان فنل کل در عصاره‌های استخراج شده با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو (Folin-CiocalteuReagent) تعیین شد (Meda *et al*., 2005). ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از فیلتر میلی‌پور (۰/۴۵μm) عبور داده شده و با ۱/۲۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتیو ۰/۲ مولار مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه قرارگیری در دمای محیط، یک میلی‌لیتر محلول Na_2CO_3 (۷/۵ گرم در لیتر) به آنها اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط دوباره انکوبه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۶۰nm خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد غلظت‌های مختلفی از اسید گالیک (۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه و طول موج آن در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان فنول کل عصاره‌های استخراج شده بر مبنای میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره استخراج شده محاسبه شد.

محتوی فلاونوئید کل در عصاره‌های استخراج شده به کمک معرف آلومینیوم کلراید ($AlCl_3$) و با استفاده از روش رنگ‌سنجی انجام شد (Chang *et al*., 2002). در این روش حدود ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره پس از فیلتر شدن (با فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵μm) با ۷۵۰ میکرولیتر متانول، ۵۰ میکرولیتر

محلول الکلی ۱۰٪$AlCl_3$، ۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۱/۴ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط شدند. بعد از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای محیط، جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵nm خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف کوئرسیتین (۲، ۱، ۰/۵، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. محتوای فلاوونوئید کل عصاره بر مبنای میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره استخراج شده با میانگین سه بار تکرار تعیین شد.

برای سنجش تانن کل از روش ماکار استفاده شد (Makkar *et al*., 1993). در این روش ابتدا با استفاده از پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون (PVPP) تانن موجود در عصاره رسوب داده شد و بعد میزان فنل در عصاره فاقد تانن تعیین شد. میزان تانن موجود در عصاره از تفاضل میزان فنل کل و فنل فاقد تانن محاسبه شد. به این منظور ۱ میلی‌لیتر از عصاره را با ۱۰۰ میلی‌گرم PVPP مخلوط کرده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. میزان تانن کل از حاصل تفاضل میزان فنل کل و فنل فاقد تانن بدست آمد.

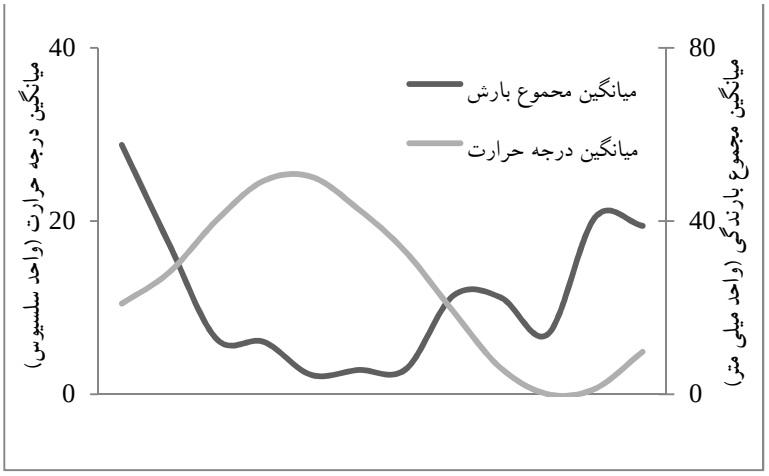
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. از آنالیز یک‌طرفه دانکن و آزمون t برای مشخص کردن اختلاف معنی‌دار بین نتایج استفاده شد. سطح اطمینان برای وجود اختلاف معنی‌دار آماری، ۵٪ در نظر گرفته شد. رسم نمودارها و جدولها توسط نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج

