

络合萃取异甘草苷的工艺条件研究

孙晓燕, 王继龙, 刘晓霞, 石盘棋, 周 博, 万玲娟, 李真真, 魏舒畅*

甘肃中医药大学 甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 甘肃 兰州 730000

摘要:目的 探究络合萃取异甘草苷时萃取与反萃取工艺条件对异甘草苷转移情况的影响。方法 以异甘草苷萃取率为指标, 确定最佳的络合萃取剂组成及质量分数; 以异甘草苷反萃取率为指标, 考察反萃取剂的种类、质量分数, 最终得到从甘草超滤液中萃取与反萃取制备异甘草苷的工艺条件。结果 最佳络合萃取条件为三烷基氧化膦 (TRPO)-磺化煤油 (7:93) 对异甘草苷的萃取率达到 97.60%。最佳反萃取剂为 0.26% NaOH 水溶液, 异甘草苷的反萃取率达到 95.40%。结论 在该实验所得萃取与反萃取最佳条件下, 可实现将异甘草苷从甘草超滤液转移至络合萃取剂再到碱性反萃取剂中, 最终通过萃取反萃取得到异甘草苷。

关键词: 异甘草苷; 甘草超滤液; 三烷基氧化膦; 磺化煤油; 络合萃取

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)20-4920-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.012

Study on technological conditions of complex extraction of isoliquiritin

SUN Xiao-yan, WANG Ji-long, LIU Xiao-xia, SHI Pan-qi, ZHOU Bo, WAN Ling-juan, LI Zhen-zhen, WEI Shu-chang

Research Center of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology and Engineering of Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of extraction and reverse extraction conditions on the transfer of isoliquiritin. **Methods** The extraction rate of isoliquiritin was used as the index to determine the best composition and concentration of complexing extractant. Taking the reverse extraction rate of isoliquiritin as the index, the species and concentration of the reverse extraction agent were investigated, and finally the technological conditions for the extraction and reverse extraction of isoliquiritin from glycyrrhizin ultrafiltration were obtained. **Results** The best complexation extraction condition was: the ratio of TRPO to sulfonated kerosene was 7:93, and the extraction rate of isoliquiritin reached 97.60%. The best reverse extraction agent was 0.26% NaOH aqueous solution, and the reverse extraction rate of isoliquiritin reached 95.40%. **Conclusion** Under the optimal conditions of extraction and reverse extraction obtained in this experiment, isoliquiritin can be transferred from glycyrrhizin ultrafiltration to complexing extractant and then to alkaline reverse extraction agent, and finally isoliquiritin can be obtained by extraction and reverse extraction.

Key words: isoliquiritin; liquorice ultrafiltration; trialkyl phosphine oxide; sulfonated kerosene; complex extraction

黄酮类化合物是甘草中重要的活性成分之一, 包括黄酮、二氢黄酮、异黄酮、二氢异黄酮、查耳酮等化合物及其苷类, 其中异甘草苷属于查耳酮类化合物, 具有抗溃疡、抗炎、抗氧化、抑制脂质过氧化、抗肿瘤血管新生、解毒等作用^[1-6]。

目前关于黄酮类物质的提取分离研究主要有有机溶剂萃取法、乙醇提取法、超声波萃取法、大孔

树脂分离法、超临界流体萃取法、微波辅助提取法等^[7-13], 这些方法存在有机溶剂用量大、溶剂回收成本高、产品中有机溶剂残留、污染环境、提取率低、纯化程度低、工艺过程繁琐等不足^[14]。本实验采用络合萃取法分离纯化甘草黄酮类物质, 该法属于化学萃取, 萃取能力强、选择性高、有机溶剂可以循环使用、产品无溶剂残留等^[15-16]。络合萃取法

收稿日期: 2019-06-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460608); 甘肃省基础研究创新群体项目 (1506RJIA034)

作者简介: 孙晓燕, 女, 硕士研究生, 从事中药制剂工艺研究。Tel: 18809421003 E-mail: 2276099801@qq.com

*通信作者 魏舒畅 (1969—), 男, 教授, 硕士生导师, 从事中药制剂工艺研究。Tel: 13893467387 E-mail: wshch006@163.com

