

Journal Pre-proofs

A multi-stage counter-current process for extracting glycyrrhizic acid from the licorice plant

Zeinab Azizi Haghighat¹, Aliakbar Safekordi, Azim Akbarzadeh and Mehdi Ardjmand

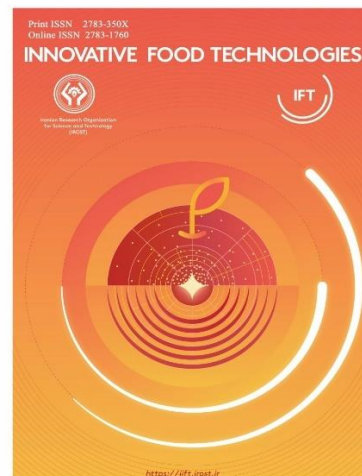
DOI: <https://doi.org/10.22104/ift.2025.7485.2207>

To appear in: Innovative Food Technologies (IFT)

Received Date: 22 April 2025

Revised Date: 24 August 2025

Accepted Date: 24 August 2025



Please cite this article as: Zeinab Azizi Haghighat¹, Aliakbar Safekordi, Azim Akbarzadeh and Mehdi Ardjmand, A multi-stage counter-current process for extracting glycyrrhizic acid from the licorice plant, *Innovative Food Technologies* (2025), doi: <https://doi.org/10.22104/ift.2025.7485.2207>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2023 The Author(s). Published by iroost.org.

مقاله پژوهشی

فرآیند چند مرحله ای با جریان متقابل برای استخراج گلیسیریزیک اسید از گیاه شیرین بیان

زینب عزیزی حیقت^۱، علی اکبر سیف کردی^۲، عظیم اکبرزاده خیایوی^۳، مهدی ارجمند^۴

۱- دانشجوی دکتری مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- دکترای مهندسی شیمی، عضو هیئت علمی دانشگاه صنعتی شریف تهران

۳- استاد، بخش نانو بیو تکنولوژی پابلوت، انستیتو پاستور ایران، تهران

۴- دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران جنوب

چکیده

در این تحقیق، عصاره ریشه شیرین بیان به روش استخراج چند مرحله ای با جریان متقابل در مقیاس بنچ، استخراج و میزان اسید گلیسیریزیک موجود در آن مورد بررسی قرار گرفت. تاثیر پارامترهای مختلف از جمله دما، زمان، تعداد مراحل استخراج و نسبت حلال (اتانول و آمونیاک غلیظ) به جامد ارزیابی شد. شرایط بهینه استخراج از طریق روش آماری سطح پاسخ تعیین گردید. نتایج تحلیل آماری نشان داد که سه متغیر دما، زمان و تعداد مراحل استخراج تأثیر معنی داری بر باده استخراج دارند. براساس بهینه سازی با معیار بیشینه سازی پاسخ، شرایط بهینه به صورت زمان ۵/۹۸ ساعت، دمای ۴۶/۱۷ درجه سلسیوس، نسبت حلال به جامد ۷/۷۰ cc/gr، تعداد مراحل ۴ به دست آمد. در این شرایط بازده استخراج گلیسیریزیک اسید ۷۸/۷ بود.

واژه های کلیدی: استخراج چند مرحله ای، شیرین بیان، اسید گلیسیریزیک، سطح پاسخ

گیاهان دارویی یکی از منابع غنی کشور محسوب می‌شوند که امکان صادرات آنها نیز وجود دارد. ایران از لحاظ آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی در زمینه رشد گیاهان دارویی یکی از بهترین مناطق جهان محسوب می‌گردد و در گذشته هم منبع تولید و مصرف گیاهان دارویی بوده است. شیرین بیان یکی از مهمترین گیاهان دارویی و صنعتی است که از تولیدات آن به شکل‌های مختلف و کاربردهای متنوع از جمله صنایع داروسازی و صنایع غذایی استفاده می‌شود.

شیرین بیان^۱ متعلق به خانواده fabaceae است که عمدتاً در جنوب اروپا و آسیا رشد می‌کند. ریشه شیرین بیان به دلیل خواص نرم کنندگی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد حساسیت، آنتی اکسیدانی، محافظت کننده دستگاه گوارش و ضد سرطان به طور گسترده در طب گیاهی استفاده می‌شود. عصاره شیرین بیان در محصولات مختلفی مانند شربت های سرفه، آدامس‌ها، نوشیدنی‌ها و تنباکو برای افزایش شیرینی استفاده می‌شود [۱]. این گیاه متعلق به تیره اصلی بقولات^۲ و تیره فرعی پروانه واران^۳ و از راسته گل سرخیان^۴ است [۳،۲]. شیرین بیان^۵ یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که از لحاظ اقتصادی ارزش بالایی دارد و به طور گسترده برای کاربردهای مختلف مورد پژوهش قرار گرفته است [۴]. بوته این گیاه به ارتفاع ۳۰-۶۰ سانتیمتر است و به نوع گیاه و شرایط اقلیمی محل رویش بستگی دارد که گل‌های آبی یا بنفش رنگی دارد. ریشه‌های آن ۱۵-۲۰ سانتیمتر هستند و شکل میله‌ای استوانه‌ای با قطر ۵/۰-۵/۲ سانتیمتر دارند [۵،۶،۷].

ریشه شیرین بیان حاوی ترکیبات متعددی از جمله قندها (تا ۱۸ درصد)، فلاونوئیدها، استرول‌ها، اسیدهای آمینه، صمغ‌ها، نشاسته‌ها، اسانس‌ها و ساپونوزیدها است. مهمترین ساپونین موجود در ریشه شیرین بیان اسید گلیسیریزیک (GA, C42H62O16) که از دو واحد اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیسرتنیک آگلیکون تشکیل شده است [۸-۱۶]. اسید گلیسیریزیک دارای وزن مولکولی ۸۲۲/۹۱ گرم می‌باشد. این ماده به شکل کریستال‌های بی‌رنگ در دمای ۱۷۰ درجه سانتیگراد نرم بوده و در ۲۰۵ درجه سانتیگراد ذوب می‌گردد. در دماهای پایین در الکل و اتر تقریباً نامحلول است که با افزایش دما نیز حلالیت آن در آب، الکل و اسید استیک افزایش می‌یابد [۱۷]. گلیسیریزیک اسید از لحاظ کاربردی از اهمیت بالایی برخوردار است و اخیراً فناوری استخراج GA از شیرین بیان بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است [۱۸-۲۰]. روش‌های معمول استخراج شامل روش‌های سوکسله، استخراج جامد-مایع و استخراج مایع-مایع می‌باشد که این روش‌ها با مصرف زیاد حلال، زمان استخراج طولانی، افزایش احتمال تخریب ترکیبات ناپایدار گرمایی همراه می‌باشند [۲۱]. به علاوه روش‌های غیرمتداول و جدید که برای استخراج مورد استفاده قرار می‌گیرد مثل استخراج با روش‌های امواج فراصوت [۲۲]. استخراج با حلال فوق بحرانی [۲۳] و استخراج جامد-مایع فشار بالا [۲۴] به ابزارهای پیشرفته و انرژی زیاد نیاز دارند. بنابراین این روش‌ها در مقیاس‌های صنعتی برای استخراج محصول دارای محدودیت هستند و گاهی غیر ممکن می‌باشند. در این پروژه از فناوری استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل^۶ (MSCE) به عنوان تکنیک جایگزین استفاده شده است. در این فناوری استخراج پویای چرخه‌ای با استخراج با جریان متقابل پیوسته ترکیب شده [۲۵] و موجب بهبود انتقال حرارت و جرم می‌شود که در کنار کاهش مصرف حلال باعث افزایش بهره‌وری استخراج شده است. این دستاوردها روش استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل را به تکنولوژی دلخواه برای استفاده در مقیاس صنعتی معرفی کرده است [۲۶]. استخراج موثر و مطلوب محصول تابع پارامترهای فرآیند مثل اندازه ذرات نمونه، غلظت حلال، نسبت حلال به ماده خشک، دما و زمان استخراج می‌باشد. بهینه کردن این پارامترها و بهبود کیفیت محصول نهایی مهمترین چالشی است که برای کاربردی کردن هر تکنولوژی در مقیاس صنعتی باید در نظر گرفته شود. در این راستا محققان به بهینه سازی پارامترهای مهم در

¹ Glycyrrhiza glabra

² Leguminosae

³ Fabaceae

⁴ Rosales

⁵ Licorice

⁶ multi-stage countercurrent extraction

بازیابی ترکیبات با ارزش از ضایعات صنعتی روی آورده‌اند [۲۷,۲۸]. در سال ۲۰۰۰ استخراج لئونوروس از این روش انجام شده است. همچنین برای استخراج پلی فنول‌های چای سبز از روش MSCE استفاده شده است [۲۹]. در سال ۲۰۰۴ ونگ و همکاران فناوری‌های متنوعی را برای استخراج گلیسیریزیک اسید بکار گرفتند که عبارت بودند از: استخراج تک مرحله‌ای، استخراج دو مرحله‌ای، استخراج ریزموج، استخراج با امواج فراصوت و استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل، نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که در استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل بیشترین بازده استخراج بدست می‌آید. تعداد مراحل استخراج تاثیر قابل ملاحظه‌ای روی بازده استخراج نداشته است. همانطور که نتایج نشان داد بازده تئوری استخراج با سه مرحله ای به ۹۳/۳٪ و با ۵ مرحله ای به ۹۸/۴٪ رسید [۳۰].