اطلاعات هواشناسی

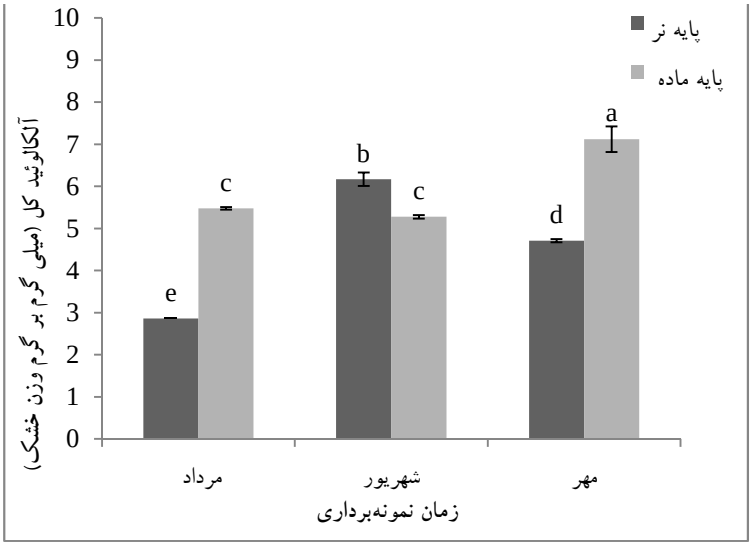
پراکندگی نزولات آسمانی در طول سال و تغییرات دما دو عنصر ویژه غیرقابل تفکیک را در زندگی گیاهان تشکیل می‌دهند و بسیاری از کارشناسان سعی کرده‌اند تا به کمک ضرایب و نمودارها روابط بین گیاه و عوامل مختلف اقلیمی را مشخص کنند. سیستم نمودارهای بارن-گرما (منحنی‌های آمبروترومیک) که به‌وسیله گوسن پیشنهاد شده، بسیار ساده و قابل استفاده در کلیه مناطق جهان است. بر روی این نمودارها میانگین ماهانه دما و میانگین ماهیانه نزولات آسمانی به گونه‌ای نشان داده می‌شوند که مقیاس نزولات آسمانی دو برابر مقیاس دما باشد. در هر ماه که نزولات آسمانی کمتر از دو برابر دما باشد، آن ماه خشک محسوب می‌شود. به عبارت دیگر، وقتی منحنی بارندگی در زیر منحنی دما قرار گیرد، آن ماه خشک محسوب می‌شود (Karimi *et al*., 2009). منحنی آمبروترومیک ایستگاه بجنورد در شکل ۱ نمایش داده شده‌است. براساس این منحنی مشخص می‌شود که منطقه نمونه‌برداری از خرداد تا مهر کم‌باران بوده و خشک‌ترین ماه سال خرداد می‌باشد.



شکل ۱- منحنی آمبروترومیک ایستگاه بجنورد

سنجش آلکالوئیدکل

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش میزان آلکالوئید کل در پایه‌های نر و ماده در ماه‌های مختلف نشان داد که میزان آلکالوئید کل در هر سه ماه مرداد، شهریور و مهر تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ نشان می‌دهد (جدول ۱). از طرفی بیشترین میزان آلکالوئید کل در نمونه برداشت شده از پایه ماده در ماه مهر (۶/۸۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) دیده شده‌است. در حالیکه کمترین میزان آلکالوئید کل در نمونه برداشت شده از پایه نر در ماه مرداد (۲/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بوده است (شکل ۲).



شکل ۲- میزان آلکالوئید کل در پایه‌های نر و ماده گیاه *Ephedra major* در طی ماه‌های مرداد تا مهر

داده‌ها حاصل میانگین سه تکرار است.