目前主要用于化工行业的污水处理^[17-18]和冶金等行业^[19],而用于中药分离纯化有关研究目前仅有本课题组进行了探究。课题组在前期分离甘草酸^[20]的基础上进一步采用超滤^[21-22]-络合萃取法制备异甘草苷,以为异甘草苷的制备提供新的技术。

1 仪器与试剂

Agilent-1100 型液相色谱仪,美国 Agilent 公司;Hypersil BDS-C₁₈ 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),赛默飞世尔科技有限公司;SJM 陶瓷超滤膜,合肥世杰膜工程有限公司;DD-5M 型湘仪离心机,湘仪离心机仪器有限公司;MX-RL-Pro LCD 数显旋转混匀仪,大龙兴创实验仪器北京有限公司;Elix Essential 型超纯水机,成都唐氏康宁科技发展有限公司。

三烷基氧化膦(TRPO),质量分数>93.0%,湖北巨龙堂医药化工有限公司;磷酸三丁酯(TBP)质量分数>98.5%,烟台市双双化工有限公司;磺化煤油(260[#]),广东正茂石化有限公司;乙腈为色谱纯,氢氧化钠、磷酸为分析纯、水为超纯水。

甘草饮片购于兰州市黄河药材市场,经甘肃中医药大学药学院魏舒畅教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fish. 的干燥根及根茎;对照品异甘草苷,批号 5041-81-6,供药品检验用,质量分数≥98%,产自北京北纳创联生物技术研究院。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 甘草超滤液的制备 取甘草饮片 5 kg,用 24 倍量 0.75%氨水回流提取 3 次,每次 1 h,提取液用 10 nm 无机陶瓷膜在 25 ℃、0.12 MPa 压强下超滤,制备的超滤液含生药量为 0.05 g/mL,备用^[19-20]。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定异甘草苷对照品适量,加 70%乙醇制成质量浓度为 8.24 μg/mL 对照品溶液,备用。

2.1.3 萃余液及反萃取液的制备 取甘草超滤液与络合萃取剂各 15 mL 加入 60 mL 离心管中,密封并置于旋转混匀仪上于室温下萃取(25 r/min) 10 h 后,3 000 r/min 离心,取下层萃余液测异甘草苷的含量,按公式计算异甘草苷的单次萃取率(E_1)。分别取萃取后的有机相与反萃取剂各 15 mL 加入 60 mL 离心管中,密封并置于旋转混匀仪上于室温下萃取(25 r/min) 10 h 后,取下层反萃取液测定异甘草苷的含量,按公式计算异甘草苷的反萃取率(E_2)。

$$E_1 = (C_0 - C_1) / C_0$$

$$E_2 = C_2 / (C_0 - C_1)$$

C_0 为甘草超滤液中异甘草苷的质量浓度, C_1 为萃余液中异甘草苷的质量浓度, C_2 为反萃取液中异甘草苷的质量浓度

2.1.4 供试品溶液的制备 精密吸取甘草超滤液、萃余液、反萃取液各 1 mL,至 50 mL 量瓶中用 70%乙醇定容,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Hypersil BDS-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.058%磷酸水溶液-乙腈,梯度洗脱:0~8 min, 19%乙腈;8~35 min, 19%~50%乙腈;35~36 min, 50%~100%乙腈;36~40 min, 100%~19%乙腈;检测波长:0~10 min, 237 nm;10~40 min, 360 nm;柱温 26 ℃;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μL;理论塔板数按异甘草苷峰计算应不低于 30 000。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取异甘草苷对照品溶液 0.5、1、5、7、9、15 mL,置 25 mL 量瓶中,用 70%乙醇定容并摇匀,精密吸取上述各对照品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪测定。以峰面积分值为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y = 3\,974.9 X + 0.246\,6$, $r = 0.999\,9$,线性范围 0.163 9~4.936 3 μg/mL。

