دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.108293.1885
جلد ۳۳، شماره ۶، صفحه ۹۷۴-۹۶۱ (۱۳۹۶)

بررسی اثر فراصوت در استخراج گلیسیریزین از شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) در مقایسه با روش اصلاح شده روسین

هادی احمدیان[1*]، فردین میراحمدی[2] و بهاالدین رشیدزاده[3]

۱*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی سنندج، سنندج، ایران
پست الکترونیک: Hadi.ahmadeian@gmail.com
۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی سنندج، سنندج، ایران
۳- استاد، گروه شیمی، دانشگاه پیام نور واحد سقز، سقز، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده

شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) گیاهی است بوته‌ای چندساله که در اطراف مدیترانه و آسیا همانند ترکیه، ایتالیا و به‌ویژه ایران به‌طور گسترده رشد می‌کند. شیرین‌بیان گیاه مطلوبی است که از هزاران سال پیش در مواد غذایی و دارویی کاربرد داشته است. این گیاه حاوی ترکیب‌های زیادی است که مؤثرترین آنها گلیسیریزین بوده که عامل طعم شیرین ریشه شیرین‌بیان (۳۰ تا۵۰ بار از شکر شیرین‌تر) است. ریشه گیاه مذکور از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی کردستان برای انجام تحقیق تهیه شده و پس از آماده‌سازی، نمونه‌های خشک شده را پودر کرده و از آن برای استخراج گلیسیریزین با روش‌های مختلف روسین (rosen modified)، پری‌سونیکاسیون (pre ultrasonic) و پوست سونیکاسیون (post ultrasonic) در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه و فرکانس‌های ۳۵ و ۱۰۰ کیلوهرتز و در دمای ثابت ۶۰ درجه سیلسیوس درصد خلوص و بازدهی استخراج مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین کلیه تیمارهای مورد بررسی در سطح $P<0/01$ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. البته بین تمامی تیمارهای بررسی شده روش‌های پوست سونیکاسیون (فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز و زمان ۶۰ دقیقه) و اصلاح شده روسین به‌ترتیب حداکثر و حداقل درصد خلوص و بازدهی استخراج را نشان داده‌است.

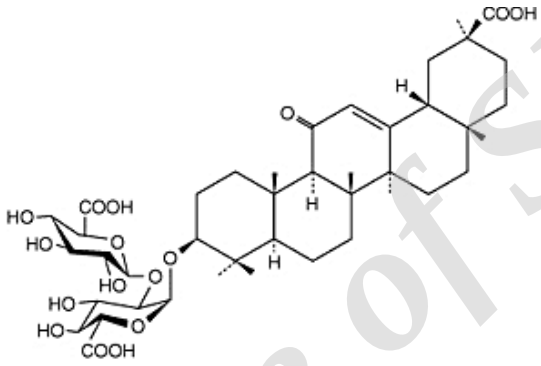
واژه‌های کلیدی: شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، اسید گلیسیریزیک، استخراج، فراصوت، روش اصلاح شده روسین.

مقدمه

فلات پهناور ایران با تنوع اقلیمی بسیار گسترده، رویشگاه گونه‌های بی‌شمار گیاهی است. تعداد زیادی از این گونه‌های گیاهی به لحاظ دارویی و طبی جزء پرارزش‌ترین و منحصر به فردترین گونه‌های جهان می‌باشند و یکی از مهمترین آنها که بیش از ۲۰۰۰ سال کاربرد دارویی دارد، گیاه شیرین‌بیان می‌باشد (Omidbaigi, 2007). گیاهی چندساله از خانواده بقولات با نام *Glycyrrhiza* که در اصل از واژه یونانی «گلیکوس ریزا» به‌معنی ریشه شیرین‌بیان و از تیره فرعی پروانه‌داران (Papilionaceae) است. شیرین‌بیان به دلیل دارا بودن ترکیب های دارویی و غذایی مهم در ریشه و

Archive of SID
www.SID.ir

ریزوم آن در دنیا حائز اهمیت بوده و به‌عنوان یک گیاه صنعتی مورد توجه صنایع دارویی، غذایی و دخانیات قرار گرفته است (Cirillo *et al.*, 2011؛ Hagiaghay *et al.*, 2012). معروف‌ترین گونه آن *Glycyrrhiza glabra* L. به نام شیرین‌بیان شهرت یافته است. شیرین‌بیان مدیترانه‌ای بوده و در جنوب‌شرق آسیا گسترش زیادی دارد (Fenwick *et al.*, 1989). در ایران نیز تقریباً در شمال، شرق، غرب و مرکز کشور به فراوانی وجود دارد (Miremadi *et al.*, 2009). ریشه شیرین‌بیان از ترکیب‌های مختلفی همانند فلاوونوئیدها، استرولها، اسیدهای آمینه، صمغ‌ها، نشاسته، اسانس‌های روغنی و ساپونین‌ها تشکیل شده‌است که عمده‌ترین آنها ساپونین (تری‌ترپن ۵ حلقه‌ای) به نام گلیسیریزین یا اسیدگلیسیریزیک با فرمول $C_{۴۲}H_{۶۲}O_{۱۶}$ می‌باشد (شکل ۱) که ۲۴-۵٪ ریشه از گلیسیریزین (که از دو واحد اسید گلوکورنیک و یک مولکول اسید گلیسیرتنیک (آگلیکون) تشکیل شده‌است) می‌باشد (Cirillo *et al.*, 2011؛ Fenwick *et al.*, 1989).



شکل ۱- ساختار اسید گلیسیریزیک

این ترکیب حدود ۱۴-۶٪ و گاهی با توجه به خصوصیات ژنتیکی (واریته) و شرایط محیطی تا ۲۰٪ وزن خشک ریشه را شامل می‌شود و گلیسیریزین یک ساپونین از اسید گلیسیریزیک با یک پیوند دی‌ساکاریدی با اتصال (۲-۱) است. این شیرین‌کننده در ریشه به‌صورت نمک کلسیم یا پتاسیم اسید گلیسیریزیک موجود است و از لحاظ تجاری به‌صورت نمک آمونیوم جداسازی می‌شود. ۵۰ تا ۱۷۰ برابر شیرین‌تر از ساکارز است، گلیسیریزین و گلیسیریزیک اسید دارای ساختار شیمیایی مشابه با استروئید هستند. نمک آمونیوم گلیسیریزین شیرین‌ترین ماده در لیست افزودنی‌های غذایی طبیعی (GRAS) Generally Recognised As Safe (عموماً شناخته شده به‌عنوان سالم) است (Wittschier *et al.*, 2009). در صنایع غذایی، به‌عنوان شیرین‌کننده و طعم‌دهنده و در تولید شیرینی‌های مختلف جایگزین مناسبی برای شکر به‌شمار می‌آید و از این قند به‌عنوان نگهدارنده، آنتی‌اکسیدان و پوشش‌دهنده یا عامل اصلاح مزه در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود (Arase *et al.*, 1990؛ Gupta *et al.*, 2013؛ Luque de Castro & Garcia-Ayuso, 1998).

