اثر زمان برداشت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ریشه شیرین‌بیان

زهره کرمی[a]*، حبیب الله میرزایی[b]، زهرا امام جمعه[c]، علیرضا صادقی ماهونک[b]، مرتضی خمیری[b]

[a] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه صنایع غذایی، گرگان، ایران
[b] استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه علوم و صنایع غذایی، گرگان، ایران
[c] دانشیار دانشگاه تهران، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۹/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۲/۲۴

چکیده

مقدمه: امروزه با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به سالم بودن افزودنی‌های غذایی خصوصا آنتی‌اکسیدان‌ها سعی بر این است که از این مواد به جای مواد شیمیایی ترکیبی در مواد غذایی استفاده شود. شیرین‌بیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد که دارای ترکیبات فیتوشیمیایی با اثرات سلامتی‌بخش است. از این ترکیبات می‌توان گلیسیریزین و ترکیبات فنولیک را به عنوان آنتی‌اکسیدان، کاهنده آسیب های اکسیداتیو به سلول که منجر به سرطان، بیماری‌های قلبی و .... می‌شود نام برد. کیفیت گیاهان دارویی تحت تاثیر عوامل زیادی از جمله زمان برداشت قرار می‌گیرد. بنابراین می‌توان گفت بررسی اثر زمان برداشت روش مناسبی برای رسیدن به بهترین کیفیت دارویی گیاه شیرین‌بیان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ریشه شیرین‌بیان در ۲ فصل پاییز و زمستان (۲۰ مهر و ۲۰ دی) از استان گلستان (ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله) جمع‌آوری گردید. ترکیب شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه‌های برداشت شده در ۲ فصل متفاوت با آزمونهای DPPH، قدرت احیاکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ارزیابی شد.

یافته‌ها: مقدار رطوبت در ریشه‌های برداشت شده در فصل پاییز بیشتر بود در حالی‌که مقدار پروتئین، قند، خاکستر و ترکیبات فنولیک در ریشه‌های برداشت شده در فصل زمستان (۲۰ دی) بیشتر بود. نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریشه شیرین‌بیان برداشت شده در فصل زمستان (۲۰ دی) بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و کیفیت مواد مؤثره آنها می‌گردند لذا برداشت یک گیاه دارویی زمانی مقرون به‌صرفه است که مواد مؤثره آن به حد مطلوب رسیده باشد. برداشت گیاهان دارویی در زمان نامناسب نه تنها میزان محصول به دست آمده 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.

واژه‌های کلیدی: *ریشه شیرین‌بیان، زمان برداشت، عصاره اتانولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: Z_karami_gua@yahoo.com

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

شیرین‌بیان یکی از مهمترین گیاهان دارویی از لحاظ اقتصادی است که به صورت گسترده مورد پژوهش قرار گرفته است (Fenwick *et al.*, 1990). نام علمی شیرین‌بیان گلایسریزا است. این گیاه متعلق به تیره اصلی بقولات[1] و تیره فرعی پروانه‌واران[2] و از راسته گل سرخیان[3] است. گیاهان دارویی گیاهانی هستند که مواد موثره موجود در آنها به صورت مستقیم یا غیر مستقیم اثر درمانی دارد و به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد (امید بیگی، ۱۳۸۳). در اندام‌های مختلف گیاهان دارویی مواد خاصی ساخته و ذخیره می‌شود که مواد موثره یا مواد فعال نام دارند. این مواد تاثیر فیزیولوژیکی بر پیکر موجود زنده به جا می‌گذارند. مواد فعال مذکور در طی یک سلسله فرآیندهای ویژه و پیچیده شیمیایی به مقدار بسیار کم و معمولا کمتر از وزن خشک گیاه ساخته می‌شوند و کاشت، داشت و برداشت این گیاهان صرفاً به خاطر استفاده از مواد موثره آنها صورت می‌گیرد (امید بیگی، ۱۳۸۴). شیرین‌بیان[4] سرشار از ترکیباتی با خواص درمانی می‌باشد که از این ترکیبات می‌توان ترکیبات فنولیک مانند فلاوانون‌ها[5] یا فلاوانونولها[6]، کلکونها[7]، ایزوفلاوان‌ها[8] و ایزوفلاوانونها[9] را نام برد که از میان آنها فلاوانون‌ها و کلکون‌ها از انواع اصلی هستند (Fenwick *et al.*, 1990). گلیسیریزین[10] یکی از اجزای اصلی ریشه شیرین‌بیان است که از لحاظ بیولوژیکی و پزشکی ترکیبی فعال است. هم اکنون عصاره‌های شیرین‌بیان و گلیسیریزین کاربردهای گسترده‌ای در صنایع‌غذایی، داروسازی و دخانیات دارند. در آمریکا میزان بالایی از شیرین‌بیان و گلیسیریزین با مصرف تقریبی ۳/۶ – ۰/۰۲۷ میلی‌گرم گلیسیریزین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در هر روز توسط مردم مصرف می‌شود. (Isbrucker & Burdock, 2006). تحقیقات صورت گرفته در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه شیرین‌بیان حاکی از وجود ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ریشه شیرین‌بیان می‌باشد. در سال ۱۹۹۷، Vaya اثر آنتی‌اکسیدانی هفت ترکیب ایزوله شده از گلیسیریزا گلابرا را بر روی اکسیداسیون LDL بررسی کرد که این هفت ترکیب عبارت بودند از: هیسپاگلابریدین[11] A، هیسپاگلابریدین B، گلابریدین، چهارارتومتیل‌گلابریدین، ایزولیکورتیجنین، ایزوپرنیل چالکون و فورمنتین. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که ترکیبات مورد استفاده همگی آنتی‌اکسیدان‌های بسیار قوی در مهار اکسیداسیون LDL می‌باشند.

یکی از مهم‌ترین عواملی که در میزان ماده مؤثره گیاهان‌دارویی 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 (شریعت، ۱۹۹۲). به عنوان مثال، ریشه و ریزوم را در اواخر پاییز برداشت می‌کنند زیرا در بهار ریشه‌ها معمولاً گوشتی و اسفنجی شکل هستند و در اثر خشک‌شدن به سرعت خرد شده و کیفیت خود را از دست می‌دهند (septak, 1999). برداشت اندام‌های زیرزمینی شیرین‌بیان در فصلی که برگ‌ها در حال ریختن است و در انتهای فصل رویشی (پاییز و زمستان) باید انجام شود زیرا در این دوره از رشد گیاه، ریشه دارای حداکثر مقدار ماده گلیسیریزین است (Mirheidar, 1996). با توجه به اهمیت زمان برداشت گیاهان‌دارویی، در این تحقیق به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه شیرین‌بیان در دو فصل پاییز (مهر) و زمستان (دی) پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

ریشه شیرین‌بیان در دو فصل پاییز و زمستان (۲۰ مهر و ۲۰ دی ۱۳۸۹) از ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان تهیه شد. مواد شیمیایی مورد نظر در این تحقیق اتانول، فری سیانید پتاسیم، تری کلرواستیک اسید، کلرید آهن، اسید سولفوریک، فسفات سدیم، آمونیوم مولیبدات، اسید گالیک، فولین سیوکالتو، DPPH و استانداردهای BHT و گلیسیریزین بودند. تمامی مواد مورد استفاده از شرکت مرک و سیگما خریداری شدند.