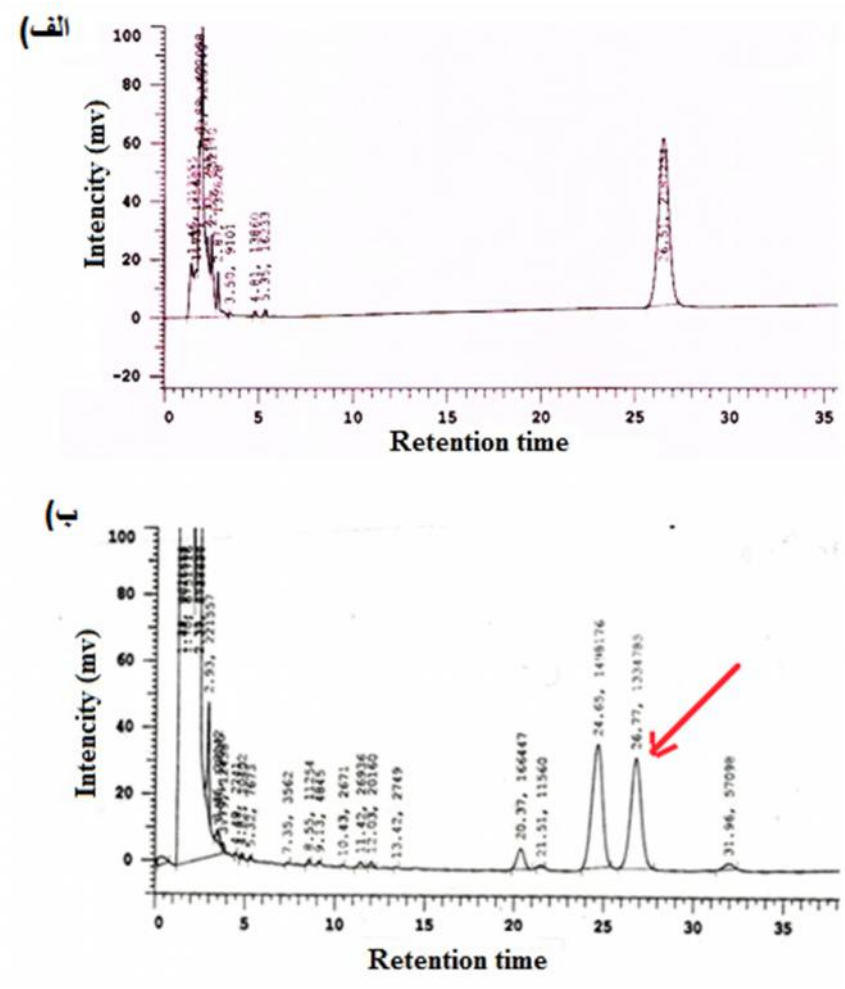
بررسی میزان افدرین به روش HPLC

در ابتدا با تزریق غلظت‌های مختلف افدرین به دستگاه، زمان بازداری افدرین (۲۶/۵ دقیقه) بدست آمد (شکل ۳- الف). با تزریق عصاره متانولی و مقایسه زمان بازداری با نمونه استاندارد، زمان خروج افدرین از ستون و پیک مربوط به آن تعیین شد (۳- ب).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده نشان داد که میزان افدرین در پایه‌های نر و ماده در ماه‌های مختلف نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ نشان می‌هد (جدول ۱). بیشترین میزان افدرین در نمونه برداشت شده از پایه نر در ماه مرداد به میزان ۱/۹۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد. در حالیکه کمترین میزان افدرین در نمونه برداشت شده از پایه نر در ماه مهر به میزان ۱/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک دیده شده‌است. این نتایج نشان داد که میزان افدرین در پایه‌های ماده هر سه ماه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری داشت. در بین پایه‌های نر نیز میزان افدرین در نمونه ماه مهر با شهریور و مرداد تفاوت معنی‌دار نشان دادند (شکل ۴).

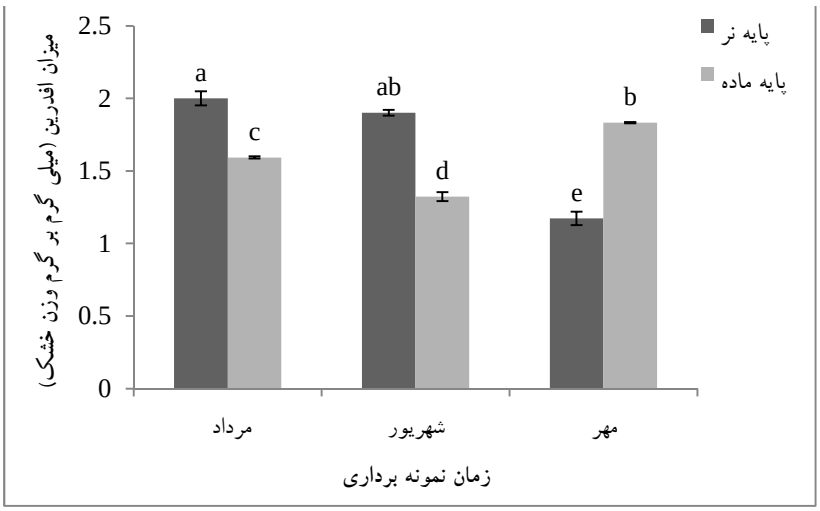
سنجش میزان فنل کل، فلاونویید کل و تانن کل