در سال ۲۰۰۵ استخراج گلوکورافارین از کارداریا بصورت تک مرحله‌ای و چند مرحله‌ای با روش MSCE انجام شد و در طی فرآیند سه مرحله ای استخراج محصول بالای ۹۰ درصد رسید [۳۱].

صفارزاده و همکاران در سال ۲۰۱۸ از استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل (MSCE) برای تولید عصاره پلی فنولی با غلظت بالا از تفاله های انار و انگور برای مقاصد تجاری استفاده کردند که در مقایسه با استخراج یک مرحله‌ای، MSCE با کاهش میزان حلال مصرفی (۸ میلی‌لیتر در گرم در مقابل ۳۰ میلی لیتر بر گرم) و دمای استخراج (۴۰ درجه سانتی گراد در مقابل ۶۵ درجه سانتی گراد) عملکرد و کارایی بهتری داشته است؛ همچنین عنوان گردید که این روش جداسازی موجب کاهش مصرف انرژی و جلوگیری از تخریب مواد زیست فعال می شود [۳۲].

در سال ۲۰۱۸ خان احمدی و همکاران گزارش کردند که بالاترین راندمان استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان ۵۴/۹٪ در شرایط زمان استخراج ۱۷ ساعت، نسبت حلال به جامد ۱۰ میلی لیتر بر گرم، pH ۱۰ و درجه حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد به روش بهینه سازی سطح پاسخ بود [۳۳].

در سال ۲۰۱۵ شب خیز و همکاران استخراج اسید گلیسیریزیک را از شیرین بیان تحت فشار بررسی کردند. بیشترین بازده استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان در فشار ۱۵ بار و درجه حرارت ۹۰ درجه سانتیگراد بود. آنها حداکثر استخراج اسید گلیسیریزیک را ۵۱/۵۷۰ میلی گرم بر گرم نمونه خشک به دست آوردند [۳۴].

در سال ۲۰۲۰ نصری و همکاران تاثیر اندازه ذره و قطر ریشه شیرین بیان بر میزان استخراج اسید گلیسیریزیک با استفاده از التراسونیک را بررسی کردند. از روش طراحی تجربی فاکتوریل کامل و روش سطح پاسخ^۱ برای تعیین سطوح پارامترها و مدل کردن پاسخ استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل اندازه ذره ریشه شیرین بیان در سه سطح (۱۲۰، ۱۶۰، ۲۰۰-۳۵ مش) و قطر ریشه شیرین بیان در سه سطح (۱-۲، ۲-۳، ۳-۴ cm) بود. نتایج نشان داد که قطر ریشه شیرین بیان تاثیر معنی داری بر بازدهی اسید گلیسیریزیک داشت، در حالی که تاثیر معنی داری بر اندازه ذره مشاهده نشد [۳۵].

در روش استخراج با جریان متقابل، تماس مؤثر بین خوراک و حلال که از جهت‌های مخالف وارد سیستم می‌شوند همراه با امکان جابجایی چندجهتی حلال، موجب بهبود فرایند انتقال جرم می‌گردد. حداکثر بازده استخراج هنگامی حاصل می‌شود که مقدار ماده خام به حلال به حالت بهینه تنظیم شوند. در اغلب مطالعات، این فرآیند در دماهای نزدیک به دمای محیط (حدود ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شده است تا ضمن صرفه‌جویی در مصرف انرژی، از تخریب ترکیبات حساس به حرارت نیز جلوگیری شود [۳۲,۳۰]. علاوه بر این، این روش به دلیل کاهش احتمال افزایش دمای کنترل نشده، کوتاه بودن زمان عملیات و بازدهی مطلوب، نسبت به روش‌های مرسوم دارای مزیت‌هایی است. بر اساس مطالعات پیشین، با مصرف حجمی مشابه از حلال، بازده استخراج گلیسیریزیک اسید در روش جریان متقابل بیشتر از روش‌هایی چون سوکسله و اولتراسونیک گزارش شده است [۳۲,۳۰].

در این پژوهش، استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان به روش چندمرحله‌ای با جریان متقابل (MCE) در مقیاس بنچ و با بهره‌گیری از طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ انجام شد. در این راستا، اثر متغیرهای فرایندی شامل دما، زمان، تعداد مراحل

¹ RSM (Response surface methodology)

استخراج و نسبت حلال به جامد بر بازده کلی عصاره مورد بررسی آماری قرار گرفت. شرایط بهینه به منظور حداکثرسازی بازده استخراج، بر اساس مدل درجه دوم کامل، تعیین گردید. نتایج نشان داد که فرآیند MCE می‌تواند با کاهش مصرف حلال، زمان عملیات و دمای فرآیند، گزینه‌ای مؤثر برای استخراج ترکیبات حساس مانند اسید گلیسیریزیک باشد. نوآوری پژوهش حاضر در به‌کارگیری همزمان فرایند استخراج چندمرحله‌ای با جریان متقابل در مقیاس بنج و استفاده از روش آماری سطح پاسخ مبتنی بر مدل درجه دوم کامل برای بهینه‌سازی استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین بیان است. در حالی که در مطالعات پیشین این روش‌ها عمدتاً به صورت مستقل یا در مقیاس‌های محدود بررسی شده‌اند، در این تحقیق برای نخستین بار مدل‌سازی اثر متقابل متغیرهای فرآیندی انجام شده و شرایط عملیاتی بهینه با قابلیت توسعه صنعتی ارائه گردیده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

ریشه شیرین بیان در (گونه گلیسرزا گلابرا papilionaceae) از استان فارس شهرستان مرودشت تهیه گردید اصالت گونه‌های گیاهی توسط دانشکده داروسازی (PMP/A) تأیید شده است. مونوآمونوم گلیسرزیک اسید با درجه خلوص ۹۹/۹ به عنوان استاندارد HPLC از شرکت سیگما^۱ خریداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق با خلوص بالا از شرکت مرک^۲ آلمان تهیه گردید.

۲-۲- تهیه پودر شیرین بیان

گونه‌ی گیاهی شیرین بیان با بررسی‌های دقیق گیاه‌شناسی، تطبیق با منابع فلور معتبر، و توسط متخصصان گروه فارماکوتوزی دانشکده داروسازی شناسایی و اصالت آن با کد نمونه‌ی گیاهی PMP/A تأیید گردید. ریشه‌های شیرین بیان پس از تمیز شدن و حذف گل و لای، با قیچی باغبانی به قطعات کوچک بریده شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته خشک گردیدند. سپس ریشه‌ها با آسیاب چکشی پودر شده و با اندازه ذرات ۰/۵ mm (مش ۳۵)، در کیسه‌های پلی‌اتیلنی و در فریزر با دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۳- فرآیند MSCE

شکل ۱ سیستم‌های چند مرحله‌ای جریان متقابل را به صورت ناپیوسته و پیوسته به ترتیب نشان می‌دهد. جریان‌های زیرین و بالایی به صورت جریان متقابل مداوم با یکدیگر جریان می‌یابند. در این سیستم گیاه در یک جهت و حلال در جهت دیگر حرکت کرده و در تماس با یکدیگر قرار می‌گیرند. اگر مقادیر حلال و مواد و نرخ جریان بهینه باشند، استخراج مواد موثره از گیاه به طور کامل امکان‌پذیر است. این فرایند بسیار کارآمد بوده و استخراج در زمان کمتری انجام می‌شود. عصاره کاملاً تغلیظ شده از یک طرف سیستم و گیاه بدون مواد موثره از طرف دیگر واحد خارج می‌گردد. با این روش در مقایسه با سایر روش‌ها با مقدار حلال کمتری می‌توان مقدار مشخصی از مواد موثره را از گیاه استخراج کرد زیرا محلول تغلیظ شده بعد از تماس با جامد تازه سیستم را ترک می‌کند.

شکل (۱). روش‌های عملیات در سیستم‌های استخراج جامد-مایع بر حسب جهت جریان (a) سیستم چند مرحله‌ای با جریان متقابل به صورت پیوسته و (b) سیستم چند مرحله‌ای با جریان متقابل به صورت ناپیوسته [۳۶].

