



Optimization of bioactive compound extraction from licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves using Response Surface Methodology (RSM)

Fatemeh Bakhshi¹, Mohammad Fattahi^{2*} and Sanaz Ashrafi-Saeidlou³

1- M.Sc. student, Horticulture Department, Agriculture Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

2*- Corresponding author, Horticulture Department, Agriculture Faculty, Urmia University, Urmia, Iran,
E-mail: mohamadfattahi@yahoo.com

3- Soil and Water Research Department, West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran

Received: 11/05/2025

Revised: 07/02/2026

Accepted: 08/02/2026

Abstract

Background and Objective: *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) is a widely recognized medicinal plant known for its diverse biological properties and rich content of bioactive compounds, including glycyrrhizic acid, phenolics, and flavonoids, which contribute significantly to its antioxidant activity. Efficient extraction of these compounds is essential to fully utilize the plant's potential. This study aimed to optimize the extraction conditions for these bioactive constituents from licorice leaves using ultrasound-assisted extraction (UAE). The primary objective was to determine the optimal conditions for maximizing the yield of bioactive compounds.

Methodology: Licorice leaves were collected, dried, and ground into a fine powder. Extraction was carried out using ultrasound-assisted extraction (UAE) based on a central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM). The effects of three independent variables, temperature (X_1 : 22.77–75.22 °C), extraction time (X_2 : 1.59–18.40 min), and solvent concentration (X_3 : 22.77–75.22%), were evaluated at five levels within predefined ranges to determine their impact on the extraction efficiency of selected phytochemicals. The extraction experiments were performed in 20 runs using an ultrasonic device operating at 120 Hz. The resulting extracts were analyzed for glycyrrhizic acid (GA) content using vanillin reagent with absorbance measured at 535 nm, total phenolic content (TPC) using Folin–Ciocalteu reagent at 760 nm, total flavonoid content (TFC) using aluminum chloride solution at 415 nm, and antioxidant activity via the DPPH radical scavenging assay at 517 nm. All spectrophotometric analyses were performed using a UV-2100 PC spectrophotometer. Statistical analysis, model fitting, and optimization of the extraction parameters were conducted using Design Expert version 10 software.

Results: Statistical analysis showed that a second-order regression model provided the best fit for glycyrrhizic acid (GA), total phenolic content (TPC), and DPPH radical scavenging activity, while an interaction model best described total flavonoid content (TFC). All models were statistically significant ($P < 0.05$), and non-significant lack-of-fit tests indicated good model adequacy. The R^2 values ranged from 0.745 to 0.798, demonstrating strong explanatory



power. Among the factors evaluated, extraction time (B) had the most significant effect on GA ($P < 0.05$). For TPC, the temperature–time interaction (AB) showed the greatest positive effect (coefficient: 28.41), while solvent concentration (C^2) had a highly significant negative effect (coefficient: -25.77). In TFC, the temperature–time interaction (AB) exerted the strongest positive influence (coefficient: 18.13), whereas extraction time (B) had a negative effect. For DPPH radical scavenging activity, solvent concentration (C^2) was the most influential variable (coefficient: -16.51), with the temperature–time interaction (AB) also highly significant (coefficient: 17.15). Three-dimensional response surface plots confirmed the complex interactions among variables and highlighted optimal extraction points for each response. Overall, higher temperatures and longer extraction times enhanced TPC and flavonoid yields, although excessive conditions could cause degradation. Solvent concentration critically affected extraction efficiency, with moderate concentrations generally outperforming both very low and very high levels. Based on these results, the optimal extraction conditions were estimated to be a temperature of $57\text{--}70\text{ }^\circ\text{C}$, an extraction time of $35\text{--}45$ minutes, and a solvent concentration of $50\text{--}60\%$.

Conclusion: This study demonstrated that the simultaneous optimization of key extraction variables, including solvent concentration, extraction time, and temperature, using response surface methodology (RSM) significantly improves the efficiency of extracting glycyrrhizic acid, phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity from licorice leaves. The results emphasized the critical roles of temperature and extraction time in determining yield. The use of RSM, as a robust statistical tool, allowed the identification of optimal conditions with a minimal number of experimental runs. These findings can be applied to optimize industrial extraction processes for licorice secondary metabolites.

Keywords: Glycyrrhizic acid, Central Composite Design, antioxidant activity, medicinal plants.

بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیب‌های زیست‌فعال از برگ‌های شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L.*) با روش سطح پاسخ (RSM)

فاطمه بخشی^۱، محمد فتاحی^{۲*} و ساناز اشرفی سعیدلو^۳

۱- دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، پست الکترونیک: mohamadfattahi@yahoo.com

۳- دکتری، بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۱

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L.*) به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی مهم با خواص بیولوژیکی گسترده، حاوی ترکیب‌های فعال متعددی از جمله اسید گلیسیریزیک، فنول‌ها و فلاونوئیدهاست که نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند. استخراج کارآمد این ترکیب‌ها برای بهره‌برداری حداکثری از ظرفیت گیاه ضروریست. این پژوهش با هدف بهینه‌سازی شرایط استخراج این ترکیب‌ها از برگ‌های شیرین بیان با استفاده از روش استخراج به کمک امواج التراسونیک (UAE) انجام شد. هدف دستیابی به بهترین شرایط برای حداکثر بازده ترکیب‌های زیست‌فعال بود.

مواد و روش‌ها: برگ‌های شیرین بیان جمع‌آوری، خشک و پودر شدند. فرایند عصاره‌گیری با روش UAE و براساس طرح آماری مرکب مرکزی (CCD) و روش سطح پاسخ انجام شد. تأثیر متغیرهای مستقل شامل دما (X1: ۲۴/۷۷-۷۵/۲۲ درجه سانتی‌گراد)، زمان استخراج (X2: ۱۸/۴۰-۱/۵۹ دقیقه) و غلظت حلال (X3: ۲۴/۷۷-۷۵/۲۲ درصد)، در دامنه‌های از پیش تعیین‌شده در پنج سطح بر میزان استخراج ترکیب‌های فیتوشیمیایی مورد نظر، بررسی شدند. استخراج در ۲۰ آزمایش مختلف با استفاده از دستگاه التراسونیک با فرکانس ۱۲۰ هرتز انجام شد. عصاره‌های حاصل برای اندازه‌گیری میزان اسید گلیسیریزیک (GA) از طریق واکنش با وانیلین و سنجش جذب در طول موج ۵۳۵ نانومتر، فنول کل (TPC) با معرف فولین-سیوکالتیو و سنجش جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر، فلاونوئید کل (TFC) با محلول آلومینیوم کلرید و سنجش جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی یا قدرت مهار رادیکال‌های آزاد با روش DPPH و سنجش جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV 2100 PC آزمایش شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، مدل‌سازی و تعیین شرایط بهینه برای حداکثر میزان استخراج، با نرم‌افزار Design Expert 10 انجام شد.

یافته‌ها: نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که مدل رگرسیونی درجه دو برای TPC، GA و DPPH و مدل برهم‌کنش برای TFC بهترین برازش را با داده‌های تجربی داشتند. تمامی مدل‌ها از نظر آماری معنی‌دار بودند ($P < 0.05$) و آزمون عدم برازش برای آنها غیر معنی‌دار بود. مقادیر R^2 در بازه ۰/۷۴۵ تا ۰/۷۹۸، توانایی خوب مدل‌ها در تبیین تغییرات را نشان داد. بررسی اثرهای عوامل نشان داد که زمان (B) بیشترین تأثیر را بر GA داشته است ($P < 0.05$). برای TPC، اثر متقابل دما-زمان (AB) با ضریب ۲۸/۴۱+ بیشترین اثر مثبت را نشان داد و تأثیر عامل حلال (C^2) بسیار معنی‌دار بود (۲۵/۷۷-). در مورد TFC، اثر تعاملی دما و زمان (AB) بیشترین تأثیر مثبت را داشت (ضریب ۱۸/۱۳)، در حالی که اثر زمان (B) کاهشده بود. برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)، غلظت حلال (C^2) بیشترین تأثیر را نشان داد (ضریب ۱۶/۵۱-) و اثر تعاملی دما-زمان (AB) بسیار معنی‌دار بود (ضریب ۱۷/۱۵+). نتایج نمودارهای سه‌بعدی نیز برهم‌کنش پیچیده عوامل و وجود نقاط بهینه را برای هر پاسخ تأیید کردند. به‌طور کلی دماهای بالاتر و زمان‌های طولانی‌تر باعث بهبود استخراج TPC و فلاونوئید شدند؛ اما افزایش بیش از حد آنها می‌توانست منجر به تخریب شود. غلظت حلال نیز تأثیر مهمی بر فرایند استخراج داشت، به‌طوری‌که غلظت‌های متوسط معمولاً عملکرد بهتری نسبت به