تجزیه واریانس داده‌های بدست‌آمده نشان داد که در بین پایه‌های نر و ماده در ماه‌های مختلف میزان فنل در ماه‌های مختلف نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ نشان می‌دهد (جدول ۱). اما بین پایه‌های نر و ماده در ماه شهریور و مرداد تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود (شکل ۵- الف). بیشترین میزان فنل کل در پایه نر در پایه ماده برداشت شده در ماه شهریور به‌ترتیب ۴۱/۱۳ و ۴۱/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد.



شکل ۳- کروماتوگرام نمونه استاندارد افدرین و عصاره گیاهی

الف) افدرین خالص، ب) عصاره متانولی *Ephedra major* (پیک مربوط به افدرین با فلش مشخص شده است.)



شکل ۴- میزان افدرین در عصاره متانولی گیاه *Ephedra major* در پایه‌های نر و ماده در ماه‌های مرداد تا مهر

داده‌ها حاصل میانگین سه تکرار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

نتایج حاصل از سنجش میزان فلاونوئید کل نشان داد که میزان فلاونوئید کل بین پایه‌های نر و ماده در ماه‌های شهریور و مهر تفاوت معنی‌داری دارد. بیشترین میزان فلاونوئید کل در پایه نر برداشت شده در ماه شهریور به میزان ۵/۸۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و کمترین آن در نمونه برداشت شده از پایه نر در ماه مهر (۳/۵۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد (شکل ۵- ب).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های بدست‌آمده نشان داد که میزان تانن کل در ماه‌های مختلف در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد. همچنین میزان تانن کل بین پایه‌های نر و ماده، در ماه‌های مرداد و شهریور تفاوت معنی‌دار نشان داد (جدول ۱). در حالیکه نتایج نشان‌دهنده آن است که در نمونه‌های برداشت شده در ماه مرداد میزان تانن کل در پایه ماده بیشتر از پایه نر است، اما نمونه‌های برداشت شده در ماه شهریور نتایج کاملاً متفاوتی را نشان داد. البته بین پایه‌های نر، نمونه برداشت شده در ماه مهر با نمونه شهریور و مرداد و بین پایه‌های ماده، نمونه‌های هر سه ماه با هم تفاوت معنی‌دار نشان دادند (شکل ۵-ج). در نمونه‌های برداشت شده از پایه نر، بیشترین میزان تانن کل در نمونه برداشت شده در ماه مهر به میزان ۱۵/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد. اما در پایه ماده نیز نمونه برداشت شده در ماه مرداد با ۲۴/۴۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و نمونه برداشت شده در ماه شهریور با ۷/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان تانن بودند.