Fig 1. Unit operations in solid-liquid extraction processes a) continuous multistage countercurrent, b) batch multistage counter-current

¹ Sigma

² Merck

در این تحقیق فرایند در دستگاه استخراج با جریان متقابل انجام شد که در شکل ۲ نشان داده شده است این دستگاه شامل ۷ واحد استخراجی می‌باشد. (البته در این کار از ۵ واحد آن استفاده شده است) این واحدها با یک لوله بهم وصل شده‌اند. هر واحد شامل یک مخزن استخراج و یک پمپ می‌باشد که بطور مستقل عمل می‌کند. شماتیک این دستگاه در شکل ۳ نشان داده شده است [۳۲]. استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل می‌تواند به دو بخش پیش استخراج و استخراج تقسیم شود. در مرحله پیش استخراج در هر واحد ۱۰ گرم از پودر آسیاب شده و مش بندی شده با ابعاد حدود ۰/۵ میلی متر با حلال یعنی ۹۸ میلی لیتر اتانول ۶۰ درصد و ۲ میلی لیتر آمونیاک غلیظ مخلوط شده و برای زمان مشخصی تحت استخراج قرار می‌گیرد. این زمان استخراج برای مخزن‌های مختلف متفاوت بوده و برای ایجاد گرادیان غلظتی طراحی شده است. برای مثال در ایجاد گرادیان غلظتی یک استخراج ۵ مرحله ای ترتیب زمانی غوطه ورسازی در واحدهای EU1 تا EU5 به ترتیب T/6، 2T/6، 4T/6 و 0 دقیقه می‌باشد. در پایان مرحله پیش استخراج، محلول استخراجی EU1 به EU5 منتقل شده و محلول‌های استخراجی EU2 و EU4 جابجا می‌شود و به واحد EU1 حلال تازه تزریق می‌شود و واحد EU3 هیچ تغییری نمی‌کند. بعد از تکمیل بخش پیش استخراج بخش دوم استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل شروع می‌شود که شرایط این استخراج بنا بر آزمایش‌های طراحی شده در نرم افزار در هر آزمایش متفاوت می‌باشد. شمایی از مراحل استخراج MSCE برای یک استخراج سه مرحله ای در شکل ۴ نشان داده شده است [۳۲].

شکل (۲). دستگاه استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل
Fig. 2. Multistage counterflow extraction device

شکل (۳). شماتیک دستگاه MSCE [۳۲]
Fig 3. Extraction flow and equipment schematic diagram

شکل (۴). مراحل استخراج برای استخراج جریان متقابل سه مرحله ای [۳۲]
Fig 4. Flow diagram of the three-stage MSCE process

۲-۴- آنالیز HPLC

آنالیز اسید گلیسیریزیک با استفاده از دستگاه HPLC (آمریکا، Waters Company) انجام شد. دستگاه شامل دو پمپ Waters 510 HPLC، آشکارکننده جذب قابل تنظیم Waters 486، آشکارکننده UV با طول موج ۲۵۴ nm، ستون C18 و شیر تزریق Waters U6K بود. زمان اجرا برای جداسازی کروماتوگرافیک ۱۵ دقیقه و زمان اقامت اسید گلیسیریزیک تقریباً ۶ دقیقه بود. حجم تزریق برای همه آزمایش‌ها ۱۰ میکرولیتر بود. پیک اسید گلیسیریزیک از طریق مقایسه زمان اقامت با استانداردها شناسایی گردید. روش استاندارد British Pharmacopoeia در این پژوهش استفاده گردید [۳۲].

۲-۵- روش آماری

روش بهینه سازی سطح پاسخ به دلیل صرفه جویی در زمان و هزینه سودمندتر از روش‌های متداول یک بهینه سازی می‌باشد. برای استخراج عصاره شیرین بیان با روش MSCE از طراحی آزمایش مرکب مرکزی^۱ با بکارگیری نرم افزار Design-Expert استفاده شد. در این مقاله به منظور بررسی شرایط بهینه استخراج، تاثیر پارامترهای مستقل (شامل تعداد مراحل، نسبت حلال به

¹ CCD (Central Composite Designs)

جامد، دمای استخراج و زمان استخراج) بر روی فرآیند استخراج گلیسیریزیک اسید از شیرین بیان با روش جریان متقابل از روش سطح پاسخ استفاده شد و تعداد ۳۰ آزمایش بر اساس روش طراحی مرکب مرکزی انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شرایط فرایندی با روش سطح پاسخ

تحلیل آماری و بهینه‌سازی فرآیند استخراج در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert و روش طراحی آزمایش مرکب مرکزی در قالب متدولوژی سطح پاسخ انجام شد. این رویکرد امکان مدل‌سازی دقیق، ارزیابی اثرات متغیرهای مستقل و تعیین شرایط بهینه فرآیند را فراهم نمود. RSM مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که برای بهینه‌سازی فرآیندهایی به کار می‌رود که پاسخ مورد نظر تحت تأثیر چندین متغیر قرار دارد. نمودارهای گرافیکی حاصل از مدل ریاضی، مبنای نام‌گذاری این روش به‌عنوان «سطح پاسخ» بوده‌اند. این طرح آماری با کاهش تعداد آزمایش‌ها، امکان برآورد کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم از جمله اثرات اصلی و اثرات متقابل بین عوامل را فراهم می‌کند. با توجه به هدف این پژوهش که بررسی تأثیرات اصلی و متقابل متغیرها بر بازده استخراج بود، روش RSM به‌عنوان طرح آماری مناسب انتخاب گردید. در این مطالعه، اثر متغیرهای مستقل شامل دما، زمان، تعداد مراحل استخراج و نسبت حلال به جامد مورد ارزیابی قرار گرفت [۳۸]. محدوده پارامترها و سطوح مورد استفاده در جدول ۱ و آزمایشات طراحی شده در جدول ۲ آورده شده است. در این روش اطلاعات به دست آمده از طراحی Central Composite با یک چند جمله‌ای مرتبه دوم به شرح زیر برازش می‌شود. مدل مورد استفاده در روش سطح پاسخ به طور معمول رابطه درجه دوم می‌باشد.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=0}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{معادله ۱}$$

در این رابطه، Y ، پارامتر پاسخ (شامل چهار متغیر وابسته فوق)، β_0 ، ثابت، β_i ، ضریب خطی، β_{ii} ، ضریب درجه دوم، β_{ij} ، ضریب تقابل و X_i و X_j پارامترهای مستقل هستند.

جدول (۱). محدوده پارامترها و سطوح مورد استفاده متغیرهای آزمایش

Table 1. The range of designed independent variables

جدول (۲). طراحی تجربی متغیرها و نتایج تجربی متغیر پاسخ

Table 2. Experimental design of variables and the test results of responses

۳-۲- ارزیابی پارامتر پاسخ گلیسیریزیک اسید استخراج شده

بر اساس جدول آزمایشات طراحی شده توسط نرم افزار آماری Design-Expert^۱، ۳۰ مورد استخراج نهایی انجام شد. جدول ۳ و ۴ نتایج آنالیز واریانس را برای مدل درجه دوم کامل با آثار متقابل به‌ترتیب در مورد پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که S/M تأثیر معنی‌داری بر اسید گلیسیریزیک نداشت. در حالی که (T، دما، N تعداد مراحل و t زمان) تأثیر معنی‌داری بر پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک داشت.

چنان‌که مشاهده می‌گردد F-Value مدل درجه دوم برابر با ۴۰/۱۸ است که بیانگر این است مدل معنادار است. که از تقسیم میانگین مربعات رگرسیون به میانگین مربعات خطا محاسبه می‌شوند. این پارامتر آزمونی برای مقایسه واریانس مدل با واریانس باقی مانده است. اگر واریانس‌ها به یکدیگر نزدیک باشند، این نسبت به یک نزدیک خواهد بود. مقدار بالای این پارامتر برای مدل بیانگر کارایی مدل است.

¹. Minitab

در مورد جملات درجه دوم، جمله C^2 (توان دوم پارامتر تعداد مراحل) A^2 دارای مقدار p-value کم تر از ۰/۰۵ است (۰/۰۰۰۱) و تاثیر معناداری بر مدل دارد. سایر جملات درجه دوم تاثیر معناداری بر مدل ندارند و می توانند از مدل حذف گردند. مقدار F-value مربوط به Lack of Fit در این مدل برابر با ۴/۱۷ است. بیانگر آن است که عدم برازش معنادار نیست. به عبارت دیگر مدل داده های تجربی را برازش میکند. $p\text{-value} > 0.05$ بر طبق آنالیز آماری از نتایج طراحی آزمایش، ضریب R-Squared برای گلیسیریزیک اسید مقدار ۰/۹۷۴۰ می باشد، و تایید می نماید که مدل پیشنهادی از طراحی آزمایش، هم خوانی و پوشش خوبی با داده های آزمایشگاهی دارد.