- آماده‌سازی ریشه شیرین‌بیان

ریشه‌های مرطوب شیرین‌بیان پس از تمیز شدن و گرفتن گل و لای آن، با قیچی باغبانی به قطعات

[1] Leguminoseae [2] Fabaceae [3] Rosales
[4] Licorice [5] Flavanones [6] Flavanonols
[7] Chalcones [8] Isoflavones [9] Isoflavanones
[10] Glycyrrhizine [11] Hispa-Glabridin

jftn.srbiau.ac.ir

کوچک‌تری بریده و در آون معمولی با دمای ۴۰°C به مدت ۱ هفته خشک شدند. ریشه‌های خشک‌شده با آسیاب چکشی پودر و در کیسه‌های پلی‌اتیلن در فریزر (دمای ۱۸°C-) نگهداری شدند.

- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی نمونه

در این تحقیق اندازه‌گیری رطوبت، چربی، پروتئین، خاکستر بر طبق روش پروانه (۱۳۸۵) انجام شد.

- اندازه‌گیری قند قبل و بعد از هیدرولیز

۴ گرم پودر عصاره شیرین‌بیان را در۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به یک ارلن مایر ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل نموده، جهت ته‌نشین شدن رزین‌ها و مواد رنگی و گلیسیریزین حدود ۱۲ میلی‌لیتر استات سرب نرمال (استات سرب اشباع) به آن اضافه و خوب هم زده شد و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت به ۷۰ میلی‌لیتر از محلول صاف رویی (محلول قندی) به اندازه کافی کربنات سدیم ۲ نرمال (حدود ۱۵ میلی لیتر) اضافه شد تا سرب باقیمانده ته‌نشین شود، سپس حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و ۱۵ دقیقه دیگر سانتریفوژ شد، مایع صاف رویی به یک بشر منتقل و برای تعیین قند قبل از هیدرولیز ۵۰ میلی‌لیتر از محلول قندی رویی به یک ارلن مایر منتقل و باقیمانده جهت اندازه‌گیری قند بعد از هیدرولیز نگهداری شد (Helrich, 1990).

الف- روش اندازه‌گیری قند قبل از هیدرولیز به شرح زیر است:

پنج میلی‌لیتر محلول فهلینگ A و پنج میلی‌لیتر محلول فهلینگ B به یک ارلن مایر ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل و خوب هم زده شد سپس محلول حاصل به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه جوشانده و سپس دو قطره متیلن بلو ۱ ٪ اضافه شد و در حال جوشاندن با محلول قندی به سرعت تیتر شد تا جایی که رنگ متیلن بلو از بین رفته و رسوب قرمز آجری مشاهده شد (تیتراسیون باید در مدت ۳ دقیقه انجام شود) سپس از رابطه زیر قند قبل ازهیدرولیز محاسبه شد (Helrich, 1990):

(۱۰۰/۴) × ۱۰۰ × (۷۰/۱۰۰) × (مصرفی تیتراسیون / ۲۵ ٪) = درصد قند قبل از هیدرولیز

۲۵٪= ضریب محلول فهلینگ

۷۰= حجم اصلی

۴= وزن نمونه

ب- روش اندازه گیری قند کل (قند بعد از هیدرولیز)

۵۰ میلی‌لیتر محلول قندی با استفاده از اسیدکلریدریک غلیظ (حدود ۸ تا ۹ قطره) و به کار بردن کاغذ تورنسل خنثی شده و پس از خنثی‌شدن کامل ۵ میلی‌لیتر دیگر اسیدکلریدریک به آن اضافه شد و روی بن‌ماری در ۷۰°C به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد و بلافاصله تا دمای محیط سرد شد. محلول حاصل سپس با هیدروکسیدسدیم ۲ نرمال (تقریبا ۲۸ میلی‌لیتر) و با استفاده از کاغذ تورنسل خنثی و حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و طبق آزمایش قبلی با استفاده از محلول فهلینگ و معرف متیلن بلو ۱٪ تیتر و طبق معادله زیر درصد قند تام محاسبه گردید:

(۱۰۰/۴) × ۱۰۰ × (۷۰/۱۰۰) × (مصرفی تیتراسیون / ۲۵ ٪)= درصد قند بعد از هیدرولیز

- تهیه عصاره

جهت تهیه عصاره فنلی از حلال اتانول ۸۰٪ (حجمی:حجمی) استفاده شد. سپس به منظور تهیه عصاره از مایکروویو خانگی طبق روش Mirzapour و همکاران (۲۰۱۰) استفاده گردید (Mirzapour *et al.*, 2010). در این روش ۵ گرم نمونه با حلال اتانول ۸۰٪ و با نسبت نمونه به حلال (۱:۱۵) مخلوط گردید. مخلوط سپس با امواج مایکروویو در ۵ دقیقه اشعه‌دهی شد. عصاره‌های حاصله با استفاده از کاغذ صافی از مواد گیاهی جدا گردیدند و به وسیله تبخیرکننده چرخان (مدل laborata 4000، ساخت کمپانی هایدولف) در دمای ۴۰ °C تغلیظ شدند. در نهایت عصاره‌ها توسط خشک‌کن انجمادی (FDB550-Operun ساخت کره جنوبی) در دمای ۵۰°C- به پودر تبدیل و تا زمان استفاده در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا در فریزر ۱۸°C- قرار گرفتند (Pan *et al.*, 2000).

- اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره ریشه شیرین‌بیان توسط رنگ‌سنجی به روش فولین- سیوکالتو[1] مورد بررسی قرار گرفت. در این روش مقدار کل ترکیبات

jfn.srbiau.ac.ir

فنولی بر اساس یک ترکیب فنولی انتخاب شده، بیان می‌گردد و در اغلب مواقع این ترکیب اسیدگالیک[2] بوده و نتایج آن به صورت اکی‌والانت اسیدگالیک بیان می‌گردد. پس از تهیه عصاره‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره در لوله آزمایش ریخته شده، سپس ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به عصاره اضافه کرده و با ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو (که به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شده بود) و ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات‌سدیم ۲ درصد به خوبی مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت نیم‌ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار کل ترکیبات فنولی با استفاده از معادله خط رسم شده برای اسید گالیک بر مبنای اسیدگالیک و به صورت میلی‌گرم در گرم نمونه خشک بیان گردید (Lin & Tang, 2007). معادله خط رگرسیونی که رابطه غلظت اسیدگالیک را با میزان جذب محلول‌ها در ۷۵۰ نانومتر نشان می‌دهد به صورت زیر می‌باشد. در این معادله Y مقدار جذب و X مقدار ترکیبات فنولی بر اساس اکی‌والانت اسیدگالیک را نشان می‌دهد.

$$Y=0.0008X+0.0649$$
$$R^2=0.9976$$

- ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد[3]

میزان مهار رادیکال‌های دی پی پی اچ (DPPH)[4]، با روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، محلول‌هائی با غلظت‌های ۵۰۰-۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر از تمامی عصاره ها و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در حلال متانول آماده شدند. روش آزمایش به این صورت بود که یک میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) به ۳ میلی‌لیتر از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل، عصاره با ۳ میلی‌لیتر متانول جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (٪)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_C} \times 100$$

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می باشند.