غلظت‌های بسیار پایین یا بالا داشتند. براساس نتایج، شرایط بهینه شامل دمای ۵۷-۷۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۵-۴۵ دقیقه و غلظت حلال ۵۰-۶۰ درصد پیشنهاد شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که بهینه‌سازی همزمان متغیرهای کلیدی شامل غلظت حلال، زمان و دمای استخراج با بهره‌گیری از روش RSM، به‌طور معنی‌داری موجب افزایش کارایی استخراج اسید گلیسیریزیک، ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی و ارتقاء فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ شیرین‌بیان می‌گردد. نتایج حکایت از آن دارد که در بین فاکتورهای ارزیابی شده دما و زمان نقش تعیین‌کننده در فرایند استخراج ایفا می‌کنند. استفاده از RSM به‌عنوان یک ابزار آماری قدرتمند، امکان شناسایی شرایط بهینه را با حداقل تعداد آزمایش فراهم می‌کند. یافته‌های این پژوهش می‌تواند در بهینه‌سازی فرایندهای استخراج صنعتی مواد مؤثره گیاه شیرین‌بیان مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسید گلیسیریزیک، طرح مرکب مرکزی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، گیاهان دارویی.

مقدمه

شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) یکی از قدیمی‌ترین و پرکاربردترین گیاهان دارویی در جهان است که در بسیاری از کشورها به‌عنوان دارویی با خواص درمانی متنوع شناخته شده است (Ding et al., 2022). این گیاه در طول قرن‌ها برای درمان بیماری‌های مختلفی مانند مشکلات گوارشی، اختلالات تنفسی، مشکلات پوستی و حتی در درمان اختلالات هورمونی مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر استفاده‌های دارویی، شیرین‌بیان به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود نیز مورد توجه قرار گرفته است. در این میان، ترکیب‌های فعال موجود در شیرین‌بیان که شامل ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی، فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدها و ترکیب‌های فنولی هستند، نقش عمده‌ای در خواص درمانی این گیاه ایفا می‌کنند (Murray, 2020).

ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی و فلاونوئیدها، به‌عنوان اصلی‌ترین اجزای مؤثر این گیاه شناخته می‌شوند (Güçlü-Üstündağ & Mazza, 2007). یکی از مهمترین ترکیب‌های موجود در گیاه شیرین‌بیان، اسید گلیسیریزیک است. این ترکیب منبع اصلی طعم شیرین در شیرین‌بیان است. اسید گلیسیریزیک یک تری‌ترپنوئید پنتاسیکلیک از نوع اولئانولان است که بیشتر به‌صورت نمک‌های پتاسیم یا کلسیم محلول در آب یافت می‌شود (Asl & Hosseinzadeh, 2008). این ترکیب از خواص دارویی زیادی برخوردار است که شامل فعالیت‌های ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد توموری و آنتی‌اکسیدانی می‌شود و به بهبود

سیستم‌های گوارشی، تنفسی، عصبی، غدد درون‌ریز و قلبی عروقی کمک می‌کند (Ceccuzzi et al., 2023).

فلاونوئیدها نیز به‌عنوان یکی دیگر از ترکیب‌های فعال شیرین‌بیان، نقش مهمی در خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه دارند. این ترکیب‌ها به‌دلیل توانایی خود در مقابله با رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش اکسیداتیو در بدن، اثرهای مثبتی در پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با اکسیداسیون مانند سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، آلزایمر و پارکینسون دارند (Zhang et al., 2021). مطالعات نشان داده‌اند که فلاونوئیدهای موجود در شیرین‌بیان می‌توانند سرعت اکسیداسیون مولکول‌های بنیادین را کاهش داده یا از آن جلوگیری کنند و نقش مؤثری در محافظت از سلول‌ها و بافت‌ها دارند (Goodarzi et al., 2018). این ترکیب‌ها در دنیای پزشکی به‌عنوان عوامل پیشگیرانه از بیماری‌های مزمن و ضد التهابی نیز شناخته می‌شوند.

پلی‌ساکاریدهای گلیسیریزین از دیگر ترکیب‌های شیرین‌بیان هستند که علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی، دارای اثرهای ضد توموری، ضد التهابی، ضد باکتریایی و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی نیز می‌باشند (Shang et al., 2022). ترکیب‌های دیگری از جمله آلکالوئیدها، روغن‌های فرار، کومارین‌ها و اسیدهای آمینه نیز در این گیاه وجود دارند که هر یک به نوعی خواص درمانی ویژه‌ای را فراهم می‌کنند. این ترکیب‌های فعال، از شیرین‌بیان یک منبع باارزش در زمینه داروسازی و طب سنتی می‌سازند (Sharma et al., 2023).

دارویی یکی از چالش‌های بزرگ در صنایع دارویی است. در این راستا، استفاده از روش‌های آماری به منظور طراحی آزمایش‌ها و تحلیل داده‌ها می‌تواند به پژوهشگران کمک کند تا بهترین شرایط برای استخراج ترکیب‌ها را شناسایی کنند. یکی از این روش‌ها، روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology - RSM) است که به طور گسترده‌ای برای بهینه‌سازی فرایندهای استخراج در صنایع مختلف استفاده می‌شود (Abu Bakar *et al.*, 2020).

روش سطح پاسخ تکنیکی آماری است که با استفاده از آن می‌توان تأثیر چندین عامل مختلف بر یک فرایند را بررسی و تجزیه و تحلیل کرد. این روش می‌تواند به طور همزمان تأثیر چندین عامل مانند نوع حلال، زمان استخراج و دما را بررسی کرده و بهینه‌ترین شرایط را برای انجام فرایند استخراج مشخص نماید. یکی از مزایای این روش، این است که می‌توان با استفاده از تعداد محدودی آزمایش، بهینه‌ترین شرایط را برای استخراج ترکیب‌های مورد نظر شبیه‌سازی کرد. این روش علاوه بر کاهش هزینه‌ها و زمان آزمایش‌ها، امکان دستیابی به نتایج دقیق‌تری را نیز فراهم می‌نماید (Weremfo *et al.*, 2023).

این پژوهش با هدف دستیابی به بهترین شرایط استخراج مواد مؤثره از عصاره برگ شیرین بیان با استفاده از امواج التراسونیک اجرا شد. بدین منظور تأثیر عوامل مختلفی شامل نسبت‌های متفاوت حلال، زمان استخراج و دما، بر میزان ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی، اسید گلیسیریزیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش آماری سطح پاسخ بررسی و تحلیل شدند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

برگ‌های گیاه شیرین بیان در اواخر تیرماه سال ۱۴۰۳ از منطقه شیرآباد، واقع در استان آذربایجان غربی، با طول و عرض جغرافیایی $37^{\circ} 44' 56''$ و $45^{\circ} 08' 54''$ ، به صورت تک بوته جمع‌آوری شدند. پس از جمع‌آوری، برگ‌ها در

استخراج ترکیب‌های فعال از گیاهان دارویی یکی از مراحل حیاتی در فرایند تولید داروهای گیاهیست. روش‌های مختلفی برای استخراج این ترکیب‌ها از گیاهان وجود دارد که با توجه به نوع ترکیب‌ها، هدف و شرایط فرایند می‌توانند متفاوت باشند. روش‌های متداول استخراج شامل استفاده از حلال‌های مختلف، استخراج به کمک امواج التراسونیک، استخراج با استفاده از فشار و دما و روش‌های بیولوژیکی مانند استخراج به کمک آنزیم‌ها هستند (Colvin *et al.*, 2018; Shabkhiz *et al.*, 2016).

