

基于超滤-络合萃取及反萃取技术的甘草苷制备工艺研究

周 博, 蒲红利, 王继龙, 孙晓燕, 魏舒畅*, 石盘棋

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 建立一种分离纯化甘草超滤液中甘草苷的络合萃取及反萃取制备技术。方法 以甘草苷萃取率为指标, 采用均匀设计确定最佳的络合萃取剂组成, 再采用正交试验优选络合萃取工艺条件。以甘草苷反萃取率为指标, 通过考察反萃取剂的种类及浓度, 确定反萃取甘草苷的工艺条件。**结果** 经络合萃取研究发现, 络合萃取剂宜选用由三烷基氧化膦 (TRPO) 和磺化煤油组成的二元络合萃取剂。甘草苷的最佳络合萃取工艺条件为 TRPO-磺化煤油 (9:91)、甘草超滤液 pH 值调至 4、有机相与水相体积比为 1:1, 甘草苷平均萃取率达到 99.6%。反萃取工艺研究发现, 在有机相与反萃取剂体积比为 1:1 的条件下, 17.5 mmol/L NaOH 水溶液为最佳反萃取剂, 甘草苷的反萃取率为 99.3%。**结论** 在优选所得条件下, 甘草超滤液中的甘草苷可实现从超滤液到络合萃取剂再到碱性反萃取剂的顺利转移, 甘草苷总转移率高达 98.9%, 可为甘草苷的分离纯化提供一种全新的制备技术。

关键词: 络合萃取; 反萃取; 甘草苷; 三烷基氧化膦 (TRPO); 甘草; 超滤液

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1095-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.011

Preparation technology of liquiritin based on ultrafiltration-complexation extraction and back extraction technology

ZHOU Bo, PU Hong-li, WANG Ji-long, SUN Xiao-yan, WEI Shu-chang, SHI Pan-qi

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

Abstract: Objective To establish a complexation extraction and back extraction technology for the separation and purification of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* ultrafiltrate. **Methods** Taking the extraction rate of liquiritin as an index, the optimum composition of complexing extractant was first determined by uniform design, and then orthogonal experiments were used to optimize the conditions of complexing extraction. Taking the back extraction rate of liquiritin as an index, the process conditions for the back extraction of liquiritin were determined by investigating the type and concentration of back extractant. **Results** The complexation extraction research found that the complexing extractant should be a binary complexing extractant composed of trialkyl phosphine oxide (TRPO) and sulfonated kerosene. The optimum extraction conditions for liquiritin were as follows: TRPO-sulfonated kerosene (9:91), pH value of *G. uralensis* ultrafiltrate was adjusted to 4, volume ratio of organic phase to aqueous phase was 1:1, and average extraction rate of liquiritin reached 99.6%. The study of back extraction process showed that under the condition that the volume ratio of organic phase to back extractant was 1:1, 17.5 mmol/L NaOH aqueous solution was the best back extractant, and the back extraction rate of liquiritin was 99.3%. **Conclusion** Under the optimized conditions, the liquiritin in *G. uralensis* ultrafiltrate can smoothly transfer from the ultrafiltrate to the complexing extractant and then to the alkaline back extractant. The total transfer rate of liquiritin is as high as 98.9%. This paper can provide a new preparation technology for the separation and purification of liquiritin.

Key words: complexation extraction; back extraction; liquiritin; trialkyl phosphine oxide; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; ultrafiltrate

甘草含有丰富的黄酮类化合物^[1-3], 其中甘草苷占甘草总黄酮的 70%~80%^[4]。以甘草苷为主的甘草黄酮类化合物具有抗氧化、抗肝炎及肝纤维化、美白、祛斑等多种药理作用, 应用非常广泛^[5-11]。

收稿日期: 2018-07-20

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: 周 博, 男, 硕士研究生。Tel: 18093189133 E-mail: 1126287338@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,国内外广泛使用有机溶剂萃取法分离甘草黄酮类化合物^[12-14]。该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等缺点。且甘草提取液中可溶性淀粉、蛋白质等大分子杂质较多,有效成分含量低,物理萃取乳化严重,不利于萃取过程的实施和有效成分的分离纯化。

本实验将超滤作为前置技术处理甘草水提取液,解决萃取过程乳化问题^[15]。再利用络合萃取技术对极性有机物稀溶液的分离具有高效性和高选择性的优势^[16],分离纯化甘草超滤液中的甘草苷。通过考察络合萃取剂组成、三烷基氧化膦(TRPO)和磺化煤油体积百分比、有机相与水相体积比、超滤液 pH 值等因素对甘草苷萃取率的影响,优化出适合于甘草苷萃取分离的萃取剂组成和络合萃取工艺参数。通过考察反萃取剂种类、反萃取浓度,确定从含有甘草苷的络合萃取剂中反萃取甘草苷的工艺条件。通过上述研究拟集成超滤-络合萃取技术,开发出一种甘草苷制备新工艺。

