مروری تحلیلی بر روش‌های جداسازی و اندازه‌گیری اسید گلیسیریزیک از گیاه شیرین‌بیان

معصومه خان‌احمدی[۱]، حسنعلی نقدی‌بادی[۲]، شاهین آخوندزاده[۳]، فرحناز خلیقی سیگارودی[٤]، علی مهرآفرین[٥]، سهیلا شهریاری[٦]، رضا حاجی‌آقایی[٤*]

۱-مربی پژوهشی، گروه شیمی جهاددانشگاهی کرمانشاه و دانشجوی دکتری پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
۲-دانشیار پژوهش، گروه پژوهشی کشت و توسعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
۳-استاد، گروه روانپزشکی، مرکز تحقیقات روانپزشکی، بیمارستان روزبه، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
٤-دانشیار پژوهش، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
٥-عضو هیأت علمی گروه پژوهشی کشت و توسعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران
٦- کارشناس ارشد، گروه شیمی، جهاددانشگاهی واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
*آدرس مکاتبه: کرج، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق‌پستی: ۱۳٦۹ - ۳۱۳۷٥
تلفن: ۱۸ - ۳٤۷٦٤۰۱۰ (۰۲٦)، نمابر: ۳٤۷٦٤۰۲۱ (۰۲۱)
پست الکترونیک: rhajiaghaee@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/٥ **تاریخ تصویب:** ۹۲/۱۰/۲۳

چکیده

گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، یک گیاه چند ساله از خانواده بقولات Fabaceae است. این گیاه به واسطه دارا بودن ترکیبات ثانویه مهم در ریزوم خود در دنیا حائز اهمیت بوده و مورد توجه صنایع دارویی، غذایی و حتی دخانیات قرار گرفته است. این گیاه به علت مصارف گسترده جهانی از نظر صادرات دارای اهمیت زیادی می‌باشد. مهم‌ترین ترکیب فعال آن از دسته ساپونین‌ها [تری ترپن ٥ حلقه‌ای]، به نام گلیسریزیک اسید است که دارای سه گروه کربوکسیل و پنج گروه هیدروکسیل می‌باشد. این ترکیب دارای خواص فارماکولوژیک گسترده‌ای می‌باشد که می‌توان به اثرات ضد التهابی و ضد حساسیتی آن در آسم، اگزما و سایر بیماری‌ها اشاره نمود. روش‌های مختلف جهت جداسازی، خالص‌سازی و تعیین مقدار گلیسریزیک اسید وجود دارد. استفاده از حلال‌های گوناگون، آب، روش‌های ترکیبی، رزین‌های ماکرو - متخلخل و سورفاکتانت‌های غیر یونی آبی از مهم‌ترین تکنیک‌های استخراج این ترکیب و استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا از مهم‌ترین روش‌های تعیین مقدار آن می‌باشد.

گل‌واژگان: شیرین‌بیان، جداسازی، خالص‌سازی، گلیسیریزیک اسید، گلیسیریزین، گلیسیرتنیک اسید

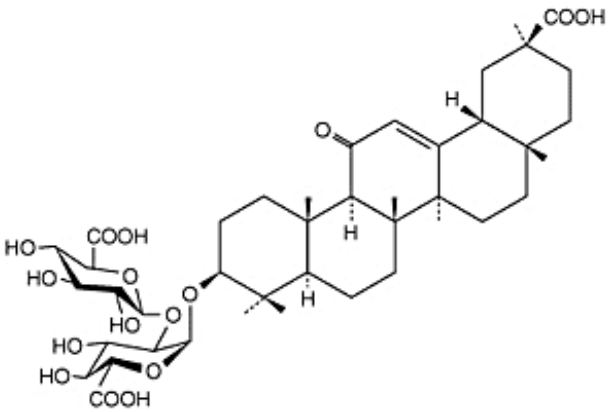
مقدمه

گیاه شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L گیاهی چند ساله از خانواده بقولات Fabaceae می‌باشد. گلیسیریزا گلابرا یک نام یونانی است و از دو واژه گلیکیس به معنی شیرین و ریزا به معنی ریشه مشتق شده است. گلابرا به معنای صاف و بدون کرک است که اشاره به بدون کرک بودن میوه این گیاه دارد [۲، ۱]. این گیاه به واسطه دارا بودن متابولیت‌های ثانویه در ریشه خود در دنیا حائز اهمیت بوده و مورد توجه صنایع دارویی، غذایی و حتی دخانیات قرار دارد. این گیاه از گیاهان بومی ایران و گیاهی مرتعی و قابل توجه در امر صادرات در عرصه های طبیعی می‌باشد.

یکی از مهم‌ترین ترکیبات فعال در ریشه این گیاه ماده‌ای به نام گلیسیریزیک اسید با فرمول ($C_{42}H_{62}O_{16}$) است که از دو واحد اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیسرتنیک (آگلیکون) تشکیل شده است (شکل شماره ۱). اسید گلیسیرتینیک اسید، بخش ساپوژنی مولکول گلیسیرزین است. این ترکیب، پودر کریستالی سفید رنگ بوده که به راحتی در اتانول حل می‌شود. میزان حلالیت این ترکیب در آب کم بوده و در اتر و کلروفرم حل نمی‌شود. این ترکیب خاصیت ضدالتهاب داشته و به نام انکسولون در فارماکوپه‌ها شناخته می‌شود. میزان اثر ضد التهابی آن شبیه هورمون کورتیزن می‌باشد. همچنین این ترکیب دارای خاصیت خلط‌آوری (اکسپکتورانت) می‌باشد [٤، ۳].