- قدرت احیاکنندگی[5]

توانائی عصاره‌ها برای احیاء یون‌های آهن سه ظرفیتی با روش Yildirim و همکاران (۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، محلول‌هائی با غلظت ۲۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های پودر شده در حلال اتانول و نیز BHT تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH =۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در حمام آب با دمای ۵۰°C قرار گرفت. پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ (وزنی: حجمی) نمونه‌ها ۱۰ دقیقه با دور ۱۶۵۰g سانتریفوژ شدند پس از سانتریفوژ. از محلول بالائی ۲/۵ میلی‌لیتر به دقت برداشته و پس از افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید.

- تعیین مقدار گلیسیریزین عصاره‌ها با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

محلول استاندارد گلیسیریزین با خلوص ۷۵ درصد برای اندازه‌گیری میزان گلیسیریزین استفاده شد. دو نمونه ۷/۵ و ۱۱/۲۵ میکروگرمی اسیدگلیسیریزیک در ۱۰ میلی‌لیتر فاز متحرک (متانول) حل شد و جهت رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با ستون نوع C_{18} فاز معکوس، ابعاد ۳/۹ میلی‌متر قطر و ۳۰ سانتی‌متر طول، حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر، سرعت جریان ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه و طول موج آشکارساز ۲۵۴ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت محلول استاندارد و مجهول نمونه‌ها) پس از عبور از صافی یکبار مصرف با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر به دستگاه تزریق شد تا کروماتوگرام‌های مورد نظر برای هر نمونه به‌دست آید (Shi Ong & Mei Len, 2003).

[1] Folin-Ciocalteu
[2] Gallic Acid
[3] Free Radical Scavenging Activity
[4] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
[5] Reducing Power

jfn.srbiau.ac.ir

- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل[1]

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها از روش Prito و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با غلظت‌های مختلف (۲۰۰۰- ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله آزمایش مخلوط شد و به مدت ۱/۵ ساعت در حمام آب با دمای ۹۰°C قرار گرفت. پس از سردکردن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر قرائت گردید. در نمونه شاهد به جای عصاره از ۰/۱ میلی‌لیتر متانول استفاده شد. نحوه آماده‌سازی معرف به این صورت بود که پس از آماده‌سازی محلول اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، مقادیر محاسبه شده از فسفات‌سدیم و آمونیوم‌مولیبدات برای رسیدن به غلظت مورد نظر در یک لیتر معرف، به صورت جداگانه در اسیدسولفوریک حل شدند. سپس این دو محلول با هم ادغام و مخلوط حاصله با باقی مانده اسید سولفوریک به حجم یک لیتر رسانده شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS.9.1 و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد. کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شدند.

یافته‌ها

- ترکیب شیمیایی عصاره ریشه شیرین‌بیان

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد اثر فصل برداشت بر میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز ریشه شیرین‌بیان معنی‌دار است و در فصل زمستان میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز بیشتر می‌باشد. همچنین جدول ۱ نشان می‌دهد میزان خاکستر در ریشه‌های شیرین‌بیان برداشت شده در فصل زمستان بیشتر از ریشه‌های برداشت‌شده در فصل پاییز است. نتایج تجزیه واریانس درصد رطوبت و پروتئین نمونه‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد که تاریخ برداشت به طور معنی‌داری درصد رطوبت و پروتئین نمونه‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین‌ها (جدول ۱) نشان داد که میزان بیشتر رطوبت در ریشه‌های جمع‌آوری شده در مهر ماه (۱۰٪) و میزان کمتر رطوبت در ریشه‌های جمع‌آوری شده در دی ماه (۳٪) به‌دست آمد ولی میزان بیشتر پروتئین در ریشه‌های جمع‌آوری شده در دی ماه (۶/۶٪) و میزان کمتر پروتئین در ریشه‌های جمع‌آوری شده در مهر ماه (۵/۸٪) به‌دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که فصل برداشت اثر معنی‌داری بر میزان ترکیبات چربی در ریشه شیرین‌بیان ندارد.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی ریشه شیرین‌بیان (بر حسب وزن خشک) در دو فصل برداشت (مهر= T_1 و دی=T_2)

ترکیب شیمیایی	زمان برداشت	
٪	T_1	T_2
چربی	۲/۱۶±۰/۲۱[a]	۲/۵۳±۰/۰۷[a]
رطوبت	۱۰±۱/۴۱[a]	۳/۴±۰/۴۲[b]
خاکستر	۵/۰۸±۰/۲۱[b]	۷/۶۵±۰/۱۴[a]
پروتئین	۵/۸۸±۰/۱۴[b]	۶/۶۴±۰/۲۱[a]
قند قبل از هیدرولیز	۸/۱±۰/۱۴[b]	۹/۳±۰/۱۴[a]
قند بعد از هیدرولیز	۱۱/۴±۰/۱۴[b]	۱۲/۴±۰/۱۴[a]

حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

- بررسی اثر زمان برداشت بر میزان ترکیبات فنولیک ریشه شیرین‌بیان

در این تحقیق میزان ترکیبات فنولیک ریشه شیرین‌بیان به روش فولین–سیوکالتو تعیین شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، فصل برداشت ریشه شیرین‌بیان تاثیر معناداری ($p<۰/۰۵$) بر مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها دارد (جدول۲). در مقایسه دو فصل، میزان ترکیبات فنولیک ریشه شیرین‌بیان برداشت شده در دی ماه ($T_۲$)، ۱۸/۳ درصد نسبت به زمان مهر ماه ($T_۱$) افزایش یافته است.

جدول ۲- مقدار کل ترکیبات فنولی به دست آمده از ریشه شیرین‌بیان در دو زمان برداشت متفاوت

زمان برداشت	ترکیبات فنولی (mg GA eq/g dry sample)
$T_۱$ (مهر ماه)	۴۵/۸۵۳±۰/۴۸[b]
$T_۲$ (دی ماه)	۵۴/۲۶۶±۰/۶۴[a]

حروف غیرمشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

[1] Total Antioxidant Capacity

jfn.srbiau.ac.ir

- **قدرت احیاءکنندگی**

نتایج آنالیز واریانس حاکی از آن بود که عصاره‌های مختلف در ۲ فصل برداشت از نظر قدرت احیاءکنندگی اختلاف معنی‌داری ($P< ۰/۰۵$) با یکدیگر و با BHT دارند. هم‌چنین با افزایش غلظت میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت.