1 仪器与试药

Agilent-1260 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;MX-RL-Pro LCD 数控旋转混匀仪,大龙兴创实验仪器北京有限公司。

磷酸三丁酯(TBP),烟台市双双化工有限公司;TRPO,溧阳市凯信化工有限公司;磺化煤油,广东正茂石化有限公司。

甘草饮片 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 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基原为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎;甘草苷对照品(批号 111610-201607,质量分数≥93.1%)购于中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甘草超滤液的制备^[15]

取甘草饮片 10 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 下超滤,超滤液浓缩至每毫升含生药 1 g,备用。

2.2 甘草苷的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取甘草苷对照品适量,精密称定,加 70%乙醇制成含甘草苷 22.5 μg/mL 的

对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取甘草超滤液、络合萃取萃余液、反萃取液各 1 mL,置具塞锥形瓶中,加适量 70%乙醇,密塞,超声处理(功率 250 W,频率 40 Hz) 30 min,放冷,摇匀,转移并定容至 50 mL 量瓶中,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件^[17] 参照《中国药典》2015 年版一部甘草项下的 HPLC 测定条件进行测定。以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,进行梯度洗脱: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;检测波长为 237 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL;理论板数按甘草苷峰计算应不低于 5 000。

2.2.4 线性关系的考察 分别精密吸取甘草苷对照品溶液 1、2.5、5、10、15、20 μL,注入高效液相色谱仪测定。以峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X)进行线性回归,得甘草苷回归方程 $Y = 1\,560.9 X + 18.267$, $r = 0.999\,9$,线性范围 22.5~450.0 ng。

2.2.5 甘草苷的测定 将“2.2.2”项下制备的甘草超滤样品液按“2.2.3”项下色谱条件进行测定,并按回归方程计算甘草苷含量。

2.3 络合萃取及反萃取方法

取甘草超滤液适量,用蒸馏水稀释至每毫升含生药 0.05 g,取 10 mL 稀释后的甘草超滤液与适量络合萃取剂加入 50 mL 离心管中,密封并置于旋转混匀仪上于室温下萃取 10 h (25 r/min) 后,3 000 r/min 离心,取下层萃余液测定甘草苷的质量浓度,有机相络合萃取剂中的甘草苷质量浓度由差减法求得,按公式计算甘草苷的萃取率。

$$\text{萃取率} = (C_0 - C_1) / C_0$$

C_0 为甘草超滤液中甘草苷的质量浓度, C_1 为萃余液中甘草苷的质量浓度

取萃取后的有机相与等体积反萃取剂加入 50 mL 离心管中,密封并置于旋转混匀仪上于室温下萃取 10 h (25 r/min) 后,取下层反萃取液测定甘草苷的质量浓度,按公式计算甘草苷的反萃取率。

$$\text{反萃取率} = C_2 / (C_0 - C_1)$$

C_2 为反萃取液中甘草苷的质量浓度

由上述所得萃取率和反萃取率,按公式计算甘草苷的总转移率。

总转移率=萃取率×反萃取率

2.4 络合萃取研究

2.4.1 络合萃取剂组成研究 在预试验研究络合萃取剂组成（络合剂及稀释剂种类、浓度等）对甘草苷萃取效果的基础上，以甘草苷萃取率为试验指标，采用 $U_5(5^3)$ 均匀设计对以 TRPO (X_1)、TBP (X_2)、磺化煤油 (X_3) 组成的不同络合萃取剂组成进行考察，均匀设计试验安排与结果见表 1，方差分析见表 2。

表 1 均匀设计试验安排及结果

Table 1 Arrangement and results of uniform design

序号	$X_1/\%$	$X_2/\%$	$X_3/\%$	甘草苷萃取率/%
1	0 (1)	5 (2)	50 (4)	6.1
2	3 (2)	15 (4)	60 (3)	19.8
3	5 (3)	0 (1)	70 (2)	54.1
4	7 (4)	10 (3)	80 (1)	55.5
5	9 (5)	20 (5)	40 (5)	72.7