از دیگر اثرات این ترکیب می‌وان به ممانعت از ترشح اسید معده، بهبود زخم معده و اثنی عشر، بهبود اختلال عملکرد کبد، درمان کهیر و ضایعات پوستی، ضد حساسیت، ضد التهاب کبد، رفع اگزما و بثورات پوست اشاره نمود.

به دلیل خواص دارویی قابل توجه و در نتیجه اهمیت تجاری و اقتصادی این ترکیب، روش‌های مختلف و متفاوت استخراج آن از ریشه شیرین‌بیان مورد مطالعه قرار گرفته است. این مقاله به بررسی روش‌های مختلف به کار رفته در جداسازی و تعیین مقدار این ترکیب از گیاه شیرین‌بیان پرداخته است. برای دستیابی به مقالات علمی مربوطه، از سایت‌های معتبر علمی نظیر Science direct، PubMed، SpringerLink، Scholar Google، SCOPUS، Elsevier، Sid، Iran doc و همچنین کتابخانه‌های الکترونیکی برخی از دانشگاه‌های داخل کشور و در حداکثر فاصله زمانی موجود استفاده شده است.



شکل شماره ۱- ساختار گلیسیریزیک اسید

روش‌های جداسازی اسید گلیسیریزیک از گیاه شیرین‌بیان

روش استخراج با حلال

در این روش پس از تهیه عصاره از ریشه گیاه، جداسازی اسید گلیسیریزیک بر اساس یکی از روش‌های زیر انجام می‌شود:

الف) عصاره‌ی تغلیظ شده با اسید سولفوریک واکنش داده می‌شود تا رسوب قهوه‌ایی به دست آید. این رسوب با آب شسته شده و به وسیله الکل استخراج می‌شود تا اسید گلیسیریزیک جداسازی شود. با اضافه نمودن محلول KOH به عصاره، نمک پتاسیم گلیسیرزین رسوب می‌نماید. سپس این رسوب فیلتر شده و به روش کریستال نمودن مجدد در اسید استیک به طور خالص در می‌آید [۵].

ب) نمک آمونیوم گلیسیریزین با اسید سولفوریک و اسید استیک به مدت ۹۰ دقیق رفلاکس می‌شود. پس از سرد شدن و فیلتراسیون، گلیسیرزینک اسید استات به صورت کیک مانند حاصل می‌شود. در مرحله بعد، به وسیله کلروفرم استخراج می‌شود. عصاره تغلیظ شده و کریستال‌های باقی‌مانده به وسیله مخلوطی از اتانول، سیکلو هگزان و بوتانل خالص می‌شوند. به منظور شکستن باندهای استاتی در اسید گلیسیرزینک استات با محلول اتانول و NaOH رفلاکس می‌شود. سپس مخلوط سرد شده و با استفاده از اسید کلریدریک pH آن به ٤ رسانده می‌شود، در این حالت اسید گلیسیرزنیک رسوب می‌نماید. اسید به دست آمده در اتانول رنگبری شده و با اضافه نمودن آب پودر سفید رنگ رسوب می‌نماید. این روش زمان‌بر بوده و بازده پایین (حدود ۱۱ درصد) دارد [۵].

ج) ابتدا گلیسیرزین به وسیله استن و اسید نیتریک ۳ درصد از ریشه شیرین‌بیان استخراج می‌شود. سپس رسوب گلیسیرزینات آمونیوم با اضافه نمودن محلول آمونیاک به عصاره تشکیل می‌شود. این نمک در استیک اسید کریستاله شده و در آب نامحلول است. در مرحله بعدی محلول استات سرب ۱۰ درصد به منظور تولید رسوب گلیسیرزینات سرب اضافه شده و فرایند به وسیله صاف کردن و شستشو به وسیله اتانول ادامه می‌یابد. با عبور دادن H_2S از میان محلول، سولفید سرب رسوب نموده و گلیسیریزیک اسید آزاد می‌شود. با توجه به استفاده از H_2S، این روش چندان ایمن نمی‌باشد. همچنین کیک به دست آمده که حاوی اسید گلیسیریزنیک استات است، ناخالصی‌های زیادی دارد. به منظور خالص‌سازی آن از هگزان استفاده می‌شود. این فرایند در دمای اتاق صورت می‌گیرد زیرا دمای بالا موجب حل شدن اسید گلیسیریزیک استات شده و بازده را کاهش می‌دهد [۵].

از محلول NaOH جهت شکستن باندهای استاتی و هیدرولیز اسید گلیسیریزیک استات استفاده می‌شود. به منظور بی‌رنگ کردن کیک قهوه‌ای به دست آمده، کربن فعال در ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول در دمای جوش به کار برده می‌شود. در یک تحقیق بازده این روش در جداسازی گلیسیرزین ۲۸/۵ درصد گزارش شده است.

روش اصلاح شده روسین (Modified Roussin Technique)

مهم‌ترین و متداول‌ترین تکنولوژی برای استخراج گلیسیریزیک اسید از ریشه شیرین‌بیان، استفاده از آب داغ در دمای محیط در حضور افزودنی‌هایی نظیر مواد قلیایی، اسیدهای معدنی، اتیل الکل، آمونیاک محلول در متانول یا اتانول و ... است. اساس این روش استخراج با آب گرم و تشکیل رسوب به وسیله اسیدی نمودن است. بدین‌صورت که ابتدا استخراج عصاره به وسیله آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفته و سپس با اسیدیفیکاسیون عصاره به وسیله اضافه نمودن اسیدهای HCl و H_2SO_4 غلیظ به نسبت حجمی ۱:۱ برای تشکیل ترکیبات جامد نمک گلیسیریزیک اسید در pH= ۱ – ۲ انجام می‌شود [۸ – ٦].

