

• 药剂与工艺 •

基于超滤-络合萃取技术的甘草酸制备工艺研究

周 博, 蒲红利, 王继龙, 刘晓霞, 魏舒畅*, 石盘棋, 孙晓燕

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 建立一种采用超滤-络合萃取技术制备甘草酸的工艺。方法 考察 pH 值 (pH 4~8) 对超滤液中甘草酸萃取率的影响; 采用正交试验优选络合萃取甘草酸的工艺条件; 通过考察反萃取剂种类及浓度, 确定甘草酸的反萃取工艺条件。结果 所得甘草酸最佳络合萃取工艺条件为超滤液 pH 值应调至 2、萃取剂为三烷基氧化膦 (TRPO)-磺化煤油 (5:95)、有机相与水相体积比为 1:1, 甘草酸平均萃取率达到 99.2%。甘草酸最佳反萃取工艺条件为 22.5 mmol/L NaOH 水溶液为反萃取剂、有机相与反萃取剂体积比 1:1, 甘草酸单次反萃取率达到 98.8%, 甘草酸总转移率为 98.1%。结论 超滤-络合萃取技术可作为甘草酸制备的一种新工艺。

关键词: 络合萃取; 反萃取; 甘草酸; 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)06-1323-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.009

Preparation technology of glycyrrhizin acid based on ultrafiltration-complexation extraction technology

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

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 technique for preparing glycyrrhizin acid (GA) by ultrafiltration-complexation extraction. **Methods** The effect of pH on the extraction rate of GA from ultrafiltrate was investigated in the range of 4—8; The orthogonal test was used to optimize the technological conditions for complexation extraction of GA; The extraction conditions of GA were determined by investigating the type and concentration of the extractant. **Results** The optimum extraction conditions for GA were as follows: pH value of *Glycyrrhiza uralensis* ultrafiltrate was adjusted to 2, TRPO-sulfonated kerosene (5:95, volume percent), volume ratio of organic phase to aqueous phase was 1:1, and average extraction rate of GA reached 99.2%. The best back extraction conditions for GA were as follows: 22.5 mmol/L NaOH aqueous solution was used as the stripping agent, the volume ratio of organic phase to stripping agent was 1:1, the single back extraction rate of GA reached 98.8%, and the total transfer rate of GA was 98.1%. **Conclusion** Ultrafiltration-complexation extraction technology can be used as a new process for the preparation of GA.

Key words: complexation extraction; back extraction; glycyrrhizin acid; trialkyl phosphine oxide; *Glycyrrhiza uralensis* ultrafiltrate

甘草酸 (glycyrrhizin acid) 是甘草中含量最多的有效成分^[1]。现代研究证实甘草酸具有抗炎、抗病毒、抗癌、保肝等多种药理作用^[2-6]。此外甘草酸还是一种纯天然甜味剂, 甜度为蔗糖的 80~300 倍, 在食品、医药、化妆品、卷烟等行业的应用非常广

泛^[7-8]。

目前, 甘草酸的工业化生产通常采用水提酸沉得甘草酸粗品, 再用重结晶、大孔树脂吸附等方法分离纯化^[9-12]。该类方法生产周期长、成本高、过程复杂, 且产品得率低、纯度不高。针对上述问题,

收稿日期: 2018-09-16

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, 从事中药制剂工艺研究。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

本实验首次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^[13],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特点,采用该技术分离纯化甘草超滤液中的甘草酸。在对络合萃取、反萃取系统研究的基础上,拟集成超滤-络合萃取技术,开发出一种制备甘草酸的新工艺。

1 仪器与试剂

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。

三烷基氧化膦 (TRPO),质量分数>93.0%,濮阳市凯信化工有限公司;磺化煤油 (260[#]),广东正茂石化有限公司;乙腈,天津市大茂化学试剂厂;磷酸,天津市祥瑞鑫化工科技有限公司。