یکی از روش‌های مؤثر و رایج استخراج، استفاده از حلال‌ها برای جداسازی ترکیب‌های فعال از گیاهان است. حلال‌ها معمولاً به دو دسته قطبی (مانند آب، اتانول، متانول) و غیرقطبی (مانند استون، هگزان، اتیلا استات) تقسیم می‌شوند. انتخاب نوع حلال بستگی به ویژگی‌های ترکیب‌های هدف دارد. ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی مانند فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک به طور معمول در حلال‌های قطبی حل می‌شوند و این حلال‌ها معمولاً برای استخراج این ترکیب‌ها مناسب‌تر هستند. از سوی دیگر، حلال‌های غیرقطبی برای استخراج ترکیب‌هایی مانند تریپن‌ها و روغن‌های فرار استفاده می‌شوند. بازده استخراج به شدت تحت تأثیر نوع حلال و شرایط مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌تواند تفاوت‌های قابل توجهی در غلظت نهایی ترکیب‌های فعال ایجاد کند (Morya *et al.*, 2022).

استفاده از امواج التراسونیک به عنوان یک روش پیشرفته استخراج در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. این روش با ایجاد امواج صوتی با فرکانس بالا در محلول حاوی گیاه، باعث شکستن ساختار سلولی گیاه و افزایش بازده استخراج می‌شود. امواج التراسونیک با ایجاد ریزحباب‌ها در مایع، باعث ایجاد شوک‌های میکروسکوپی در دیواره سلول‌ها شده و موجب آزادسازی ترکیب‌های درون سلول‌ها می‌شوند. این روش به دلیل کاهش زمان استخراج و افزایش بهره‌وری، به طور گسترده‌ای در صنایع دارویی و غذایی استفاده می‌شود (Bhadange *et al.*, 2024).

بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیب‌های فعال از گیاهان

متفاوت (X1)، زمان‌های مختلف (X2) و نسبت‌های مختلف حلال (X3) براساس مقادیر واقعی و کد شده (+a، +۱، ۰، -۱، -a) در جدول ۱ ارائه شده است.

برای استخراج ترکیب‌های فعال، ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های خشک و پودر شده گیاه شیرین‌بیان به‌طور جداگانه در ویال‌های مربوط به آزمایش‌های ۲۰ گانه طراحی شده با روش سطح پاسخ قرار داده شد. سپس عصاره‌گیری توسط دستگاه التراسونیک با فرکانس ۱۲۰ هرتز انجام شد. پس از استخراج، عصاره‌ها از کاغذ صافی گذرانده شده و در ویال‌های شیشه‌ای دربسته ریخته شدند. عصاره‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

دمای اتاق و در شرایط دور از نور خورشید، در مسیر جریان هوای طبیعی خشک گردیدند. سپس، برگ‌های خشک شده به‌طور کامل توسط هاون چینی پودر شده و برای فرایند عصاره‌گیری و آزمایش‌های بعدی آماده شدند.

عصاره‌گیری براساس طرح مرکب مرکزی

به‌منظور ارزیابی تأثیر مقادیر متغیرهای مؤثر بر میزان استخراج اسید گلیسیریزیک، ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از برگ شیرین‌بیان، از روش سطح پاسخ استفاده شد. طراحی آزمایش‌ها با ترکیب مقادیر مختلف هریک از متغیرهای مستقل بر مبنای طرح مرکب مرکزی انجام شد. دامنه متغیرهای موردنظر شامل دماهای

جدول ۱- دامنه مقادیر متغیرهای مورد مطالعه در روش سطح پاسخ

Table 1. Range of studied variables amounts in RSM

Independent variable	Coded amount of variable	Range and amounts				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
Temperature (°C)	X1	24.77	35	50	65	75.22
Time (min)	X2	1.59	5	10	15	18.40
Solvent (%)	X3	24.77	35	50	65	75.22

سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) استفاده شد. در ابتدا، ۵ میکرولیتر از هر عصاره با ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس، ۱۲۰۰ میکرولیتر از معرف فولین به این مخلوط اضافه شده و بعد از ۵ دقیقه، ۷/۵ درصد کربنات سدیم به آن افزوده شد. پس از انجام این مراحل، نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. در نهایت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (UV 2100 PC) اندازه‌گیری شد. آب مقطر به‌عنوان شاهد و اسید گالیک به‌عنوان استاندارد در این آزمایش استفاده گردید. منحنی استاندارد براساس اسید گالیک ترسیم شده و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Ebrahimzadeh et al., 2008).

اندازه‌گیری میزان اسید گلیسیریزیک

برای تعیین میزان اسید گلیسیریزیک استخراج شده از عصاره‌ها، ۳۰۰ میکرولیتر از معرف وانیلین (شامل ۰/۱ گرم وانیلین، ۲۸ میلی‌لیتر متانول و ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک) به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره و ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن‌ماری با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV 2100 PC اندازه‌گیری شد (Fu et al., 2005).

اندازه‌گیری میزان فنول کل

برای اندازه‌گیری ترکیب‌های فنولی، از معرف فولین-

ارزیابی مقدار فلاونوئید

برای سنجش میزان فلاونوئیدهای کل، ۱۰ میکرولیتر از هر عصاره به همراه ۱/۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات سود ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر ترکیب شد. میزان جذب مخلوط بدست آمده بعد از ۴۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به شاهد اندازه گیری گردید. برای رسم منحنی استاندارد، از کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها براساس میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش گردید (Razavi et al., 2009).

عصاره در لوله آزمایش ریخته شد و بعد ۲۰۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (حاوی ۰/۰۰۸ گرم DPPH در ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد) به آن اضافه گردید. پس از مخلوط کردن، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. در پایان، جذب محلول‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UV 2100 PC) اندازه گیری شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی یا قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط عصاره‌ها با استفاده از فرمول استاندارد مربوط (معادله ۱) محاسبه گردید (Nakajima et al., 2004).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش به منظور طراحی آزمایش‌ها و نیز تجزیه و تحلیل‌های مربوط به طرح مرکب مرکزی از نرم افزار Design Expert 10 استفاده شد.

تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از روش DPPH استفاده شد. در این روش، ابتدا ۲ میکرولیتر از هر

$$\text{DPPH free radical scavenging (\%)} = \frac{(\text{Abs blank} - \text{Abs sample})}{\text{Abs blank}} \times 100 \quad (1)$$

Abs blank میزان جذب در نمونه شاهد و Abs sample میزان جذب در نمونه را نشان می‌دهد.

تغییرات داده‌ها بودند (جدول ۳).

بررسی اثرهای عوامل نشان داد که برای اسید گلیسیریزیک (GA)، عامل زمان (B) و حلال (C) به ترتیب با مقدار p-value برابر با ۰/۰۰۲ در مدل خطی و ۰/۰۰۰۹ در مدل درجه دو بیشترین تأثیر را داشته است. در مورد ترکیب‌های فنولی (TPC)، برهم کنش دما و زمان (AB) با ضریب ۲۸/۴۱+ بیشترین اثر مثبت را نشان داد و تأثیر عامل حلال (C²) با ضریب ۲۵/۷۷- از نظر آماری بسیار معنی‌دار بود. برای فلاونوئیدها (TFC)، اثر تعاملی دما و زمان (AB) با ضریب ۱۸/۱۳+ بیشترین تأثیر مثبت را داشت، در حالی که اثر زمان (B) با ضریب ۳۰/۰۳- کاهنده بود. در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) نیز برهم کنش

نتایج

طرح آزمایشی و نتایج مربوط به بررسی تأثیرات متغیرهای نسبت متانول به آب، زمان و دما بر میزان استخراج اسید گلیسیریزیک، ترکیب‌های فنولی، فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که مدل درجه دو برای اسید گلیسیریزیک (GA)، فنول کل (TPC) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) و مدل برهم کنش برای فلاونوئید کل (TFC) بهترین تطبیق را داشتند. تمامی مدل‌ها از نظر آماری معنی‌دار بودند ($P \leq 0.05$). در حالی که آزمون عدم برازش برای آنها غیرمعنی‌دار بود. مقادیر R² در بازه ۰/۷۴۵ تا ۰/۷۹۸، نشان‌دهنده توانایی بالای مدل‌ها در تبیین

دما و زمان (AB) با ضریب +۱۷/۱۵ بیشترین تأثیر را
گذاشت و اثر عامل توان دوم حلال (C²) با ضریب
-۱۶/۵۱ بسیار معنی‌دار بود.