جهت حذف اسید از رسوب جداسازی شده، چندین بار شستشو انجام می‌شود. تخلیص نهایی رسوب با استفاده از اتانول صورت می‌گیرد. بازده به دست آمده گلیسیریزیک اسید در این روش ٢٤ درصد می‌باشد.

روش استخراج با آب داغ تحت فشار (Pressurized Hot Water Extraction)

سیستم آزمایشگاهی Pressurized Hot Water Extraction یا PHWE برای استخراج حرارتی ترکیبات

قطبی و غیرقطبی در اغلب گیاهان دارویی به ویژه برای استخراج گلیسیریزین از شیرین‌بیان، بربرین از زرشک و ... استفاده شده است. آب یک حلال ویژه است که خصوصیات فیزیکی آن با افزایش دما تغییر می‌کند و در دماهای بالا شبیه یک حلال آلی عمل می‌کند. اخیراً محققین برای کاهش خطرات ناشی از آلودگی حلال‌های آلی مورد استفاده در این روش، به استفاده از واسطه های میسل (micello) به عنوان جایگزین حلال‌های آلی در فرایندهای استخراج پرداخته‌اند.

در این روش، ریشه‌ها به قطعات کوچک ۱/۵ – ۱ سانتی‌متری خرد شده و در آب سرد به مدت ۲٤ ساعت غوطه‌ور می‌شوند. این امر، موجب سهولت استخراج و حذف ترکیبات مزاحم موجود در پودر خشک می‌شود. در این سیستم محفظه تحت فشار قرار می‌گیرد تا آب به صورت مایع باقی بماند. دستگاه آزمایشگاهی شامل اتوکلاوی است که می‌تواند در فشار ۲۰۰ بار و دمای تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد عمل نماید. این فشار توسط گاز CO_2 ایجاد می‌شود. آب تحت فشار (PHWE) در این روش در یک اتوکلاو گرم می‌شود. گلیکوزیدهای موجود در شیرین‌بیان عموماً در ترکیب با پتاسیم و کلسیم هستند که خاصیت اسیدیته ضعیف دارند. فرم اسیدی گلیسیریزین چندان در آب حل نمی‌شود اما نمک آمونیومی آن در آب در pH بیشتر از ٤/٥ حل می‌شود و خواص ضد التهابی دارد.

برای تشکیل نمک آمونیومی اسید گلیسیرزیک، مخلوط آب و آمونیاک به نسبت ٤ – ۰/۰۱ درصد وزنی- حجمی تهیه و به راکتور استخراج کننده افزوده می‌شود. جهت ایجاد فشار از سلیندر CO_2 استفاده شده و محلول به دست آمده پس از صاف شدن جهت تصفیه وارد مرحله بعدی می‌شود [۹].

بالا بودن مقدار آمونیاک در آب موجب افزایش گروه‌های آمونیاک در نمک به دست آمده می‌شود. غلظت بهینه آمونیاک ۰/۰۱ درصد می‌باشد. در غیر این صورت فرایند خالص‌سازی می‌بایست انجام گیرد. به این‌صورت که به محصول نهایی اتانول ۷۰ درصد با نسبت ۳:۱ اضافه می‌شود. محلول تشکیل شده جداسازی و تغلیظ شده و با اضافه نمودن تدریجی اسید سولفوریک، pH محلول کنترل می‌شود. رسوب سفید مونو آمونیوم گلیسیرزات (MAG) در ۲-۱ =pH تشکیل می‌شود. در این روش اضافه کردن NH_3 بیشتر، موجب تشکیل نمک دی و تری ـ گلیسیرزات آمونیوم خواهد شد. در نهایت رسوب از محلول جداسازی شده و به وسیله اتانول مطلق شسته می‌شود. رسوب سفید به دست آمده مونو آمونیوم گلیسیرزات (MAG) است که یک شیرین‌کننده طبیعی محسوب می‌شود. در این فرایند بازده مونو آمونیوم گلیسیرزات به دست آمده که با روش رنگ‌سنجی تعیین شده ۳/۵ درصد گزارش شده است.

روش استخراج با میکروویو Microwave Extraction

در این روش عصاره‌ی شیرین‌بیان با استفاده از آب گرم و دستگاه میکروویو استخراج می‌شود. ابتدا به ۵ گرم از پودر گیاه، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه می‌شود. دما حدود ۱۱۰ درجه و فشار ۱/۵ بار با سلیندر CO_2 تنظیم می‌شود. زمان این فرایند ۱۵ دقیقه است. با اضافه نمودن اسید سولفوریک و رساندن pH به حدود ۲ – ۱، گلیسیریزیک اسید رسوب می‌نماید. به نمونه خنک شده جهت خالص‌سازی نهایی، اتانول مطلق اضافه می‌شود [۱۰].

در این روش، حلال مصرفی به ازای هر گرم نمونه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و طول مدت ٤ – ۳ دقیقه، ۱۰ میلی‌لیتر و درصد خلوص گلیسیرزیک اسید ۱٦/٤٤ درصد می‌باشد. با افزایش دمای واکنش به ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و زمان واکنش به ۱۵ دقیقه، حلال مصرفی به ازای هر گرم نمونه، ٦۰ میلی‌لیتر و درصد خلوص به ۹٦/۵ درصد افزایش می‌یابد. بهترین حلال در این روش آب گزارش شده است [۱۱].