甘草饮片(批号 170916)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甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎;甘草酸铵对照品,批号 110731-20161,供定量测定用,质量分数≥93.0%,购于中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 甘草超滤液的制备^[14]

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 压强下超滤,超滤液浓缩至含生药 1 g/mL,备用。

2.2 甘草酸的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取甘草酸铵对照品适量,精密称定,加 70%乙醇制成含甘草酸 216 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^[10] 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,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。色谱图见图 1。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取甘草酸对照品溶液 1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 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)作回归曲线,得甘草酸回归方程 $Y=650.48X-24.746$, $r=0.9999$,线性范围 0.216~4.320 μg。

2.2.5 甘草酸含量测定 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酸含量。

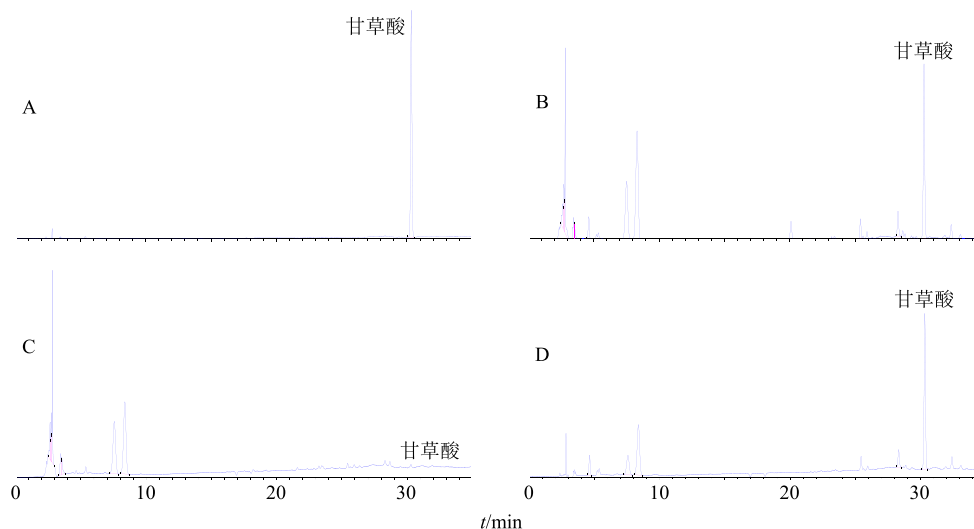


图 1 对照品溶液 (A)、甘草超滤液 (B)、络合萃取萃余液 (C) 和反萃取液 (D) 的 HPLC 图

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

2.3 络合萃取及反萃取方法

取甘草超滤液(含生药 0.05 g/mL)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,取下层萃余液测定甘草酸的质量浓度,有机相络合萃取剂中的甘草酸质量浓度由差减法求得,计算甘草酸的萃取率[萃取率=(C_0-C_1)/ C_0 , C_0 为甘草超滤液中甘草酸的质量浓度, C_1 为萃余液中甘草酸的质量浓度]。

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 后,取下层反萃取液测定甘草酸的质量浓度,计算甘草酸的反萃取率[反萃取率= $C_2/(C_0-C_1)$, C_2 为反萃取液中甘草酸的质量浓度]。

由上述所得萃取率和反萃取率,按公式计算甘草酸的总转移率。

$$\text{总转移率} = \text{萃取率} \times \text{反萃取率}$$

2.4 络合萃取研究

2.4.1 超滤液 pH 值对甘草酸萃取率的影响 在前期研究过程中发现,当甘草超滤液 pH>6,采用 TRPO-磺化煤油作为萃取剂,甘草苷基本被萃取完全,而甘草酸几乎不被萃取。为了提高甘草酸的萃取率,在预实验研究络合萃取剂组成(络合剂及稀释剂种类、浓度等)对甘草酸萃取效果的基础上,以 4% TRPO+96%磺化煤油为萃取剂,考察超滤液 pH 值对甘草超滤液中甘草酸萃取效果的影响,结果见表 1。甘草超滤液 pH 值在 4~8,甘草酸萃取率随超滤液 pH 值的升高而逐渐降低。当甘草超滤液 pH>6 时,甘草酸萃取率几乎降为 0。