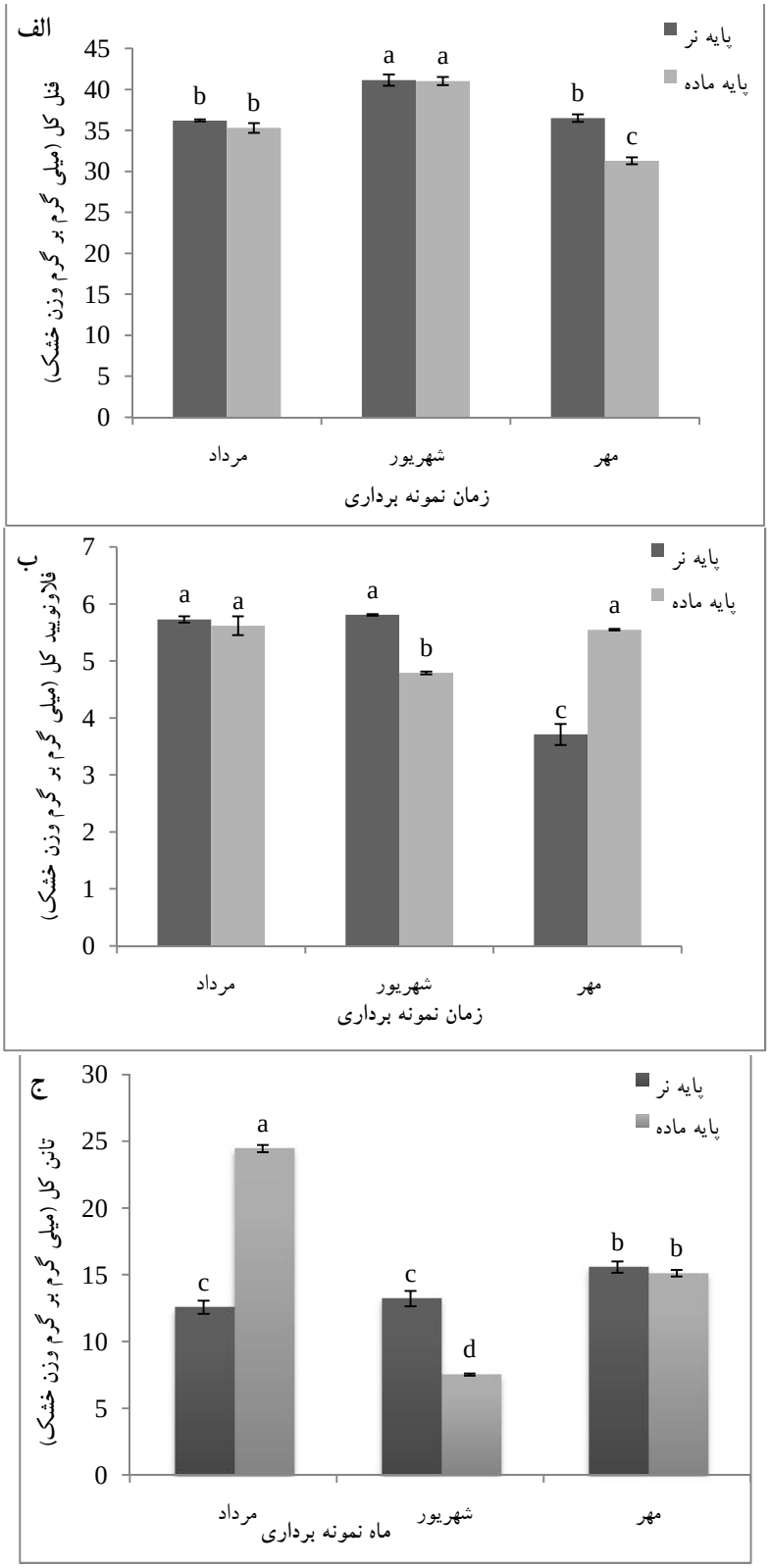
جدول ۱- تجزیه واریانس مربوط به میزان فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل در طی ماه‌های مرداد تا مهر

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		آلکالوئید کل	افدرین	فنل کل	فلاونوئید کل	تانن کل
ماه‌های نمونه‌برداری	۳	۴/۰۲۳ **	۰/۳۲۲ *	۸۱/۱۱۹ *	۲/۰۰۱ *	۹۰/۶۷۲ *
خطا	۱۲	۱/۲۲۴	۰/۰۶۹	۳/۰۱۸	۰/۰۳۳	۱۳/۲۱۴

*: تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪؛ **: تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪

