

بررسی اثر فصل و منطقه برداشت بر میزان اسید گلیسیریزیک، املاح معدنی و

قند موجود در ریشه شیرین بیان

زهره داورپناه^۱، محمود شیخ زین الدین^{۱*}، شهرام دخانی^۱ و قدرت اله سعیدی^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۷/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۸/۱۲)

چکیده

ارزش و اهمیت ریشه شیرین بیان به دلیل تنوع مواد شیمیایی موجود در آن است که از بین این ترکیبات، اسید گلیسیریزیک به عنوان ماده مؤثره آن از اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی، داروسازی و دخانیات برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی اثر فصل و منطقه برداشت بر ترکیبات شیمیایی شامل خاکستر، قند و اسید گلیسیریزیک و کیفیت ریشه شیرین بیان بود. در این پژوهش، ریشه‌های شیرین بیان در دو فصل تابستان و پاییز و از ۳ منطقه (اقلید، بیضاء و دشمن زیاری) در استان فارس، یک منطقه در استان کرمان (بافت) و یک منطقه در استان کرمانشاه (اسلام‌آباد) برداشت و آزمایش‌های شیمیایی تعیین صفات روی پودر عصاره آنها انجام شد. داده‌های آزمایش بر اساس طرح بلوک کامل تصادفی با ۶ تکرار و به صورت مرکب تجزیه گردید. با توجه به نتایج حاصل، اثر فصل بر میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز، اثر منطقه و اثر متقابل فصل و منطقه بر میزان خاکستر، قند قبل و بعد از هیدرولیز و میزان اسید گلیسیریزیک در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. نتایج نشان داد که کمترین میزان خاکستر در ریشه شیرین بیان منطقه اسلام‌آباد و در فصل تابستان، بیشترین میزان قند قبل از هیدرولیز در ریشه‌های برداشت شده از منطقه اسلام‌آباد و بافت، بیشترین میزان قند بعد از هیدرولیز از ریشه‌های برداشت شده از منطقه اسلام‌آباد در فصل پاییز و بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های برداشت شده از منطقه بیضاء در فصل پاییز به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: منطقه، فصل، شیرین بیان، اسید گلیسیریزیک، قندها، HPLC

مقدمه

متنوع شیرین بیان، از دیرباز فراورده‌های متنوعی شامل پودر، عصاره و شیره شیرین بیان، گلی سین، شیرین بیان فاقد اسید گلیسیریزیک (DGL) و اجزای فاقد اسید گلیسیریزیک از آن تهیه شده است (۷ و ۱۵). مهم‌ترین ماده فعال بیولوژیک در ریشه شیرین بیان یک تری ترپنوئید به نام اسید گلیسیریزیک است که میزان آن با زیاد شدن سن گیاه افزایش می‌یابد، به طوری که ریشه‌های مسن دارای بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک

شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) گیاهی خودرو، علفی، پایا و چند ساله است که از زمان‌های بسیار قدیم به دلیل داشتن خواص دارویی مورد توجه بوده است (۲، ۴ و ۵). امروزه عصاره شیرین بیان به طور وسیع در صنایع داروسازی، صنایع غذایی (به عنوان عامل شیرین کننده و تغییر دهنده عطر) و صنایع دخانیات به کار می‌رود (۱۴). با توجه به ویژگی‌های

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. دانشیار زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zeinodin@cc.iut.ac.ir

و بعد از هیدرولیز ریشه‌های شیرین بیان بود.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

در این مطالعه از مواد شیمیایی استات سرب خالص، اسید کلرید ریک ۳۷ درصد، آمونیاک ۲۵ درصد، کربنات سدیم خالص، اسید استیک گلاسیال، متیلن بلو، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم خالص، سولفات مس خالص، متانول با درجه HPLC و کاغذ تورنسل تهیه شده از شرکت مرک آلمان، مونوآمونیوم اسید گلیسرینیکات با خلوص ۹۷/۵ درصد تهیه شده از شرکت سیگمای آلمان و اتانول ۹۶ درصد محصول شرکت گوارای ایران استفاده گردید.