جدول ۲- ماتریس مقادیر متغیرهای کد شده در مدل‌سازی روش طرح مرکب مرکزی

Table 2. Matrix of coded variables amounts in central composite design model

Experiment number	Coded amounts			Glycyrrhizic acid	Total phenols content	Total flavonoids content	Antioxidant activity
	Temperature	Ultrasonic time	Solvent	(mg.g ⁻¹ DW)	(mg gallic acid.g ⁻¹ DW)	(mg quercetin.g ⁻¹ DW)	(%)
1	0	0	0	18.48	84.05	69.23	54.29
2	0	0	-1.68	6.11	58.84	54.31	31.00
3	+1.68	0	0	18.25	79.60	75.69	49.17
4	0	0	0	18.23	82.87	70.31	52.62
5	-1	-1	-1	5.66	62.52	50.15	56.55
6	-1	+1	+1	11.11	65.30	49.92	31.88
7	0	0	0	13.54	79.33	67.46	48.25
8	+1	-1	+1	15.29	63.22	58.77	44.61
9	+1	+1	-1	9.29	74.33	56.15	51.89
10	+1	-1	-1	7.67	63.70	57.15	56.26
11	0	+1.68	0	18.48	79.12	50.38	52.04
12	0	-1.68	0	14.50	60.23	57.38	45.27
13	-1.68	0	0	18.45	82.17	72.77	58.15
14	+1	+1	+1	17.88	75.81	73.46	52.77
15	0	0	0	14.62	69.34	68.54	49.78
16	0	0	0	16.48	81.83	71.23	54.88
17	-1	-1	+1	16.07	87.24	72.38	49.49
18	0	0	0	16.22	79.40	69.00	49.85
19	0	0	+1.68	10.57	56.90	55.23	40.68
20	-1	0	-1	9.28	68.63	61.38	54.37

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر متغیرهای مستقل بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در برگ گیاه شیرین بیان

Table 3. ANOVA of independent variables effects on measured indicators in Licorice leaves

Part of model	Model parameter	d.f.	M.S.			
			GA	TPC	TPF	DPPH
Model	-	9	31.95*	154.7**	121.22*	60.19*
Linear	A (Temperature)	1	8.81 ^{ns}	80.46 ^{ns}	129.99 ^{ns}	70.82 ^{ns}
	B (Time)	1	0.1159**	17.36 ^{ns}	343.73**	0.0107 ^{ns}
	C (Solvent)	1	5.43 ^{ns}	84.23 ^{ns}	3.29 ^{ns}	29.59 ^{ns}
Interaction	AB	1	3.85 ^{ns}	190.67*	77.64*	69.51*
	AC	1	1.98 ^{ns}	51.96 ^{ns}	8.31 ^{ns}	44.07 ^{ns}
	BC	1	7.26 ^{ns}	85.04 ^{ns}	40.5 ^{ns}	1.06 ^{ns}
Second order	A ²	1	0.3572 ^{ns}	8.34 ^{ns}	38.41 ^{ns}	35.55 ^{ns}
	B ²	1	3.58 ^{ns}	148 ^{ns}	445.64**	0.5763 ^{ns}
	C ²	1	164.67***	784.59***	396.92**	322.25*
Lack of fit	-	5	11.59 ^{ns}	45.65 ^{ns}	73 ^{ns}	94.43 ^{ns}
Pure error	-	5	3.79 ^{ns}	28.14 ^{ns}	1.76 ^{ns}	7.32 ^{ns}
R ²	-	-	0.789	0.791	0.745	0.798
R ² _{adj}	-	-	0.599	0.602	0.515	0.515

ns, *, **, and ***: non-significant, significant at 5, 1, and 0.1% probability levels, respectively.

GA: Glycyrrhizic acid; TPC: Total phenols content; TPF: Total flavonoids content; DPPH: Antioxidant activity.

(معادلات ۲-۵):

براساس مدل‌های پردازش‌شده و داده‌های آزمایشی،

معادله کلی برای هر یک از پاسخ‌ها به شرح زیر بدست آمد

$$GA = 17.08 - 0.5514B - 11.8C^2 \quad (۲)$$

$$TPC = 79.94 + 28.41AB - 25.77C^2 \quad (۳)$$

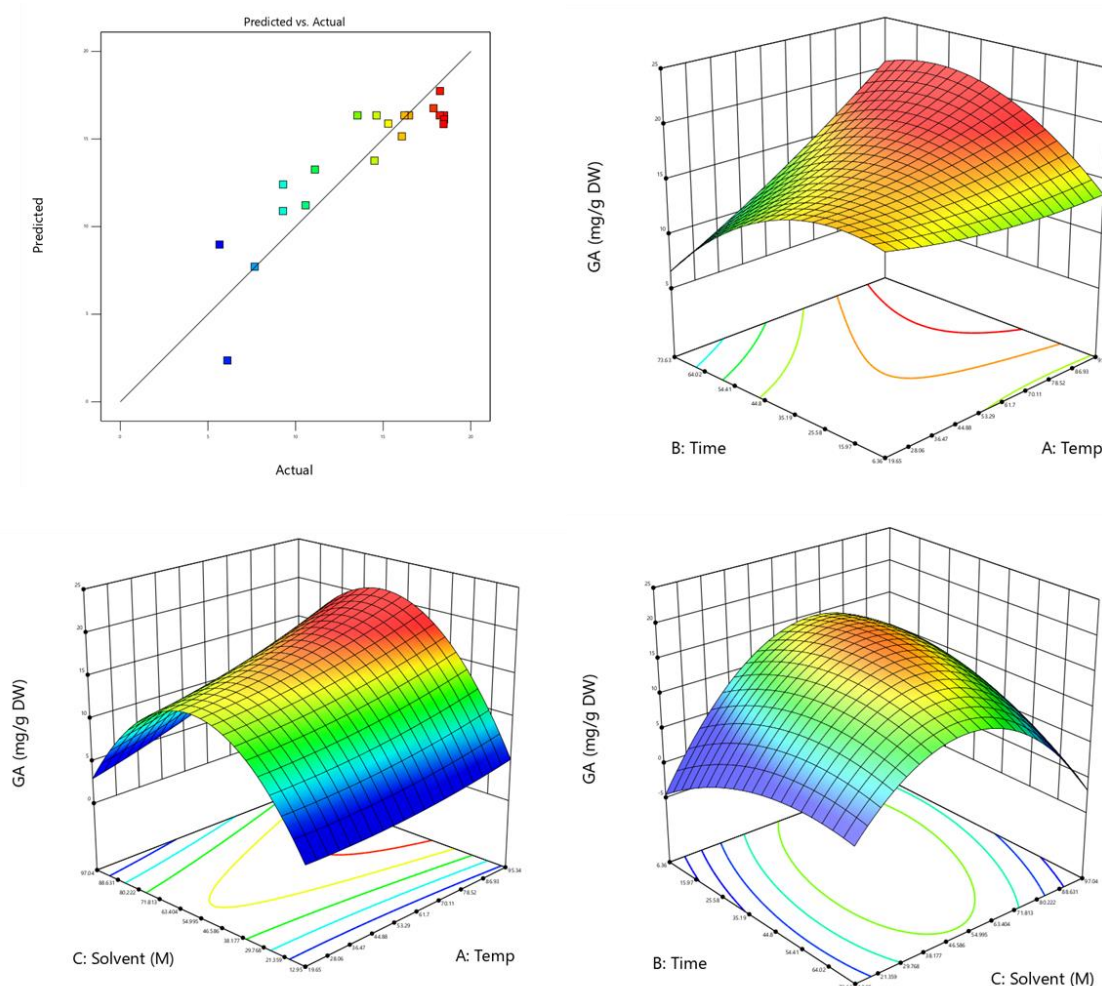
$$TFC = 64.42 - 30.03B - 40.26B^2 - 18.33C^2 \quad (۴)$$

$$DPPH = 51.66 + 17.15AB - 16.51C^2 \quad (۵)$$

می‌دهند. این معادلات پس از حذف عوامل غیرمعنی‌دار براساس آزمون‌های آماری ساده‌سازی شده‌اند تا پیش‌بینی دقیق‌تری از نتایج ارائه دهند.

نتایج تحلیل نمودارهای سه‌بعدی مربوط به اسید گلیسیریزیک (GA) نشان‌دهنده وجود تعامل معنی‌دار بین عوامل دما (A)، زمان (B) و حلال (C) است (شکل ۱). براساس این نمودارها، بالاترین مقدار GA (۲۰/۰۶ واحد) در دمای ۵۷ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۵ تا ۴۰ دقیقه و غلظت حلال ۵۵ تا ۶۵ درصد مشاهده شد.