بحث

تاکنون مطالعات اندکی در مورد گیاه افدرا منتشر شده‌است اما در هیچ‌یک از این تحقیقات، مقایسه‌ای بین ترکیب‌های سازنده پایه‌های نر و ماده انجام نشده است. نتایج حاضر بیانگر آن است که تفاوت معنی‌داری در میزان آلکالوئید کل و افدرین پایه‌های نر و ماده در هر سه ماه مرداد، شهریور و مهر وجود دارد. نتایج حاضر نشان داد که میزان آلکالوئید کل در نمونه‌های برداشت شده در طی سه ماه مرداد، شهریور و مهر بین ۰/۲۶٪ تا ۰/۶۸٪ (۲/۶ تا ۶/۸۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) متغیر است. در حالیکه گزارش‌های قبلی نشان داده که میزان آلکالوئید کل در *E. major* بین ۰/۸٪ تا ۱/۸٪ در مناطق مختلف ایران متغیر است (Baher *et al.*, 2000). از طرفی دیگر Kashki (۲۰۰۰) در تحقیقات خود میزان آلکالوئید کل را در *E. major* رویش یافته در خراسان ۰/۹٪ وزن خشک اعلام کرده‌است. این تفاوت می‌تواند به‌دلیل روش سنجش میزان آلکالوئید کل باشد، زیرا Baher و همکاران (۲۰۰۰) و نیز Kashki (۲۰۰۰) در تحقیق خود از روش GC-MS برای سنجش میزان آلکالوئید کل استفاده کرده‌اند. از طرفی دیگر نتایج این تحقیق با یافته‌های Caveney و همکاران (۲۰۰۱) متفاوت است. این محققان نیز نشان دادند که میزان آلکالوئید کل در *E. major* رویش‌یافته در اروپا بین ۲-۱ درصد وزن خشک است که به نظر می‌رسد این تفاوت در میزان آلکالوئید کل در تحقیق حاضر و دیگر تحقیقات انجام شده به‌دلیل زمان برداشت و نیز تفکیک پایه‌های نر و ماده باشد، زیرا تاکنون در هیچ‌یک از تحقیقات انجام شده میزان آلکالوئید کل در پایه‌های نر و ماده به‌صورت جداگانه سنجش نشده‌است.



شکل ۵- الف) میزان فنل کل، ب) فلاونویید کل و ج) تانن کل در پایه‌های نر و ماده گیاه *Ephedra major* در ماه‌های مرداد تا مهر (داده‌ها حاصل میانگین سه تکرار است.)

تاکنون گزارشی مبنی بر اندازه‌گیری میزان افدرین از گیاه *E. major* رویش یافته در ایران منتشر نشده‌است. نتایج حاضر نشان داد که میزان افدرین در این گیاه از ۰/۱۵٪ تا ۰/۱۹۹٪ در ماه‌های مورد بررسی متغیر است. اولین منبع تجاری افدرین *Ephedra sinica* است که میزان افدرین آن تا ۳/۴٪ گزارش شده‌است. گزارش‌های موجود نیز نشان داده که میزان افدرین در گیاه *E. major* بین ۲-۱ درصد وزن خشک آن است (Schanberg *et al*., 2003؛ Fukushima, 2004). باتوجه به اینکه میزان و نوع آلکالوئیدهای افدرین برحسب گونه، واریته، بخش‌های مختلف گیاه، فصل برداشت و ناحیه جغرافیایی و ارتفاعی که گیاه رشد می‌کند متفاوت است، تفاوت حاضر منطقی به نظر می‌رسد (Haller *et al*., 2004).

نتایج حاصل از سنجش دیگر متابولیت‌های ثانویه نیز نشان داد که میزان فنل فقط در ماه مهر، میزان فلاونوئید کل در ماه‌های شهریور و مهر و میزان تانن کل در ماه‌های مرداد و شهریور بین پایه‌های نر و ماده تفاوت معنی‌داری دارد. البته میزان فنل کل در این گیاه بین ۳/۲٪ تا ۴/۱٪ در ماه‌های مختلف متغیر است. پیش از این نیز Hejazi و El-Lamey (۲۰۱۱) وجود ترکیب‌های ارزشمندی نظیر کاتشین، روتین، اسید کلروژنیک، کوئرستین و اسید کوماریک را در *Ephedra alata* گزارش کردند. ترکیب‌های فنلی شامل انواع فنل‌های ساده، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، تانن‌ها و لیگنین‌ها می‌باشند که نقش‌های مختلفی ازجمله جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و خواص آنتی‌اکسیدانتی، دفاع در مقابل گیاهخواران و عوامل بیماری‌زا، جلب حشرات، خاصیت آللوپاتی و جذب تشعشعات UV را دارند (Taiz & Ziger, 2010). با توجه به اهمیت دارویی این ترکیب‌ها و نیز میزان بالای فنل در گیاه *Ephedra major* به نظر می‌رسد بررسی ترکیب‌های فنلی در این گیاه از اهمیت خاصی برخوردار باشد.