از دیگر مصارف و کاربردهای عصاره شیرین‌بیان، ضد ویروس، ضد التهاب، ضد سرفه، درمان هپاتیت B، C و ایدز، تنظیم عملکرد قلب، ضد سرطان، تقویت بدن و حافظه، پادزهر و تسکین درد می‌باشد (Renmin *et al.*, 2012؛ Wang *et al.*, 2004)، همچنین در درمان نارسایی طحال، گلودرد و برونشیت و نارسایی کبد و کلیه و متابولیت کبد نقش بسزایی دارد (Kimura *et al.*, 2008). برای درمان گاستریت معده، عفونت‌های تنفسی، زخم

Archive of SID
www.SID.ir

معده و دوازدهه و همچنین سروتونین و پروستاگلاندین‌ها در معده را افزایش داده و سبب کاهش ورم معده می‌شود و در درمان افسردگی و کاهش کلسترول خون کاربرد دارد (Hartung, 1979).

با وجود اینکه گیاهان حاوی رنج گسترده‌ای از ترکیب‌هایی مانند لیپیدها، مواد مغذی، مواد دارویی، رنگدانه‌ها، طعم‌دهنده‌ها، شیرین‌کننده‌ها و اسانس‌ها هستند که عصاره‌های استخراجی آنها به‌طور گسترده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، تکنیک‌های استخراج برای دستیابی به چنین ترکیب‌های طبیعی ارزشمندی از گیاهان برای تجاری‌سازی به‌صورت گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. روش‌های سنتی مانند استخراج اصلاح شده روسین و تقطیر که دهه‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند، بسیار وقت‌گیر هستند و نیازمند مقادیر نسبتاً زیادی از حلال و انرژی می‌باشند (Kaufmann & Christen, 2002) و برای پر کردن این خلأ و جبران نقص بکارگیری روش‌های مدرن امری ضروریست. تکنیک‌های استخراج مدرن شامل استخراج به کمک فراصوت (Teo *et al.*, 2010)، استخراج به کمک میکروویو (Shen *et al.*, 2007)، استخراج سیال فوق بحرانی (Mauricio *et al.*, 2003) و استخراج حلال تسریع یافته هستند.

تحقیقات در زمینه بررسی این پدیده در دو دسته انجام شده است: دسته اول مقایسه استخراج گلیسیریزیک اسید به روش‌های مدرن و سنتی و دسته دوم مربوط به جداسازی گلیسیریزیک اسید و سایر ترکیب‌های شیرین‌بیان به روش‌های مختلف است و پیرامون اهمیت مطالب ذکر شده نیز مطالعاتی در گذشته انجام شده است. Pan و همکاران (۲۰۰۰) استخراج گلیسیریزیک به کمک میکروویو (MCE) در مقایسه با روش‌های سنتی را بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که روش میکروویو بازدهی بیشتری داشت. Wang و همکاران (۲۰۰۴) در این تحقیق کارایی استخراج MCE با کارایی‌ها و تکنیک‌های موسوم شامل: استخراج ظرف منفرد گروه، استخراج میکروویو انجام شده، استخراج فراصوت، استخراج روسین و استخراج دمای اتاق را مقایسه کردند. نتایج نشان می‌دهند که پروسه MCE، ارائه‌دهنده بالاترین بازده در استخراج اسیدگلیسیریزیک و صرفه‌جویی قابل توجه در زمان، انرژی و مصرف حلال داشت. Wee Eng و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی که مقایسه استخراج گلیسیریزیک اسید با روش مایع تحت فشار با روش فراصوت بود نشان دادند که روش مایع تحت فشار در مقایسه با روش فراصوت در استخراج اسیدگلیسیریزیک بازده بیشتری داشته است. Miremadi و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقی مقایسه استخراج اسید گلیسیریزیک از پودر عصاره شیرین‌بیان را با روش اصلاح شده روسین، اتانول مطلق و اسید سولفوریک و میکروویو انجام دادند و نتایج آنان نشان داد که در این مقایسه روش‌های معمول میکروویو دارای بهره استخراج بیشتری بود. Trupti و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیق استخراج اسید گلیسیریزین از ریشه شیرین‌بیان که با تکنیک فراصوت انجام شد، استخراج به کمک فراصوت نه تنها بازده بالاتری را ارائه بلکه زمان استخراج را هم نسبت به روش سنتی کاهش می‌دهد.

در دسته دوم اسیدگلیسیریزیک که با روش‌های مختلف استخراج شده توسط روش‌های مدرن جداسازی شده و مطالعاتی در این زمینه انجام شده است. Gupta و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی مقایسه استخراج گلیسیریزیک اسید را به کمک روش‌های فراصوت، حلال تسریع یافته و روش سنتی و جداسازی با روش کرماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و ستون C18 مورد مطالعه قرار دادند و نتایج آنان نشان داده که حلال تسریع یافته کارایی بالا در استخراج داشته است. Sun و همکاران (۲۰۰۷) و Teo و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقی که برای کاهش خطرات ناشی از آلودگی حلال‌های آلی با استفاده از واسطه‌های میسل و سورفاکتانت غیر یونی به‌عنوان جایگزین حلال‌های آلی در روش‌های استخراج و جداسازی اسیدگلیسیریزیک و لیکوئیریتین از

Archive of SID

www.SID.ir

شیرین‌بیان با سورفاکتانت سطح فعال غیریونی آبی انجام دادند، نشان دادند که این سیستم به علت ویژگی‌های بسیار بی‌نظیر مانند مواد شیمیایی امن، سازگار با محیط‌زیست و بی‌خطربودن آن، سطح جدیدی از سیستم استخراجی است که بازیابی و بازدهی جداسازی را بالا برده است. از سوی دیگر، Fu و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای عصاره گیاه شیرین‌بیان را با بکارگیری فراصوت استخراج و بعد تغلیظ کرده و این محلول را از رزین‌های ماکرو و متخلخل پلیمری مختلف عبور داده و عملکرد چهار تا از رزین‌های با منافذ درشت در جداسازی گلیسیریزیک اسید و فلانوئید از شیرین‌بیان را بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که رزین‌های متخلخل و پلیمرهای هیدروفیل قطبی با ظرفیت جذب بالا و قدرت احیای مناسب، روش فرایند مناسب، هزینه پایین و کارایی بالا داشته است.

بنابراین هدف از این تحقیق، تعیین بهترین روش از لحاظ دستگاهی و دستیابی به بیشترین بازدهی و حداکثر درصد خلوص و همچنین استفاده بهینه از منابع گیاهی دارویی در تهیه محصولات غذایی سودمند و رسیدن به محصولاتی است که از لحاظ ایمنی مطلوب هستند.

مواد و روش‌ها

گونه گیاهی مورد مطالعه شیرین‌بیان در این تحقیق، *Glycyrrhiza glabra* بود. بدین‌صورت که نمونه‌های برگی و ریشه‌ای با نمونه هرباریومی موجود در مرکز تحقیقات سنندج و همچنین با استناد از فلور ایرانیکا مورد تطبیق قرار گرفتند و پس از تأیید گونه آنها نمونه‌های حاصل مورد ارزیابی قرار گرفت. مونوآمونیوم گلیسیریزیک اسید با درجه خلوص ۹۹/۵٪ به‌عنوان استاندارد HPLC تولید شرکت سیگما آلدریچ و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق دارای خلوص و کیفیت آزمایشگاهی بوده و تولید شرکت آلمان بوده است. علاوه‌بر دستگاه‌ها و لوازم معمول آزمایشگاهی از تجهیزات زیر نیز استفاده شد.

دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل waters 600E با مشخصات ستون C18، طول ستون ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۶/۴ میلی‌متر، با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه و مجهز به آشکارساز UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر، دمای انجام آزمایش همان دمای اتاق بوده؛ فاز متحرک، سرعت جریان و حجم تزریق به‌ترتیب (متانول-آب به نسبت ۷۰:۳۰ و ۱٪ اسید استیک) و با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. دستگاه با ایندومتاسین استانداردسازی شد و نمونه استحصالی به دستگاه تزریق و بعد غلظت اسیدگلیسیریزیک موجود در نمونه مورد آزمایش از روی ترسیم منحنی کالیبراسیون (شکل ۱) و مقایسه با سطح زیر منحنی نمونه محاسبه شد. در پژوهش‌ها آب به‌عنوان حلال مناسب برای استخراج گلیسیریزین معرفی گردید (Trupti *et al*., 2012).

دستگاه دوار تحت خلأ، مدل EW ۰۱-۲۸۷۰۵ ساخت شرکت Heidolf آمریکا بود.

ریشه شیرین‌بیان تهیه شده، پس از جداسازی خاک و مواد اضافی پودر شده و پودر حاصل تا زمان استفاده در بسته‌های دور از نور و هوا نگهداری شدند و مراحل عملی برای تعیین مقدار گلیسیریزین به‌شرح زیر انجام گردید:

روش روسین اصلاح شده

به‌منظور عصاره‌گیری با روش روسین اصلاح شده بر روی ۵ گرم پودر شیرین‌بیان، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و محلول را به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده و پس از خنک کردن محلول از طریق نگهداری آن در دمای محیط به مدت نیم ساعت از فیلتر خلأ عبور داده شد و بعد برای تغلیظ با استفاده از دستگاه دوار تخت خلأ در دمای ۸۰ درجه سلسیوس با سرعت ۴۰ دور در دقیقه تغلیظ شده و بعد از جداسازی ناخالصی‌ها (صمغ و نشاسته)، به آن اتانول مطلق (۲۰ میلی‌لیتر در گرم) افزوده و در مرحله بعد اتانول تبخیرکننده تحت خلأ گردان در دمای ۷۰ درجه

Archive of SID
www.SID.ir

سلسیوس با سرعت ۴۰ دور در دقیقه جداسازی شده و بعد از افزودن اسید سولفوریک به مقدار ۱ به ۱ حجمی و در PH حدود ۱ تا ۲ گلیسیریزین ترسیب شده و با آب و اتانول شستشو داده شد تا بقیه اسیدها و ناخالصی‌ها جدا شود، ترکیب بدست‌آمده در آون تحت خلأ ۴۰ درجه سلسیوس خشک شده و برای تعیین خلوص به HPLC تزریق شد (Mukhopadhyay & Panja, 2008؛ Tian *et al.*, 2008؛ Miremadi *et al.*, 2009).

روش فراصوت

پری‌سونیکاسیون (ابتدا اولتراسونیک اعمال شده سپس حرارت) نمونه حمام اولتراسونیک برای زمان‌های مختلف (۳۰ و۶۰ دقیقه) در فرکانس‌های (صفر، ۳۰ و ۱۰۰ کیلو هرتز)، سپس به مدت ۳۰ دقیقه تحت حرارت قرارگرفته و در روش پوست سونیکاسیون (ابتدا حرارت سپس اولتراسونیک اعمال شده) نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده و بعد در حمام اولتراسونیک برای زمان‌های مختلف (۳۰ و ۶۰ دقیقه) و در فرکانس‌های مختلف (صفر، ۳۰ و ۱۰۰ کیلوهرتز) قرار گرفته بعد عصاره استخراج شده با کاغذ صافی از گیاه جدا شد (Albu *et al.*, 2004) و پس از خنک شدن محلول، سایر محلول خالص‌سازی و طبق روش قبل مراحل تغلیظ انجام شد.

تعیین درصد خلوص

با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا درصد خلوص و مقدار گلیسیریزین استحصالی از روش‌های بالا براساس روش استاندارد AOAC (۲۰۰۲) به شماره ۹۸۲/۱۹ تعیین گردیدند (رابطه ۱) و بهره استخراج براساس رابطه ۲ بدست آمد. استانداردها در غلظت‌های ۱۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میکرولیتر تزریق شده محاسبه شدند.

رابطه ۱

$$\text{درصد خلوص اسید گلیسیریزیک} = \frac{c'}{c} \times \frac{pH}{pH'} \times \frac{v'}{v} \times 100$$

C`= غلظت محلول استاندارد برحسب میلی‌گرم در لیتر

C= غلظت محلول نمونه

pH= ارتفاع پیک نمونه

pH`= ارتفاع پیک استاندارد

V`= حجم استاندارد تزریق شده در میکرولیتر

V= حجم نمونه تزریق شده در میکرولیتر

رابطه ۲

$$\text{درصد بهره استخراج (وزنی/وزنی)} = \frac{\text{درصد خلوص} \times \text{وزن خشک ترکیب استحصال شده}}{\text{پودر عصاره شیرین‌بیان}}$$

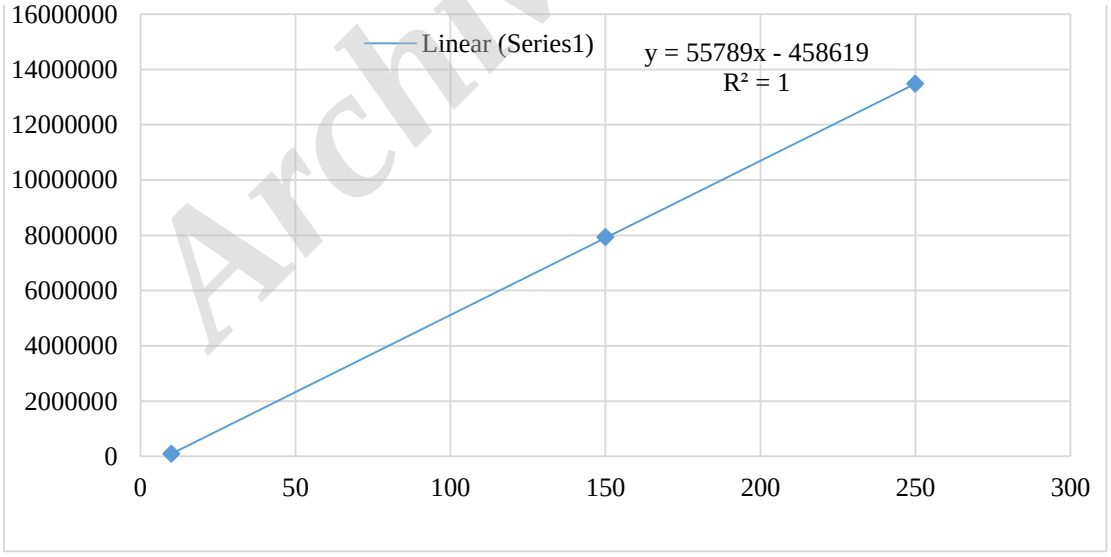
تیمارهای مورد استفاده به‌شرح جدول ۱ می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