جدول (۳). نتایج ANOVA برای ارزیابی پارامتر پاسخ بازده گلیسیریزیک اسید در مورد مدل درجه دوم با آثار متقابل
Table 3. ANOVA for response surface full quadratic model including interactions for response of Glycyrrhizic acid yield

جدول (۴). آنالیز واریانس پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک
Table 4. The analysis of variance for reduced quadratic model with interactions on glycyrrhizic acid yield response

طبق نتایج تجربی معادله ۲ با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی، تابع پاسخ توسط یک معادله چندجمله ای درجه دوم برازش داده شد. این معادله بر حسب عوامل کدگذاری شده به صورت زیر ارائه شده است:

$$R1 = +67.24 + 3.10 * A + 4.03 * B + 12.81 * C - 0.97 * D - 1.51 * A * B - 1.14 * A * C - 0.21 * A * D + 1.78 * B * C + 0.14 * B * D - 0.99 * C * D - 13.03 * A^2 + 6.22 * B^2 - 20.53 * C^2 + 1.22 * D^2$$

معادله ۲

شکل ۵ نمودار باقیمانده ها بر حسب مقادیر پیش بینی شده را نشان می دهد. چنانکه مشاهده می شود نقاط در بین دو خط قرار دارند و بنابراین مدل به خوبی داده های تجربی را برازش می کند. شکل ۶ نمودار نرمال باقیمانده ها را برای پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک نشان می دهد. چنانکه مشاهده می شود نقاط بر روی خط راست قرار دارند و از توزیع نرمال تبعیت می کنند.

شکل (۵). نمودار باقیمانده ها بر حسب مقادیر پیش بینی شده در مورد پاسخ گلیسیریزیک اسید

Fig 5. The residuals against the predicted Glycyrrhizic acid yield response

شکل (۶). نمودار نرمال باقیمانده هادر مورد پاسخ گلیسیریزیک اسید

Fig 6. The normalized residuals plot for Glycyrrhizic acid yield response

۳-۳- نمودار سطح پاسخ سه بعدی

یکی از مزایای استفاده از طراحی آزمایش، بهینه سازی توسط نرم افزار و امکان بررسی تاثیرات متقابل فاکتورها بر دامنه پاسخ می باشد، به منظور بررسی این تاثیرات متقابل شکل های سه بعدی فاکتورها دو به دو رسم شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته اند.

شکل های (a-۷) و (b-۷) اثر فاکتورها بر فرآیند استخراج را نشان می دهند. همان طور که مشاهده می شود، با افزایش دما از ۲۵ تا حدود ۴۶/۱۷ درجه سانتی گراد، مقدار اسید گلیسیریزیک استخراج شده افزایش می یابد. این به دلیل افزایش نفوذپذیری حلال، کاهش ویسکوزیته و کشش سطحی و تسریع انتقال جرم است [۳۹]. با این حال، در دماهای بالاتر از ۴۶/۱۷ درجه، افزایش دما باعث کاهش پایداری ترکیبات فعال می شود که منجر به تثبیت یا حتی کاهش بازده استخراج می گردد. حداکثر استخراج در دمای ۴۶/۱۷ صورت می گیرد و افزایش دما تا ۵۵ درجه به معنی افزایش استخراج نیست. علاوه بر این، دماهای پایین تر به دلیل حفظ پایداری ترکیبات و صرفه جویی در مصرف انرژی ترجیح داده می شوند.

شکل های ۷-الف و ۷-ب. نمودارهای سه بعدی سطح پاسخ تاثیر دما، زمان، تعداد مراحل استخراج و نسبت خوراک به حلال روی پاسخ بازدهی اسید

گلیسیریزیک

Figures 7a and 7b. 3D response surface effects of solvent to solid ratio and temperature and time and stage number on Glycyrrhizic acid yield response

تأثیر متقابل زمان با فاکتورهای دیگر به این صورت است که در حالت کلی زمان اثر مستقیم با افزایش پاسخ دارد و مقدار استخراج گلیسیریزیک اسید در زمان‌های بالای ۴ ساعت نتایج بهتری نشان می‌دهند. در واقع وقتی جامدات زمان بیشتری در تماس با حلال قرار می‌گیرند باعث نفوذ بیشتر حلال به آنها شده و ترکیبات بیشتری استخراج می‌شود [۴۰].

۳-۴- شرایط بهینه استخراج MSCE گلیسیریزیک اسید برای دستیابی به مقدار بیشینه پاسخ‌ها

در این مطالعه، بهینه‌سازی فرآیند استخراج چند مرحله‌ای ریشه شیرین‌بیان با هدف بیشینه سازی مقدار اسید گلیسیریزیک پاسخ انجام شد. معیار بهینه سازی در نرم افزار Design-Expert بر اساس بیشینه کردن این پاسخ تعیین گردید. شرایط بهینه استخراج مطابق جدول ۵ شامل دمای ۴۶/۱۷ درجه سانتی‌گراد، زمان ۵/۹۸ ساعت، تعداد مراحل ۴ و نسبت حلال به جامد ۷/۷۰ است. مقدار پیش‌بینی شده بازده استخراج اسید گلیسیریزیک در این شرایط برابر با ۷۸/۷ درصد می‌باشد. آزمایش‌های تأییدی انجام شده مقدار تجربی نزدیک به این مقدار را نشان داد که اعتبار مدل و روند بهینه سازی را تأیید می‌کند.

جدول (۵). شرایط بهینه پیش بینی شده برای پاسخ بازدهی اسید گلیسیریزیک

Table 5. The predicted optimal conditions for glycyrrhizic acid yield response

۴-نتیجه گیری

در این مطالعه، اثر فناوری استخراج چندمرحله‌ای با جریان متقابل در استخراج اسید گلیسیریزیک از ریشه شیرین‌بیان در مقیاس پنج مورد بررسی قرار گرفت. بهینه سازی شرایط فرآیند استخراج با بهره‌گیری از روش سطح پاسخ (RSM) و مدل‌سازی آماری درجه دوم به منظور بیشینه سازی درصد استخراج اسید گلیسیریزیک انجام شد. پارامترهای زمان استخراج، دما، نسبت حلال به جامد و تعداد مراحل استخراج به عنوان متغیرهای مؤثر انتخاب و ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که مدل آماری به خوبی قادر به پیش‌بینی پاسخ‌های تجربی بوده و صحت آن توسط داده‌های آزمایشگاهی تأیید گردید. یافته‌ها حاکی از آن است که فناوری استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل، به عنوان روشی کارآمد با مصرف بهینه انرژی و حلال، و تولید محصولی با کیفیت بالاتر، قابلیت کاربرد در مقیاس صنعتی برای استخراج ترکیبات فعال گیاهان دارویی را دارا می‌باشد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تشکر و قدردانی

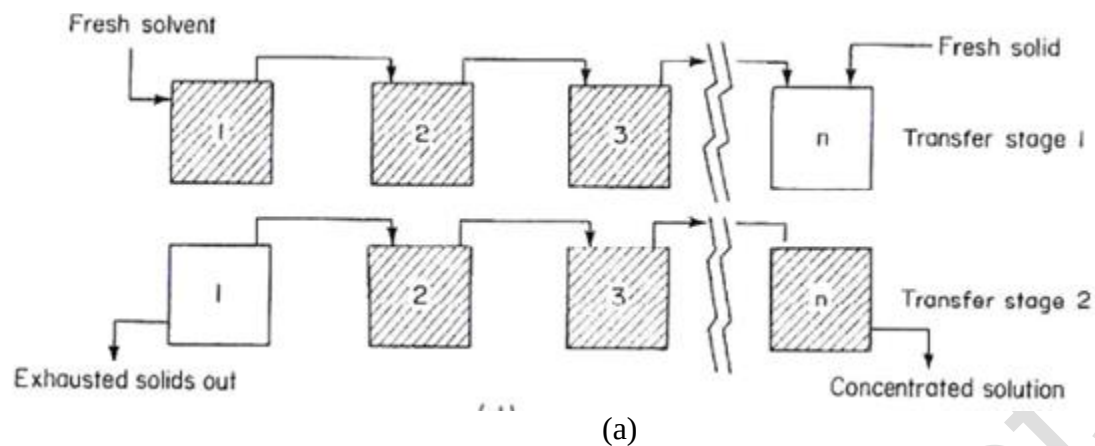
نویسندگان برخود لازم میدانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از پژوهشگاه علمی صنعتی ایران که در انجام پژوهش یاری دادند، اعلام کنند.

مراجع

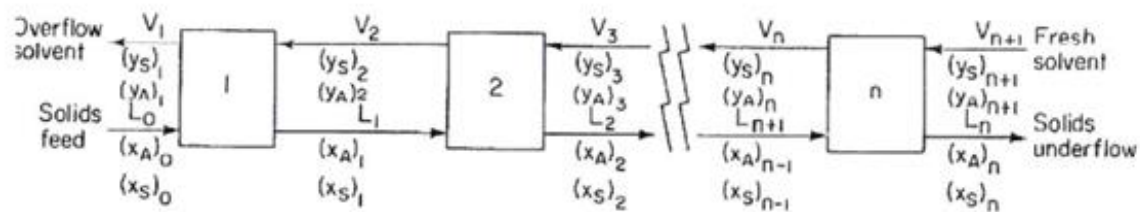
- [1] Isbrucker, R.A., Burdock, G.A., (2006). Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory Toxicology and pharmacology*, 46, 167-192.
- [2] Tolouizadeh, KH., (1941). Study on *Glycyrrhiza* products of Iran, Thesis of Medical Sciences, Tehran University.
- Vaya, J., Belinky, P., Aviram, M., 1997, Antioxidant Constituents from Licorice Roots: Isolation, Structure Elucidation and Antioxidative Capacity toward LDL Oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 23 (2), 302-313.
- [3] Lesan Khoshnik, GH., (1962). Kinds of Iran *Glycyrrhiza* and their growth locations. Thesis of Medical Sciences, Tehran University.
- [4] Fenwick, G. R., Lutomski, J. & Nieman C., (1990). Liquorice, composition, uses and analysis. *Food Chemistry*, 38, 119- 143.