2.3.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定,异甘草苷峰面积 RSD 为 1.47%。

2.3.3 精密度试验 取同一份供试品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,结果异甘草苷峰面积 RSD 为 0.19%。

2.3.4 重复性试验 取同一批甘草药材制备甘草超滤液 6 份和反萃取液 6 份,按“2.1.4”项下方法制备成待测样品,按上述色谱条件测定,结果异甘草苷 RSD 分别为 2.06%、1.98%。

2.3.5 加样回收率试验 取同一批甘草药材,加入一定量异甘草苷对照品,制备甘草超滤液 6 份和反萃取液 6 份按“2.1.4”项下方法制成待测样品,按上述色谱条件测定异甘草苷的含量,计算回收率。结果异甘草苷的平均回收率分别为 96.93%、98.72%,RSD 分别为 2.30%、2.35%。

2.3.6 专属性考察及络合萃取异甘草苷的可行性研究 异甘草苷对照品、甘草超滤液、7% TRPO+93%

磺化煤油络合萃取萃余液、0.26% NaOH 反萃取液的 HPLC 色谱图见图 1。上述色谱图中,图 1-A 为异甘草苷对照品图谱,图 1-B 为甘草超滤液图谱,其中与图 1-A 相对应位置为异甘草苷的峰,经过络合萃取剂萃取甘草超滤液后异甘草苷被萃取到络合萃取剂中,故在图 1-C 络合萃取萃余液中对应位置异甘草苷的峰几乎没有;用 0.26% NaOH 水溶液将

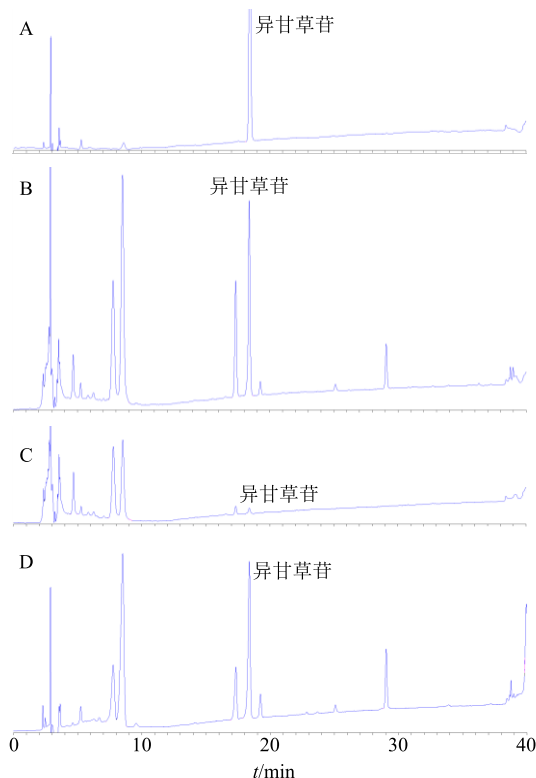


图 1 异甘草苷对照品 (A)、0.05 g·mL⁻¹ 甘草超滤液 (B)、络合萃取萃余液 (C) 和 0.26% NaOH 反萃取液 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of isoliquiritin reference substance (A), 0.05 g·mL⁻¹ glycyrrhizae ultrafiltration (B), complex extractant (C), and 0.26% NaOH reverse extraction solution (D)

络合萃取剂进行反萃取,异甘草苷被反萃取到 0.26% NaOH 水溶液中,故在图 1-D 0.26% NaOH 反萃取液中对应位置可见异甘草苷的峰。上述 4 个图谱说明了异甘草苷从甘草超滤液中被萃取到络合萃取剂中又被反萃取到 0.26% NaOH 反萃取液中,实现了用络合萃取法制备异甘草苷,为异甘草苷的制备提供新的工艺。

2.3.7 异甘草苷的含量测定 按照“2.1.4”项下方法制备的供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定,并按回归方程计算含量。

