

溶剂萃取法分离水溶性甘草黄酮

田庆来^{1,2,3}, 谢渝春¹, 张波^{1,3}, 刘会洲¹

(1. 中国科学院过程工程研究所分离科学与工程实验室, 北京 100080;

2. 河北理工大学化工与生物技术学院, 河北 唐山 063009; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 以三烷基氧化膦(Trialkylphosphine Oxide, TRPO)石油醚溶液为萃取有机相, 从甘草浸提液中对水溶性甘草黄酮进行了萃取分离. 正交实验表明, TRPO 浓度是影响总黄酮萃取的显著因素, 相比(A/O)的影响次之, pH 值的影响最小. 在 pH 5~8 的范围内总黄酮萃取率随 pH 值升高而逐渐下降; 在 pH 5~6 的范围内甘草酸的萃取率随 pH 值升高迅速降低, 在 pH 6 以上几乎降为 0; 总黄酮萃取率随相比的增大而减小, 随萃取剂浓度的增大迅速提高; 总黄酮的萃取率随温度的升高而下降, 说明萃取黄酮的反应是放热反应. TRPO 萃取甘草甙的萃合比为 3. 通过溶剂萃取方法可实现水溶性甘草黄酮和甘草酸的分离.

关键词: 甘草黄酮; 甘草酸; 萃取; 分离; 正交实验

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2007)03-0496-05

1 前言

甘草中的有效成分主要包括黄酮类、三萜类、多糖等^[1], 从各种甘草中分离得到的黄酮类化合物有 150 多种^[2], 三萜类化合物以甘草酸最多. 甘草黄酮具有抑菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等药理作用^[3], 其中水溶性总黄酮具有明显的抗心肌缺血活性^[4].

甘草黄酮包括黄酮甙元和黄酮甙, 黄酮甙元是脂溶性的, 黄酮甙是水溶的和脂溶性的. 传统的甘草黄酮浸取分离一般用有机溶剂, 然后经过进一步处理得甘草黄酮^[5-9]. 工业生产中通常用水浸取甘草酸, 经酸沉可得甘草酸粗品, 再用重结晶法^[10,11]、二次沉淀法^[10,11]、大孔吸附树脂法^[10-15]、强酸型阳离子交换树脂^[16]得到甘草酸纯品. Niu 等^[17]用溶剂萃取法从甘草浸提液中分离甘草酸, 因甘草黄酮甙有糖羟基和酚羟基, 会随甘草酸一同被水浸取出来. 以上各种方法既没有回收浸取液中的黄酮, 也没有回收粗甘草酸中的黄酮, 不仅造成了黄酮的浪费, 也影响甘草酸的纯度.

傅博强等^[18,19]以 70% 乙醇浸取甘草酸、甘草黄酮, 提取液经蒸发脱乙醇再加水, 以此水溶液为原料, 用大孔吸附树脂同时吸附甘草酸和甘草黄酮, 用不同的洗脱剂洗脱分别得到甘草黄酮和甘草酸. 这种方法虽为回收甘草水浸提液中的黄酮提供了一种方法, 但它有诸多不足之处. 浸提液中有许多杂质, 未去除前就过吸附柱容易堵塞树脂, 吸附率容易受溶质浓度和 pH 值的影响, 分步解吸也不易控制, 使甘草酸和甘草黄酮不能充分分离, 因受吸附、解吸速度的限制, 该方法耗时多, 生产

效率低. 解吸甘草酸需用高浓度乙醇溶液, 蒸发回收乙醇耗能高, 过程中损失的乙醇使成本增加. 赵文军^[20]提出使用稀氨水提取并用大孔吸附树脂吸附得到甘草总黄酮, 但其步骤多效率低. 为此本工作提出用适合工业化生产的、生产效率高的溶剂萃取法从甘草水浸提液中直接萃取分离水溶性甘草黄酮, 以回收水溶性甘草黄酮并提高甘草酸的纯度, 研究了各种影响萃取的因素, 从而确定了实现水溶性甘草黄酮与甘草酸分离的工艺条件.

2 实验

2.1 仪器与试剂

分析天平(上海天平仪器厂生产的 TG328A 型), 高效液相色谱仪(Agilent 生产的 HP1100 型). 乙腈为色谱纯, 冰乙酸、氢氧化钾、氢氧化钠、硫酸、甲醇均为分析纯, 石油醚的沸程为 60~90℃, 三烷基氧化膦(Trialkylphosphine Oxide, TRPO)为工业级产品, 超纯水由中国科学院半导体研究所制备, 甘草酸单铵盐 3 水合物标准品购自中国药品生物制品检定所, 甘草甙(含量为 99%)购自上海康九化工有限公司, 甘草片由内蒙古亿利资源集团科技甘草分公司提供.