این معادلات رابطه بین عوامل فرایندی (دما، زمان و حلال) و پاسخ‌های مختلف را نشان می‌دهند. ضرایب مثبت در معادله ۳ (مانند ۲۸/۴۱AB) به معنای افزایش پاسخ با افزایش آن عامل است، در حالی که ضرایب منفی در معادله ۲ (مانند ۰/۵۵۱B) نشان‌دهنده کاهش پاسخ با افزایش آن عامل می‌باشد. عبارات AB و C² به ترتیب نمایانگر اثرهای تعاملی بین دو عامل و اثرهای غیرخطی (سه‌موی یا درجه دو) هستند. اعداد ثابت (از جمله ۱۷/۰۸) سطح پایه پاسخ را در شرایط مرجع و بدون تأثیر عوامل خارجی نشان

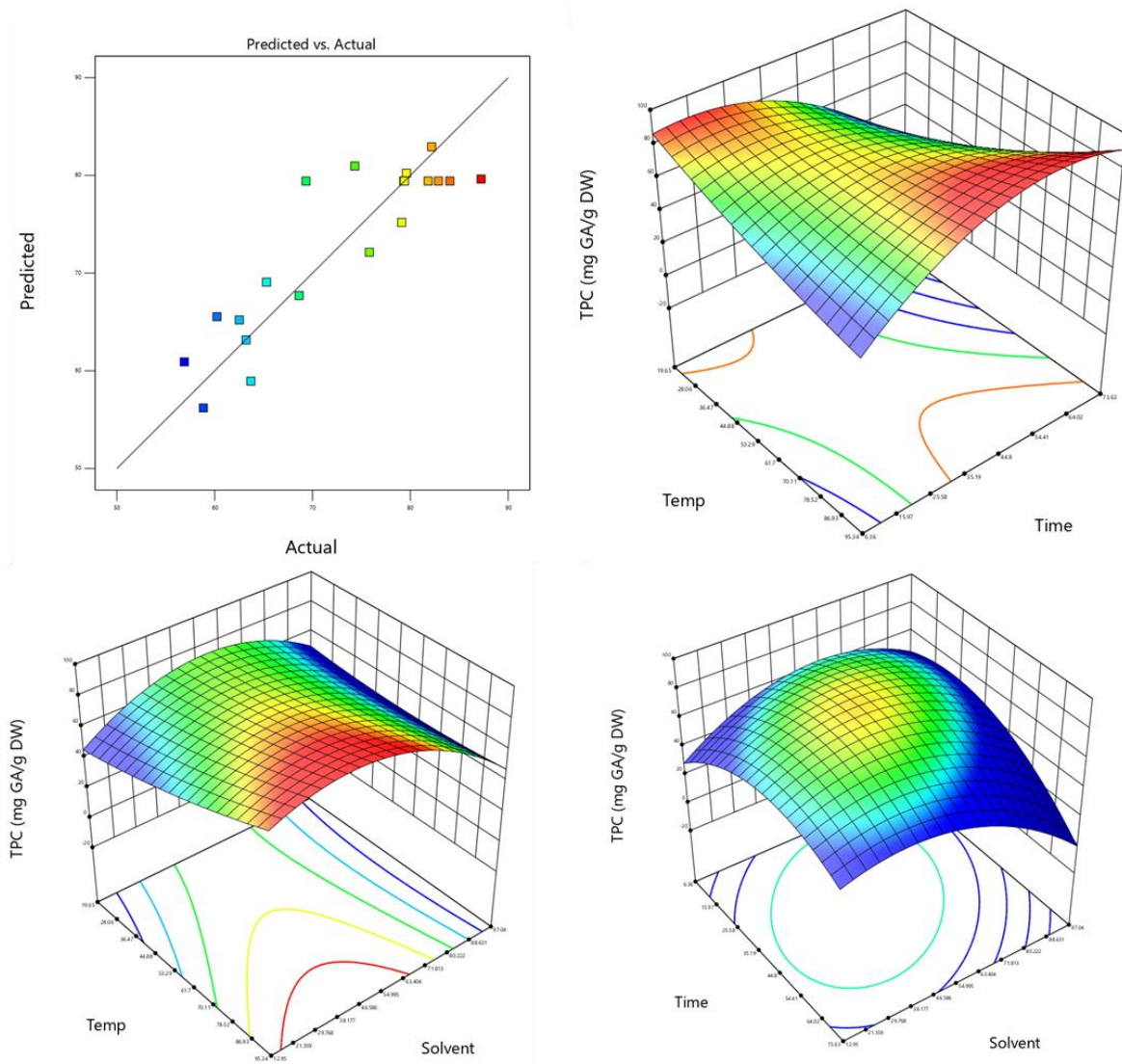


شکل ۱- نمایش سه بعدی اثر متقابل متغیرهای مستقل بر استخراج اسید گلیسیریزیک از برگ شیرین بیان

Figure 1. Three-dimensional representation of independent variables interaction on glycyrrhizic acid extraction from licorice leaves

حلال (کمتر از ۵۰ درصد) به دلیل کاهش توان حل‌شوندگی ترکیب‌های قطبی و غلظت‌های بالا (بیشتر از ۷۵ درصد) به دلیل استخراج ناخالصی‌ها، موجب کاهش بازده استخراج شدند. همچنین، بررسی تعامل زمان و غلظت حلال در دمای ثابت (تقریباً ۵۷/۴۹۵ درجه سانتی‌گراد) نشان داد که زمان بهینه برای استخراج حداکثر TPC (تقریباً ۶۵/۳۰ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک) در محدوده ۳۵-۴۰ دقیقه و غلظت حلال ۶۰-۶۵٪ قرار دارد. افزایش زمان بیشتر از این محدوده، حتی با استفاده از غلظت بهینه حلال، منجر به تخریب ترکیب‌های فنولی شد.

نتایج تحلیل نمودارهای سه بعدی مربوط به محتوای فنول کل (TPC) نشان داد که برهم‌کنش عوامل دما (A)، زمان (B) و حلال (C) تأثیر معنی‌داری بر میزان ترکیب‌های فنولی دارد. در شرایط ثابت غلظت حلال (۵۵٪)، افزایش دما در محدوده ۶۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد همراه با زمان ۳۵-۴۰ دقیقه، بیشترین مقدار TPC (حدود ۸۷/۲۴ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک) را ایجاد نمود (شکل ۲). در بررسی تأثیر دما و غلظت حلال (با ثابت نگه داشتن زمان تقریباً ۴۰ دقیقه)، بیشترین مقدار TPC (تقریباً ۷۸ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک) در غلظت حلال ۶۰-۶۵٪ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. غلظت‌های پایین



شکل ۲- نمایش سه بعدی اثر متقابل متغیرهای مستقل بر استخراج فنول کل از برگ شیرین بیان