- [5] Jaymand, K. & Rezaee, M., (2002). Evaluation of glycyrrhizin in Licorice root using high performance liquid chromatography. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 14, 1-14.
- [6] Kamali Servestani, R., (1991). Economical view on Glycyrrhiza. *Food Science Congress*, Shiraz.
- [7] Zargari, A., (1981). *Medicinal plants*, 3rd edition, Tehran University Publication.
- [8] Nezamabadi H, Rahimiyan Mashhadi H, Zand A and Alizadeh H., (2006). Ecophysiological aspects of Licorice rhizome. *Plant Diseases and Pests*; 74 (2): 45 – 62.
- [9] Martin RJ, Duglas MH and Heaney AJ., (1997). Yield and root distribution in a commercial licorice crop. *J. Crop and Food Res*, 40, 45 - 9.
- [10] Hough CAM., (1973) *Developments in sweeteners-1*, edited by Hough C A M. parker K J. Vlitos AJ. LTD London. 140 - 3.
- [11] Jiang Y, Lu TH and Chen F., (2004). preparative purification of glycyrrhizin extracted from the root of licorice using high-speed counter- current chromatography. *J. Chromatogr*, 1033, 183 -6.
- [12] Montoro P, Maldini M, Russo M, Postorino S, Piacente S and Pizza C., (2011). Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolilites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. *J. Pharmaceut Biomed Anal*, 54, 535 - 45.
- [13] Blumenthal M, Goldberg A and Brinckmann., (2000). *Expanded Commission E Monographs*. 1st ed. Integrative Medicine Communications. J.Herbal Medicine, USA. 233 - 5.
- [14] Alan Teck WE, Yuan HM and Shi OE., (2007). Evaluation of surfactant assisted pressurized liquid extraction for the determination of glycyrrhizin and ephedrine in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*, 583, 289 - 95.
- [15] Mehravar M., (1991). Extraction of licorice from licorice roots by pure water and one percent aqueous ammonia solution. M.Sc. Thesis. Shiraz University, Shiraz, Iran. 107. (In Persian).
- [16] Marzi V, Circella G and Vampa GM., (1993). Effect of soil depth on the rooting system growth in *Glycyrrhiza glabra* L. *ISHS Acta Horticulture*, 331, 71 - 8
- [17] Ibanogula, E. & Ibanogula, S., (2000). Foaming behavior of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. *Food Chemistry*, 70, 333– 336
- [18] X.J. Pan, H.Z. Liu, G.H. Jia., (2000). Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Biochem. Eng. J*, 5, 173– 177.
- [19] Y.L. Huang., (1997). Extraction of glycyrrhizin from licorice. *Guangzhou Food Sci. Technol*. 13 (3), 16–17.
- [20] X. Zhao, B.T. Li, X. Liu., (2000). Study on strengthening extraction of glycyrrhizic acid by ultrasound field. *Food Sci. Technol*. 5, 38–39.
- [21] Shehata, E., Grigorakis, S., Loupassaki, S., Makris, D.P., (2015). Extraction optimisation using water/glycerol for the efficient recovery of polyphenolic antioxidants from two *Artemisia* species. *Sep. Purif. Technol*, 149, 462–469. <https://doi:10.1016/J.SEPPUR.2015.06.017>.
- [22] Tabaraki, R., Heidarizadi, E., Benvidi, A., (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Sep. Purif. Technol*. 98, 16–23. <https://doi:10.1016/j.seppur.2012.06.038>.
- [23] He, L., Zhang, X., Xu, H., Xu, C., Yuan, F., Knez, Ž., Novak, Z., Gao, Y., (2012). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS+ assay. *Food Bioprod. Process*, 90, 215–223. <https://doi:10.1016/J.FBP.2011.03.003>.
- [24] Xi, J., Yan, L., (2017). Optimization of pressure-enhanced solid-liquid extraction of flavonoids from *Flos Sophorae* and evaluation of their antioxidant activity. *Sep. Purif. Technol*, 175, 170–176. <https://doi:10.1016/J.SEPPUR.2016.10.013>.
- [25] Wang, Q.E., Ma, S., Fu, B., Lee, F.S.C., Wang, X., (2004). Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Biochem. Eng. J*, 21, 285–292. <https://doi:10.1016/j.bej.2004.06.002>.
- [26] Xie, Z., Liu, X., Chen, Y., Wang, L., (2009). Pilot-Scale Multi-Stage Countercurrent Extraction of Scutellarein from *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz. *Sep. Sci. Technol*. 44, 1250–1260. <https://doi:10.1080/01496390902728801>.
- [27] Galanakis, C.M., Markouli, E., Gekas, V., (2013). Recovery and fractionation of different phenolic classes from winery sludge using ultrafiltration. *Sep. Purif. Technol*, 107, 245–251. <https://doi:10.1016/j.seppur.2013.01.034>.
- [28] Galanakis, C.M., Schieber, A., (2014). Editorial. *Food Res. Int*, 65, 299–300. <https://doi:10.1016/j.foodres.2014.11.019>.
- [29] Jiang, S.T., Pan, L.J., Huang, S.X., (1997). Study on the multistage countercurrent extracting green tea polyphenols with ethyl acetate. *J. Agric. Eng*, 4, 202–206.

- [30] Wang, Q.E., Ma, S., Fu, B., Lee, F.S.C., Wang, X., (2004). Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Biochem. Eng. J.* 21, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.06.002>.
- [31] Powell, E.E., Hill, G. a., Juurlink, B.H.J., Carrier, D.J., (2005). Glucoraphanin extraction from *Cardaria draba*: Part 2. Countercurrent extraction, bioactivity and toxicity testing. *J. Chem.Technol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1002/jctb.1274>.
- [32] Saffarzadeh-Matin, Fatemeh Masoudi-Khosrowshahi, (2018). Simultaneous separation and concentration of polyphenols from pomegranate industrial waste by multistage counter-current system; comparing with ultrafiltration concentration, *Separation and Purification Technology*, 204 ,261–275 . <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.083>.
- [33] Khanahmadi, M., Gaffarzadegan, R., Khalighi-Sigaroodi, F., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Hajiaghvae, R. (2018). Optimization of the *glycyrrhizic acid* extraction from *licorice* by response surface methodology, *Iranian Journal of Chemistry and Chemal Enineering*, 37 (1), 121-129
- [34] Shabkhiz, M.A., Eikani, M.H., Golmohammad, F., Bashiri Sadr, Z., (2015). Optimized Pressurized hot water extraction of *glycyrrhizic acid* from *Licorice* roots, *Innovative Food Technologies*, 2(4), 11-21. (In Persian). DOI:10.22104/JIFT.2015.200
- [35] Nasri, Z. (2022). Particle size and root diameter effects on the extraction of glycyrrhizic acid from licorice using ultrasonic: Full factorial experimental design and response surface methodology. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (2), 179-194. . (In Persian).
- [36] Schweitzer, P.A. (1979). *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers*: McGraw-Hill.
- [37] British Pharmacopoeia, (2009). *Medicines and Healthcare products Regulatory Agency*, London.
- [38] Sin, H.N., Yusof, S., Sheikh Abdul Hamid, N., Abd. Rahman, R., (2006). Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology. *J. Food Eng.* 74, 352-357.
- [39] Goto, M., Sato, M., Hirose, T., (1993). Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide, *J. Chem. Eng. JPN*, 26, 474-481.
- [40] Corrales, M., Fernández, A., Butz, P., Tauscher, B., Dm, P., (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *J. Food Eng.* 90, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.003>