2.2 方法

2.2.1 甘草总黄酮及甘草酸的分析方法

甘草总黄酮(Total Flavonoids, TF)分析方法采用紫外分光光度法^[21], 以甘草甙为对照品, 在 410 nm 处测定其吸光度.

甘草酸(Glycyrrhizic Acid, GA)含量的测定采用高

收稿日期: 2006-08-29, 修回日期: 2006-09-22

作者简介: 田庆来(1965-), 男, 河北省唐山市人, 博士研究生, 讲师, 研究方向为天然产物分离; 刘会洲, 通讯联系人, Tel: 010-62554264, E-mail: hzliu@home.ipe.ac.cn.

效液相色谱法^[22], 分析柱为 Zorbax-ODS (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm), 保护柱为 Zorbax-SB, 流动相组成为 $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (41:59, φ , 含 3% CH_3COOH), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 248 nm. 以甘草酸单铵盐 3 水合物为对照品.

2.2.2 甘草黄酮萃取实验方法

正交实验和 pH 值影响实验在烧杯中进行. 将一定体积的有机相和经离心过滤预处理的甘草浸提液加入烧杯中, 在磁力搅拌下将 pH 调到预定值, 再搅拌 10 min, 将液体倒入离心管静置、离心, 取出水相分析总黄酮和甘草酸的浓度. 其他实验在 50 mL 离心管中进行, 按相比将有机相和一定 pH 值的甘草浸提液加入离心管, 在振荡器的水浴中预热 20 min、振荡 30 min、静置 30 min, 离心后取水相分析总黄酮浓度和甘草酸浓度. 有机相中总黄酮浓度和甘草酸浓度按物料衡算计算. 总黄酮萃取率、甘草酸萃取率分别按式(1)和(2)计算. 本工作中萃取所用的有机相为三烷基氧化磷的石油醚溶液.

$$\text{总黄酮萃取率} = \frac{\text{萃取后有机相中总黄酮的质量}}{\text{最初水浸提液中总黄酮的质量}} \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{甘草酸萃取率} = \frac{\text{萃取后有机相中甘草酸的质量}}{\text{最初水浸提液中甘草酸的质量}} \times 100\%. \quad (2)$$

2.3 正交实验影响因素的选择

甘草酸与甘草黄酮的结构不同, 甘草酸有 3 个羧基和 5 个羟基, 甘草黄酮一般只有酚羟基, 它们的酸性强弱不同, 在水溶液中以分子形式存在的 pH 范围不同, 故可在不同的 pH 条件下用溶剂将它们分步萃取出来. 本研究选择浸提液的 pH 值作为考察的因素之一. 有机相与水相的体积比(A/O)以及萃取剂的浓度会影响萃取率, 故也考察这 2 个因素, 本次实验的影响因素和水平

见表 1. 一般温度也是影响萃取的因素, 为了提高正交实验的准确性, 暂不考虑温度的影响, 均控制在室温.

表 1 正交实验影响因素和水平

Level	Factor		
	pH value, A	Phase ratio (A/O), B	Concentration of extractant, C (% , φ)
1	7	2:1	5
2	6	3:1	10
3	5	4:1	15

3 结果与讨论

3.1 正交实验结果

因要考察 3 个影响因素和 3 个水平, 选用 $L_9(3^3)$ 表安排实验. 正交实验设计及结果见表 2, 方差分析见表 3. 由极差和方差分析结果可以看出, 以总黄酮萃取率为考察指标, 3 种因素对甘草总黄酮萃取率的影响程度依次为 C(萃取剂浓度)>B(相比)>A(pH 值), 并且萃取剂浓度是影响显著的因素. 本研究的目的是分离甘草黄酮和甘草酸, 即希望甘草黄酮更多地被萃取出来, 甘草酸尽可能多地留在水相中. 在 pH<6 萃取甘草黄酮, 有较多甘草酸同时被萃取出来, 所以萃取甘草黄酮的 pH 应为 6 以上; pH>7 时, 总黄酮萃取率降低较多, 故萃取甘草黄酮的 pH 应在 6~7 之间. 实验中观察到实验 2, 7 几乎没有乳化现象, 其他实验均有不同程度的乳化. 经对比分析, 实验 2, 7 的共同特点是萃取剂的浓度为 5%, 且 pH 值在 6 以上, 在以后的验证实验中, 萃取剂浓度为 5%(φ)时均不发生乳化. 所以为了避免乳化对实验的影响, 在以后大部分实验中萃取剂浓度均为 5%(φ). 为了提高甘草黄酮的萃取率, 可在高萃取剂浓度下进行, 但必须解决乳化问题.