2.4 不同络合萃取剂对异甘草苷萃取率的影响

研究不同络合萃取剂对异甘草苷萃取效果的影响,以异甘草苷萃取率为指标,以磺化煤油为稀释剂,考察 TRPO、TBP 组成的不同络合萃取剂^[23-24],实验结果见表 1。由表 1 结果可知,在条件平行情况下,与 TBP 相比,TRPO 对异甘草苷萃取效果更好,故将 5% TRPO+95%磺化煤油作为萃取异甘草苷的络合萃取剂。

2.5 络合萃取剂体积比对异甘草苷萃取率的影响

在筛选出的络合萃取剂 5% TRPO+95%磺化煤油的基础上,为了进一步提高异甘草苷的萃取率,进行络合萃取剂 TRPO 最佳体积比考察,结果见表 2。由表 2 结果可知,随着 TRPO 比例增大异甘草苷萃取率增加不显著,由于 TRPO 价格较高,为降低成本,本实验最终选定 7% TRPO+93%磺化煤油为异甘草苷的络合萃取剂。

2.6 不同反萃取剂对异甘草苷反萃取率的影响

为得到没有溶剂残留的异甘草苷,本实验考察以纯水、20%氨水、0.2% NaOH 水溶液作为反萃取剂,将异甘草苷萃合物从萃取剂中解络合,反萃取进入水相的效果,其中萃取剂与反萃取剂比为 1:

表 1 络合萃取剂组成对甘草超滤液中异甘草苷萃取率的影响

Table 1 Effect of complexing agent composition on extraction rate of isoliquiritin in glycyrrhizae ultrafiltration

萃取剂组成	超滤液中异甘草苷/(μg·mL ⁻¹)	萃取剂中异甘草苷/(μg·mL ⁻¹)	异甘草苷萃取率/%
5% TRPO+95%磺化煤油	1.911 0	1.821 0	95.29
5% TBP+95%磺化煤油	1.911 0	0.184 4	9.65

表 2 TRPO 体积比对甘草超滤液中异甘草苷萃取率的影响

Table 2 Effect of TRPO volume ratio on extraction rate of isoliquiritin in glycyrrhizae ultrafiltrate

萃取剂组成	超滤液中异甘草苷/(μg·mL ⁻¹)	萃取剂中异甘草苷/(μg·mL ⁻¹)	异甘草苷萃取率/%
5% TRPO+95%磺化煤油	1.911 0	1.821 0	95.29
7% TRPO+93%磺化煤油	1.911 0	1.865 1	97.60
9% TRPO+91%磺化煤油	1.911 0	1.873 7	98.05

1, 结果见表 3。由表 3 结果可知, 0.2% NaOH 水溶液的反萃取效果最好, 故选择 NaOH 水溶液作为异甘草苷的反萃取剂。

2.7 NaOH 水溶液质量分数对异甘草苷反萃取率的影响

为了进一步考察 NaOH 水溶液质量分数对异甘草苷反萃取效果的影响, 进行 NaOH 水溶液质量分数考察实验, 结果见表 4。从表 4 结果可知, 随着 NaOH 水溶液质量分数增大, 异甘草苷反萃取率也增大, 当 NaOH 水溶液质量分数为 0.4% 时, 反萃取率超过了 100%; 继续增大 NaOH 水溶液质量分数

超过 1.2% 时, 反萃取率变化不再显著, 说明反萃取已达到平衡。

2.8 NaOH 水溶液质量分数对异甘草苷反萃取率影响的最佳工艺

从上述结果可知, NaOH 水溶液质量分数对异甘草苷的萃取率有影响, 为了考察 NaOH 水溶液质量分数对异甘草苷反萃取率影响的最佳工艺, 进行以下实验。从表 5 结果可知, NaOH 水溶液质量分数大于 0.26% 时异甘草苷反萃取率超过了 100%, 故本实验最终选择 0.26% NaOH 水溶液为反萃取异甘草苷的最佳工艺。

表 3 反萃取剂种类对异甘草苷反萃取率的影响

Table 3 Effect of different kinds of reverse extraction agents on reverse extraction rate of isoliquiritin

反萃取剂种类	萃取剂中异甘草苷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	反萃取剂中异甘草苷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	异甘草苷反萃取率/%
纯水	1.865 1	0.000 0	0.00
20%氨水	1.865 1	0.168 2	9.02
0.2% NaOH 水溶液	1.865 1	1.462 3	78.40