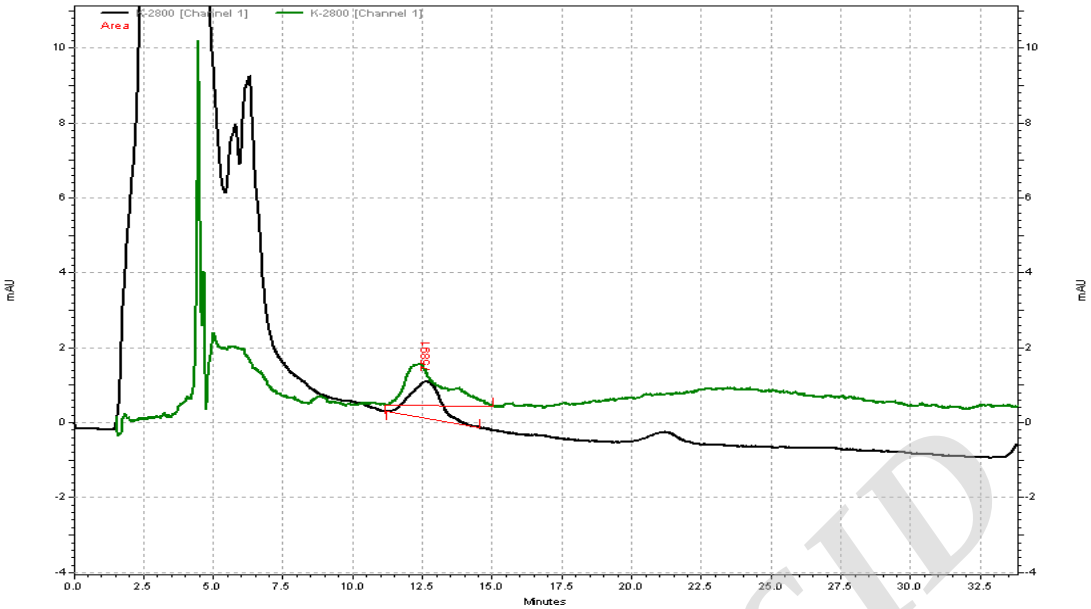
جدول ۱- معرفی و نشانه‌گذاری تیمارها

نشانه‌گذاری مورد استفاده	نوع تیمارها (روش‌های استخراج)
s-method	روش اصلاح شده روسین
ho۱۱-method	روش حرارت دادن اولیه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه سپس اولتراسوند با شدت ۳۰ کیلوهرتز و زمان ۳۰ دقیقه
ho۱۲-method	روش حرارت دادن اولیه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه سپس اولتراسوند با شدت ۱۰۰ کیلوهرتز و زمان ۳۰ دقیقه
ho۲۱-method	روش حرارت دادن اولیه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه سپس اولتراسوند با شدت ۳۰ کیلوهرتز و زمان ۶۰ دقیقه
ho۲۲ –method	روش حرارت دادن اولیه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه سپس اولتراسوند با شدت ۱۰۰ کیلوهرتز و زمان ۶۰ دقیقه
Oh۱۱-method	روش اولتراسوند با شدت ۳۰ کیلوهرتز و زمان ۳۰ دقیقه سپس حرارت دادن ثانویه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه
Oh۱۲-method	روش اولتراسوند با شدت ۱۰۰ کیلوهرتز و زمان ۳۰ دقیقه سپس حرارت دادن ثانویه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه
Oh۲۱-method	روش اولتراسوند با شدت ۳۰ کیلوهرتز و زمان ۶۰ دقیقه سپس حرارت دادن ثانویه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه
Oh۲۲-method	روش اولتراسوند با شدت ۱۰۰ کیلوهرتز و زمان ۶۰ دقیقه سپس حرارت دادن ثانویه ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه
O۱۲-method	روش اولتراسوند با شدت ۳۰ کیلوهرتز و زمان ۶۰ دقیقه
O۲۲-method	روش اولتراسوند با شدت ۱۰۰ و زمان ۶۰ دقیقه



شکل ۲- نمودار کالیبراسیون نمونه‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- دیاگرام نمونه‌های استخراجی و تزریق شده همراه با نمونه‌های استاندارد

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شده و طرح بررسی اثر اولتراسوند بر روی فرایند استخراج و بالا بردن بازدهی آن توسط نرم‌افزار SAS و MINITAB انجام شده و در قالب طرح کاملاً تصادفی یک عاملی و از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج

در جدول ۲ نتایج بدست آمده از آنالیز واریانس مقدار گلیسریزین استخراج شده به روش‌های مختلف آورده شده است. با بررسی میزان غلظت، ماده خشک، درصد خلوص و بازدهی استخراج در روش‌های اصلاح شده روسین، پری‌سونیکاسیون و پوست سونیکاسیون در فرکانس‌های صفر، ۳۵ و ۱۰۰kHz؛ و زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه، (جدول ۳ و شکل ۱) مقایسه میانگین تمامی تیمارها از لحاظ غلظت به روش دانکن نشان می‌دهد که در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بیشترین مقدار مربوط به تیمار ho۲۲ و به میزان ۱۱/۷۰۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و کمترین مقدار مربوط به تیمار S به میزان ۹/۲۲۲۳ میکرولیتر بر میلی‌لیتر می‌باشد. همچنین مطابق جدول ۳ و شکل ۲ مقایسه میانگین تمامی تیمارها از لحاظ درجه خلوص به روش دانکن نشان می‌دهد که در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بیشترین مقدار مربوط به تیمار ho۲۲ و به میزان ۵۰/۲۰۲۵٪ و کمترین مقدار مربوط به تیمار oh۱۲ به میزان ۱۴/۴۶۳۷٪ می‌باشد. مقایسه میانگین تمامی تیمارها از لحاظ بازدهی استخراج به روش دانکن نشان می‌دهد که نمونه‌های ho۲۲ و ho۱۱ با دیگر تیمارها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری دارند (شکل ۳)، ولی بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود نداشته و در یک گروه قرار می‌گیرند. بیشترین مقدار بازدهی مربوط به ho۲۲ به میزان ۱۹/۸۳۷۹٪ می‌باشد و کمترین مقدار مربوط به تیمار oh۱۲ به میزان ۱/۳۲۸۵٪ می‌باشد. مطابق جدول ۳ و شکل ۴ مقایسه میانگین تمامی تیمارها از لحاظ نسبت ماده خشک به ماده مرطوب به روش دانکن نشان می‌دهد که نمونه‌های ho۲۲ و ho۱۱ با هم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ نداشته و در یک گروه قرار می‌گیرند، ولی با بقیه تیمارها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری دارند. بین