البته تفاوت میزان متابولیت‌های ثانویه بین پایه‌های نر و ماده در یک گیاه احتمالاً به متابولیسم آن برمی‌گردد (Hejazi & El-Lamey, 2011). به‌هرحال پایه نر در فاصله فروردین تا اردیبهشت فقط دانه‌های گرده را تولید می‌کند اما در پایه ماده پس از ظهور مخروط‌های ماده (همزمان با پایه نر) و عمل گرده‌افشانی و لقاح، متابولیسم گیاه درگیر پر کردن بذر و رسیدگی میوه می‌شود. میوه‌های این گیاه در اواخر مرداد کاملاً رسیده و آبدار هستند (طبق مشاهدات عینی). این تفاوت فیزیولوژی و متابولیسم بالطبع می‌تواند منجر به تفاوت در الگوی سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه گردد. از طرفی دیگر باید توجه داشت که آلکالوئیدهای افدرین و فلاونوئیدها هر دو از یک اسید آمینه واحد یعنی فنیل‌آلانین مشتق می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد با افزایش خشکی (افزایش دما و کاهش بارندگی) که اوج آن در ماه مرداد می‌باشد، مسیر سنتز فلاونوئیدها فعال‌تر بوده و میزان فلاونوئیدها افزایش می‌یابد و بعکس در ماه مهر که دمای هوا کاهش می‌یابد، مسیر سنتز آلکالوئیدها فعالتر شده و بالطبع میزان آلکالوئیدها افزایش یابد.

از طرفی دیگر نتایج حاضر نشان داد که میزان تانن کل از ۷/۲۵٪ تا ۲۴/۴۶٪ متغیر است که این نتیجه در تضاد با نتایج Caveney و همکاران (۲۰۰۱) در مورد *E. major* رویش‌یافته در اروپا است که میزان تانن را در این گونه بین ۰/۲٪ تا ۰/۵٪ وزن خشک گزارش کرده‌اند. آنان همچنین میزان تانن‌های متراکم در ساقه تعداد زیادی از گونه‌های آسیایی و امریکایی را از صفر تا بیش از ۰/۵٪ وزن خشک ذکر کرده‌اند. البته علت تغییرات میزان تانن در طی ماه‌های مختلف ممکن است دلایل گوناگونی داشته باشد. تانن‌های موجود در افدرا با توجه به مشکلاتی که در هضم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها در دستگاه گوارشی علفخواران بوجود می‌آورند (Valizadeh *et al*., 2010) به نظر می‌رسد به‌عنوان عامل دفاعی عمل کرده و میزان این ترکیب‌ها نیز مانند آلکالوئیدها در فصول پاییز و زمستان در ساقه‌های همیشه سبز افدرا افزایش یابد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که بررسی میزان آلکالوئید، افدرین، فنل، فلاونوئید و تانن در پایه‌های نر و ماده گیاه *E. major* نشان داده که متابولیسم و پاسخ پایه‌های نر و ماده به شرایط و عوامل فیزیولوژیکی و

محیطی در مراحل گوناگون رشد متغیر می‌باشد. افزایش یا کاهش در مقدار این ترکیب‌ها ممکن است دارای اهمیت عملکردی برای گیاه بوده و بر مقاومت گیاه در مواجهه با شرایط رشد و نمو اثر بگذارد.

در مجموع نتایج حاضر نشان می‌دهد با توجه به آنکه گونه *E. major* بومی ایران بوده و در بخش‌های زیادی از کشور رشد می‌کند، این گیاه می‌تواند منبع مناسبی برای تولید افدرین و استفاده از آن در صنعت داروسازی باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه گلستان به‌دلیل حمایت مالی این تحقیق نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