نمودار ۱ مقایسه میانگین میزان جذب غلظت‌های مختلف عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان در دو زمان‌های برداشت مختلف (T_1 و T_2) و با BHT را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد در تمامی غلظت‌های مورد بررسی (۲۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT دارای بیشترین قدرت احیاءکنندگی است. البته در غلظت‌های پایین تفاوت معنادار بیشتری بین عصاره‌ها و BHT وجود داشت ولی در غلظت‌های بالاتر (حدود ۲ mg/ml)، این تفاوت کمتر می‌شود.

به‌منظور مقایسه بهتر قدرت احیاءکنندگی مقادیر EC_{50} برای عصاره‌های مختلف تعیین و با یکدیگر مقایسه شد. در این روش، غلظتی از عصاره که در طول موج ۷۰۰ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ دارد، تحت عنوان EC_{50} نامیده می‌شود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد، اختلاف معنی‌داری بین مقادیر EC_{50} عصاره‌های مختلف در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد (جدول ۳) با توجه به جدول، بیشترین میزان EC_{50} در این روش به ترتیب متعلق به عصاره اتانولی مهر ماه می‌باشد و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT کمترین میزان EC_{50} را به خود اختصاص داد و هیچ کدام از عصاره‌های مورد بررسی قادر به رقابت با آن نبودند. همان‌طور که گفته شد در مقایسه بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان (مهر و دی ماه) اختلاف معنی‌داری از این نظر بین این دو عصاره وجود داشت (جدول ۲). بنابراین می‌توان گفت فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ترکیبات فنولی در ارتباط است.

جدول ۳- مقایسه میانگین مقادیر EC_{50} (میلی‌گرم عصاره در میلی‌لیتر) برای عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان برداشت شده در دو فصل متفاوت در روش قدرت احیاءکنندگی

عصاره	EC_{50}
مهر ماه	۰/۸۵۳^{a}
دی ماه	۰/۷۶۳^{b}
BHT	۰/۰۷۳^{c}

حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است

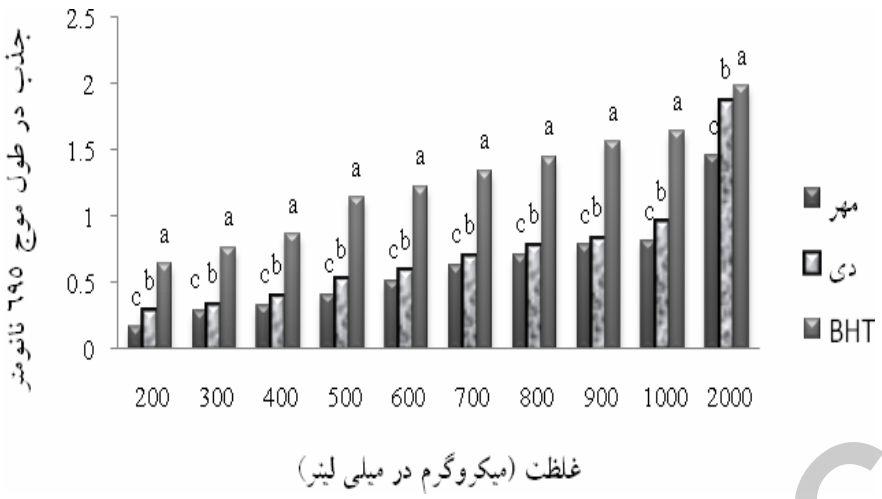
- **ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل**

نتایج آنالیز واریانس نشان داد، اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های دو فصل (مهر و دی) و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های دو فصل و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT در نمودار ۲ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) افزایش یافت.

نمودار ۱- مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان در ۲ فصل برداشت و BHT

حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

jftn.srbiau.ac.ir



نمودار ۲- مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان در دو فصل مختلف برداشت و BHT.
حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

همان‌طور که در شکل ۲ نیز دیده می‌شود، عصاره‌های اتانولی ریشه شیرین‌بیان T_2 (دی ماه) در تمامی غلظت‌های مورد بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره‌های اتانولی ریشه شیرین‌بیان T_1 (مهر ماه) داشتند و در میزان جذب عصاره‌های اتانولی در غلظت‌های بالا (حدود ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تفاوت کمتری نسبت به.غلظت‌های پایین مشاهده می‌شود و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را به خود اختصاص داد.

جدول ٤- مقایسه میانگین مقادیر EC_{50} (میلی‌گرم عصاره در میلی‌لیتر) برای عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان برداشت شده در دو فصل متفاوت در روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

عصاره	EC_{50}
مهر ماه	۰/۵۹^{a}
دی ماه	۰/۴۹۳^{b}
BHT	۰/۱۶۵^{c}

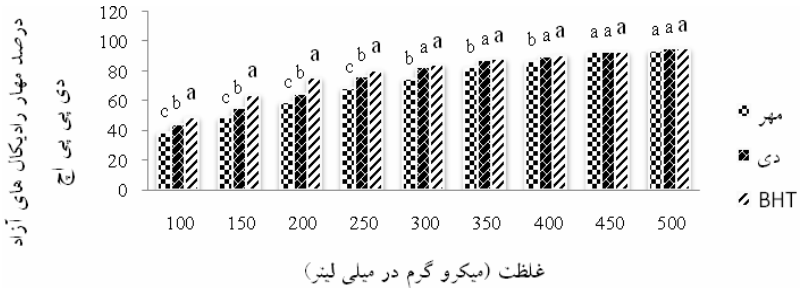
حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

در این روش نیز مقادیر EC_{50} برای عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان و آنتی‌اکسیدان سنتزی محاسبه و با یکدیگر مقایسه شدند. منظور از EC_{50} در این روش غلظتی (بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از عصاره است که در طول موج ۶۹۵ نانومتر جذبی معادل ۰/۵ دارد. نتایج نشان داد که فصل تاثیر معنی‌داری بر میزان EC_{50} عصاره‌ها دارد. مقایسه میانگین مقادیر EC_{50} برای عصاره‌های (T_1 و T_2) در جدول نشان داده شده است (جدول ۴). طبق نتایج به‌دست آمده، در این روش نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT کمترین میزان EC_{50} و در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری را داشت و پس از آن عصاره‌های T_2 و T_1 در مراتب بعدی قرار گرفتند. همان‌طور که قبلا ذکر شد، عصاره T_1، حاوی کمترین مقدار ترکیبات فنولی بود و در روش‌های مختلف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشترین مقدار EC_{50} به این عصاره تعلق داشت.

- ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد

نتایج آنالیز واریانس نشان داد نوع و غلظت عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان سنتزی تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند. همچنین نتایج حاکی از آن بود که توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت فعالیت ضد رادیکالی آنها افزایش می‌یابد. نمودار ۳ نشان می‌دهد که کاهش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در غلظت رادیکال‌های DPPH به علت توانایی در مهار رادیکال‌ها توسط عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان و استاندارد می‌باشد. از BHT به عنوان استاندارد استفاده شد. اثر مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان و استاندارد به این صورت می‌باشد $BHT>T_2>T_1$. با توجه به نتایج در محدوده غلظت ۴۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تفاوت معناداری بیان عصاره‌ها و BHT بود ولی در غلظت‌های بالاتر تفاوت معناداری در مهار رادیکال‌های آزاد بین عصاره‌ها و

jftn.srbiau.ac.ir



نمودار ۳- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های T_2 و T_1 ریشه شیرین‌بیان و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT

حروف غیر مشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

BHT وجود نداشت این نتایج نشان می‌دهد که در محدوده غلظت ۳۰۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد متعلق به BHT بود اما در غلظت‌های بالا (۴۰۰ میکروگرم/میلی لیتر) عصاره ریشه شیرین‌بیان در مهار رادیکال‌های آزاد با آنتی‌اکسیدان سنتزی رقابت می‌کند.

برای مقایسه فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌های T_2، T_1 و BHT، از فاکتور EC_{50} استفاده می‌شود. همان‌طور که گفته شد EC_{50} به غلظتی از عصاره اطلاق می‌گردد که در آن ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار شوند. بنابراین هر چه این غلظت کمتر باشد، نشان‌دهنده این است که عصاره مورد نظر فعالیت ضدرادیکالی بیشتری دارد. در این بررسی نیز مقادیر EC_{50} برای عصاره‌های T_2 و T_1 تعیین و با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مقایسه گردید (جدول ۵) همانطور که در جدول دیده می‌شود، کمترین میزان EC_{50} متعلق به BHT بود که از این نظر اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) با عصاره‌های T_2 و T_1 داشت. هر دو عصاره نسبت به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT ضعیف‌تر بودند و بیشترین میزان EC_{50} متعلق به عصاره‌های T_1 بود.

جدول ۵- مقایسه میانگین مقادیر EC_{50} (میلی‌گرم عصاره در میلی‌لیتر) برای عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان برداشت شده در دو زمان متفاوت در روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

عصاره	EC_{50}
مهر ماه	۰/۱۵۶^{a}
دی ماه	۰/۱۲۳^{b}
BHT	۰/۰۵۱۸^{c}

حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است

- آنالیز عصاره‌های فنولی ریشه شیرین‌بیان با HPLC

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۶) نشان داد که تاریخ برداشت بر میزان گلیسیریزین اثر معنی‌داری دارد به طوری‌که مقدار بیشتر در دی ماه (۱/۱۱۲ درصد وزن خشک) و میزان کمتر این ماده در مهر ماه (۰/۸۸۶ درصد) تعیین شد.

جدول ٦ - مقایسه میانگین میزان گلیسیریزین در زمان های مختلف برداشت گیاه شیرین بیان

زمان برداشت	میزان گلیسیریزین (٪)
T_1 (مهر ماه)	۰/۸۸۶±۰/۰۲^{b}
T_2 (دی ماه)	۱/۱۱۲±۰/۰۷^{a}

حروف غیر مشابه در هر سطر بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است

بحث

- ترکیب شیمیایی عصاره ریشه شیرین‌بیان

طبق استاندارد شماره ۲۳۴۳ ایران، میزان قند قبل و بعد از احیا به ترتیب باید حداقل ۷ و ۱۰ درصد باشد. به نظر می‌رسد یکی از دلایل معنی‌دار شدن اثر فصل بر میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز موجود در ریشه شیرین‌بیان این باشد که در دوره‌های مختلف رشد گیاه ترکیبات قندی تولید می‌شود که مقداری از این قند تولید شده به مصرف سوخت و ساز گیاه می‌رسد و مازاد آن در ریشه ذخیره می‌شود. در اوایل فصل رشد که سوخت و ساز گیاه زیاد است میزان قند ذخیره شده در ریشه گیاه کاهش می‌یابد و با نزدیک‌شدن به فصل خواب گیاه به دلیل کاهش سوخت و ساز گیاه، قند کمتری مصرف می‌شود و میزان قند ریشه افزایش می‌یابد، در فصل خواب، فعالیت‌های گیاه به‌شدت کاهش می‌یابد و

jfn.srbiau.ac.ir

در نتیجه قند ذخیره شده در ریشه گیاه ثابت می‌ماند، بنابراین انتظار می‌رود بیشترین میزان قند ذخیره شده در ریشه گیاه قبل از فصل خواب باشد.

میزان خاکستر طبق روش پروانه (۱۳۸۵) به‌دست آمد. در استاندارد شماره ۲۳۴۳ ایران و استاندارد MAFCO میزان خاکستر ریشه شیرین‌بیان باید از ۹ درصد کمتر باشد. نتایج به‌دست آمده برای میزان خاکستر مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۱به دست آمد. نتایج نشان داد که اثر فصل بر میزان خاکستر ریشه شیرین‌بیان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است. معنی‌دار شدن اثر فصل می‌تواند به دلیل متفاوت بودن عناصر معدنی خاک در ۲ فصل پاییز و زمستان باشد که هر چه میزان عناصر معدنی خاک بیشتر باشد، میزان خاکستر بیشتر است.

- بررسی اثر زمان برداشت بر میزان ترکیبات فنولیک ریشه شیرین‌بیان

فنول‌ها به دلیل خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد به واسطه گروه هیدروکسیل آنها، از متابولیت‌های مهم گیاهی محسوب می‌شوند، بنابراین میزان ترکیبات فنولیک گیاهان به طور مستقیم مربوط به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد. مشخص است که میزان ترکیبات فنولیک در انواع مواد گیاهی تحت تاثیر فرآیند، ژنوتیپ، زمان برداشت و شرایط رشد متغیر است و تغییر غلظت فنولیک در ریشه شیرین‌بیان اثر زمان برداشت، شرایط آب و هوایی را در تولید و آزادسازی این متابولیت‌ها تایید کرد. تغییر در محتوای ترکیبات فنولیک وابسته به تعادل متابولیک بین بیوسنتز و کاتابولیسم گیاهان و اختلالات محیط خارجی می‌باشد (Liu *et al.*, 2007). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که استرس دمای پایین در میزان تولید ترکیبات فنولیک در میوه‌های هلو، گوجه فرنگی، سیب زمینی و میوه کیوی تاثیرگذار می‌باشد. (Meng *et al.*, 2009 Padda & Picha, 2008؛). واکوئل‌ها در سلول‌های گیاهی محل اصلی تجمع ترکیبات فنولیک می‌باشد (Toor & Savage, 2006). در دماهای پایین، نفوذپذیری غشاهای سلولی و فعالیت آنزیم‌های درون سلولی تغییر می‌کند و سبب تجمع ترکیبات واسطه سمی در سلول‌ها می‌شود. این موضوع استرس فیزیولوژی را در سلول‌های گیاهی ایجاد می‌کند و بنابراین میزان آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) (آنزیم مهم در بیوسنتز ترکیبات فنولیک) را افزایش می‌دهد و در نتیجه میزان ترکیبات فنولیک افزایش پیدا می‌کند. انواع استرس‌هایی مثل اشعه‌دهی، جراحت، کمبود مواد مغذی، فرآیند علف‌کشی، دمای پایین، حمله پشه‌ها و قارچها می‌تواند سنتز PAL یا فعالیت PAL را افزایش دهند (Morello *et al.*, 2005).