2.4.2 络合萃取工艺研究 由“2.4.1”项实验结果可知,甘草超滤液 pH 值对甘草酸萃取率具有显著的影响。在预实验的基础上,选择以 TRPO 和磺化煤油体积百分比(A)、超滤液 pH 值(B)、有机相与水相体积比(C)为影响因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交表 1 超滤液 pH 值对甘草超滤液中甘草酸萃取效果的影响

Table 1 Effect of pH of ultrafiltrate on extraction rate of GA

pH 值	甘草酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		萃取率/%
	超滤液	有机相	
4	17.16	8.02	46.7
5	17.16	1.29	7.5
6	17.16	0.14	0.8
7	17.16	0.05	0.3
8	17.16	0.02	0.1

设计优选络合萃取甘草超滤液中甘草酸的最佳工艺条件。因素水平及正交试验结果见表 2、方差分析结果见表 3。

表 2 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiment

序号	A	B	C	D(空白)	萃取率/%
1	3 : 97 (1)	2 (1)	1 : 1 (1)	(1)	69.5
2	3 : 97 (1)	3 (2)	2 : 1 (2)	(2)	57.4
3	3 : 97 (1)	4 (3)	3 : 1 (3)	(3)	39.2
4	4 : 96 (2)	2 (1)	2 : 1 (2)	(3)	84.1
5	4 : 96 (2)	3 (2)	3 : 1 (3)	(1)	73.9
6	4 : 96 (2)	4 (3)	1 : 1 (1)	(2)	45.9
7	5 : 95 (3)	2 (1)	3 : 1 (3)	(2)	98.3
8	5 : 95 (3)	3 (2)	1 : 1 (1)	(3)	83.3
9	5 : 95 (3)	4 (3)	2 : 1 (2)	(1)	53.2
K_1	166.1	251.9	198.7	196.6	
K_2	203.9	214.6	194.7	201.6	
K_3	234.8	138.3	211.4	206.6	
R	68.7	113.6	16.7	10.0	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	789.260 0	2	47.355 6	$P<0.05$
B	2 235.326 7	2	134.119 6	$P<0.01$
C	50.686 7	2	3.041 2	
D(误差)	16.666 7	2		

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

由方差分析可知,因素 A、B 均对甘草酸萃取率具有显著性影响($P<0.05$ 、 0.01),因素 C 对甘草酸萃取率无显著性影响,选取第 1 水平较佳。综上所述最终选取 $A_3B_1C_1$ 水平组合为络合萃取甘草酸的最佳工艺,即将甘草超滤液 pH 值用稀盐酸调至为 2,用 5% TRPO+95%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 值为 2,用移液管精密量取 3 等份,每份 10 mL,与 5% TRPO+95%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,甘草酸萃取率分别为 99.5%、99.3%、98.8%,甘草酸平均萃取率为 99.2%,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 反萃取剂种类考察 为实现萃取剂的循环利用和解决甘草酸产品中有机溶剂的残留问题, 本实验对“2.4.3”项下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 4。可知 NaOH 水溶液作为反萃取剂, 甘草酸反萃取率高, 反萃取效果最好。

2.5.2 反萃取剂浓度考察 为了进一步提高甘草酸的反萃取率, 本实验考察了反萃取剂中 NaOH 浓度对甘草酸反萃取率的影响, 结果见表 5。可知随着反萃取剂中 NaOH 浓度的增大, 甘草酸的反萃取率也在增大。当以 22.5 mmol/L NaOH 为反萃取剂时, 甘草酸的反萃取率高达 98.8%, 效果非常理想。

表 4 反萃取剂种类对甘草酸反萃取率的影响

Table 4 Effect of different kinds of stripping agents on back extraction rate of GA