表 4 NaOH 水溶液质量分数对异甘草苷反萃取率的影响

Table 4 Effect of NaOH concentration on isoliquiritin reverse extraction rate

NaOH/%	萃取剂中异甘草苷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	反萃取剂中异甘草苷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	异甘草苷反萃取率/%
0.2	1.865 1	1.462 3	78.40
0.4	1.865 1	2.313 4	124.04
0.6	1.865 1	3.224 0	172.86
0.8	1.865 1	3.853 7	206.62
1.0	1.865 1	3.978 1	213.29
1.2	1.865 1	4.211 1	225.78
1.4	1.865 1	4.245 6	227.63

表 5 NaOH 质量分数对异甘草苷反萃取率影响的最佳工艺考察

Table 5 Study on effect of NaOH concentration on reverse extraction rate of isoliquiritin

NaOH/%	萃取剂中异甘草苷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	反萃取剂中异甘草苷/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	异甘草苷反萃取率/%
0.25	1.865 1	1.736 2	93.09
0.26	1.865 1	1.779 3	95.40
0.27	1.865 1	1.881 5	100.88
0.28	1.865 1	1.983 0	106.32

2.9 最佳工艺验证试验

取同一批甘草超滤液 50 mL, 均匀分成 5 份, 每份 10 mL, 分别加入 7% TRPO+93% 碘化煤油组成的络合萃取剂 10 mL 进行络合萃取; 再向 5 份络合萃取后的萃取剂中分别加入 0.26% NaOH 水溶液 10 mL 进行反萃取。结果异甘草苷的平均萃取率为 97.98%, RSD 为 1.86%; 异甘草苷的平均反萃取率为 95.37%, RSD 为 2.11%, 说明该工艺条件重复性

较好, 可用于异甘草苷的萃取纯化。

3 讨论

本实验从甘草超滤液中络合萃取异甘草苷的过程中发现, 用 NaOH 水溶液从有机相中反萃取异甘草苷时, 随着 NaOH 水溶液质量分数增大, 异甘草苷反萃取率也随之增大。当 NaOH 水溶液质量分数大于 0.26% 时, 异甘草苷反萃取率超过 100%; 当 NaOH 水溶液质量分数为 1.2% 时, 异甘草苷反萃取

率为 225.78%；继续增大 NaOH 水溶液质量分数，异甘草苷反萃取率变化不显著。查尔酮类是二氢黄酮 C 环的 1、2 位键断裂生成的开环衍生物，即三碳链不构成环，其中 2'-羟基衍生物为二氢黄酮的异构体，两者可以相互转化^[25]。异甘草苷反萃取率超过 100%是二氢黄酮类化合物的甘草苷转化为查尔酮类化合物的异甘草苷，已有相关实验进行了甘草苷转化为异甘草苷的研究^[26]。为了保证甘草中各黄酮类成分的原有比例和性质，在进行络合萃取的反萃取实验中应控制 NaOH 的用量。

络合反应是在络合剂的特殊官能团与具有相应官能团的溶质之间发生的，所以络合萃取法对于极性有机物稀溶液的分离具有高效性和高选择性，故广泛应用于废水处理、冶金等化工行业。本实验将该技术用于分离纯化甘草超滤液中黄酮类化合物，由于黄酮类物质含有酚羟基属于 Lewis 酸，络合剂 TRPO 的萃取功能基 P=O 键有较强的 Lewis 碱性，二者发生氢键缔合反应形成萃合物，而形成的萃合物难溶于水相甘草超滤液，易溶于 TRPO 和磺化煤油组成的有机相，以此实现相转移。后续通过反萃取使萃合物发生解离从而制备高纯度的异甘草苷，且有机相可循环使用。本实验既分离纯化得到了目标物质，还使得萃取剂循环使用，很大程度上节约了成本。