از مهم‌ترین دلایل افزایش درصد بهره‌ی استخراج و خلوص در روش دوم می‌توان به کاهش چگالی گرانروی، کشش سطحی و قطبیت آب با افزایش دما اشاره نمود. این فرآیند موجب استخراج بیشتر گلیسیریزیک اسید از بافت گیاهی می‌شود در یک تحققی بازده استخراج اسید گلیسیرزیک ۳۳ درصد گزارش شده است. همچنین ساختار بسیار قطبی گلیسیریزیک اسید به دلیل حضور سه گروه کربوکسیل و ۵ گروه هیدروکسیل تحت تأثیر اشعه مایکروویو، به استخراج آن از عصاره گیاه به داخل آب کمک می‌نماید [۱۲].

روش استخراج با سیستم‌های مایع چند فازی

از سیستم دو فازی حلال شامل اتانول/ فسفات نیز برای جداسازی گلیسیرزین از گیاه شیرین‌بیان استفاده شده است. اما بازده بسیار پایین، از معایب این روش می‌باشد [۱۳]. به منظور افزایش بازده، جایگزینی سیستم سه فازی مایع پیشنهاد شده است [۱٤]. در این سیستم‌های سه فازی، استفاده از پلی اتیلین گلیکول، پلی‌پروپیل گلیکول و تری بوتیل فسفات (TBP) بسیار مرسوم می‌باشد [۱٤].

در این روش از گیاه، با استفاده از محلول آمونیاک ۰/۵ درصد حجمی – حجمی و دستگاه ماوراء صوت، عصاره گیاه استخراج می‌شود. محلول به دست آمده صاف شده و به وسیله آب مقطر شسته می‌شود. در مرحله بعد جهت جداسازی گلیسیریزیک اسید از عصاره از سیستم سه فازی مایع شامل: حلال‌های آلی نظیر ۲- اتیل هگزان یا تری بوتیل فسفات، نمک‌های معدنی مانند سولفات آمونیوم و پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰، ٤۰۰۰ و ٦۰۰۰ به عنوان پلیمر به کار برده می‌شود [۱۳].

این سیستم مخلوط شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به هم زده می‌شود. با استفاده از اسید سولفوریک ۲ مولار یا هیدروکسید سدیم ۱ مولار pH آن تنظیم می‌شود. پس از سانتریفوژ محلول به مدت ۵ دقیقه، سه فاز در آن شامل: فاز بالایی مربوط به فاز آلی، فاز میانی غنی از کوپلیمر و فاز آبی پائینی تشکیل می‌شود. نتایج آنالیز سه فاز تشکیل شده نشان می‌دهد که ۹۰ درصد از لیکورتین (فلانویید اصلی گیاه شیرین‌بیان) در فاز میانی جداسازی شده است. در pH= ۲ مقدار گلیسیریزیک اسید در فاز آلی و میانی یکسان و ۵۰ درصد گزارش شده است. اما با افزایش اسیدیته محیط به ٤، گلیسیریزیک اسید تشکیل شده از فاز آلی به فاز میانی مهاجرت می‌نماید.

روش استفاده از رزین‌های ماکرو و متخلخل پلیمری

در این روش عصاره گیاه شیرین‌بیان به وسیله‌ی مخلوط حلال‌های اتانول/ آب به نسبت ۷۰:۳۰ حجمی – حجمی و دستگاه فراصوت استخراج می‌شود. سپس محلول سانتریفوژ شده و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء ۱۰ برابر تغلیظ می‌شود. این محلول از رزین‌ها مختلف عبور داده می‌شود [۱٦، ۱۵].

در مطالعات مختلف عملکرد ٤ نوع رزین متداول با تخلخل بالا برای جداسازی عصاره‌ی فاقد گلیسرزین حاوی فلاونویید ارزیابی شده است. خواص جذب و واجذب فلاونوییدهای شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید روی چهار رزین xDA-1، LSA-10، D101 و LSA-20 مقایسه شده است. ظرفیت جذب به شدت به pH محلول تغذیه و نوع محلول تغذیه بستگی دارد. در این مطالعه رزین xDA-1 ظرفیت جذب بالایی برای فلاونوییدهای شیرین‌بیان و گلیسیریزیک اسید بر اساس منحنی ایزوترم جذبی خود نشان داد. یک عصاره روغنی غنی از فلاونویید (LFO) (با خلوص حدود ۲۱/۹ درصد) عاری از گلیسیریزیک اسید و یک عصاره‌ی گلیسیریزیک اسید با درصد خلوص ٦٦ درصد از عصارهٔ خام جداسازی شد [۱٦]. باید توجه داشت که، این روش برای جداسازی گلیسیرزیک اسید از فلاونوییدهای کل استفاده شده است و به تنهایی برای جداسازی یک فلاونویید به کار برده نشده است. این روش برای جداسازی آنتوسیانین از انگور و ... نیز به کار رفته است [۱٦].

رزین‌های ADS یک سری از رزین‌های جذب ماکروپروس هستند که به وسیله Nankai معرفی شده‌اند. این رزین‌ها به ویژه برای جذب انتخابی فلاونویید از محلول‌های آبی و غیر آبی به کار رفته‌اند. در این روش ذرات با الک مش ٦۰ – ۲۰ جدا می‌شوند. فرایند جذب سه مرحله‌ای است. در هشت نوع رزین مورد مطالعه ظرفیت جذب با افزایش زمان جذب افزایش می‌یابد. در بین رزین‌های مطالعه شده، رزین ADS-F8 قدرت بالایی در استخراج داشته است. در محدوده دمایی مطالعه شده (۲۰ تا ٤۵ درجه سانتی‌گراد)، دمای پایین باعث قدرت جداسازی بهتر ایزولیکورتین (ISL) روی رزین ADS-F8 شده است. در شرایط بهینه، بازده ۸۰/۱ درصد به دست آمده است [۱۷].