种类	甘草酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		反萃取率/%
	有机相	反萃取剂	
纯水	17.03	0.00	0.0
10%氨水	17.03	10.76	63.2
2.5 mmol·L ⁻¹ NaOH 水溶液	17.03	13.35	78.4

表 5 反萃取剂浓度对甘草酸反萃取率的影响

Table 5 Effect of concentration of stripping agent on back extraction rate of GA

NaOH/(mmol·L ⁻¹)	甘草酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		反萃取率/%
	有机相	反萃取剂	
7.5	17.03	14.43	85.1
12.5	17.03	15.46	90.8
17.5	17.03	16.06	94.3
22.5	17.03	16.82	98.8

2.6 络合萃取及反萃取物的 HPLC 分析

对照品溶液、甘草超滤液、5% TRPO+95%磺化煤油络合萃取萃余液、22.5 mmol/L NaOH 反萃取液中甘草酸 HPLC 图见图 1。结果表明, 甘草酸首先被成功地萃取到络合萃取剂中, 再被反萃取到碱性反萃取剂中。超滤-络合萃取技术可用于甘草酸的制备。

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。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^[15-16]。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。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、极性较大的甘草酸的富集和纯化有比较大的优势。

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酸的分离, 萃取过程乳化现象严重^[17]。因此, 本实验将超滤作为前置技术, 在保留甘草酸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酸分离具有了适用性, 为甘草酸的制备开辟了新的工艺路线。

在本课题组前期络合萃取甘草苷时, 甘草酸萃取率很低。经分析, 甘草酸含有羧基, 酸性较强, 在较高 pH 值条件下, 超滤液中的甘草酸以离子形式存在, 不利于络合萃取。因此本实验着重考察了超滤液 pH 值对甘草酸萃取率的影响。通过降低超滤液的 pH 值, 使得甘草酸的萃取率大幅度提高。而且针对络合萃取技术对极性有机物稀溶液具有选择性富集作用, 本实验使用不经浓缩的甘草超滤液(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, 有利于甘草酸的工业化生产。

由于本实验的目的在于络合萃取出更多的甘草酸。在本实验优选所得的工艺条件下, 实现了甘草酸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酸几乎被络合萃取及反萃取完全, 甘草酸总转移率高达 98.1%。

参考文献

- [1] 高雪岩, 王文全, 魏胜利, 等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2695-2700.
- [2] 万文婷, 马运运, 许利嘉, 等. 野甘草的现代研究概述和应用前景分析 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2492-2498.
- [3] 田庆来, 官月平, 张波, 等. 甘草有效成分的药理作

- 用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(2): 343-347.
- [4] 肖明中, 胡爱萍. 甘草的药理作用及其用于艾滋病的研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(12): 48-50.
- [5] 孙波, 李小芹, 周方. 甘草酸对小鼠实验性结肠炎的治疗作用及其机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(10): 2471-2476.
- [6] 黄群荣, 马哲. 甘草酸的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 384-387.
- [7] 韩瑶聘, 王彬, 王政雨, 等. 甘草酸药理作用的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012, 27(21): 81-82.
- [8] 王肖娜, 金玉姬, 刘洋, 等. 甘草甜素的应用及研究现状 [J]. 吉林医药学院学报, 2014, 35(2): 144-147.
- [9] 李玉山. 甘草酸提取纯化工艺的研究进展 [J]. 化学试剂, 2016, 38(5): 428-432.
- [10] 冯月, 吴文夫, 魏建华, 等. 甘草酸及甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展 [J]. 人参研究, 2012, 24(3): 46-50.
- [11] 赵祎镭, 师清芝, 唐星. 甘草中甘草酸和甘草苷的提取纯化工艺研究 [J]. 中国药房, 2009, 20(6): 426-429.
- [12] 魏炜, 银建中, 朱彻. 甘草酸及甘草黄酮类物质的提取、精制和应用的研究进展 [J]. 能源化工, 2005, 26(1): 30-33.
- [13] 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.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.