参考文献

- [1] 杨 瑞, 袁伯川, 马永生, 等. 3 种不同基原甘草中 4 个主要黄酮类化合物的含量分析 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(10): 1729-1736.
- [2] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.
- [3] 周 珊, 袁伯川, 杨 瑞, 等. HPLC 法分析 12 产地甘草中 4 种主要黄酮类化合物的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 1943-1947.
- [4] 韦 悦, 程娟娟, 程雪梅, 等. 维吾尔药复方木尼孜其颗粒剂的质量控制方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1799-1809.
- [5] 任 明, 许真真. HPLC-UV 切换波长法同时测定复方甘草合剂中甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸 [J]. 山东医药, 2016, 56(11): 35-37.
- [6] 彭 燕, 谭晓斌, 贾晓斌. 甘草黄酮类成分对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白功能和表达的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2703-2709.
- [7] 邓梦琴. 菠萝蜜果皮总黄酮的提取、分离纯化、结构鉴定及其抗氧化活性研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [8] 郑洁旋, 林烁慧, 陈泽意, 等. 阴香叶黄酮类化合物提取工艺的研究 [J]. 保鲜与加工, 2016, 16(2): 48-52.
- [9] 张艳军, 杨途熙, 魏安智, 等. 花椒果皮中总黄酮与多酚的积累及其抗氧化活性研究 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(3): 620-625.
- [10] 冯 靖, 彭效明, 李翠清, 等. 天然产物中黄酮类化合物的开发研究进展 [J]. 中医药导报, 2018, 24(4): 71-74.
- [11] 李慧娜, 田少君. 油料作物中黄酮类化合物的提取方法研究进展 [J]. 中国油脂, 2017, 42(8): 111-115.
- [12] 徐春明, 李 婷, 王英英, 等. 微波辅助双水相提取苦荞麦粉中黄酮类化合物 [J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(6): 36-41.
- [13] 熊苏慧, 唐 洁, 李诗卉, 等. 一种新型天然低共熔溶剂用于玉竹总黄酮的绿色提取 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2378-2386.
- [14] 孙 琳, 袁杰彬, 陈双为, 等. 苦荞中黄酮类化合物提取方法的研究进展 [J]. 酿酒科技, 2018(9): 74-80.
- [15] 张 瑾, 戴猷元. 络合萃取技术及其应用 [J]. 现代化工, 2000(2): 21-24.
- [16] 程海梅, 资双飞, 肖金超. 络合萃取高浓度含酚废水工艺研究 [J]. 广东化工, 2018, 45(4): 64-65.
- [17] 王吉坤, 杜 松. 络合萃取脱酚工艺性能试验 [J]. 洁净煤技术, 2018, 24(1): 90-95.
- [18] 宋 红, 董振海, 孙宇明. 苯磺酸类染料废水络合萃取机理研究 [J]. 精细与专用化学品, 2018, 26(1): 18-21.
- [19] 周维华, 李振漆, 段 猛, 等. 钒渣浸出液中络合除铁的研究 [J]. 钢铁钒钛, 2016, 37(5): 20-24.
- [20] 周 博, 蒲红利, 王继龙, 等. 基于超滤-络合萃取技术的甘草酸制备工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1323-1327.
- [21] 朱应怀, 刘晓霞, 王继龙, 等. 基于陶瓷膜超滤技术的甘草酸和甘草苷同步提取纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4173-4178.
- [22] 朱应怀, 刘晓霞, 宋晓春, 等. 甘草总黄酮氨水提取及超滤纯化工艺研究 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(4): 492-495.
- [23] 单欣昌, 秦 炜, 戴猷元. 三烷基氧膦反应萃取一元羧酸的规律 [J]. 化工学报, 2005(12): 2346-2350.
- [24] 符 钰, 秦 炜, 戴猷元. 化学萃取丙酸平衡特性的研究 [J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2002(S1): 15-18.
- [25] 匡海学, 石任兵, 董小萍, 等. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011.
- [26] 赵海娇, 任全霞, 范玉涵, 等. 利用二氢黄酮与查尔酮相互转化的性质制备异甘草苷 [J]. 食品科技, 2011, 36(10): 210-213.