روش استخراج مایع تحت فشار Pressured Liquid Extraction

این روش شامل استفاده از مایع در دما و فشار بالا است که در مقایسه با روش‌هایی که در دمای محیط انجام می‌شوند،

کارایی بیشتری دارد. اصول این روش شبیه روش PHWE است با این تفاوت که در سیستم PHWE از آب به عنوان حلال استفاده می‌شود. همچنین افزایش دما موجب افزایش حلالیت و افزایش انتقال جرم می‌شود. استخراج مایع تحت فشار به عنوان یک روش سبز در استخراج ترکیبات گیاهی و غذایی کاربرد دارد. از مزایای این روش قابلیت استفاده مجدد از حلال مورد استفاده می‌باشد.

دو نوع تجهیزات شامل تجهیزات دینامیکی و استاتیکی برای این روش وجود دارد. در نوع دینامیکی، حلال مورد استفاده برای استخراج، به صورت پیوسته روی گیاه پمپ می‌شود و نیاز به پمپ فشار بالا دارد. سیستم‌های جدید هر دو قسمت دینامیکی و استاتیکی را با هم داشته و توانایی تولید حلال تازه در طول فرایند را دارند.

در تجهیزات استاتیکی، ضمن فرایند استخراج، یک یا چندین بار حلال تازه اضافه می‌شود. در حالی که در سیستم دینامیکی سرعت جریان در طول زمان تنظیم و پمپ با سرعت ثابت جریان حلال اولیه را ایجاد می‌نماید. در این روش محدوده‌های مختلف دما و فشار، از دمای محیط تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲۰۰ – ۳۵ بار به کار برده می‌شود. با توجه به اینکه حضور رطوبت در ماتریکس نمونه، کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین هیدروماتریکس جهت جذب رطوبت از بافت نمونه استفاده می‌شود. انتخاب نوع هیدروماتریکس بر اساس ماهیت نمونه و میزان رطوبت موجود در آن صورت می‌گیرد. در استخراج استاتیکی، دما و زمان استخراج دو پارامتر بحرانی هستند. کارایی استخراج بستگی به حلالیت ترکیب مورد استخراج، حلال استخراج کننده و فراکسیون کردن جزء مورد استخراج بین آب و حلال دارد. برای غلبه بر محدودیت حجم استخراجی، افزایش تعداد سیکل‌ها پیشنهاد می‌شود [۱۸].

روش استفاده از سورفاکتانت‌های غیریونی آبی

جهت استخراج گلیسیرزیک اسید، روش‌های گوناگونی نظیر استخراج با حلال، جذب، کروماتوگرافی، کریستاله کردن و ترکیبی از این روش‌ها به کار برده می‌شود. غالب این روش‌ها زمان‌بر، کم بازده و هزینه‌بر هستند. اخیراً گزارش شده است که محلول‌های سورفاکتانت غیریونی می‌توانند به عنوان جایگزین سیستم حلال در PLE باشد [۱۹].

سورفاکتانت‌ها، مولکول‌های Amphiphilic هستند، که یک سر آن قطبی یا آب دوست بوده و دم آن عموماً زنجیرهٔ هیدروکربنی با تعداد اتم‌های کربن مختلف و آب‌گریز است. یکی از مهم‌ترین خواص سورفاکتانت‌ها ایجاد خاصیت حل‌شوندگی برای مواد با خواص مختلف است. در این نوع استخراج که به استخراج نقطه ابری نیز شناخته شده است، از مواد فعال سطحی استفاده می‌شود که دارای ساختار R-X بوده که R زنجیر هیدروکربنی بوده و X یون قطبی و آب دوست می‌باشد. طبقه‌بندی رایج این مواد بر اساس طبیعت گروه آبدوست آنها می‌باشد که به چهار گروه غیریونی، کاتیونی، آنیونی و یون دوقطبی تقسیم می‌شوند. مولکول‌های فعال سطحی می‌توانند در محلول‌های آبی تجمع یابند و میسل‌ها را ایجاد نمایند. کمترین غلظت ماده فعال سطحی موردنیاز برای تولید میسل، غلظت بحرانی نامیده می‌شود. هنگامی که محلول شامل غلظت بحرانی از ماده فعال سطحی غیریونی حرارت داده می‌شود در یک محدوده دمایی شروع به کدر شدن می‌کند که به آن دمای نقطه ابری می‌گویند. در حقیقت محلول به دو فاز تبدیل می‌شود. یک فاز غنی از سورفاکتانت و فاز آبی. دمای نقطه ابری به ساختار سورفاکتانت و غلظت آن بستگی دارد. در خصوص استخراج گلیسیرزیک اسید از عصاره شیرین‌بیان، استفاده از ترکیباتی نظیر سدیم دودسیل سولفات SDS و تریتون ۱۰۰ – ٦ نسبت به حلال‌های آلی کارایی بهتری را نشان داده‌اند. استفاده از سورفاکتانت‌ها باعث کاهش تجزیه ترکیبات گیاهی در مقایسه با روش PHWE می‌شوند [۲۲، ۲۱، ۲۰]. در این روش، به منظور حذف یا کاهش استفاده از حلال‌های ارگانیک و بهبود فرایند استخراج، از استخراج با آب داغ تحت فشار (PHWE) نیز استفاده می‌شود.

برای استخراج استاتیک ـ دینامیک با آب، استفاده از SDS در فشار ۱۵۰ و دمای ۲۲۵ – ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد پیشنهاد شده است. اگرچه SDS به طور موفق در استخراج ترکیبات غیرقطبی نظیر پلی آروماتیک‌های هیدروکربنی در خاک استفاده

می‌شود، سورفاکتانت غیریونی نظیر تریتون ۱۰۰-x نیز موجب افزایش کارایی استخراج ترکیبات آب‌گریز حتی در دمای پایین در گیاه می‌شود. در فرایند استخراج با این نوع سورفاکتانت، نیازی به استفاده از آب وجود ندارد مگر اینکه قطبیت ترکیب گیاهی مورد استخراج خیلی پایین باشد.