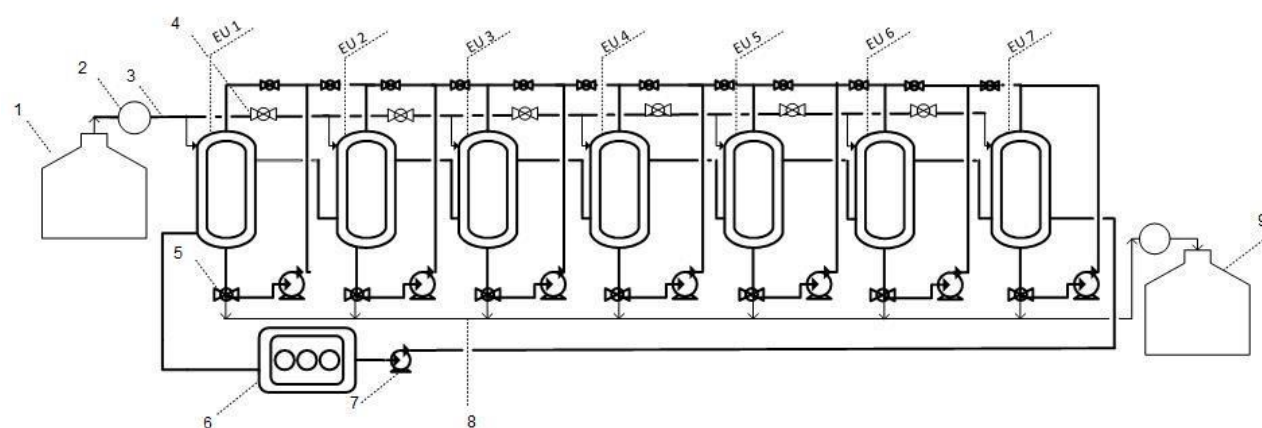


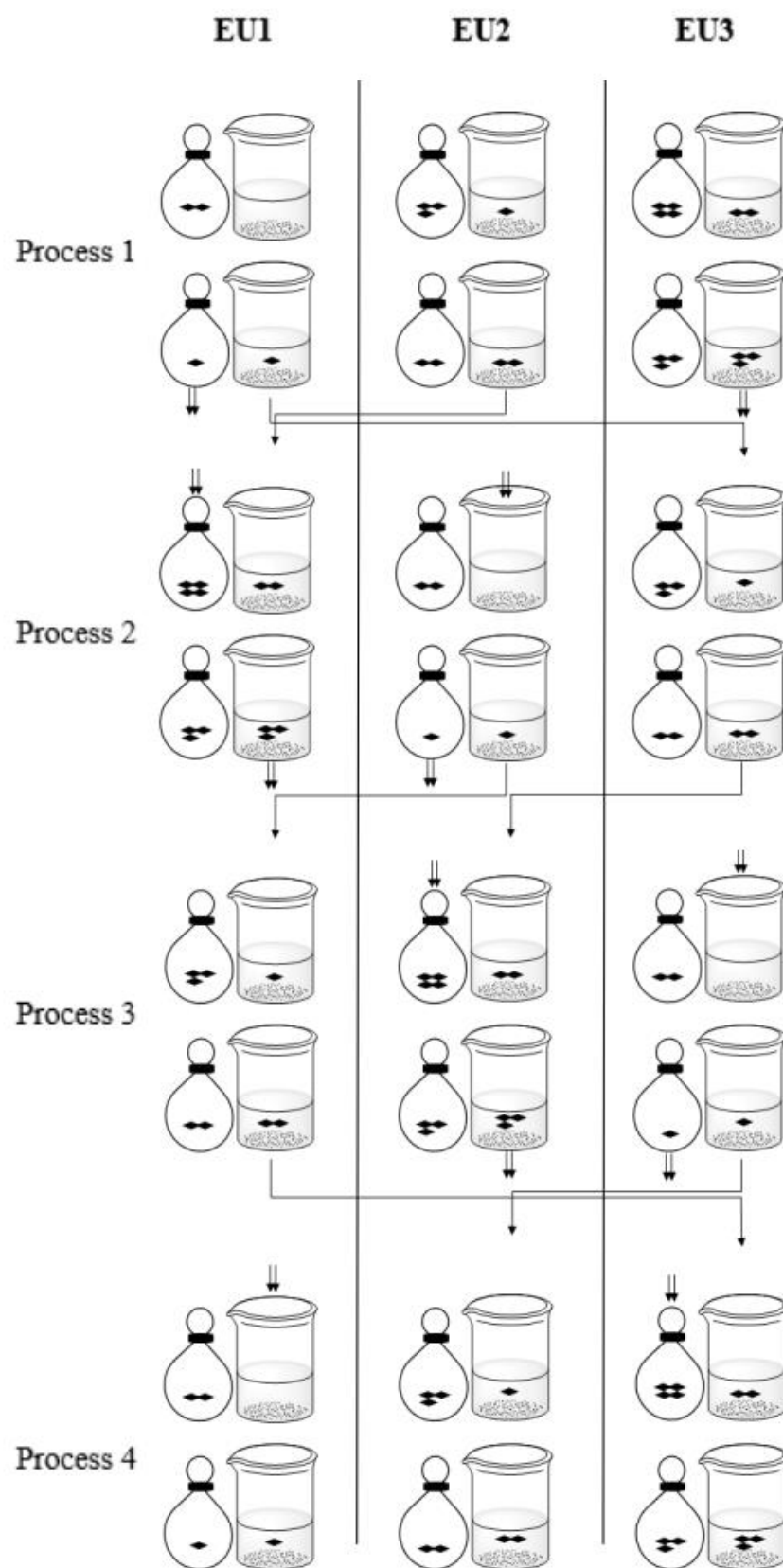
(a)



(b)