نمونه برداری

ریشه‌های شیرین بیان در دو فصل تابستان (حدود ۲۰ مرداد) و پاییز (حدود ۲۰ آذر) و از سه منطقه اقلید، بیضاء و دشمن زیاری در استان فارس، یک منطقه در استان کرمان و یک منطقه در استان کرمانشاه برداشت شد. برداشت نمونه‌های ریشه به این صورت انجام شد که در هر یک از مناطق مورد نظر (مناطق انتخاب شد که به تازگی برداشت ریشه در آن صورت نگرفته بود و ریشه‌های چند ساله داشت) محلی که شاخص آن منطقه بود به شش قسمت یا بلوک تقسیم شد و در هر بلوک برای دو فصل تابستان و پاییز ریشه‌های شیرین بیان به میزان یک کیلوگرم از واحدهای آزمایشی مربوطه برداشت شد. لذا در هر منطقه اثر دو فصل در ۶ بلوک و به صورت طرح بلوک کامل تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

آماده‌سازی ریشه‌ها

ریشه‌های مرطوب برداشت شده از هر واحد آزمایشی پس از تمیز شدن و گرفتن گل ولای آن به قطعات کوچک تری تقسیم و در آون معمولی با دمای 70°C طی ۲۴ ساعت خشک شد. ریشه‌های خشک شده با آسیاب چکشی پودر گردید و جهت

می‌باشند. این ترکیب به صورت پودر کریستاله سفید رنگی استخراج می‌شود و شامل نمک‌های پتاسیم و کلسیم اسید گلیسرینیک است (۲، ۵، ۶، ۷ و ۸). میزان شیرینی حاصل از اسید گلیسرینیک ۵۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از شیرینی ساکارز است و بر اثر هیدرولیز به ترکیبات سازنده خود شامل یک مولکول اسید گلیسرینیک و دو مولکول اسید گلوکورونیک تجزیه می‌شود و شیرینی خود را از دست می‌دهد (۱، ۲ و ۵).

به‌طور متداول، کیفیت گیاه شیرین بیان به صورت مشاهده‌ای ارزیابی می‌شود و آنهایی که ریشه حجیم، ساقه‌های قوی و کرم رنگ داشته باشند، کیفیت بهتری دارند، ولی ارزیابی صحیح‌تر از کیفیت شیرین بیان بستگی به اندازه‌گیری دقیق اسید گلیسرینیک در آن دارد. با توجه به این که شاخص‌های تعیین کننده کیفیت ریشه شیرین بیان میزان اسید گلیسرینیک و فاکتورهایی مانند قند قبل و بعد از هیدرولیز و خاکستر است، تعیین عوامل مؤثر بر هر یک از این پارامترها نقش مؤثری در افزایش کیفیت ریشه شیرین بیان دارد، به ویژه این که تجربه نشان داده است که استفاده از مخلوطی متعادل از ریشه‌های شیرین بیان محصولی با کیفیت بهتر تولید می‌کند. در تحقیقی (۲۰) چندین روش آزمایشگاهی برای استخراج اسید گلیسرینیک بررسی شده که شامل روش تقطیر برگشتی (رفلاکس حرارتی)، اولتراسونیک، سوکسله، استخراج در دمای اتاق و استخراج به کمک مایکروویو می‌باشد و گزارش شده است که از بین روش‌های مطرح شده، روش استخراج به کمک مایکروویو از نظر سرعت و نیز کاهش حلال مصرفی بر سایر روش‌ها برتری دارد. در سال‌های اخیر نیز، روش‌های تجزیه‌ای متفاوتی شامل کروماتوگرافی لایه‌ای (۱۳)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (۱۱، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰)، الکتروفورز موئینه‌ای با فشار بالا (۲۱، ۲۳ و ۲۴) و اسپکتروسکوپی نزدیک مادون قرمز (۲۳) برای اندازه‌گیری اسید گلیسرینیک استفاده شده است.