Archive of SID
www.SID.ir

سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود نداشته و در یک گروه قرار می‌گیرند. بیشترین مقدار نسبت ماده خشک به ماده مرطوب مربوط به تیمار ho۲۲ به میزان ۳۹/۵۱۷۰ می‌باشد و کمترین مقدار مربوط به تیمار S به میزان ۷/۸۶۸۰ می‌باشد (شکل ۷). در شکل ۵ درجه خلوص اسید گلیسیریزیک استخراجی در هر روش اعمالی و در شکل ۶ بازدهی استخراج اسید گلیسیریزیک در هر روش اعمالی دیده می‌شود.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس مدل و روش‌های مختلف استخراج اسید گلیسیریزیک از لحاظ ویژگی‌های مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	واریانس (میانگین مربعات)			
		غلظت	درجه خلوص	بازدهی (بازده استخراج)	نسبت ماده خشک به مرطوب
مدل انتخابی	۱۰	۱/۰۸۵۳ **	۲۶۷/۲۷۵۷ **	۸۲/۴۵۳۷ **	۳۱۱/۳۳۰۳ **
تیمارها*	۱۰	۱/۰۸۵۳ **	۲۶۷/۲۷۵۷ **	۸۲/۴۵۳۷ **	۳۱۱/۳۳۰۳ **
خطای آزمایشی	۲۲	۰/۰۰۰۰۰۲۹	۰/۰۰۰۰۸۶	۳/۷۶۹۵۱۴۷	۲۳/۳۵۲۷
CV		۰/۰۰۵۲۵۴	۰/۰۳۶۱۸۵	۲۹/۲	۲۷/۹۱۴۵

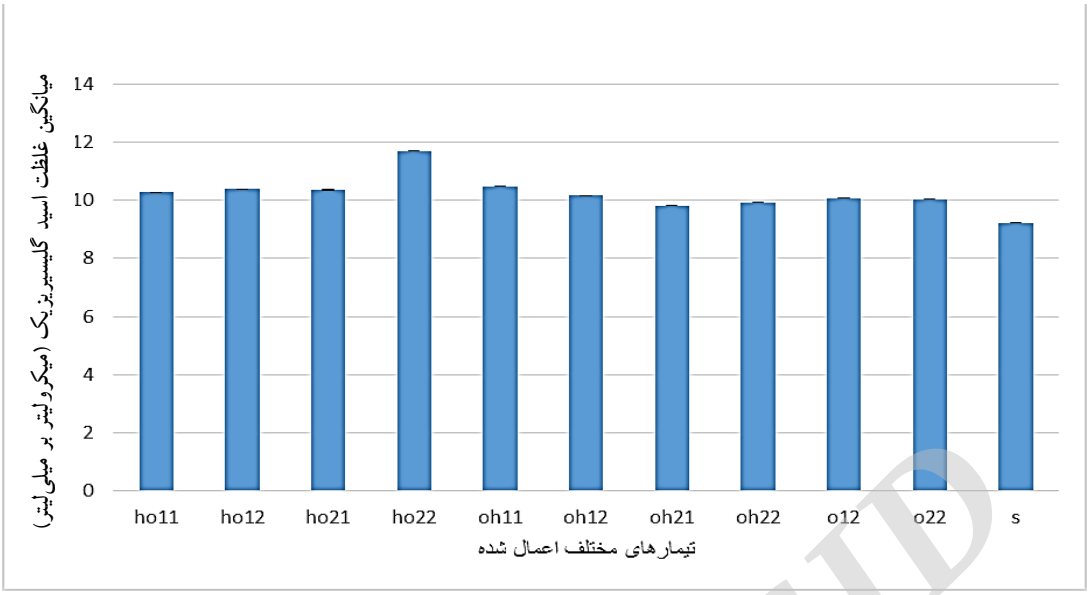
*: انواع تیمارهای روش استخراج؛ **: در سطح ۱٪ بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

جدول ۳- مقایسه میانگین تیمار انواع روش‌های استخراج از لحاظ ویژگی‌های مختلف مورد بررسی

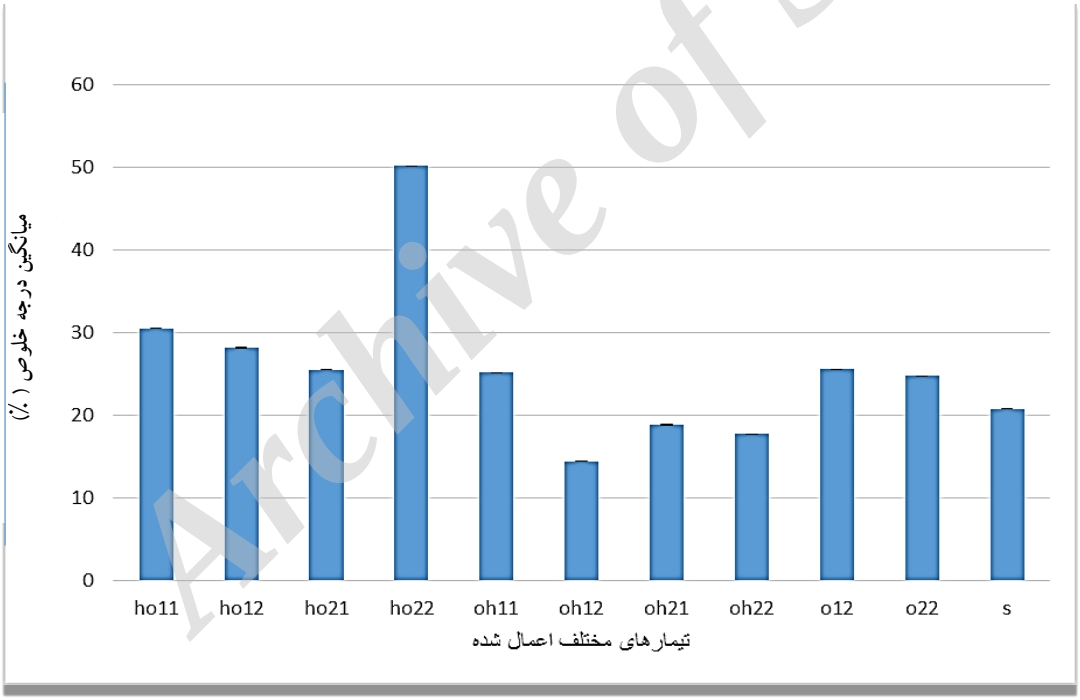
روش‌های استخراج	میانگین ویژگی‌های مورد بررسی			
	غلظت	درجه خلوص	بازدهی (بازده استخراج)	نسبت ماده خشک به مرطوب
s-method	۹/۲۲۲۳±۰/۰۰۱۱ K	۲۰/۸۲۶۶±۰/۰۰۴۱ H	۱/۶۳۸۵±۰/۱۵۴۰۸ C	۷/۸۶۸۰±۰/۷۴۰۱۹ C
ho۱۱-method	۱۰/۲۷۳۵±۰/۰۰۱۱ B	۳۰/۵۵۳۱±۰/۰۰۲۰۸ B	۲/۹۳۲۵±۰/۰۶۶۴۳ C	۹/۵۹۸۰±۰/۲۱۷۸۳ C
ho۱۲-method	۱۰/۳۹۰۳±۰/۰۰۰۱۴ C	۲۸/۲۰۵۲±۰/۰۰۲۱۸ C	۴/۳۰۲۵±۰/۱۳۷۵۹ C	۱۵/۲۵۴۰±۰/۴۸۶۹۲ BC
ho۲۱-method	۱۰/۳۵۷۷±۰/۰۱۱ D	۲۵/۵۴۸۰±۰/۰۰۱۰۶ E	۸/۰۹۳۷±۰/۱۵۵۴۷ B	۳۱/۶۸۰۷±۰/۶۰۹۶۱ A
ho۲۲-method	۱۱/۷۰۲±۰/۰۰۰۱۹ A	۵۰/۲۰۲۵±۰/۰۰۳۱۵ A	۱۹/۸۳۷۹±۱/۷۲۰۵ A	۳۹/۵۱۷۰±۳/۴۲۹۹۳ A
Oh۱۱-method	۱۰/۴۸۵±۰/۰۰۰۱۶ E	۲۵/۱۹۵۲±۰/۰۰۲۱۸ F	۳/۳۸۸۶±۰/۳۷۶۹۶ C	۱۳/۴۴۸۷±۱/۴۹۵۵۹ C
Oh۱۲-method	۱۰/۱۶۲۶±۰,۰۰۰۱۱F	۱۴/۴۶۳۷±۰/۰۰۰۹۹ K	۱/۳۲۸۵±۰/۱۱۲۹۸ C	۹/۱۸۴۷±۰/۷۸۰۵۲ C
Oh۲۱-method	۹/۸۱۶۷±۰/۰۰۰۲۲ J	۱۸/۸۹۱۰±۰/۰۰۳۵۷ I	۲/۸۸۸۴±۰/۲۱۵۷۱ C	۱۵/۲۸۸۰±۱/۱۳۸۸۹ BC
Oh۲۲-method	۹/۹۲۸۳±۰/۰۰۰۲۴ I	۱۷/۷۴۶±۰/۰۰۳۳۷ J	۴/۱۵۰۲±۰/۲۱۳۹۴ C	۲۳/۳۸۷۳±۱/۲۰۷۲۵ B
O۱۲-method	۱۰/۰۷۷۶±۰/۰۰۰۱۵ G	۲۵/۶۱۸۹±۰/۰۰۲۷۳ D	۲/۴۴۰۳±۰/۱۶۷۶۵ C	۹/۵۲۴۷±۱/۵۵۲۷۳ C
O۲۲-method	۱۰/۰۳۱۲±۰/۰۰۰۱۲ H	۲۴/۷۸۴۹±۰/۰۰۲۱۷ G	۳/۸۸۵۳±۰/۳۸۴۵۶ C	۱۵/۶۷۶۷±۰/۰۶۲ BC