معرف فولین سیوکالتو به صورت غیراختصاصی با ترکیبات فنولی واکنش می‌دهد، علاوه بر این سایر ترکیبات موجود در عصاره نظیر قندها، آمینواسیدها، ویتامین‌ها، اسیدهای آلی، آمین‌های آروماتیک و ویتامین‌ها نیز قادر به احیای این معرف می‌باشند (Mohsen & amar, 2009). بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط فاکتورهای زیادی تحت تاثیر قرار می‌گیرد که توصیف آن به طور کامل با یک روش امکان پذیر نمی‌باشد. بنابراین استفاده از چندین آزمون جهت محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضروری می‌باشد. همچنین ممکن است اطلاعات گسترده‌ای در رابطه با توانایی آنها در مهار رادیکال‌های آزاد دهد. در این تحقیق جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان از آزمون‌های میزان مهار رادیکال‌های DPPH، قدرت احیاکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل استفاده شد.

- قدرت احیاءکنندگی

در مطالعه حاضر، قدرت احیاکنندگی عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان بر اساس احیا آهن ۳ ظرفیتی و تبدیل آن به آهن ۲ ظرفیتی سنجیده شد و با استاندارد BHT به عنوان عامل احیاکننده قوی مقایسه شد. حضور عوامل احیاءکننده (آنتی اکسیدان‌ها) منجر به احیاء کمپلکس‌های فری‌سیانید و تبدیل آنها به شکل فروس می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاءکنندگی عصاره‌های مورد بررسی با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های سبز و آبی همراه است. از آنجائی که این کمپلکس در طول موج ۷۰۰ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب می‌باشند، لذا می‌توان غلظت یون‌های آهن دو ظرفیتی را با اندازه‌گیری میزان جذب محلول تعیین نمود (Soares *et al.*, 2009). قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها وابسته به غلظت افزایش پیدا می‌کند. عصاره ریشه شیرین‌بیان در فصل دی ماه که

ifrn.srbiau.ac.ir

شامل بیشترین مقدار ترکیبات فنولیک می‌باشد عامل احیاکننده قوی‌تری می‌باشد و از آنجایی که عصاره ریشه شیرین‌بیان در ماه مهر دارای ترکیب فنولی کمتری می‌باشد احیاکننده ضعیف‌تری نیز می‌باشد. روابط مشابه بین قدرت احیاءکنندگی و میزان ترکیبات فنولیک در مطالعات گزارش شده است اگرچه همبستگی همیشه ممکن است به صورت خطی نباشد (Yildirim *et al.*, 2000؛ Arabshahi- & Urooj , 2007).

در سال ۲۰۰۸، Oliveira و همکاران میزان ترکیبات فنولی را در پوست سبز گردو (Juglans regia L.) در ۵ کشت متفاوت اندازه‌گیری کرده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را با روش‌های DPPH، قدرت احیاءکنندگی و بی‌رنگ شدن بتا کاروتن تعیین کردند. این محققین نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ۳ روش ذکر شده به صورت وابسته به غلظت تغییر پیدا می‌کند و عصاره‌های حاوی ترکیبات فنولی بیشتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان می‌دهند. نتایج به دست آمده توسط سایر محققین وجود ارتباط بین میزان ترکیبات فنولی عصاره و قدرت احیاءکنندگی آن را تائید می‌نماید. در سال ۲۰۰۴، Negi و همکاران با بررسی قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های متانولی، کلروفرمی، اتیل استات و استونی سنجد (*Hippophae rhamnoides*) در غلظت‌های ۴/۸- ۰/۴۸ میلی‌گرم در میلی‌لیترگزارش کردند، میزان جذب عصاره‌های مختلف با افزایش غلظت آنها افزایش یافت. عصاره متانولی در تمامی غلظت‌های مورد بررسی بیشترین میزان جذب را داشت که به بالابودن بازدهی استخراج و مقدار ترکیبات فنولی آن نسبت داده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی، اتانولی و استونی دانه‌های جو نیز با ۲ روش مهار رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاءکنندگی مورد بررسی قرار گرفت و با اسید آسکوربیک و BHT مقایسه شد. نتایج حاکی از آن بود که در هر دو روش به ترتیب اسید اسکوربیک، BHT و عصاره استونی بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشته و اختلافی بین عصاره‌های اتانولی و متانولی مشاهده نگردید. هم‌چنین مقایسه میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها نشان داد، عصاره استونی، اتانولی و متانولی به ترتیب حاوی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی و پروآنتوسیانیدین می‌باشند (Liu & Yao, 2007). در سال ۲۰۰۸، Oliveira و همکاران مقدار ترکیبات فنولی و قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ی آبی پوسته سبز ۵ رقم مختلف گردو را بررسی کردند. نتایج نشان داد رقم‌های فرانکوت[1]، ماربوت[2]، مایته[3]، پارزین[4] و ملانایز[5] به ترتیب حاوی بیشترین مقدار ترکیبات فنولی بود و مقادیر EC_{50} این رقم‌ها در این عصاره‌ها به ترتیب ۰/۵، ۰/۵۱، ۰/۶۷، ۰/۶۲ و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شد. در کل عصاره‌های حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی EC_{50} کمتری داشتند.

- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

اساس کار در این روش احیاء مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. این واکنش با تشکیل کمپلکس‌های سبز رنگ فسفو مولیبدن همراه بوده که در طول موج ۶۹۵ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب می‌باشند. عصاره‌هائی که شدت جذب بالاتری در این طول موج دارند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند (Prito *et al.*, 1999). در بررسی‌های انجام شده توسط Kumaran & Karunakaran در سال ۲۰۰۷، عصاره‌های متانولی ۵ واریته گیاه *Phyllanthus* از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج نشان داد که ارتباط مثبتی بین مقدار ترکیبات فنولی در واریته‌های مختلف با این ویژگی وجود داشت به طوری که واریته‌های حاوی مقادیر بیشتری از ترکیبات فنولی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری داشتند. در سال ۲۰۰۶، Arabshahi & Urooj مقدار ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف برگ شاه‌توت را مورد بررسی قرار دادند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی، استونی، آبی و BHT به ترتیب ۱/۳۹۳، ۱/۳۸۶، ۰/۶۶ و ۳/۹۲۱ معادل میکرومول آلفاتوکوفرول در گرم عصاره بود. هم‌چنین مقدار ترکیبات فنولی به ترتیب درعصاره‌ی متانولی> استونی> آبی بود. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق از نظر وجود ارتباط بین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها با نتایج به دست آمده توسط محققین دیگر مطابقت داشت.