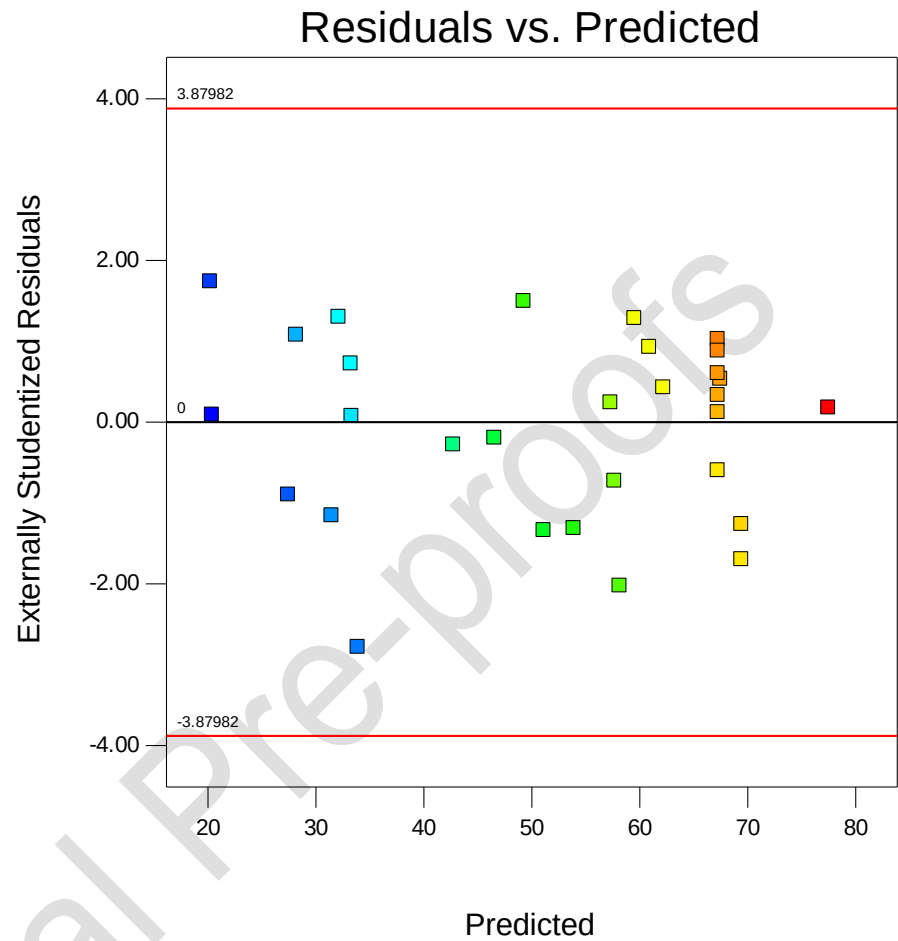






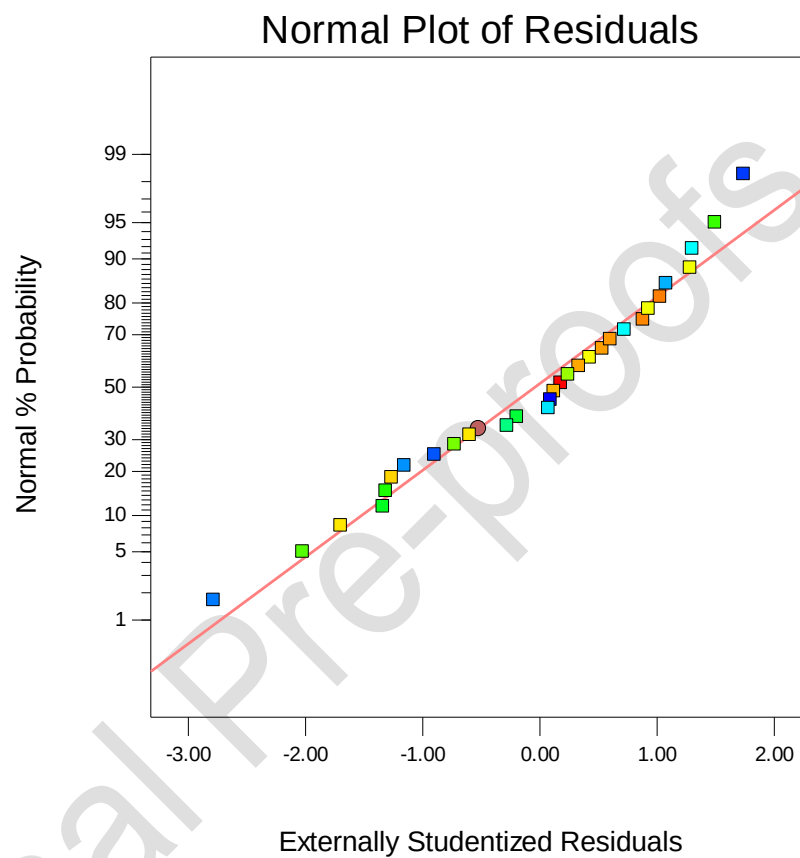
Design-Expert® Software
R1

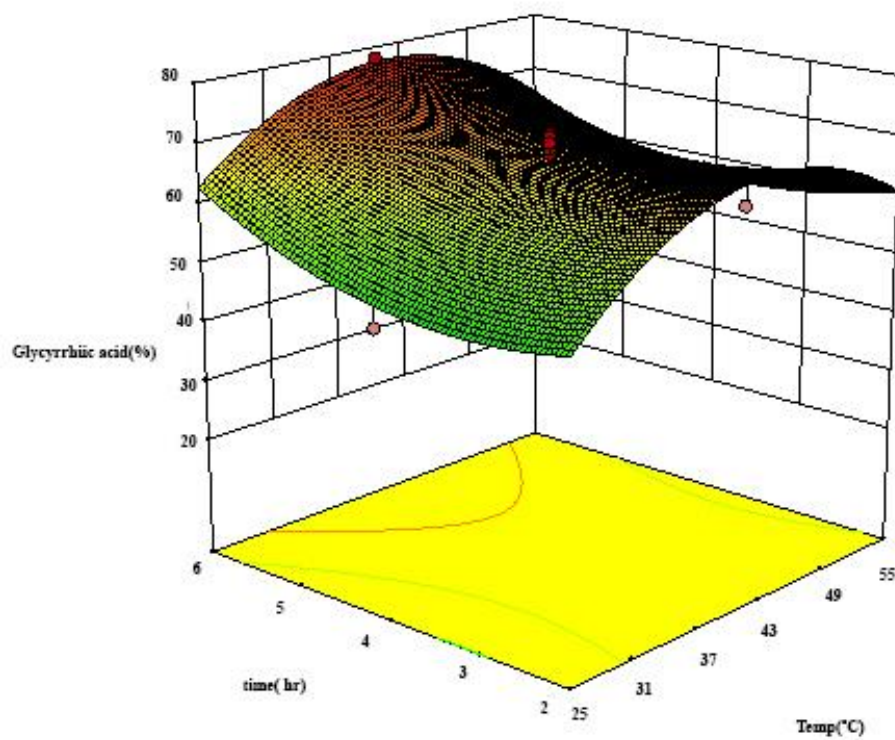
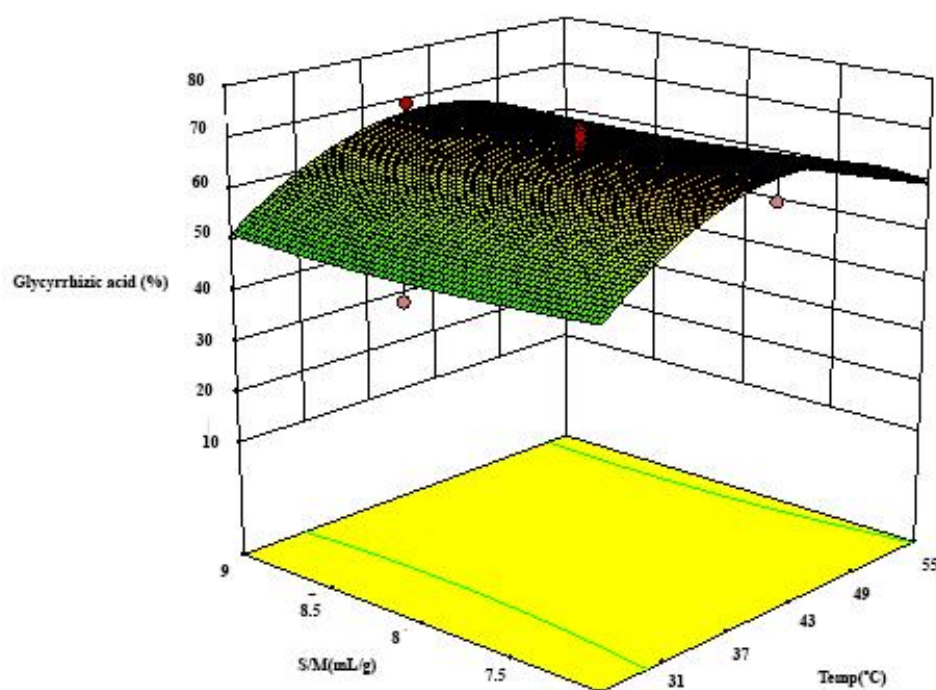
Color points by value of
R1:

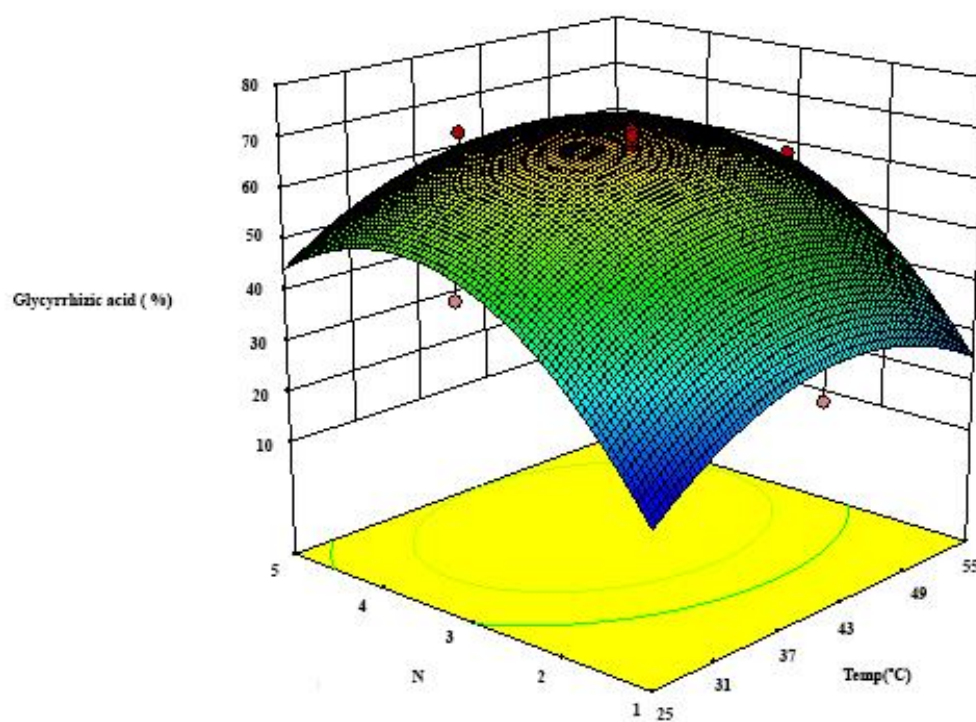
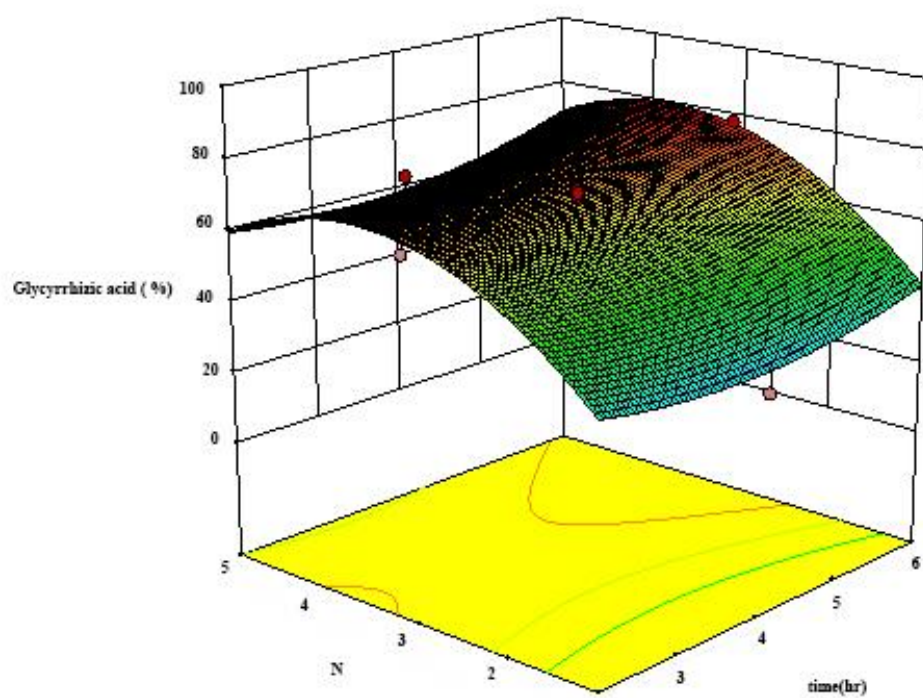