表 2 均匀设计方差分析

Table 2 Variance analysis of uniform design

模型	非标准化系数		标准系数		t	显著性
	B	标准误差	Beta			
常量	26.649	4.370			6.098	
X_1	9.126	0.286	1.154	31.919	$P<0.05$	
X_2	-1.260	0.146	-0.361	-8.647		
X_3	-0.270	0.063	-0.155	-4.273		

数据采用 SPSS 21.0 进行多元线性回归分析。由表 2 方差分析可知，TRPO 体积分数对甘草苷萃取率具有显著影响。TBP 和磺化煤油对甘草苷萃取率无显著影响。但考虑到 TRPO 黏度较大，影响萃取分层和传质效果，仍然将磺化煤油作为稀释剂与 TRPO 混合使用，初步确定以 TRPO 和磺化煤油组成的二元络合萃取剂分离纯化甘草苷。

2.4.2 络合萃取工艺研究 由于甘草苷结构含有酚羟基，显弱酸性，在水溶液中能电离出氢离子，在不同 pH 值的提取液中，以分子形式存在的甘草苷和以离子形式存在的甘草苷比例不同。所以超滤液的 pH 值影响甘草苷的萃取率，因此在预试验的基础上，选择以 TRPO 和磺化煤油体积比 (A)、超滤液 pH 值 (B)、有机相与水相体积比 (C) 为影响因素，采用 $L_9(3^4)$ 正交设计优选甘草苷络合萃取最佳工艺条件。正交试验设计与结果见表 3、方差分析见表 4。

表 3 正交试验设计与试验结果

Table 3 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D (空白)	甘草苷萃取率/%
1	5 : 95 (1)	4 (1)	1 : 1 (1)	(1)	67.3
2	5 : 95 (1)	5 (2)	2 : 1 (2)	(2)	61.8
3	5 : 95 (1)	6 (3)	3 : 1 (3)	(3)	53.6
4	7 : 93 (2)	4 (1)	2 : 1 (2)	(3)	74.1
5	7 : 93 (2)	5 (2)	3 : 1 (3)	(1)	72.4
6	7 : 93 (2)	6 (3)	1 : 1 (1)	(2)	63.6
7	9 : 91 (3)	4 (1)	3 : 1 (3)	(2)	99.6
8	9 : 91 (3)	5 (2)	1 : 1 (1)	(3)	95.5
9	9 : 91 (3)	6 (3)	2 : 1 (2)	(1)	90.1
K_1	182.7	241.0	226.4	229.8	
K_2	210.1	229.7	226.0	225.0	
K_3	285.2	207.3	225.6	223.2	
R	102.5	33.7	0.8	6.6	

表 4 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal test

来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 877.446 7	2	241.939 0	$P<0.01$
B	196.126 7	2	25.274 1	$P<0.05$
C	0.106 7	2	0.013 8	
D (误差)	7.760 0	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

通过表 4 方差分析可知，因素 A（TRPO 和磺化煤油体积比）对甘草苷萃取率具有显著性影响，宜选择第 3 水平。因素 B（超滤液 pH 值）对甘草苷萃取率也具有显著性影响，宜选择第 1 水平。因素 C（有机相与水相体积比）对甘草苷萃取率无显著性影响，综合萃取剂成本以及后续反萃取操作的实施，选取第 1 水平较佳。综上最终选取 $A_3B_1C_1$ 水平组合为络合萃取甘草苷的最佳工艺，即将甘草超滤液 pH 值用稀盐酸调至 4，用 9% TRPO+91% 磺化煤油为络合萃取剂，在有机相与水相体积比 1 : 1 的条件下进行络合萃取。

2.4.3 络合萃取最佳工艺验证 取同一批 0.05 g/mL 的甘草超滤液 50 mL，稀盐酸调节其 pH 值至 4，用移液管精密量取 3 等份，每份 10 mL，与 9% TRPO+91%磺化煤油组成的络合萃取剂在有机相与水相体积比 1 : 1 的条件下进行络合萃取，甘草苷萃取率分别为 99.3%、99.8%、99.6%，甘草苷平均萃取率为 99.6%。RSD 值小于 3%，说明该工艺条件重复性较好。

2.5 反萃取工艺研究

2.5.1 反萃取剂种类 为实现萃取剂的循环利用和解决甘草苷产品中有机溶剂的残留问题, 本实验对含有甘草苷的络合萃取剂进行反萃取, 通过用纯水、10%氨水、25 mmol/L NaOH 水溶液做为反萃取剂对“2.4.3”项所得萃取剂进行反萃取(有机相与水相体