[1] Franquette [2] Marbot [3] Mayette [4] Parisienne [5] Mellanaise

ifn.srbiau.ac.ir

- ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد

ارزیابی مهار رادیکال‌های DPPH، که در واقع اندازه‌گیری توانایی ترکیبات احیاءکننده نظیر فنول‌ها جهت انتقال اتم هیدروژن به رادیکال می‌باشد، معمول‌ترین روش برای محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این روش نتایج بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول‌های DPPH در حضور عصاره نسبت به محلول DPPH فاقد عصاره بیان می‌گردد (Ferreres *et al.*, 2007). در بررسی سایر گیاهان، محققان نتایجی را گزارش کردند که نتایج تحقیق حاضر با آنها هم‌خوانی داشت. بر طبق گزارش Yanishlieva & Marianova در سال ۱۹۹۶، افزودن عصاره مرزه به روغن آفتابگردان روند اکسیداسیون را کند می‌کند. این عصاره در غلظت ppm ۵۰۰۰ دارای اثر بهتری نسبت به BHT در غلظت ppm ۲۰۰ بود. در مطالعه‌ای توسط Singh و همکاران در سال ۲۰۰۵ فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره شبت با استفاده از آزمون آون در روغن کلزا بررسی شد. اسانس و عصاره با غلظت ppm ۲۰۰ به روغن افزوده شد و تغییرات عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۸ روز بررسی شد. ترتیب قدرت فعالیت آنتی‌اکسیدانی به این صورت بود: BHT>BHA>عصاره>اسانس. حضور ترکیبات فنولیکی مانند دیل آپیول و آنتول سبب اثرات آنتی‌اکسیدانی ذکر گردید. محققین دیگری نیز توانائی عصاره‌های گیاهی مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار داده‌اند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس *Thymus spathulifolius* L. نیز با آزمون DPPH و بی‌رنگ شدن بتاکاروتن مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور EC_{50} برای اسانس µg/ml ۲۴۳ بود. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای اسانس ۹۲٪ و برای BHT به عنوان کنترل مثبت، ۹۶٪ گزارش شد. تیمول، کارواکرول و γ-ترپینن، سه ترکیب فنولیکی عمده در این اسانس، عامل اصلی در حذف ترکیبات رادیکالی بیان شدند (Atalay *et al.*, 2004). Kordali و همکاران (۲۰۰۵) فعالیت آنتی‌رادیکالی اسانس *Artemisia dracunculus* را در ۴ سطح غلظتی ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و µg/ml ۱۰۰۰ بررسی کردند که درصد فعالیت گیرندگی رادیکال به ترتیب ۴، ۱۰، ۸ و ۱۸ درصد به‌دست آمد. فعالیت آنتی‌رادیکالی اسانس *Cyclotrichium origanifolium* L. توسط Tep و همکاران در سال ۲۰۰۵، بررسی شد و مقدار EC_{50} اسانس مورد مطالعه mg/ml ۱۷/۱ برآورد شد که نشانگر فعالیت آنتی‌رادیکالی نسبتا کم این اسانس می‌باشد. در تحقیق دیگری فعالیت آنتی‌رادیکالی اسانس و عصاره بذر *Anethum graveolens* L. در غلظت ppm ۲۰۰ در مقایسه با BHA، BHT و PG بررسی و درصد فعالیت گیرندگی رادیکال به ترتیب ۸۱/۶٪، ۹۶/۵٪، ۸۸/۵٪، ۹۰/۳٪ و ۹۳/۴٪ گزارش شد. نتایج نشان داد که علت قوی‌تر بودن فعالیت آنتی‌رادیکالی عصاره بذر نسبت به اسانس آن، حضور بیشتر دو ترکیب فنولیک آنتول و دیل آپیول است (Singh *et al.*, 2005).

در کل از بین عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان، عصاره ریشه برداشت شده در ماه مهر عملکرد ضعیف‌تری در ارتباط با مهار رادیکال‌های آزاد داشت. در کل افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانائی عصاره‌های مختلف را در مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولی به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Sanchez-Moreno *et al.*, 1999). مطالعه‌ای در مورد اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست و دانه انگور، توسط Emad در سال ۲۰۰۶ در روغن آفتابگردان انجام گرفت و نتایج نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر عصاره پوست انگور، به علت وجود ترکیبات فنولیک بیشتر در آن بود. به عبارت دیگر اثرات پرواکسیدانی در عصاره دانه انگور بیشتر دیده شد.

- آنالیز عصاره‌های فنولی ریشه شیرین‌بیان با HPLC

عوامل محیطی مثل خاک، آب، هوا و روش‌های کاشت در ترکیب مواد مؤثره دخالت دارند بنابراین ارزیابی یکایک آن‌ها به تنهایی بسیار مشکل است (شریعت، ۱۹۹۲). در سال ۱۹۹۰، Fenwick و همکاران و در سال ۱۹۹۸، Hayashi و همکاران گزارش کردند که غلظت گلیسیریزین در ریشه‌های شیرین‌بیان به واریته، محل و زمان برداشت وابسته است. آب موجود در خاک عامل اصلی جابه‌جایی و توزیع مواد درون خاک است و بالا بودن مقدار

jftn.srbiau.ac.ir

رطوبت بر جذب ریشه اثر مهمی دارد زیرا میزان تحرک، انتشار و نفوذ یونهای مواد غذایی را بر اثر حل شدن ترکیبات آن‌ها بالا می‌برد و آنها را در حد مطلوبی برای جذب در مجاورت ریشه قرار می‌دهد (Ghahraman, 1999). در طی دوره دو ماهه برداشت گیاه، دی ماه دارای کمترین مقدار بارندگی بوده است؛ هم چنین بر طبق نتایج حاصله از بررسی میزان رطوبت نمونه‌های برداشت شده از ریشه، دی ماه دارای کمترین میزان رطوبت در مقایسه با ریشه‌های برداشت شده در سایر ماه‌ها بود. از آنجایی که گلیسیریزین در آب محلول می‌باشد. غلظت گلیسیریزین موجود در نمونه‌های برداشت شده در دی ماه، بالاتر از سایر ماه‌ها بود

نتیجه‌گیری

اثر فصل برداشت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه شیرین‌بیان تاثیر معنی‌داری را نشان داد. از بین عصاره‌های ریشه شیرین‌بیان، عصاره ریشه برداشت شده در ماه مهر عملکرد ضعیف‌تری نسبت به ماه دی در ارتباط با مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل داشت. این نتایج نشان می‌دهد ارتباط مستقیمی بین افزایش غلظت ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره وجود دارد. همچنین اثر فصل برداشت بر میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز ریشه شیرین‌بیان معنی‌دار بود. در اوایل فصل رشد به دلیل بالاتر بودن سوخت و ساز گیاه میزان قند ذخیره شده در گیاه کاهش می‌یابد به همین دلیل میزان قند در دی ماه بالاتر بود.