هدف از این مطالعه بررسی اثر عوامل محیطی شامل فصل و منطقه برداشت بر میزان اسید گلیسرینیک، خاکستر و قند قبل

جدول ۱. میانگین ترکیبات موجود در ریشه شیرین بیان در مناطق و فصول مختلف

صفات				عامل آزمایشی
درصد اسید گلیسیریزیک	درصد قند بعد از هیدرولیز	درصد قند قبل از هیدرولیز	درصد خاکستر	
۸/۱ ^{ab}	۱۱/۱ ^b	۸/۰ ^c	۷/۵ ^a	اقلید
۹/۵ ^a	۱۱/۱ ^b	۷/۹ ^c	۶/۸ ^b	بیضا
۷/۲ ^{bc}	۱۱/۱ ^b	۸/۰ ^c	۷/۵ ^a	دشمن زیاری
۸/۲ ^{ab}	۱۱/۹ ^a	۸/۷ ^a	۷/۵ ^a	بافت
۶/۶ ^c	۱۲/۰ ^a	۸/۳ ^b	۶/۰ ^c	اسلام آباد
۱/۰	۰/۲	۰/۲	۰/۵	LSD(۰/۵)
۸/۱ ^a	۱۰/۸ ^b	۷/۵ ^b	۷/۰ ^a	تابستان
۷/۸ ^a	۱۲/۱ ^a	۸/۸ ^a	۷/۱ ^a	پاییز
۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۳	LSD(۰/۵)

در هر عامل و برای هر صفت، میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD(5%) نمی‌باشند.

برداشت شده از مناطق بافت و بیضاء مشاهده شد. در مورد قند بعد از هیدرولیز بیشترین و کمترین میزان مشاهده شده به ترتیب مربوط به ریشه‌های برداشت شده از اسلام‌آباد و اقلید، بیضاء و دشمن زیاری بود. مقایسه آماری نتایج نشان داد از نظر میزان قند قبل از هیدرولیز بین نمونه‌های برداشت شده از بافت و سایر مناطق تفاوت معنی‌دار وجود دارد؛ در حالی که بین نمونه‌های استحصال شده از مناطق اقلید، بیضا و دشمن زیاری تفاوت معنی‌داری دیده نشد. میزان قند قبل از هیدرولیز در ریشه‌های مربوط به اسلام‌آباد نیز که در رتبه دوم قرار گرفت تفاوت معنی‌داری با سایر نمونه‌ها داشت. از نظر مقدار قند بعد از هیدرولیز تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از بافت و اسلام‌آباد مشاهده نشد؛ ولی این گروه با گروه دوم شامل ریشه‌های برداشت شده از اقلید، بیضا و دشمن زیاری اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۱). هم‌چنین میزان هر دو نوع قند در ریشه‌های برداشت شده در فصل پاییز بیشتر از ریشه‌های برداشت شده در فصل تابستان بود (جدول ۱). بررسی میانگین‌های اثر متقابل بین فصل و منطقه برداشت بر میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز ریشه شیرین بیان (جدول ۲) نشان داد که

مناطق مختلف باشد. اثر فصل بر میزان خاکستر معنی‌دار نبود که نشان می‌دهد شرایط محیطی دو فصل زراعی تأثیر معنی‌داری را بر میزان خاکستر نداشته‌اند. تا کنون گزارشی در مورد اثر فصل و منطقه برداشت بر میزان خاکستر ریشه شیرین بیان منتشر نشده است.