积比为 1:1), 反萃取结果见表 5。用纯水做为反萃取剂, 甘草苷的反萃取率为 0; 用 10%氨水做为反萃取剂, 甘草苷的反萃取率只有 1.9%; 用 25 mmol/L NaOH 水溶液做为反萃取剂, 甘草苷的一次反萃取率高达 99.7%。选择 NaOH 水溶液做为甘草苷的反萃取剂比较合适。

表 5 反萃取剂种类对甘草苷反萃取率的影响

Table 5 Effect of different kinds of back extractant on back extraction rate of liquiritin

反萃取剂种类	有机相中甘草苷质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	反萃取剂中甘草苷质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	甘草苷反萃取率/%
纯水	5.271 5	0.000 0	0.0
10%氨水	5.271 5	0.099 1	1.9
25 mmol·L ⁻¹ NaOH 水溶液	5.271 5	5.255 6	99.7

2.5.2 反萃取剂浓度考察 由“2.5.1”项实验结果可知, 选择 NaOH 水溶液做为反萃取剂, 甘草苷的反萃取率高、反萃取效果好。为了进一步降低反萃取剂的碱性, 减小 NaOH 的用量, 本实验考察了反萃取剂中 NaOH 浓度对甘草苷反萃取率的影响, 结果见表 6。由表 6 可知, 随着反萃取剂中 NaOH 浓度的增大, 甘草苷的反萃取率也在增大。当 NaOH

的浓度为 17.5 mmol/L 时, 甘草苷的反萃取率高达 99.3%。此后 NaOH 的浓度继续增大, 甘草苷的反萃取率基本不变。因此选择 17.5 mmol/L NaOH 水溶液做为反萃取有机相中甘草苷的反萃取剂。对照品溶液、甘草超滤液、9% TRPO+91%磺化煤油络合萃取萃余液、17.5 mmol/L NaOH 反萃取液中甘草苷 HPLC 色谱图见图 1。

表 6 反萃取剂浓度对甘草苷反萃取率的影响

Table 6 Effect of concentration of back extractant on back extraction rate of liquiritin

NaOH 浓度/(mmol·L ⁻¹)	有机相中甘草苷质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	反萃取剂中甘草苷质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	甘草苷反萃取率/%
2.5	5.271 5	4.461 2	84.6
7.5	5.271 5	4.538 7	86.1
12.5	5.271 5	4.764 4	90.3
17.5	5.271 5	5.234 6	99.3
22.5	5.271 5	5.245 1	99.5

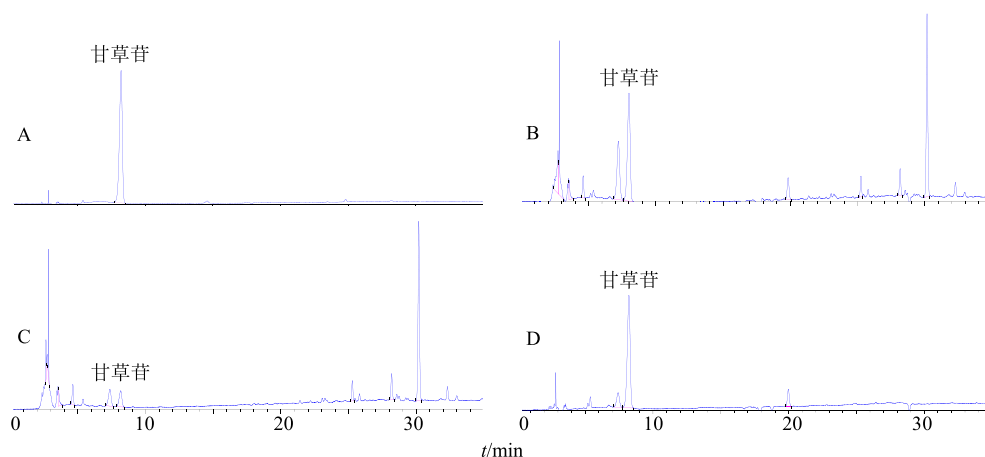


图 1 对照品溶液 (A)、甘草超滤液 (B)、络合萃取萃余液 (C) 和反萃取液 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of sample solution (A), licorice ultrafiltrate (B), complexing extraction raffinate (C), and back extract (D)

3 讨论

络合萃取是通过被萃取物质和萃取剂两者之间的官能基团发生专属化学反应,生成可溶于萃取剂的新物质萃合物实现分离目的的化学萃取技术^[18]。由于萃合物与被萃取物质的结构不同,萃合物在有机萃取剂中的浓度不受水相中被萃取物质浓度的影响,因此该技术对极性有机物稀溶液的分离具有高效性和高选择性^[19]。萃合物在反萃取过程中可通过反萃取液 pH 值的调整完全解离得到纯度较高的目标物质^[20]。该技术与传统物理萃取相比不但选择性更高,而且由于萃取剂在水相中不溶,因此从水性反萃取液中获得的目标物质无有机萃取剂残留。将该技术用于浓度很低、极性较大的甘草苷的富集和纯化有比较大的优势。