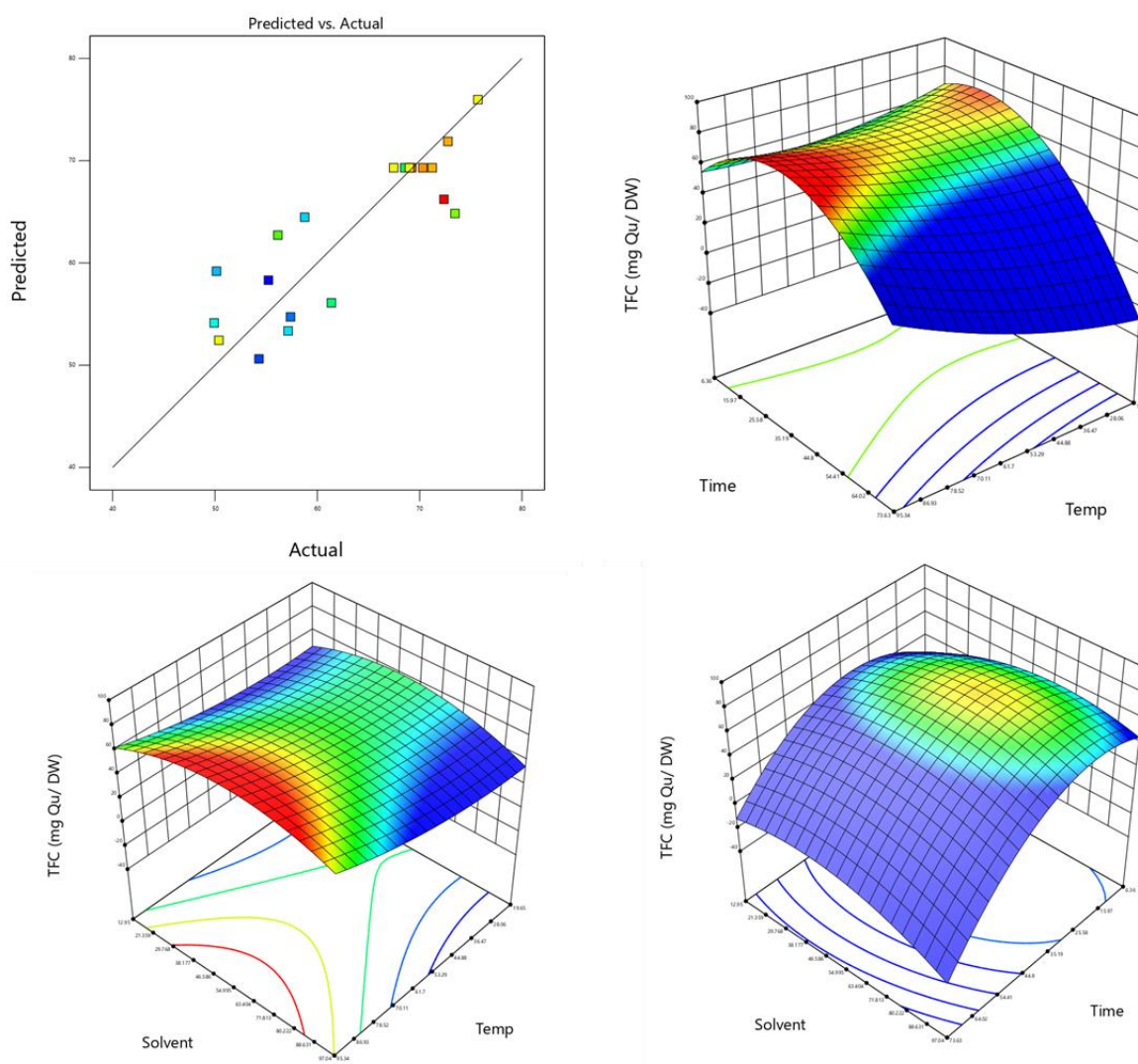
Figure 2. Three-dimensional representation of independent variables interaction on total phenols extraction from licorice leaves

طیف مقادیر مشاهده شده برای TFC بین ۴۹/۹۲ تا ۷۵/۶۹ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه متغیر بود، که این تنوع بیانگر حساسیت بالای ترکیب های فلاونوئیدی به شرایط استخراج است. هنگامی که زمان و دما در مقادیر پایین تری تنظیم شدند، محتوای TFC در حداقل مقدار خود (حدود ۴۹/۹۲ واحد) قرار گرفت. در مقابل، هنگامی که زمان استخراج با غلظت حلال در سطوح متوسط ترکیب شد، مقدار TFC به حدود ۶۲/۷۳ واحد افزایش

در بررسی اثر شرایط استخراج بر محتوای فلاونوئید کل (TFC)، تحلیل نمودارهای سه بعدی نشان دهنده تأثیر متقابل و معنی دار بین پارامترهای فرایند شامل دما (A)، زمان (B) و حلال (C) بود. مقادیر بهینه این فاکتورها به ترتیب برابر با ۵۷/۴۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۹/۹۹۵ دقیقه و ۵۴/۹۹۵ درصد تعیین شدند که در ترکیب با یکدیگر منجر به بیشترین بازده استخراج فلاونوئیدها (حدود ۷۵/۶۹ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه) گردیدند (شکل ۳).

برای استخراج ترکیب‌ها فراهم نمود (۷۵/۶۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه)، اما زمان و دماهای بالای استخراج، احتمالاً از طریق اکسیداسیون یا هیدرولیز فلاونوئیدها منجر به کاهش (۱۱٪) این ترکیب‌ها گردید. همچنین در دماهای پایین (حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان‌های استخراج طولانی تأثیر معنی‌داری در افزایش استخراج فلاونوئیدها داشت. نوع حلال نیز تأثیر مستقیمی بر بازده استخراج داشت و با مقدار بهینه ۵۴/۹۹ درصد، باعث استخراج مقادیر بالایی از فلاونوئیدها شد.

یافت. تنها در شرایطی که هر سه فاکتور در بازه‌های بهینه خود قرار داشتند، حداکثر مقدار TFC به دست آمد. این موضوع نشان‌دهنده وجود هم‌افزایی بین متغیرهای مورد مطالعه در افزایش بازدهی استخراج است. تحلیل نمودارهای سه‌بعدی سطح پاسخ نشان داد که افزایش دما تا مقدار بهینه (حدود ۵۷/۴۹۵ درجه سانتی‌گراد) موجب بهبود قابل‌توجهی در استخراج فلاونوئیدها شد. از سوی دیگر، زمان استخراج نقش دوگانه‌ای در فرایند داشت؛ افزایش زمان تا سطح بهینه (حدود ۳۹/۹۹۵ دقیقه) فرصت کافی



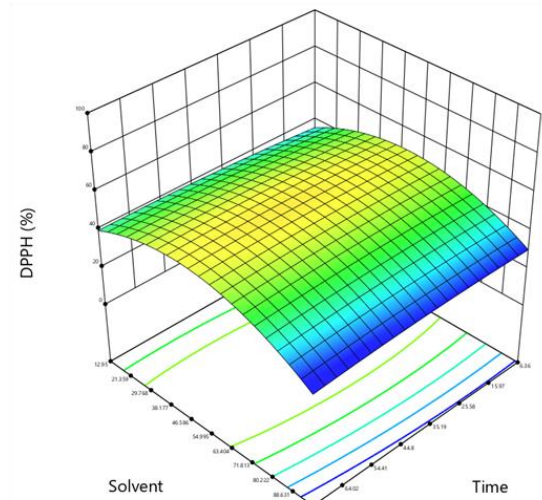
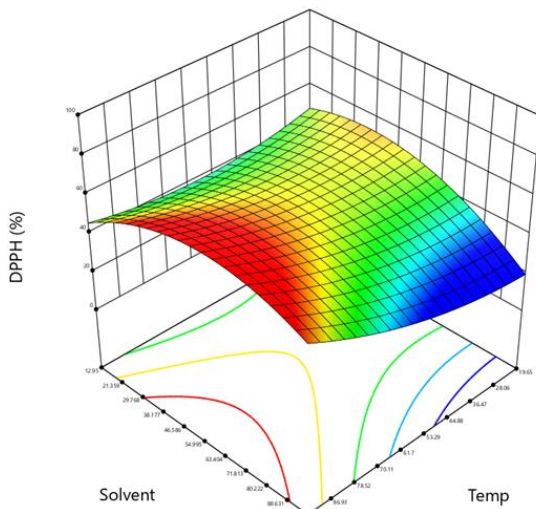
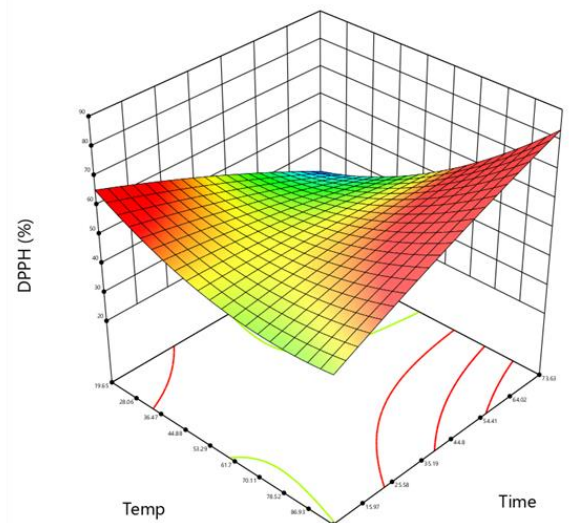
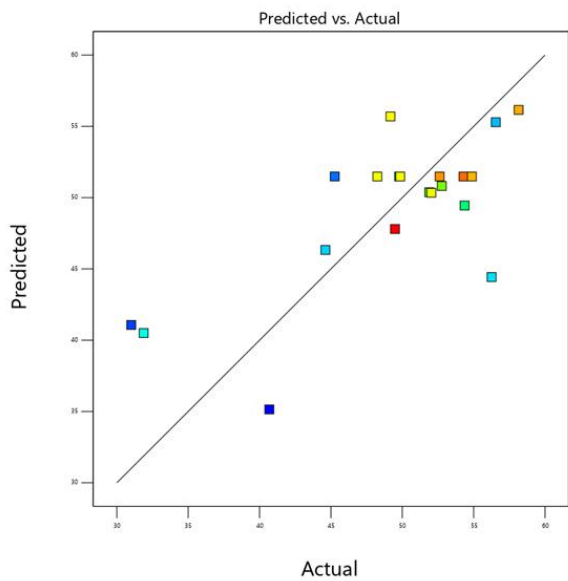
شکل ۳- نمایش سه‌بعدی اثر متقابل متغیرهای مستقل بر استخراج فلاونوئید کل از برگ شیرین‌بیان

Figure 3. Three-dimensional representation of independent variables interaction on total flavonoids extraction from licorice leaves

است.