منابع مورد استفاده

- Abourashed, E.A., El-Alfy, A.T., Khan, I.A. and Walker, L., 2003. Ephedra in perspective-a current review. Phytotherapy Research, 17(7): 703-712.
- Asadi, M., 2000. Flora of Iran: Ephedraceae Family. Research Institute of Forest and Rangelands, Tehran, 58p.
- Baher, Z., Ahmadi, L. and Babakhanloo, P., 2000. Comparison content of ephedrine and pseudoephedrine in different *Ephedra* spp of Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 6: 48-65.
- Caveney, S., Charlet, D.A., Freitag, H., Maier-Stolte, M. and StarCraft, A.N., 2001. New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). American Journal of Botany, 88(7): 1199-1208.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10: 178-182.
- Fukushima, K., 2004. Bioactivity of Ephedra: integrating cytotoxicity assessment with real-time biosensing. The Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science.
- Ghahreman, A., 1993. Plant Systematics: Cormophytes of Iran (Vol. 2). Tehran University Press, Tehran, 842p.
- Haller, C.A., Duan, M., Benowitz, N.L. and Jacob, P., 2004. Concentrations of ephedra alkaloids and caffeine in commercial dietary supplements. Journal of Analytical Toxicology, 28(3): 145-151.
- Hejazi, G.A.E. and El-Lamey, T.M., 2011. Callus induction and extraction of ephedrine from *Ephedra alata* Culture. American-Eurassian Journal Agriculture and Inviroment Science, 11: 19-25.
- Karimi, F., Amini Eshkevari, T. and Zeinali, A., 2009. Differences of total atropine and scopolamine contents in leaves of *Atropa belladonna* L. from Vaz area-north of Iran in relation to some environmental and phonological factors. Iranian Journal of Plant Biology, 1: 77-88.
- Kashki, M.T. 2000. Comparison content of alkaloids in endemic species of *Ephedra* in Khorasan province. Final Report of Research Project, Khorasan Agriculture and Natural Resources Research Center, (In Persian).
- Makkar, H.P.S., Bluemmel, M., Borowy, N.K. and Becker, K., 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. Journal of the Science and Food Agriculture, 61: 161-165.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry, 91(3): 571-577.
- Roxanas, M.G. and Spalding J., 1977. Ephedrine abuse psychosis. *Medical Journal* of *Australia*, 2(19): 639-643.
- Schaneberg, B.T., Crockett, S., Bedir, E. and Khan, I.A., 2003. The role of chemical fingerprinting: application to *Ephedra*. Phytochemistry, 62(6): 911-918.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. and Verdian-rizi, M., 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Thailand Journal of Pharmacy and Science, 32: 17-20.
- Taiz, I. and Zeiger, E., 2010. Plant Physiology. Sinauer Associates, 782p.
- Valizadeh, R., Ghadami Kohestani, M. and Melati, F., 2010. Chemical composition, in situ degradability and in vitro gas production of ephedra plant (*Ephedra intermedia*). Iranian Journal of Animal Science Research, 3(2): 166-170.

A comparative study on some secondary metabolites of male and female stems of *Ephedra major* Host

M. Mofid Bojnoordi[1], M. Aghdasi[2*], M. Mianabadi[3] and M. Nadaf[4]

1- M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran, E-mail: m.aghdasi@gu.ac.ir
3- Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran
4- Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

Received: October 2014 Revised: April 2015 Accepted: April 2015

Abstract

Ephedra, belonging to the Ephedraceae family of gymnosperms, is a dioecious shrub, which has different medicinal properties. The purpose of this study was to compare some secondary metabolites of male and female stems of *Ephedra major* during August to October months. The male and female samples were collected from Bojnoord highlands and then were dried. The methanolic extract was separated by solvent method and total alkaloid, ephedrine, total phenol, total flavonoid and tannin levels were measured in collected samples. The measurement of total alkaloid and ephedrine content showed significant difference between male and female stems during different months. The highest amount of total alkaloid was obtained in samples collected from male stem during October month. While, the highest level of ephedrine was observed in samples collected in both male and female stems during August month. The data from HPLC analysis showed that ephedrine content ranged from 1.5 to 1.99 mg/g dry weight. Meanwhile, total phenol, total flavonoid and total tannin content ranged from 31.5-41.13, 3.51-5.81 and 15.57-24.46 mg/g dry weight, respectively. The obtained results revealed that there was significant difference between male and female stems in total phenol just in October, total flavonoid in September and October, and total tannin in August and September.

Keywords: *Ephedra major* Host, alkaloid, ephedrin, male stem, female stem.