Archive of SID

www.SID.ir

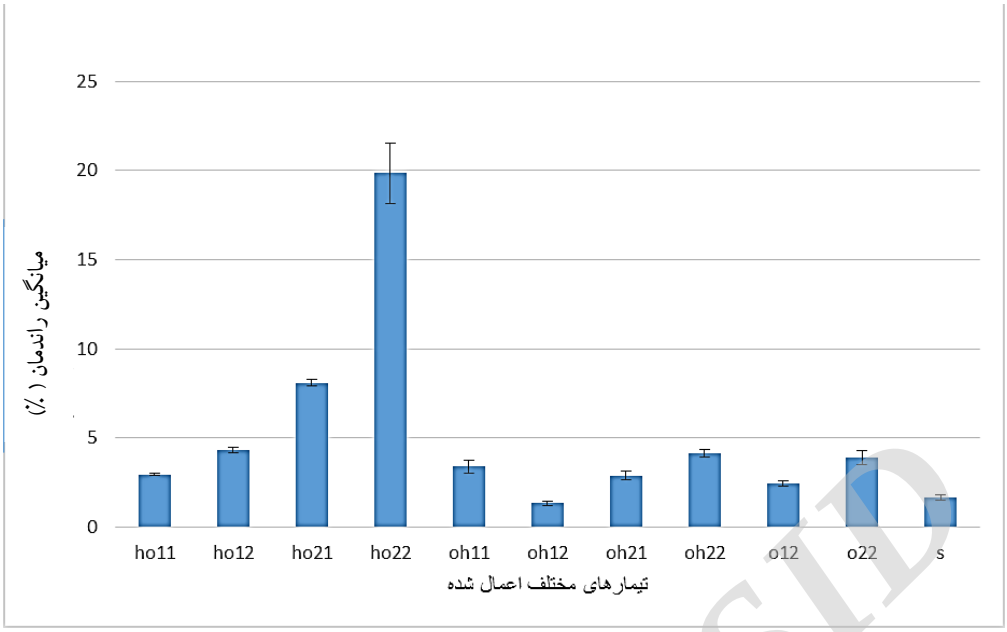


شکل ۴- غلظت‌های اسید گلیسیریزیک استخراجی در هر روش اعمال

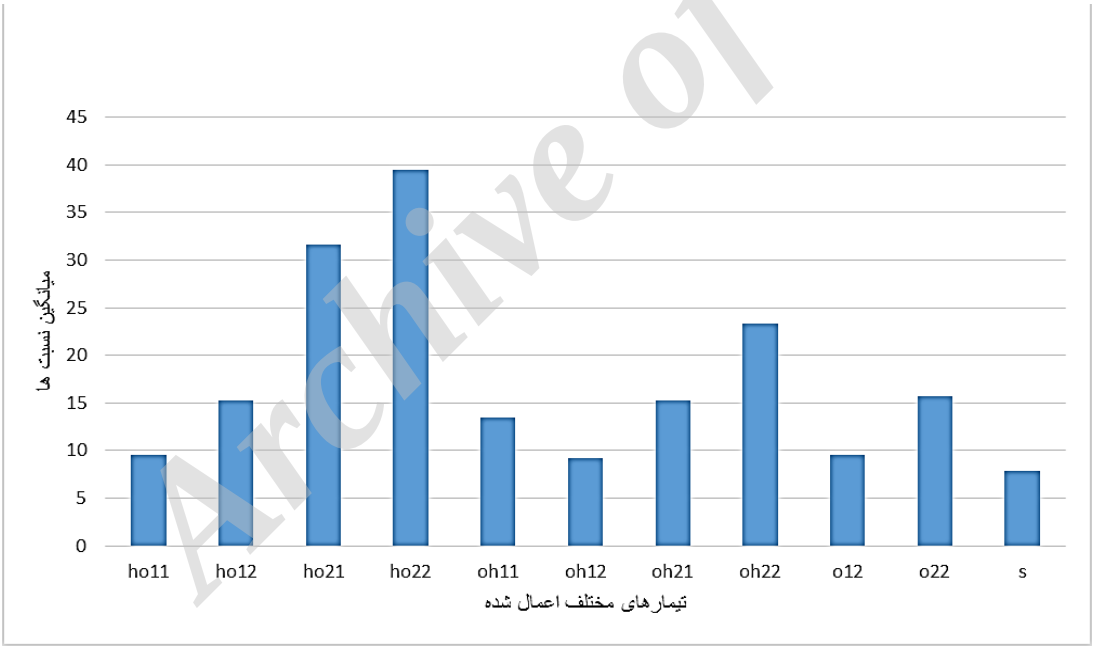


شکل ۵- درجات خلوص اسید گلیسیریزیک استخراجی در هر روش اعمالی

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۶- بازدهی استخراج اسید گلیسیریزیک در هر روش اعمالی