با توجه به نمودارها، بهینه‌ترین مقادیر برای پارامترها به ترتیب دما (۵۷/۴۹۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۳۹/۹۹۵ دقیقه) و غلظت حلال (۵۴/۹۹۵ درصد) بودند. این شرایط به‌طور خاص، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۵۸/۱۵ درصد) را به دنبال داشتند.

تحلیل اثر شرایط استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از نمودارهای سه‌بعدی نشان داد که تغییرات متغیرهای مستقل شامل غلظت دما (A)، زمان (B) و حلال (C) تأثیر معنی‌داری بر بازده ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی دارند (شکل ۴). مقادیر فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH) در دامنه ۳۱ تا ۵۸/۱۵ درصد قرار دارد که این بازه نشان‌دهنده تغییرات قابل توجه ناشی از ترکیب این عوامل



شکل ۴- نمایش سه‌بعدی اثر متقابل متغیرهای مستقل بر استخراج آنتی‌اکسیدان‌ها به روش DPPH از برگ شیرین بیان

Figure 4. Three-dimensional representation of independent variables interaction on antioxidants extraction using DPPH method from licorice leaves

بحث

این پژوهش، به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیب‌های زیست‌فعال از گیاه مورد مطالعه به روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی انجام شد.

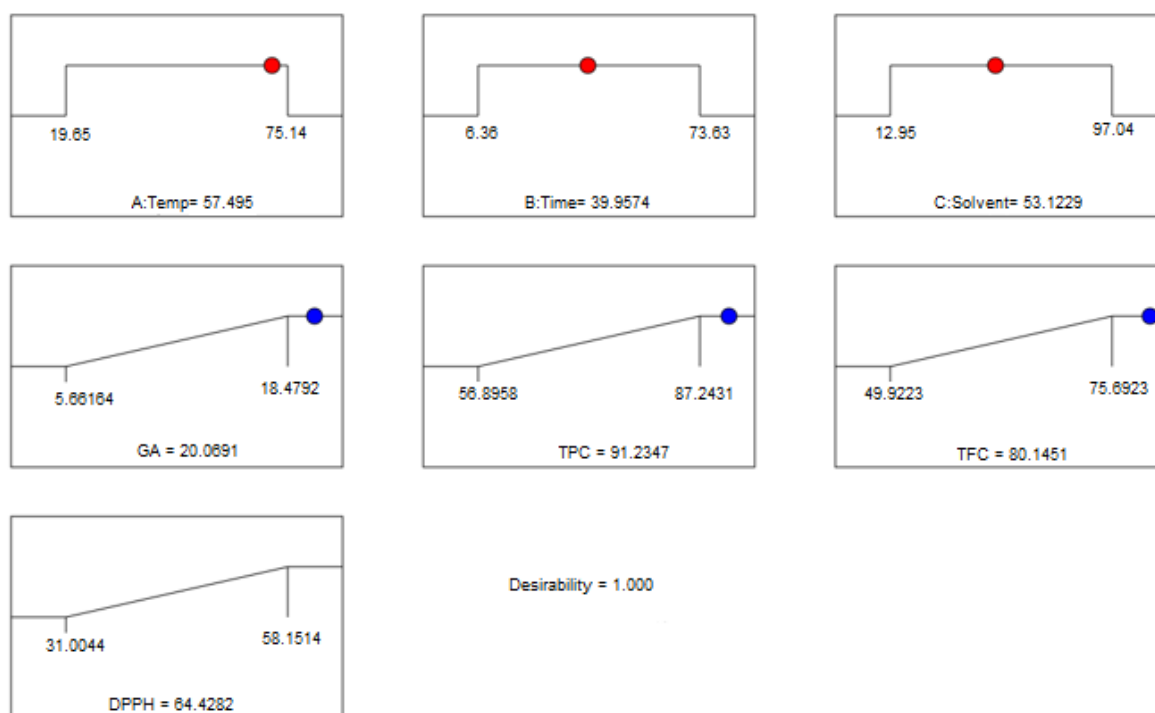
روند تغییرات هر یک از پاسخ‌ها تحت تأثیر پارامترهای مختلف، گویای وجود روابط غیرخطی و تعامل‌های پیچیده بین متغیرها بود. به‌طور مشخص، دمای بالا و زمان طولانی استخراج، در محدوده مشخصی منجر به بهبود بازده استخراج و افزایش آزادسازی ترکیب‌های هدف به دلیل تخریب ساختار سلولی شدند. با این حال، عبور از آستانه بهینه برای دما (بیش از ۷۰ درجه سانتی‌گراد) یا زمان (بیش از ۴۵ دقیقه) منجر به کاهش معنی‌دار مقادیر GA، TPC و TFC گردید که احتمالاً ناشی از تخریب حرارتی و اکسیداسیون ترکیب‌های حساس است (Oke et al., 2020; Singh et al., 2025; Plawgo et al., 2024). این یافته‌ها با مطالعات پیشین روی گیاهان دارویی مشابه مانند رزماری، زردچوبه و شیرین بیان هم‌راستا می‌باشد (Spigno et al., 2007; Nayak et al., 2015; Maroun et al., 2018).

تحلیل برهم‌کنش بین دما و غلظت حلال نشان داد که در سطوح پایین حلال (زیر ۵۰٪)، افزایش دما تأثیر قابل‌توجهی در بهبود استخراج ندارد و حتی ممکن است منجر به تخریب ترکیب‌ها شود. در مقابل، غلظت‌های بالای حلال (بیش از ۷۰٪) نیز به دلیل استخراج ترکیب‌های نامطلوب و کاهش کیفیت عصاره، مناسب نبوده و حلال‌های با قطبیت متوسط (متانول ۶۰٪) بهترین عملکرد را از خود نشان دادند. این موضوع تأکید می‌کند که انتخاب صحیح حلال، نقش کلیدی در تعادل بین حل‌شوندگی ترکیب‌های مفید و کاهش ناخالصی‌ها دارد (Rajha et al., 2014).

در بررسی استخراج فلاونوئیدها، نتایج نشان داد که افزایش دما تا حدود ۵۷/۴۹۵ درجه سانتی‌گراد و افزایش زمان تا حدود ۳۹/۹۹۵ دقیقه منجر به بیشترین مقدار TFC می‌گردد، اما فراتر رفتن از این مقادیر منجر به افت استخراج می‌شود. این اثر دوگانه زمان و دما برای DPPH نیز مشاهده شد، به‌گونه‌ای که نقطه بهینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دمای حدود ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد و زمان حدود ۳۹/۹۹۵ دقیقه حاصل گردید. این نتایج نشان می‌دهند که مدت زمان تماس بین حلال و ماتریکس گیاهی باید به‌گونه‌ای تنظیم شود که از یکسو امکان استخراج کامل فراهم شود و از سوی دیگر از تخریب ترکیب‌ها جلوگیری شود (Drăghici-Popa et al., 2023; Abdallah et al., 2024).

در عین حال، برخی محدودیت‌ها مانند وجود نقاط پرت در داده‌های DPPH و مقادیر منفی R^2 پیش‌بینی‌شده در برخی مدل‌ها شناسایی گردید. این موارد ممکن است ناشی از ویژگی‌های غیرخطی شدید در سیستم استخراج یا نویز در داده‌های تجربی باشند. استفاده از تبدیل‌های ریاضی مناسب یا داده‌برداری دقیق‌تر در نقاط مرزی می‌تواند در مطالعات آینده به بهبود برازش مدل کمک کند.