本实验将络合萃取技术应用于甘草提取液中甘草苷的分离纯化,为甘草苷的制备开辟了新的工艺路线。然而甘草提取液中有效成分含量低、大分子杂质多,且甘草酸、TRPO 等都具有表面活性作用,直接将络合萃取技术应用于甘草提取液中甘草苷的分离,萃取过程乳化现象严重^[21]。因此,本实验将超滤作为前置技术,在保留甘草苷的同时有效地除去了甘草提取液中悬浮物和可溶性大分子杂质,使得提取液黏度大幅度降低,使乳化现象大为减轻,改善了萃取传质效果。使络合萃取技术应用于甘草苷的分离具有了适用性。

由于络合萃取技术对极性有机物稀溶液具有选择性富集作用,本实验将甘草超滤液不经浓缩(0.05 g/mL)直接进行络合萃取,与传统物理萃取时需浓缩提取液的工艺相比,该处理方法不但节约生产成本,而且使工艺更简洁。

在本实验优选所得的工艺条件下,实现了甘草苷从超滤液到络合萃取剂再到碱性反萃取剂的高效转移,甘草超滤液中含有的甘草苷几乎被络合萃取及反萃取完全,甘草苷总转移率高达 98.9%。

参考文献

- [1] 李 薇,宋新波,张丽娟,等.甘草中化学成分研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(7):40-44.
- [2] Zhang Q Y, Min Y, Xie P S, et al. Chemical analysis of the Chinese herbal Gan-Cao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1969.
- [3] 朱靖博,籍立新,萧 伟,等.反相二维色谱制备甘草中黄酮类化合物[J].中草药,2018,49(9):2033-2040.

- [4] 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.
- [5] 张明发,沈雅琴.甘草及其有效成分抗脂肪肝和抗肥胖的研究进展[J].药物评价研究,2015,38(4):439-447.
- [6] 王 兵,王亚新,赵红燕,等.甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J].吉林医药学院学报,2013,34(3):215-218.
- [7] 王 青,苗文娟,向 诚,等.乌拉尔甘草中黄酮类化学成分的研究[J].中草药,2014,45(1):31-36.
- [8] 赵雅欣,高文远,张连学,等.甘草在化妆品中的应用[J].香料香精化妆品,2010(4):45-48.
- [9] 钟永恒,贾仕杰,郝同江,等.甘草黄酮类化合物生理功能及其在食品中应用研究[J].中国林副特产,2016,39(3):91-94.
- [10] 沈 洁,张 维,顾海燕.2012—2016年南京市第二医院甘草酸类抗炎药物的门诊使用情况分析[J].现代药物与临床,2017,32(8):1570-1573.
- [11] 朱世超,郑学敏,张 玥,等.甘草次酸衍生物抗肝纤维化的实验研究[J].中草药,2017,48(17):3554-3559.
- [12] 张志东,唐琦勇,茆 军,等.甘草黄酮提取方法研究进展[J].新疆农业科学,2006,43(6):517-519.
- [13] 钟地长,张淑凤,陈振锋,等.天然产物黄酮类化合物的提取、纯化及其金属配合物的研究进展[J].化学世界,2006,47(9):561-564.
- [14] 王 铎,王 晶,刘春明,等.甘草总黄酮提取方法的对比及工艺优化[J].安徽农业科学,2011,39(6):3272-3273.
- [15] 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.
- [16] King C J. Separation Process based upon Reversible Chemical Complexation [A] // Rowseau R W. *Handbook of Separation Process Technology* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- [17] 中国药典[S].一部.2015.
- [18] 戴猷元,秦 炜,张 瑾.有机物络合萃取化学[M].北京:化学工业出版社,2015.
- [19] 张华夏,程原小.有机羧酸稀溶液的络合萃取研究进展[J].安徽化工,2014,40(2):3-5.
- [20] 韩海滨,段泽敏,王贤萍,等.络合萃取技术及其在生物碱分离中的应用[J].中国农学通报,2009,25(2):39-42.
- [21] 田庆来,谢渝春,张 波,等.溶剂萃取法分离水溶性甘草黄酮[J].过程工程学报,2007,7(3):496-500.