نتایج بررسی اثر متقابل فصل و منطقه برداشت بر میزان خاکستر (جدول ۲) نشان داد که در مناطق اقلید، دشمن زیاری و بافت اثر فصل بر میزان خاکستر معنی‌دار نبود؛ در صورتی که در منطقه بیضاء و اسلام‌آباد اثر فصل معنی‌دار بود. در منطقه بیضاء کمترین میزان خاکستر در ریشه‌های برداشت شده در فصل پاییز و در منطقه اسلام‌آباد در ریشه‌های برداشت شده در فصل تابستان به دست آمد. به طور کلی ریشه‌های برداشت شده از منطقه اسلام‌آباد در فصل تابستان دارای کمترین میزان خاکستر بودند.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر فصل، اثر منطقه و اثر متقابل فصل و منطقه برداشت بر میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز ریشه شیرین بیان معنی‌دار بوده است. بیشترین و کمترین میزان قند قبل از هیدرولیز به ترتیب در ریشه‌های

جدول ۲ میانگین‌های اثر متقابل فصل و منطقه برداشت برای صفات درصد خاکستر، قند قبل و بعد از هیدرولیز و اسید گلیسیریزیک

صفات				عامل آزمایشی	
درصد اسید گلیسیریزیک	در صد قند بعد از هیدرولیز	درصد قند قبل از هیدرولیز	درصد خاکستر	فصل	منطقه
۸/۹ ^b	۱۰/۳ ^h	۷/۴ ^d	۷/۳ ^b	تابستان	اقلید
۷/۴ ^{de}	۱۱/۹ ^c	۸/۶ ^b	۷/۸ ^{ab}	پاییز	
۸/۶ ^{bc}	۱۰/۶ ^g	۷/۵ ^d	۷/۹ ^a	تابستان	بیضاء
۱۰/۴ ^a	۱۱/۶ ^{de}	۸/۲ ^c	۵/۹ ^d	پاییز	
۷/۹ ^{cde}	۱۰/۵ ^{gh}	۷/۳ ^d	۷/۳ ^b	تابستان	دشمن زیاری
۶/۶ ^{def}	۱۱/۸ ^{cd}	۸/۶ ^b	۷/۷ ^{ab}	پاییز	
۸/۲ ^{bed}	۱۱/۴ ^{ef}	۸/۲ ^c	۷/۵ ^{ab}	تابستان	بافت
۸/۲ ^{bed}	۱۲/۴ ^b	۹/۱ ^a	۷/۶ ^{ab}	پاییز	
۷/۰ ^{def}	۱۱/۳ ^f	۷/۳ ^d	۵/۳ ^d	تابستان	اسلام‌آباد
۶/۳ ^f	۱۲/۸ ^a	۹/۲ ^a	۶/۶ ^c	پاییز	

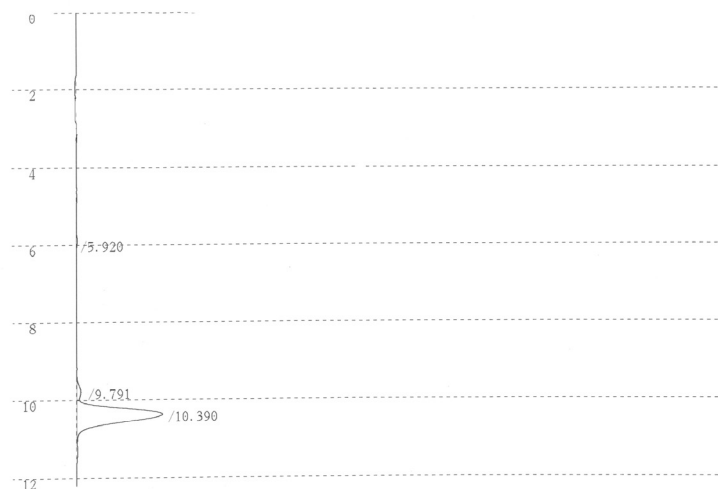
برای هر صفت، میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک دارای تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD(5%) نمی‌باشند.

شیرین‌بیان (جدول ۲) نشان داد که در ریشه‌های برداشت شده از دو منطقه اقلید و بیضاء اثر فصل بر میزان اسید گلیسیریزیک معنی‌دار بود، ولی در ریشه‌های برداشت شده از سایر مناطق فصل اثر معنی‌داری را بر میزان این اسید نشان نداد. در منطقه اقلید و اسلام‌آباد بهترین فصل برداشت ریشه شیرین‌بیان از نظر بالا بودن میزان اسید گلیسیریزیک در ریشه فصل تابستان و در منطقه بیضاء فصل پاییز بود. به‌طور کلی بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک از ریشه‌های برداشت شده از منطقه بیضاء و در فصل پاییز به‌دست آمد.