کارایی روش استخراج با استفاده از سورفاکتانت مانند SDS و ترتیون ۱۰۰-x با روش استفاده از حلال آلی مقایسه شده است. افزایش دما در این روش از ۱۸۰ - ۱۲۵ درجه سانتی‌گراد موجب افزایش بازده بازیابی استخراج ترکیبات فعال مورد نظر گیاهی می‌شود. جهت جریان آب و شکل هندسی ظرف استخراج حداقل تأثیر در این روش را داشته است.

مطالعات نشان داده است که SDS به نسبت تریتون باعث افزایش بیشتر بازده استخراج گلایسیریزین شده است. حضور سورفاکتانت آنیونی مانند SDS نسبت به تریتون ۱۰۰ در جریان استخراج، موجب افزایش حلالیت استخراج شونده مورد هدف از ماتریکس نمونه به فاز متحرک و در نتیجه افزایش کارایی استخراج می‌شود. همچنین عملکرد این روش با روش ماوراء صوت همراه با حلال آلی مقایسه شده است. این مدل استخراج به جهت سادگی سیستم طراحی، عدم استفاده از حرارت و فشار منظم قابل توجه است [۲٤، ۲۳].

روش‌های تعیین مقدار گلیسیریزیک اسید

روش‌های مختلفی نظیر رنگ‌سنجی، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (High Performance Liquid Chromatography یا HPLC)، الکتروفورز لوله موئین (Capillary Zone Electrophoresis یا CZE) و کروماتوگرافی لوله موئین الکتروسنیتیکی میسل (Micelle Electrokinetic Capillary Chromatography یا MECC) و برای تعیین مقدار گلیسیریزیک اسید در گیاه شیرین‌بیان استفاده شده‌اند. این مطالعات نشان داده‌اند که نتایج به دست آمده در دو روش HPLC و MECC بسیار به یکدیگر نزدیک بوده و دارای دقت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها می‌باشند [۲۷، ۲٦، ۲۵].

روش آنیلین/ اسیدسولفوریک

در این روش برای تعیین بازده محصول نهایی از روش رنگ‌سنجی استفاده می‌شود. ابتدا نمونه با آب مقطر با نسبت ۱:۱۰۰ رقیق می‌شود. ۱ میلی‌لیتر از نمونه رقیق شده به محلولی شامل ۱ میلی‌لیتر محلول وانیلین ۸ درصد در اتیل الکل مطلق و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد در حمام یخ اضافه و جهت یکنواخت نمودن، هم زده می‌شود. سپس لوله آزمایش روی حمام بخار ۰/۵ ± ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به هم زده شده و ۵ - ۲ دقیقه در حمام یخ سرد می‌شود. محلول بلانک نیز به روش مشابه آماده می‌شود. باید توجه داشت در تهیه محلول بلانک به جای ۱ میلی‌لیتر محلول رقیق شده، ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله اضافه می‌شود. جذب محلول رنگی (قهوه‌ایی ـ سبز) به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۷۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. غلظت مادهٔ شیرین‌کننده با ترسیم منحنی کالیبراسیون بر حسب غلظت ماده معلوم محاسبه می‌شود [۲٦، ۲۵].

روش الکتروفورز موئین

در این روش از ستون موئینه سیلیکای ذوب شده و آشکارساز ماوراء بنفش استفاده می‌شود. جذب در طول موج ۲۵٤ نانومتر خوانده می‌شود. بافر مورد استفاده در این روش محلول ۰/۰۲ مول بر لیتر از دی پتاسیم هیدروژن فسفات و بوراکس (pH=۹) است. عصارهٔ گیاه در محلول متانول - آب به نسبت ۱:۱ در ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه به هم زده می‌شود. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ می‌شود. محلول به دست آمده به وسیله فیلتر سلولز استاتی صاف می‌شود. سپس آنالیز گلیسیرزین انجام می‌شود [۲۸].

روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

در استاندارد ملی ایران و فارماکوپه (BP) از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای تعیین مقدار اسید گلیسریزیک استفاده شده است [۳۲ - ۲۹]. در این روش محلول منوآمونیوم گلیسیرزات به عنوان ماده استاندارد مرجع

به کار می‌رود. فاز متحرک شامل: اسید استیک، استونیتریل و آب می‌باشد. سه غلظت ۰/۵، ۰/۷۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از ماده استاندارد و سه غلظت ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم از عصاره حل شده در آب مقطر با درجه خلوص مناسب تهیه و به دستگاه HPLC تزریق می‌شود. سپس غلظت اسید گلیسیرزیک موجود در نمونه مورد آزمایش از روی ترسیم منحنی کالیبراسیون و مقایسه با سطح زیر منحنی نمونه محاسبه می‌شود.

نتیجه‌گیری

ارزش تجارت شیرین‌بیان در سال ۲۰۰۷، در دنیا ٤۲ میلیون دلار برآورد شد. در ایران سالیانه صدها تن از ریشهٔ گیاه شیرین‌بیان با نام لیکوریس (Licorice) به صورت پودر، جامد و مایع صادر و فرآورده‌های آن به کشور وارد می‌شوند. از عصاره این گیاه در کشورهای پیشرفته دنیا ۵۰۰ نوع فرآورده تولید می‌شود [۳۳].