همچنین فصل بر میزان خاکستر ریشه شیرین‌بیان در سطح احتمال ۵ درصد تاثیر معنی‌داری داشت. معنی‌دار شدن اثر فصل احتمالا می‌تواند به دلیل متفاوت‌بودن عناصر معدنی خاک در دو فصل پاییز و زمستان باشد که هر چه میزان عناصر معدنی خاک بیشتر باشد، میزان خاکستر بیشتر است. همچنین تاریخ برداشت به طور معنی‌داری درصد رطوبت و پروتئین نمونه‌ها را تحت تاثیر قرار داد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان رطوبت در ریشه‌های جمع‌آوری شده در مهر ماه (۱۰٪) و کمترین میزان رطوبت در ریشه‌های جمع‌آوری شده در دی ماه (۳٪) در حالیکه بیشترین میزان پروتئین در ریشه‌های جمع‌آوری شده در دی ماه (۶/۶٪) و کمترین میزان پروتئین در ریشه‌های جمع‌آوری شده در مهر ماه (۵/۸۸٪) به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که فصل برداشت اثر معنی‌داری بر میزان چربی در ریشه شیرین‌بیان ندارد.

منابع

امید بیگی، ر. (۱۳۸۳). تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات آستان قدس رضوی. ۳۹۷ صفحه.

امید بیگی، ر. (۱۳۸۴). تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول، انتشارات آستان قدس رضوی. ۲۸۰ صفحه.

پروانه، و. (۱۳۸۵). کنترل کیفی و آزمایش‌های شیمیائی مواد غذائی. چاپ سوم. موسسه‌ی انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳۳۲ ص.

شریعت، ص. (۱۳۸۲). ترجمه تجزیه و شناسایی مواد دارویی گیاهی به روش میکروسکوپی و کروماتوگرافی، اشتال، آ. انتشارات روزبهان.

Arabshahi-Delouee, S. & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. Food Chemistry, 102, 1233–1240.

Atalay, S., Medine, G. & Dimitra, D. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanole extracts of endemic Thymus spathulifolius. Food Chemistry, 15, 627-634.

Emad, S. (2006). Antioxidant effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. LWT, 883-892.

Fenwick, G. R., Lutomski, J. & Nieman, C. (1990). Liquorice, composition, uses and analysis, Food Chemistry, 38, 119-143.

Ferreres, F., Sousa, C., Valento, P., Seabra, R. M., Pereira, J. A. & Andrade, P. B. (2007). Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea L. var. costata DC*) seeds: phytochemical characterization and antioxidant potential. Food Chemistry, 101, 549-558.

Ghahraman, A. (1999). Basic Botany: Anatomy and Morphology, Vol. 1. University of Tehran Press, 539p.

Hayashi, H., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Yammamoto, H. & Yoshikawa, T. (1998). Seasonal variation of glycyrrhizin and isoliquiritigenin glycosides in the root of *Glycyrrhiza glabra* L. Biological and Phamaceutical Bulletin, 21, 9. 987-989.

Helrich, k. (1990). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists (AOAC), 15th Edit.

ifrt.srbiau.ac.ir

Isbrucker, R.A. & Burdock, G. A. (2006). Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root(Glycyrrhiza sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. Regulatory Toxicology and pharmacology, 46, 167-192.

Kumaran, A. & Karunakaran, R. J. (2007). In vitro antioxidant ctivities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. LWT. 40: 344-352.

Lin, J. Y. & Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chemistry, 101,140-147.

Liu, W., Zu, Y. G., Fu, Y. J., Kong, Y., Ma, W. & Yang, M. (2010). Variation in contents of phenolic compounds during growth and post-harvest storage of pigeon pea seedlings. Food Chemistry, 121, 732–739.

Liu, Q. & Yao, H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry, 102, 732-737.

Mohsen, S. M. & Ammar, A. S. M. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chemistry, 112, 595-598.

Meng, X., Han, J., Wang, Q. & Tian, S. (2009). Changes in physiology and quality of peach fruit treated by methyl jasmonate under low temperature stress. Food Chemistry, 114, 1028–1035.

Mirzapour, M., Hamedi, M. & Rahimipanah, M. (2010). Sunflower Oil Stabilization by Persian Walnut Leaves Extract During Oven Storage Test. Food Science and Technology Research, 16, 443-446.

Mirheidar, H. (1996). Plant Education with plant employed in prevention and Disease remedy. 3, Farhang-e eslami Press, 532p.

Morello, J. R., Romero, M. P., Ramo, T. & Motilva, M. J. (2005). Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (Olea europaea L.) from fruit setting period to harvesting time. Plant Science, 168, 65–72.

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K. & Jena, B.S. (2004). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chemistry, 80, 393–397.

Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L. & Pereira, J. A. (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia L.*) green husks. Food and Chemical Toxicology, 46, 2326–2331.

Padda, M. S. & Picha, D. H. (2008). Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. Postharvest Biology and Technology, 47, 176–180.

Pan, X., Liu, H., Jia, G. & Shu, Y. (2000). Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. Journal of Biochemical Engineering, 5,173–177.

Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry, 269, 337-341.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32, 407–412.

Septak, M. (1999). Comparison study of Antimocrobal effects of root and leaf pure extract of licorice and licorice powder in market. Ph.D. Thesis Pharmaceutics faculty, Ferdowsi University, Mashhad, 102p.

Shimada, K., ujikawa, F. K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 945-948.

Shi, O. E. & Mei, L. S. (2003). Pressurized hot water extraction of berberin, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants. Analytica Chemica Acta, 482, 81-89.

Soares, A. A., Souza, C. G. M., Daniel, F. M., Ferrari, G. P., Costa, S. M. G. & Peralta, R. M. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of Agaricus brasiliensis (*Agaricus blazei Murril*) in two stages of maturity. Food Chemistry, 112, 775-781.

Singh, G., Maurya, S. & Catalan, C. (2005). Chemical constituents antimicrobial investigations and antioxidant potentials of *Anethum graveolens* essential oil and acetone extract. Journal of Food Science, 70, 208-215.

Tepe, B., Sokmen, M., Sokmen, A., Daferera, D. & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oils various extracts of *Cyclotrichium origanifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. Journal of Food Engineering, 69, 335- 342.

jfn.srbiau.ac.ir

Toor, R. K. & Savage, G. P. (2006). Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. Food Chemistry, 99, 724–727.

Vaya, J., Belinky, P. A. & Aviram, M. (1997). Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. Free Radical Biol. And medicine, 23, 303-313.

Yanishlieva, N. V. & Marinova, E. M. (1996). Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und - Forschung A. 203, 220-223.

Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4083–4089.

Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, A. A., Algur, O. F. & Bilaloglu, V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activity of tilia (Tilia argenta Desf. Ex. D.C.), sage (Salvia triloba L.) and black tea (Camellia sinensis L.) extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 5030–5034.

jftn.srbiau.ac.ir