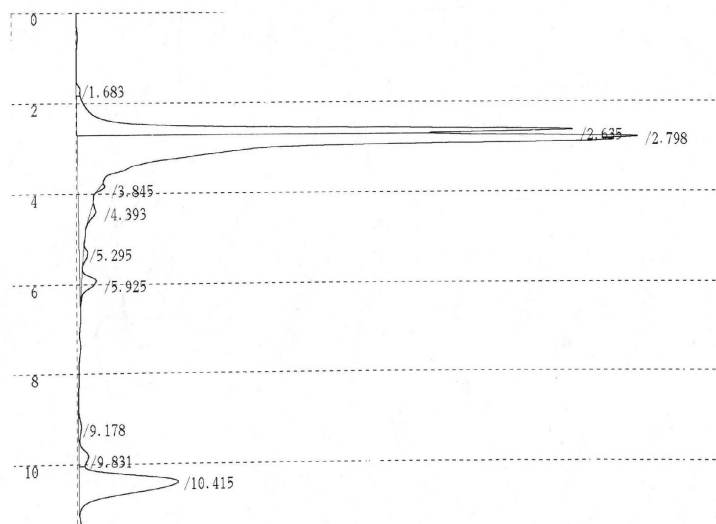
در مطالعات دیگر نیز محققان ایتالیایی (۲۲) اثر منطقه برداشت ریشه شیرین‌بیان را بر میزان مواد مؤثره و فعالیت‌های بیولوژیک آن بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که میزان اسید گلیسیریزیک ریشه‌های شیرین‌بیان برداشت شده از ۹ منطقه بین ۰/۴۲ تا ۲/۰۸ درصد وزن مرطوب تغییرات داشته و اثر منطقه بر میزان اسید گلیسیریزیک معنی‌دار بود که علت آن را شرایط محیطی متفاوت مانند میزان تابش خورشید، ارتفاع از سطح دریا و عرض جغرافیایی ذکر نموده‌اند.

در همه مناطق اثر فصل بر میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز معنی‌دار شد و میزان تأثیر فصل بر این صفات در مناطق مختلف متفاوت بود؛ ولی میزان هر دو قند در تمامی مناطق در فصل پاییز بیشتر از فصل تابستان بود. به‌طور کلی بیشترین میزان قند قبل و بعد از هیدرولیز در ریشه‌های برداشت شده از منطقه اسلام‌آباد و در فصل پاییز به‌دست آمد (جدول ۱).

میزان اسید گلیسیریزیک ریشه شیرین‌بیان با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد که کروماتوگرام مربوط به استاندارد و نمونه‌ها به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ دیده می‌شود. بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها، اثر منطقه و اثر متقابل فصل و منطقه برداشت بر میزان اسید گلیسیریزیک ریشه شیرین‌بیان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان اسید گلیسیریزیک در ریشه‌های برداشت شده از منطقه بیضاء و کمترین میزان آن در ریشه‌های برداشت شده از منطقه اسلام‌آباد به‌دست آمد (جدول ۱). میانگین‌های اثر متقابل بین فصل و منطقه برداشت برای میزان اسید گلیسیریزیک ریشه



شکل ۱. کروماتوگرام مربوط به ترکیب استاندارد مونوآمونوم اسید گلیسریدیکات (MAG) شرایط کروماتوگرافی: ستون (RP-C₁₈ (150 × 4.6 mm) ، دمای آون °C ۴۰، آشکار ساز UV (طول موج nm ۲۵۴)، فاز متحرک : متانول- آب- اسید استیک (۷۵V/V/V : ۲۴ : ۱)، سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه



شکل ۲. کروماتوگرام HPLC عصاره ریشه شیرین بیان، شرایط کروماتوگرافی: ستون (RP-C₁₈ (150 × 4.6 mm) ، دمای آون °C ۴۰، آشکار ساز UV (طول موج nm ۲۵۴)، فاز متحرک : متانول- آب- اسید استیک (۷۵V/V/V : ۲۴ : ۱)، سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه

بر میزان این ماده در ریشه شیرین بیان می باشد (۱۲). به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که بهترین منطقه و فصل از نظر پایین بودن میزان خاکستر ریشه شیرین بیان منطقه اسلام آباد و در فصل تابستان بود. بیشترین میزان قند قبل از هیدرولیز در ریشه های برداشت شده از مناطق اسلام آباد و بافت در فصل پاییز و برای قند بعد از هیدرولیز در ریشه های برداشت شده از منطقه اسلام آباد در فصل پاییز به دست آمد. از نظر میزان اسید گلیسیریزیک ریشه های برداشت شده از منطقه بیضاء در فصل پاییز بیشترین مقدار را دارا بود؛ بنابراین برای دستیابی به محصولی با کیفیت بهتر توصیه می شود که مخلوطی از ریشه های شیرین بیان برداشت شده از مناطق مختلف به عنوان ماده اولیه استفاده شود. همچنین در هر فصل، از مناطقی برداشت ریشه شیرین بیان صورت گیرد که از نظر میزان اسید گلیسیریزیک و سایر ترکیبات مناسب باشد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم شرکت سهامی ریشمک که بخشی از هزینه های انجام این تحقیق را تأمین نمودند، سپاسگزاری می شود. همچنین از کارشناس محترم آزمایشگاه های گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان، جناب آقای مهندس بهرامی که در بخش HPLC نقش جدی داشته اند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

محققان عشق آباد ترکمنستان بر اساس مطالعاتی که انجام دادند گزارش نمودند که نمونه های شیرین بیان که در جلگه های اطراف آمودریا (رود جیحون) می رویند از لحاظ اسید گلیسیریزیک غنی می باشند و مقدار این ترکیب متناسب با شرایط رشد منطقه و فصل برداشت گیاه متغیر است (۳).

تحقیق دیگری بیان کرد که کمترین مقدار اسید گلیسیریزیک مربوط به ریشه های برداشت شده در فصل پاییز بود و ریشه های برداشت شده از مناطق مختلف دارای میزان اسید گلیسیریزیک بین ۳/۶۳ تا ۱۳/۰۶ درصد بودند که گویای تأثیر فصل و منطقه برداشت بر میزان اسید گلیسیریزیک ریشه شیرین بیان است (۴). در یک مطالعه دیگر نیز گزارش شد که ریشه های برداشت شده از مناطق خراسان، ارومیه و فارس به ترتیب دارای ۴/۲، ۶/۵۴ و ۱۳/۳ درصد اسید گلیسیریزیک بودند که بیانگر تأثیر منطقه برداشت بر میزان اسید گلیسیریزیک ریشه شیرین بیان می باشد (۱). در یک پژوهش دیگر نیز نتیجه گیری شده است که مقدار اسید گلیسیریزیک در ریشه شیرین بیان با رشد گیاه افزایش می یابد، با تغییرات فصل، تغییر محسوسی در میزان اسید گلیسیریزیک ریشه ها دیده نمی شود، مقدار اسید گلیسیریزیک در ریشه های جانبی و ریزوم های افقی بیشتر از ریشه های عمودی است، ریشه های گیاهانی که در زمین های نمک دار رشد کرده باشند، نسبت به ریشه هایی که در زمین های بدون نمک رشد نمایند، دارای اسید گلیسیریزیک بیشتری می باشند که این موارد نیز گویای تأثیر عوامل محیطی

منابع مورد استفاده

۱. ابریشمیان، ح. ۱۳۶۴. کاربرد اسید گلیسیرتینیک حاصل از شیرین بیان در بیماری های پوستی. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران.
۲. امید بیگی، و. ۱۳۷۹. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد.
۳. آقای جونی، ک. ۱۳۶۴. بررسی و مقایسه میزان اسانس و ترکیب های متشکله آن در گیاهان اوکالیپتوس کاماندولنسیس در شرایط مزرعای و کشت بافت. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی تهران.
۴. رازانی بروجردی، ص. ۱۳۵۳. بررسی گلیسیریزا گلابرا و انتشار و پراکندگی آن در ایران. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران.