نکته قابل توجه در تحلیل نتایج، شناسایی ناحیه بهینه‌ای بود که در آن، تعادل بین سه عامل دما، زمان و غلظت حلال به‌گونه‌ای برقرار شده که بیشترین میزان GA، TPC، TFC و DPPH حاصل گردید. این ناحیه با دمای ۷۰-۵۷ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۵-۴۵ دقیقه و غلظت حلال ۶۰-۵۰ درصد انطباق دارد. چنین تعاملی نشان‌دهنده اهمیت رویکردهای چندمتغیره در مقابل بهینه‌سازی تک‌عاملی در طراحی فرایندهای استخراج است.



شکل ۵- بهینه‌سازی مقادیر پارامترهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی برای کسب بیشینه مقادیر پارامترهای مورد نظر

Figure 5. Optimization of input parameters of the central composite design model for obtaining maximum amounts of considered parameters

بر اساس نتایج این مطالعه، به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که غلظت حلال، زمان و دمای استخراج تأثیرات معنی‌داری بر میزان استخراج اسید گلیسیریزیک، ترکیب‌های فنولی کل، فلاونوئیدهای کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. براساس مدل‌های آماری حاصل، شرایط بهینه شامل دمای ۵۷-۷۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۵-۴۵ دقیقه و غلظت حلال ۵۰-۶۰ درصد پیشنهاد شد که منجر به استخراج بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک (۲۰/۰۶۹)، فنول کل (۹۱/۲۳) میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه، فلاونوئید کل (۸۰/۱۴) میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

(۶۴/۴۲ درصد) می‌شود (شکل ۵). همچنین این مطالعه نشان داد که استفاده از روش RSM با طرح CCD ابزار قدرتمندی برای بهینه‌سازی همزمان چند پاسخ در فرایند استخراج گیاهیست. این روش امکان کاهش تعداد آزمایش‌ها، صرفه‌جویی در زمان و هزینه و دستیابی به مدل‌های پیش‌بینی‌کننده مناسب را فراهم می‌کند. به‌عنوان پیشنهاد، انجام آزمایش‌های تأییدی در شرایط بهینه شناسایی شده برای اعتبارسنجی مدل‌ها و بررسی دقیق‌تر سازوکارهای تخریب ترکیب‌های حساس می‌تواند در تحقیقات آینده مدنظر قرار گیرد.

References

- Abdallah, H.B., Abbassi, A., Trabelsi, A., Krichen, Y., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K., 2024. Optimization of ultrasound-assisted extraction of

polyphenols and flavonoids from *Citrus aurantium* L. var. amara Engl. Fruit peel using response surface methodology. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(13): 14139-14151,

- <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03947-x>
- Abu Bakar, F.I., Abu Bakar, M.F., Abdullah, N., Endrini, S. and Fatmawati, S., 2020. Optimization of extraction conditions of phytochemical compounds and anti-gout activity of *Euphorbia hirta* L. (Ara Tanah) using response surface methodology and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1): 4501261. <https://doi.org/10.1155/2020/4501261>
 - Asl, M.N. and Hosseinzadeh, H., 2008. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(6): 709-724. <https://doi.org/10.1002/ptr.2362>
 - Maroun, R.G., Rajha, H.N., El Darra, N., El Kantar, S., Chacar, S., Debs, E., Vorobiev, E. and Louka, N., 2018. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources: 265-293. In: Galanakis, C.M., (Ed.). *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing, New York, 458p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00008-7>
 - Bhadange, Y.A., Carpenter, J. and Saharan, V.K., 2024. A comprehensive review on advanced extraction techniques for retrieving bioactive components from natural sources. *ACS omega*, 9(29): 31274-31297. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c02718>
 - Ceccuzzi, G., Rapino, A., Perna, B., Costanzini, A., Farinelli, A., Fiorica, I., Marziani, B., Cianci, A., Rossin, F., Cesaro, A.E. and Spampinato, M.D., 2023. Licorice toxicity: A comprehensive narrative review. *Nutrients*, 15(18): 3866. <https://doi.org/10.3390/nu15183866>
 - Colvin, D.M., 2018. A review on comparison of the extraction methods used in licorice root: Their principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 7(6): 323. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000323>
 - Ding, Y., Brand, E., Wang, W. and Zhao, Z., 2022. Licorice: Resources, applications in ancient and modern times. *Journal of Ethnopharmacology*, 298: 115594. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115594>
 - Drăghici-Popa, A.M., Boscornea, A.C., Brezoiu, A.M., Tomas, Ş.T., Pârvolescu, O.C. and Stan, R., 2023. Effects of extraction process factors on the composition and antioxidant activity of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruit extracts. *Antioxidants*, 12(10): 1897. <https://doi.org/10.3390/antiox12101897>
 - Ebrahimzadeh, M., Hosseinimehr, S., Hamidinia, A. and Jafari, M., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline*, 1: 7-14. <https://www.researchgate.net/publication/286282080>
 - Fu, B., Liu, J., Li, H., Li, L., Lee, F.S. and Wang, X., 2005. The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid. *Journal of Chromatography A*, 1089(1-2): 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.051>
 - Goodarzi, S., Rafiei, S., Javadi, M., Khadem Haghighian, H. and Noroozi, S., 2018. A review on antioxidants and their health effects. *Journal of Nutrition and Food Security*, 3(2): 106-112. <http://jnfs.ssu.ac.ir/article-1-158-en.html>
 - Güçlü-Üstündağ, Ö. and Mazza, G., 2007. Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3): 231-258. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>
 - Morya, S., Awuchi, C.G. and Menaa, F., 2022. Advanced functional approaches of nanotechnology in food and nutrition: 257-272. In: Chowdhary, P., Kumar, V., Kumar, S. and Hare, V., (Eds.). *Environmental Management Technologies*. CRC press, Boca Raton, 384p. <https://doi.org/10.1201/9781003239956-16>
 - Murray, M.T., 2020. *Glycyrrhiza glabra* (licorice). *Textbook of natural medicine*, 641p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43044-9.00085-6>
 - Nakajima, J.I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M. and Saito, K., 2004. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *BioMed Research International*, 2004: 241-247. <https://doi.org/10.1155/S1110724304404045>
 - Nayak, B., Liu, R.H. and Tang, J., 2015. Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7): 887-918. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.654142>
 - Oke, E.O., Adeyi, O., Okolo, B.I., Adeyi, J.A., Ayanyemi, J., Osoh, K.A. and Adegoke, T.S., 2020. Phenolic compound extraction from Nigerian *Azadirachta indica* leaves: Response surface and neuro-fuzzy modelling performance evaluation with Cuckoo search multi-objective optimization. *Results in Engineering*, 8: 100160. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2020.100160>
 - Plawgo, M., Kocira, S. and Bohata, A., 2024. Multi-objective optimization of the green extraction conditions of bio-active compounds from a *levisticum officinale* WDJ Koch: Pareto optimality

- and compromise solutions for process management. *Agricultural Engineering*, 28. <https://doi.org/10.2478/agriceng-2024-0010>
- Rajha, H.N., El Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R.G. and Louka, N., 2014. Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. *Food and Nutrition Sciences*, 5: 397-409. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.54048>
 - Razavi, S.M., Zahri, S., Zarrini, G., Nazemiyeh, H. and Mohammadi, S., 2009. Biological activity of quercetin - 3 - O - glucoside, a known plant flavonoid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35: 376-378.
 - Shabkhiz, M.A., Eikani, M.H., Sadr, Z.B. and Golmohammad, F., 2016. Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Food Chemistry*, 210: 396-401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.006>
 - Shang, Z., Liu, C., Qiao, X. and Ye, M., 2022. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine licorice (Gan-Cao): An update review. *Journal of Ethnopharmacology*, 299: 115686. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115686>
 - Sharma, R., Singla, R.K., Banerjee, S. and Sharma, R., 2023. Revisiting licorice as a functional food in the management of neurological disorders: Bench to trend. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 155: 105452. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105452>
 - Singh, N., Kumar, S. and Patle, D.S., 2025. Intensification of extraction of bioactive compounds from pomegranate peel using an ultrasound-microwave assisted extraction approach: Parametric optimization, kinetics and thermodynamics. *Separation and Purification Technology*, 359: 130681. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.130681>
 - Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1): 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
 - Weremfo, A., Abassah-Oppong, S., Adulley, F., Dabie, K. and Seidu-Larry, S., 2023. Response surface methodology as a tool to optimize the extraction of bioactive compounds from plant sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(1): 26-36. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12121>
 - Zhang, Z., Yang, L., Hou, J., Tian, S. and Liu, Y., 2021. Molecular mechanisms underlying the anticancer activities of licorice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 267: 113635. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113635>