در این مقاله به بررسی روش‌های مختلف جهت جداسازی، خالص‌سازی و تعیین مقدار گلیسریزیک اسید پرداخته شده است. این روش‌ها را می‌توان به چند دسته کلی تقسیم‌بندی نمود:

۱- جداسازی با حلال‌های آلی: این روش‌ها شامل مراحل زیاد و همچنین مصرف حلال‌های زیادی هستند. به منظور غلبه بر این مشکلات، روش‌های جدید ارائه و توسعه یافته‌اند.

۲- جداسازی با آب: در این روش‌ها از آب در فشار محیط، فشار بالا و یا گاهی از دستگاه‌های کمک‌کننده به امر استخراج مانند ماوراء صوت استفاده می‌شود. بازده محصول به دست آمده با استفاده از آب در فشار محیط چندان قابل قبول نمی‌باشد. در روش‌های با فشار بالا بازده بهتر بوده و با افزایش دما، بازده استخراج نیز افزایش می‌یابد. همچنین افزایش فشار نیز موجب افزایش حلالیت NH_3 در آب شده بنابراین سرعت واکنش افزایش خواهد یافت. از مزایای به کارگیری امواج ماوراء صوت می‌توان به سرعت بالا و مصرف نسبتاً قابل قبول حلال اشاره نمود. در این روش هم با افزایش دما و زمان استخراج، افزایش بازده مشاهده می‌شود.

۳- جداسازی با استفاده از روش‌های ترکیبی: در این روش‌ها از مخلوط حلال‌های آلی و آب استفاده می‌شود. همچنین ممکن است فشار بالا نیز به کار برده شود. مزیت اصلی این روش‌ها، کاهش استفاده از حلال‌های آلی مضر و توسعه تکنیک‌های جدید استخراج سازگار با محیط زیست است. این روش‌ها بویژه به دلیل استفاده از حلال آب بسیار قابل رقابت با تکنیک های متداول استخراج است.

٤- جداسازی با رزین‌های ماکرو و متخلخل پلیمری: رزین‌های پرتخلخل، پلیمرهای هیدروفیل قطبی یا غیرقطبی با ظرفیت جذب بالا و قدرت احیای مناسب هستند. خالص‌سازی در طول جذب بر اساس تفاوت وزن مولکولی و قطبیت محلول که منجر به تفاوت در تمایل به جذب می‌شوند، اتفاق می‌افتد. از مزایای این روش سهولت فرایند، هزینه پایین، کارایی بالا می‌باشد.

۵- جداسازی با سورفاکتانت‌های غیریونی آبی: سورفاکتانت‌ها با داشتن هر دو بخش آب دوست و آب گریز به تشکیل ذراتی به نام میسل کمک می‌نمایند. محلول آلی سورفاکتانت‌های غیریونی به دلیل خواص ویژه خود می‌توانند جایگزین حلال‌های آلی فرار شوند. از مزایای این روش عدم استفاده از حلال‌های آلی و جایگزینی آنها با محلول سورفاکتانت می‌باشد. استفاده از سورفاکتانت‌ها باعث کاهش تجزیه ترکیبات گیاهی بویژه در مقایسه با برخی روش‌های استخراج می‌شود. استفاده از سیستم میسلی باعث افزایش فاکتور تغلیظ و در نتیجه افزایش بازیابی می‌شود. همچنین این روش آسان، ارزان، ایمن، غیر سمی و دارای کاربرد گسترده می‌باشد. از نقطه نظر تجزیه‌ای یکی از مهم‌ترین خواص مواد فعال سطحی (سورفاکتانت‌ها) ظرفیت بالای آنها برای حل کردن گونه‌های مختلف می‌باشد که اجازه می‌دهد در حضور مقادیر پایینی از آنها، مواد با حلالیت پایین و نامحلول در آب، به راحتی در آب حل شوند.

با توجه به ارزش تجاری این گیاه و وجود مواد اولیه در داخل، فراوری آن نیز می‌تواند عمدتاً در داخل انجام شده و فرآورده‌های حاصل از آن صادر شوند. از مهم‌ترین دلایل عدم انجام فراوری در این گیاه، علی‌رغم وجود تعداد قابل توجه

واحد صنعتی فعال کشور در زمینه تولید عصاره خام شیرین‌بیان می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- غالب روش‌های مرسوم در تولید و فراوری عصاره شیرین‌بیان قادر به تولید گلیسیریزیک اسید با خلوص مورد نظر استانداردهای مربوطه نمی‌باشند.

تکنیک‌های متداول آن معایبی نظیر زمان طولانی استخراج، مصرف بالای حلال، استفاده از حلال‌های آلی سمی و خطرناک، بازده پایین و دمای استخراج بالا دارند. بنابراین نیاز به یک روش مؤثر و اقتصادی جهت تهیه عصاره با کیفیت بالا، فراوری آن و تولید متابولیت‌های خالص مطابق با استانداردهای مربوطه وجود دارد.

منابع

1. Chandler F. Herbs Everyday Refrence for Healt professionals. *Canadian Pharmacists Association and the Canadian Medicinal Association* 2000; 58: 181 - 4.

2. Akhondzadeh S. Encyclopedia of Iranian Medicinal plants. Institue of Medicinal Plants. ACECR. 2000, pp: 213.

3. Dan L, Dandan S and Gang G. The synthesis of 18β-glycyrrhetinic acid derivatives which have increased antiproliferative and apoptotic effects in leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chem*. 2007; 15: 5432 - 9.

4. Khanahmadi M, Naghdi Badi H, Akhondzadeh S, Khalighi – Sigaroodi F, Mehrafarin A, Shahriari S, Hajiaghaee R. A Review on Medicinal Plants of *Glycyrrhiza glabra* L. *J. Medicinal Plants* 2013; 46: 1 - 12.