Design-Expert® Software
R1

Color points by value of
R1:







Factor	Name	Low Level	Mean Level	High Level
A	Temperature(°C)	25	40	55
B	Time(hr)	2	4	6
C	N	1	3	5
D	S/M(ml/g)	7	8	9

Run	A(°C)	B(hr)	C	D(ml/g)	Glycyrrhizic acid(%)
1	40	4	5	8	63
2	55	6	5	7	63.2
3	40	4	3	8	71
4	40	4	3	8	67.7
5	25	2	5	7	46.1
6	55	6	1	9	34.9
7	25	2	5	9	42.1
8	25	2	1	7	23.9
9	40	4	3	8	70.5
10	25	6	5	9	56
11	25	2	1	9	20.6
12	55	6	1	7	33.5
13	55	6	5	9	54
14	55	4	3	8	58
15	25	6	1	7	25.4
16	40	4	3	8	68.5
17	40	4	3	9	69
18	40	2	3	8	66
19	40	4	3	8	69.5
20	40	4	1	8	27.5
21	55	2	1	7	35
22	40	4	3	8	65
23	55	2	1	9	28.9
24	40	4	3	7	65
25	55	2	5	9	52.5
26	25	6	5	7	63
27	55	2	5	7	51
28	40	6	3	8	78
29	25	4	3	8	47.5
30	25	6	1	9	30.6

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	8374.58	14	598.18	40.18	<0.0001	Significant
A-T	172.98	1	172.98	11.62	0.00039	
B-t	292.01	1	292.01	19.62	0.0005	
C-N	2954.24	1	2954.24	198.44	<0.0001	
D-S/M	17.01	1	17.01	1.14	0.3019	
AB	36.30	1	36.30	2.44	0.1392	
AC	20.93	1	20.93	1.41	0.2542	
AD	0.68	1	0.68	0.046	0.8336	
BC	50.77	1	50.77	3.41	0.0846	
BD	0.33	1	0.33	0.022	0.8835	
CD	15.80	1	15.80	1.06	0.3192	
A2	440.05	1	440.05	29.56	<0.0001	
B2	100.16	1	100.16	6.73	0.0203	
C2	1092.26	1	1092.26	73.37	<0.0001	
D2	3.84	1	3.84	0.26	0.6189	
Residual	223.30	1	14.89			
Lack of Fit	199.4	1	19.94	4.17	0.0642	not significant
Pure Error	23.90	5	4.78			
Cor Total	8597.89	29				

Source	Std. Dev	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	R-Squared	PRESS
<u>Quadratic</u>	3.86	0.9498	0.8647	0.9740	<u>Suggested</u>

Number	Temp	Time	N	S/M	R1y	Desirability
1	46.17	5.98	3.75	7.70	78.6921	1.000
2	40.95	5.96	3.55	8.49	79.3763	1.000
3	39.67	5.58	3.85	7.15	78.5213	1.000
4	43.74	5.98	3.46	8.69	78.9507	1.000
5	38.29	5.98	3.32	7.06	80.7859	1.000
6	36.35	5.98	3.55	7.62	79.2925	1.000
7	42.75	5.76	3.96	7.66	78.1229	1.000
8	43.42	5.97	3.56	8.11	79.1995	1.000
9	38.11	5.91	4.00	8.39	78.1917	1.000
10	42.71	5.98	3.71	7.88	79.8615	1.000

Research Article

A multi-stage counter-current process for extracting glycyrrhizic acid from the licorice plant.

Zeinab Azizi Haghighat¹, Aliakbar Safekordi², Azim Akbarzadeh^{3*} and Mehdi Ardjmand⁴

1-Department of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran;

2- Chemical Engineering Department, Sharif University of Technology, Tehran, Iran;

3-Department of Chemical Engineering, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran;

4-Department of Pilot Nanobiotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

In this study, licorice root extract was obtained using a multi-stage countercurrent extraction method at bench scale, and the content of glycyrrhizic acid was investigated. The effects of various parameters including temperature, extraction time, number of extraction stages, and solvent-to-solid ratio were evaluated. The optimal extraction conditions were determined using response surface methodology (RSM). Statistical analysis revealed that temperature, time, and number of extraction stages had significant effects on the extraction yield. Under the optimized conditions temperature of 46.17 °C, extraction time of 5.98 hours, solvent-to-solid ratio of 7.70 cc/g, and 4 stages the maximum glycyrrhizic acid extraction yield was 78.7%.

Keywords: multi-stage countercurrent extraction, licorice, glycyrrhizic acid, response surface methodology.

*Corresponding authors: azimakbarzadeh@pasteur.ac.ir

Introduction

Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) belongs to the Fabaceae family and is mainly grown in southern Europe and Asia. Licorice root is widely used in herbal medicine due to its emollient, anti-inflammatory, antiviral, antiallergic, antioxidant, gastrointestinal protective, and anticancer properties. Licorice root contains numerous compounds including sugars (up to 18%), flavonoids, sterols, amino acids, gums, starches, essential oils, and saponosides. The most important saponin found in licorice root is glycyrrhizic acid (GA, C₄₂H₆₂O₁₆), which, has been composed of two glucuronic acid units and one glycyrrhetic acid aglycone molecule. Glycyrrhizic acid has a molecular weight of 822.91 g. It is a colorless crystalline substance that softens at 170 °C and melts at 205 °C. Common methods for extracting GA from licorice include Soxhlet, solid-liquid extraction, and liquid-liquid extraction, which are associated with high solvent consumption, long extraction times, and increased risk of thermally unstable compounds. In addition, unconventional and new methods used for extraction, such as ultrasonic extraction, supercritical solvent extraction, and high-pressure solid-liquid extraction, require advanced equipment and high energy. Therefore, these methods are not useful and sometimes impossible on an industrial scale. Due to these disadvantages, in this project, multi-stage countercurrent extraction technology (MSCE) has been used as an alternative technique. In this technology, dynamic cyclic extraction is combined with continuous countercurrent extraction, which improves heat and mass transfer and increases extraction yield along with reducing solvent consumption.

Materials and methods: Dried licorice root samples (*Glycyrrhiza glabra*, papilionaceae variety) were collected from Fars province. The authenticity of the plant species was verified by the Faculty of Pharmacy (PMP/A). After cleaning and removing dirt, the licorice roots were cut into smaller pieces using gardening scissors and dried at 25°C for one week. The roots were then ground into powder with a hammer mill and stored in a polyethylene bag in a freezer at -4°C. Multi-stage countercurrent extraction was carried out using a countercurrent extraction device composed of seven extraction units, each connected by pipe. Each unit includes an extraction tank and a pump that operates independently. This extraction process is divided into two parts: pre-extraction and extraction. In the pre-extraction stage, 10 grams of ground and meshed powder with dimensions of about 0.5 mm per unit is mixed with 98 ml of ethanol 60 % and 2 ml of concentrated ammonia as solvent, and then is subjected to extraction for a determined time. For example, in a five-stage extraction aimed at creating this gradient, the immersion time in units EU1 to EU5 is set at T/6, 2T/6, 3T/6, 4T/6, and 0 minutes, respectively. At the end of the pre-extraction stage, the extraction solution from EU1 is transferred to EU5, while the solutions from EU2 and EU4 are moved as well. Fresh solvent is then injected into unit EU1, and no changes are made to unit EU3. Following the pre-extraction phase, the second stage of the multi-stage extraction with countercurrent flow begins, with conditions differing for each experiment based on the designs specified in the software.

Results and discussion: Based on the results, S/M had no significant effect on glycyrrhizic acid, while the temperature (T), number of stages (N), and time (t) had a significant effect on the response of glycyrrhizic acid yield. The value of R-squared (0.974) shows that the model applied fits the experimental data as well.

One of the advantages of using experimental design and optimization by the software is the possibility of examining the mutual effects of factors on the response range. In order to examine these mutual effects, the three-dimensional shapes of the factors have been plotted. Maximum extraction occurs at a temperature of 46.17. This is due to enhanced solvent permeability, reduced viscosity and surface tension, and improved mass transfer at elevated temperatures. However, above 46.17 °C, thermal degradation of glycyrrhizic acid may occur, limiting further increases in extraction yield. Therefore, the optimal extraction temperature balances maximizing yield and maintaining compound stability. Additionally, lower temperatures are preferred to reduce energy consumption and preserve compound integrity.

Conclusions: In this study, the effect of multi-stage countercurrent extraction technology on glycyrrhizic acid extraction from licorice root at bench scale was investigated. Optimization of the extraction process conditions was carried out using response surface methodology (RSM) and second-order statistical modeling to maximize the glycyrrhizic acid extraction percentage. Extraction time, temperature, solvent-to-solid ratio, and number of extraction stages were selected and evaluated as effective variables. The results showed that the statistical model was able to accurately predict the experimental responses, and its validity was confirmed by laboratory data. The findings indicate that the multi-stage countercurrent extraction technology, as an efficient method with optimized energy and solvent consumption and producing a higher-quality product, has the potential for industrial-scale application in the extraction of active compounds from medicinal plants.