۵. زرگری، ع. ۱۳۶۲. گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران.
۶. کمالی سروستانی، ح. ۱۳۷۰. شیرین بیان یکی از شگفتی های طبیعت. سازمان برنامه و بودجه استان فارس، شیراز.
۷. نوابی، م. ۱۳۵۶. تعیین مقدار اسید گلیسیریتیک در گلیسیریزا گلابرا. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران.
۸. واعظ زاده، ف. ۱۳۴۲. انواع شیرین بیان ایران و مقایسه مواد مؤثره آن. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران.
۹. وزارت صنایع، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۶۳. استاندارد عصاره شیرین بیان، شماره استاندارد ۲۳۴۳، تهران.
۱۰. وزارت صنایع، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۲. استاندارد شیرین بیان - اندازه گیری اسید گلیسیریزیک در عصاره به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - روش آزمون، شماره استاندارد ۶۶۹۹، تهران.
11. Andrisano, V., D. Bonazzi and V. Cavrini. 1995. HPLC analysis of liquorice triterpenoides – applications to the quality control of pharmaceuticals. J. Pharmaceut. Botanic. Anal. 13(4-5): 597-605.
12. Chih, F. K. 1965. The quality of Chinese licorice comparative studies on the wild licorice of northeast china. Chem. Abst. 62: 821.
13. Cui, S., B. Fu, F.S.C. Lee and X. Wang. 2005. Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprinting of licorice. J. Chromatog. B, 828: 33-40.
14. Fenwick, G.R., J. Lutomski and C. Nieman. 1990. Licorice, composition, uses and analysis. Food Chem. 38(2): 119-143.
15. Harold, A. 1979. Glycyrrhizin-free fractions licorice root and process for obtaining such fraction. U.S.A. pat # 4163067.
16. Hurst, W.J., J.M. Mckim and R.A. Martin. 1983. High-performance liquid chromatographic determination of glycyrrhizin in licorice products. J. Agric. Food Chem. 31: 387-389.
17. Jiang, Y., T. Lu and F. Chen. 2004. Preparative purification of glycyrrhizin extracted from the root of licorice using high-speed counter-current chromatography. J. Chromatog. A, 1033: 183-186.
18. Koga, K., K. Ohmachi, S. Kavashima, K. Takada and M. Murakami. 2000. Determination of 18 α -glycyrrhizin and 18 β -glycyrrhizin in dog plasma by high-performance liquid chromatography. J. Chromatog. B, 738: 165-168.
19. Ong, E.S. and S.M. Len. 2003. Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants. Analytica Chimica Acta 482: 81-86.
20. Pan, X., H. Liu, G. Jia and Y.Y. Shu. 2000. Microwave- assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. Biochem. Eng. J. 5: 173-177.
21. Rouchen, S.F., Y. Matsumura, Y. Yamamoto, S. Yamaji and T. Tani. 2005. Analysis and comparison of *Radix glycyrrhizae* from Europe and china by capillary-zone electrophoresis. J. Pharmaceut. and Biomed. Anal. 38: 594-600.
22. Statti, G.A., R. Tundis, G. Sacchetti, M. Muzzoli, A. Bianchi and F. Menichini. 2004. Variability in the content of active constituents and biological activity of *Glycyrrhiza glabra*. Fitoterapia 75: 371-374.
23. Wang, L., F.S.C. Lee and X. Wang. 2005. Near-infrared spectroscopy for classification of licorice and prediction of glycyrrhizic acid content. LWT 40(1):1-6.
24. Zu, Y.G., H.Y. Li and Y. Pei. 2001. Analysis of the glycyrrhizic acid content in *glycyrrhiza uralensis* by capillary electrophoresis. Bull. Botan. Res. 21: 425-427.