5. Amini M and Sotudeh R. Optimal extraction of Glycyrrhetinic Acid from Licoric root. *Journal of Food Technol*. 2005; 3: 576 - 80.

6. Association of official Analytical Chemists, official method. 2002, 982: 19.

7. Tian M, Yan I and Row K. Extraction of GA and Glabridin from licorice. *International Journal of Molecular Sci*. 2008; 9: 571 - 7.

8. Sedaghat N. study of sweetening and giving taste properties of Glycyrrhizin and extract of Glycyrrhiza glabra in chocolate. Dissertation of agriculture engineering – food industries, MS degree, Tarbiat Modares University. 1369, p: 45.

9. Mukhopadhyay M and Panja P. A novel process for extraction of natural sweetner from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots. *Separation and Purification Technol*. 2008; 63: 539 - 45.

10. Renmin W, Chan L, Jingliang L and Fang Y. Pressured Microwave-assisted Hydrolysis of Crude Glycyrrhizic Acid for Preparation of Glycyrrhetinic Acid. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 2012; 20: 152 - 7.

11. Pan X, Liu H, Jia G and Shu Y. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Biochemical Engineering J*. 2000; 5: 173 – 7.

12. Zeng QH. Study on extraction process of glycyrrhetic acid and glycyrrhetinic acid. *Journal of Zunyi Normal College* 2006; 8: 62 - 4.

13. Tianwei T, Huo A and Ling A. Purification of GL and Fro G. Uralensis Fish with ethanol/phosphate aqueous two phase system. *Biotechnol. Lett.* 2002; 24: 1417 - 20.

14. Shen S, Chang J, Liu X, Sun X, Hu X and Liu H. Separation of glycyrrhizic acid and liquritin from *Glycyrrhiza uralensis* Fish extract by three-liquid-phase extraction systems, *Separation and Purification Technol*. 2007; 53: 216 - 23.

15. Wang QE, Ma SM, Fu BQ, Lee FSC and Wang X. Development of multistage countercurrent extraction technologhy for the extraction of glycyrrhizin acid from Licoric. *Biochem. Eng. J.* 2004; 21: 285 - 92.

16. Fu B, Liu J, Huan L, Liu L, Lee FSC and Wang X. The application of macro-porous resins in the separation of licorice flavonoids and

glycyrrhizic acid. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1089: 18 - 24.

17. Yang F-j and Yang M. Preparative enrichment and separation of isoliquirtigenin from licorice extracts with macro porous resins. *Journal of Medicinal Plants Res*. 2011; 5: 1741 - 8.

18. Mustafa A and Turner Ch. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2011; 703: 8 - 18.

19. Choi MPK, Chan KKC, Leung HW and Huie CW. Pressurized liquid extraction of active ingredients from medicinal plants using nonionic surfactant solutions. *Journal of Chromatography A*. 2003; 983: 81 - 9.

20. Kiathevest K, Sasaki M, Pavasant P and Shotipruk A. Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution. *Separation and Purification Technol*. 2009; 66211: 111 - 7.

21. Sun C, Xie Y, Tian Q and Liu H. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2005; 305: 42 - 7.

22. Niu G, Xre Y, Lou J and Liu H. Isolation and purification of glycyrrhizic acid with solvent extraction. *Sep. Purify. Technol*. 2005; 44: 189 - 96.

23. Wee Eng AT, Heng MY and Ong SE. Evaluation of surfactant assisted pressurized liquid extraction for the determination of glycyrrhizin and ephedrine in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*. 2007; 583: 289 - 95.

24. Chen S and Zhao PX. The Cloud Point Extraction of Glycyrrhizic Acid by a Non-ionic Surfactant System. *Chinese Journal of Applied Chem*. 2010; 11: 1351 - 5.

25. Peng J, Wang F and Zhu M. Determination of glycyrrhizic acid in glycyrrhiza preparations with capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Se Pu*. 1999; 17: 90 - 2.

26. Guanbin L, Hongyi Z, Yuquan F, Liang Z and Zhide H. Migration behavior and separation of active components in Glycyrrhiza uralensis Fisch and its commercial extract by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatography A*. 1999; 863 (1): 105 – 14.

27. Jiang A. Preparative purification of glycyrrhizin extracted from the root of licorice using high-speed counter-current chromatography. *Pharm. Chem. S*. 2004; 31: 183 - 6.

28. Sabbioni C, Mandrioli R, Ferranti A and Bugamelli F. Separation and analysis of glycyrrhizin, 18β-glycyrrhetic acid and 18β-glycyrrhetic acid in licorice roots by means of capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr*. 2005; 1081: 6571. 65 - 71.

29. Glycyrrhiza glabra- Glycyrrhizic acid measuring in extract using High-performance liquid chromatography, analyzing method. Standard and industrial research institution of Iran. Standard no. 6699.

30. Iso 11023. Liquorice extracts (*Glycyrrhiza glabra* L.)- Determination of glycyrrhizic acid content-method using high performance liquid choromatography. 1999, p: 21.

31. Yang L, Tiny-ting L and Yaangang Z. Development of sample preparation method for isoliquirtignion, Liquirtin and glycyrrhizic acid analysis licorice by ionic liquids-ultrasound based extraction and high-performance liquid chromatography detection. *Food Chem*. 2013; 138: 173 - 9.

32. The British Pharmacopoeia. Vol. 2. London: British Pharmacopoeial Commission; 2009, pp: 1 - 3.

33. Beacley WZ, Howord S and Bell AD. Separation of Major components in Licorice using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*. 1979; 175: 350 - 5.