شکل ۷- نسبت ماده خشک به ماده مرطوب روش‌های مورد بررسی استخراج

بحث

بین روش‌های استخراج (روش اصلاح شده روسین، استخراج پری‌سونیکاسیون و پوست سونیکاسیون به کمک فراصوت) از نظر میزان ترکیب‌های اسید گلیسیریزیک از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P<۰/۰۵$) انجام شد تا بهترین روش برای استخراج اسید گلیسیریزیک انتخاب شود. همان‌طور که در بررسی نتایج و

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز واریانس در جدول ۲ مشاهده شد اثر نوع روش پری‌سونیکاسیون از نظر میزان استخراج ترکیب اسید گلیسیریزیک، ماده خشک، درجه خلوص و بازدهی اسید گلیسیریزیک ($P<۰/۰۵$) با سایر روش‌ها اختلاف معنی‌داری داشته است و مقایسه میانگین آنها نشان داد که روش پری‌سونیکاسیون تیمار (ho۲۲) از نظر درصد خلوص و بهره استخراج بالاتر از روش پوست سونیکاسیون و اصلاح شده روسین می‌باشد و از سوی دیگر در مقایسه روش پوست سونیکاسیون با اصلاح شده روسین با توجه به جدول ۳ مشخص شده که در سطح ($P<۰/۰۵$) از لحاظ غلظت و درجه خلوص اختلاف معنی‌دار می‌باشد و بیشترین مقدار به‌ترتیب مربوط به روش پوست سونیکاسیون تیمار Oh۱۱ به مقدار ۱۰/۴۸۵ و روش اصلاح شده روسین به میزان ۰/۶۶۸۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر می‌باشد ولی از لحاظ بازدهی و نسبت ماده خشک به مرطوب معنی‌دار نبوده و در یک کلاسه قرار گرفته‌اند و بیشترین مقدار به‌ترتیب مربوط به روش پوست سونیکاسیون تیمار Oh۲۲ و به مقدارهای ۴/۱۵۰۲ و ۲۳/۳۸۷۳ میکرولیتر بر میلی‌لیتر می‌باشد؛ که این می‌تواند ناشی از حرارت اولیه قبل از اعمال فراصوت باشد. افزایش دما سبب شکستن اجزای سلولی سلول‌های گیاه شیرین‌بیان شده و منجر به افزایش نفوذپذیری اجزای غشای سلولی می‌شود، در نتیجه باعث تسهیل در آزادسازی اسید گلیسیریزیک شده است. این نتایج در راستای نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در استخراج گلیسیریزین می‌باشد (Mukhopadhyay & Panja, 2008؛ Tian *et al.*, 2008).

اثر شدت فراصوت پارامتری مهم است که بر استخراج اثر می‌گذارد، افزایش شدت منجر به افزایش در استخراج اسید گلیسیریزیک می‌شود، یعنی شدت اثر خطی مثبت را بر استخراج اسید گلیسیریزیک نشان داد. در استخراج به کمک فراصوت، میزان استخراج به کمک حفره‌سازی افزایش یافته و زمانی که دیواره سلولی توسط حرارت اولیه سست شده با اعمال این امواج و افزایش شدت آن در دیواره سلولی حفره‌های بزرگ و بیشتری ایجاد شده و با شکستن این حفره‌ها انرژی زیادی آزاد می‌شود و این انرژی سبب تغییرات ناگهانی و لحظه‌ای در دما و فشار بر دیواره سلولی شده و از این‌رو، نفوذ حلّال به سلول گیاهی بیشتر شده و سبب آزادسازی محتویات سلول به درون حلّال می‌شود و این نتایج در مطالعات پیشین هم به اثبات رسیده است (Trupti *et al.*, 2012 ؛Vinatoru, 2001). از سوی دیگر با فرکانس بالا (شدت پایین) و افزایش زمان اندازه حباب‌ها به آستانه شعاع پایداری نمی‌رسد، در این صورت پدیده کاویتاسیون کم، جریان توربلانسی بیشتر شده و اثرات مکانیکی فراصوت سبب نفوذ بیشتر حلّال شده و به مواد سلولی شده انتقال جرم ارتقاء داده و منجر به افزایش استخراج اسید گلیسیریزیک می‌شود، یعنی افزایش فرکانس، زمان و اثرات متقابل آنها اثر خطی مثبت را بر استخراج اسید گلیسیریزیک نشان داده که این نتایج در راستای نتایج مطالعات پیشین که در زمینه استخراج شیرین‌کننده‌های طبیعی از شیرین‌بیان انجام شده است، می‌باشد (Bernard *et al.*, 2001) و همانند استخراج ایزوفلاون به کمک فراصوت از سویا (Alissandrakis *et al.*, 2003) در استخراج ترکیب‌های فرّار از مرکبات به کمک فراصوت می‌باشد (Dong *et al.*, 2010).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که این پژوهش، برای تعیین مقدار اسید گلیسیریزیک به روش فراصوت در مقایسه با روش اصلاح شده روسین انجام شده است و فراسنجه‌هایی همانند روش استخراج، شدت فراصوت و زمان که بر بازده استخراج مؤثرند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از استخراج به کمک فراصوت با نتایج حاصل به روش اصلاح شده روسین مشاهده شد که روش استخراج فراصوت (پری–سونیکاسیون) با شدت ۱۰۰ کیلوهرتز و زمان ۶۰ دقیقه روشی مؤثر و سریع، به‌عنوان یک تکنیک کلیدی در استخراج اسید گلیسیریزیک می‌باشد. این روش در مقایسه با روش سنتی، بازدهی و درصد خلوص و کیفیت ماده استخراج شده را افزایش داده و با بکارگیری روش کلاسیک در مقایسه با روش‌های سنتی

Archive of SID

www.SID.ir

موجب کاهش زمان استخراج و صرفه‌جویی در هزینه، مصرف انرژی و حلّال مصرفی شده است.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی به‌ویژه جناب آقای دکتر رضادوست، برای آنالیز نمونه‌ها و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان برای تهیه نمونه شیرین‌بیان، آزمایشگاه دانشگاه پیام نور سقز و اداره استاندارد سنندج، صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع مورد استفاده

- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. and Mason, T.J., 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics Sonochemistry, 11(3-4): 261-265.
- Alissandrakis, A., Daferera, D., Tarantili, P.A., Polissiou, M. and Harizanis, P.C., 2003. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. Food Chemistry, 82: 575-582.
- AOAC, 2002. Association of Official Analytical Chemists. Official Method 982.19.
- Arase, Y., Keda, K., Murashima, N., Chayama, K., Tsubota, A., Koida, I., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M. and Kumada, H., 1990. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. American Cancer Society, 79: 494-500.
- Bernard, F., Soleimani, H. and Rezai, J., 2001. The amount of glycyrrhizic acid a population of callus natural roots of the liquorice plant. Journal of Teacher Education, 2: 3.
- Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O., Puoci, F., Iemma, F., Spizzirri, U., Restuccia, D. and Picci, N., 2011. Molecularly imprinted polymers for the selective extraction of glycyrrhizic acid from liquorice roots. Food Chemistry, 125: 1058-1063.
- Dong, J., Liu, Y., Liang, Z. and Wang, W., 2010. Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from Salvia miltiorrhiza root. Ultrasonics Sonochemistry, 17: 61-65.
- Fenwick, G.R., Lutomski, J. and Nieman, C., 1989. Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.-composition, uses, and analysis. Food Chemistry, 38(2): 119-143.
- Fu, B., Liu, J., Li, H., Li, L., Lee, F.S.C. and Wang, X., 2005. The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid. Journal Chromatography A, 1089: 18-24.
- Gupta, D.K., Verma, M.K. and Khajuria, R.K., 2013. Development of a validated UPLC-qTOF-MS/MS method for determination of bioactive constituent from *Glycyrrhiza glabra*. Journal Pharmaceutical Analysis, 33: 205-210.
- Hagiaghay, R., Khan Ahmadi, M., Naghdi badi, H., Akhundzade, N., Khaliq, F., Mherafarin, A. and Shahriar, S., 2012. Analytical review on methods to isolate and measure the glycyrrhizic acid from licorice. Journal of Medicinal Plants, 13(50): 1-10.
- Hartung, H.A., 1979. Potassium-Magnesium-Calcium Glycyrrhizin. U.S. Patent 27.
- Kaufmann, B. and Christen, P., 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. Phytochemical Analysis, 13: 105-113.
- Kimura, M., Moro, T., Motegi, H., Maruyama, H., Sekine, M., Okamoto, H., Inoue, H., Sato, T. and Ogihara, M., 2008. In vivo glycyrrhizin accelerates liver regeneration and rapidly lowers serum transaminase activities in 70% partially hepatectomized rats. European Journal of Pharmacology, 579: 357-364.
- Luque de Castro, M.D. and Garcia-Ayuso, L.E., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. Analytica Chimica Acta, 369: 1-10.
- Mauricio, A., Rostagno, M.P. and Carmelo, G.B., 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatography A, 1012: 119-128.
- Meireles, A. and Angela, M., 2003. Supercritical extraction from solid: process design data. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 7: 321-330.
- Miremadi, P., Ezzatpanah, H., Larijani, K., Azizinezhad, R. and Motaghian, P., 2009. Comparison of different methods of obtaining glycyrrhizic acid from licorice extract powder. Food Technology & Nutrition, 8(1): 21-27.
- Mukhopadhyay, M. and Panja, P.A., 2008. A novel process for extraction of natural sweetener from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots. Separation Purification Technology, 63(3): 539-545.
- Omidbaigi, O., 2007. Production and Processing of Medicinal Herbs (Vol 3). Quds Razavi Publication, Mashhad, 397p.

Archive of SID

www.SID.ir

- Pan, X., Liu, H., Jia, G. and Shu, Y.Y., 2000. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. Journal of Biochemical Engineering, 15: 173-177.
- Renmin, W., Chan, L., Jingliang, L., Fang, Y., Jianpei, G. and Xuejun, P., 2012. Pressured microwave-assisted hydrolysis of crude glycyrrhizic acid for preparation of glycyrrhetinic acid. Chinese Journal of Chemical Engineering, 20(1): 152-157.
- Shen, S., Chang, Z., Liu, J., Sun, X., Hu, X. and Liu, H., 2007. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. extract by three-liquid-phase extraction systems. Separation Purification Technology, 53: 216-223.
- Smith, R.M., 2002. Extractions with superheated water. Journal of Chromatography A, 975: 31-46.
- Sun, S., Xie, Y., Tian, Q. and Liu, H., 2007. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. Colloids and Surfaces A: Physicochemcal Engineering Aspects, 305: 42-47.
- Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S. and Ong, E.S., 2010. Pressurized hot water extraction (PHWE). Journal of Chromatography A, 1217(16): 2484-2498.
- Tian, M., Yan, H. and Row, K.H., 2008. Extraction of GA and glabridin from licorice. Journal of International Molecular Science, 9: 571-577.
- Trupti, W., Virendra, C. and Rathod, K., 2012. Extraction of glycyrrhizic acid from licorice root using ultrasound: Process intensification studies. Chemical Engineering and Processing, 54: 37-41.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8: 303-313.
- Wang, Q., Ma, S., Fu, B., Lee, F.S.C. and Wang, X.D., 2004. Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). Journal of Biochemical Engineering, 21(3): 285-292.
- Wee Eng, A.T., Heng, M.Y. and Ong, E.S., 2007. Evaluation of surfactant assisted pressurized liquid extraction for the determination of glycyrrhizin and ephedrine in medicinal plants. Analytica Chimica Acta, 583: 289-295.
- Wittschier, N., Faller, G. and Hensel, A., 2009. Aqueous extracts and polysaccharides from Liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of Helicobacter pylori to human gastric mucosa. Journal of Ethnopharmacology, 125: 218-223.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of ultrasound on extraction of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza glabra* L. in comparison with modified Rosen's method

H. Ahmadian[1*], F. Mirahmadi[2] and B. Rashidzadeh[3]

1*- Corresponding author, M.Sc. graduated, Department of Food Industries, Agriculture and Natural Resources University of Sanandaj, Sanandaj, Iran, E-mail: Hadi.ahmadeian@gmail.com
2- Department of Food Industries, Agriculture and Natural Resources University of Sanandaj, Sanandaj, Iran
3- Department of Chemistry, University of Payam Noor Saghez, Saghez, Iran

Received: November 2016 Revised: November 2017 Accepted: November 2017

Abstract

Glycyrrhiza glabra L. (Licorice) is a perennial shrub growing in Mediterranean region and Asia and is widespread in Turkey, Italy and specially Iran. Licorice is a favorable herb used in food and medicinal remedies for thousands of years. This herb contains a variety of substances, among which glycyrrhizin is the most effective substance, giving a sweet taste to the root (30 to 50 times sweeter than sucrose). The roots of the study species were collected from the Kurdistan Agricultural Research and Education Center. All samples were dried and then powdered to extract the glycyrrhizin with different methods including modified Rosen, pre ultrasonic and post ultrasonic methods at 30 and 60 minutes, ultrasound frequencies of 35 and 100 kHz and a constant temperature of 60°C. The results showed that there were significant differences among the study treatments (P<0.01). The highest and lowest purity and extraction yield efficiency were obtained from the post ultrasonic (100 kHz and 60 m) and modified Rosen's method, respectively.

Keywords: *Glycyrrhiza glabra* L., glycyrrhizic acid, extraction, ultrasonic- assisted, Rosen's modified method.

Archive of SID

www.SID.ir