表 2 正交实验设计及实验结果

Table 2 Orthogonal test design and experimental results

Exp.	pH value	Phase ratio	Concentration of trialkylphosphine oxide (% , φ)	Extraction rate of total flavonoid (%)	Extraction rate of glycyrrhizic acid (%)
1	1	1	3	66.9	3.4
2	2	1	1	34.7	2.0
3	3	1	2	58.1	45.1
4	1	2	2	49.9	4.0
5	2	2	3	68.0	4.0
6	3	2	1	31.9	20.1
7	1	3	1	28.0	1.3
8	2	3	2	47.7	3.6
9	3	3	3	65.2	47.9
k_1	144.8	159.7	94.6		
k_2	150.4	149.8	155.7		
k_3	155.2	140.9	200.1		
K_1	48.3	53.2	31.5		
K_2	50.1	49.9	51.9		
K_3	51.7	47.0	66.7		
R	3.5	6.2	35.2		

表3 方差分析
Table 3 Analysis of variance

Source	Sum of squared deviation	Degree of freedom	Mean variance	F test	Significance
A	S_1 18.1	2	9.05	1.28	
B	S_2 59.0	2	29.5	4.18	$p>0.2$
C	S_3 1 870.6	2	935.3	132.7	$p>0.01$
Error	S_e 14.1	2	7.05		
Sum of error	S_T 1 961.8	8			

3.2 pH 值的影响

黄酮的酚羟基在水溶液中能电离出氢离子,在不同 pH 值的水溶液中,以分子形式存在的黄酮和以离子形式存在的黄酮比例不同.萃取过程中黄酮以分子形式被萃入有机相,所以 pH 值影响总黄酮的萃取率.图 1 表明,在 pH 5~8 的范围内总黄酮萃取率随 pH 值升高而下降,但在 pH 值 5~7 的范围内变化较小,在 pH 值 7~8 的范围内变化较大.图 1 还表明在 pH 值 5~6 的范围内 pH 值对甘草酸的萃取率有显著的影响,萃取率迅速降低; pH>6 萃取率几乎降为 0.这说明用溶剂萃取可使甘草浸液中甘草酸、水溶性甘草黄酮得到分离.实际上某种物质的萃取率由三个因素控制,一是分配常数,二是它的电离平衡即电离常数,三是物料衡算.在不考虑活度系数的前提下,由萃取反应平衡、电离平衡、物料衡算式可得如下总黄酮萃取率(ER)计算公式:

$$ER = \frac{K_R [\text{TRPO}]^n}{K_R [\text{TRPO}]^n + \frac{V_A}{V_o} + \frac{K_a V_A}{[\text{H}^+] V_o}} \times 100\% \quad (3)$$

式中, K_R 是萃取反应平衡常数, n 是萃合比, K_a 是电离平衡常数, V_A 是水相的体积, V_o 是有机相的体积.

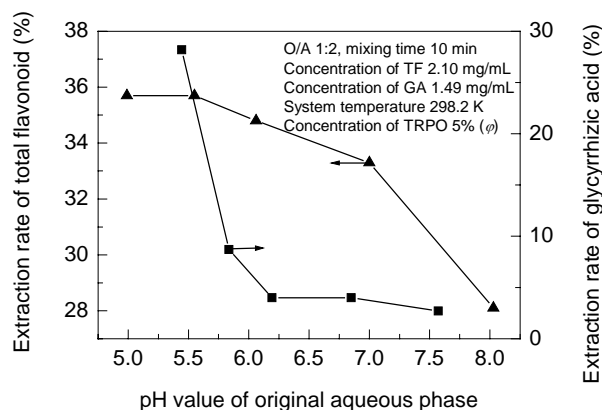


图1 pH 值对总黄酮和甘草酸萃取的影响
Fig.1 Effect of pH on the extraction rates of total flavonoid (TF) and glycyrrhizic acid (GA) in aqueous leaching solution

由式(3)可知,在其他条件不变的情况下,随着 pH 值升高,即氢离子浓度减小,总黄酮的萃取率逐渐降低.当氢离子浓度小于电离平衡常数 K_a 时,这种降低速度会迅速增大.在 pH 5~7 的范围内,黄酮、甘草酸的萃取

率有不同的变化趋势,主要原因是它们的电离常数不同.以上结果进一步说明水溶性甘草黄酮的萃取应在 pH 6~7 的范围内进行.

3.3 相比的影响

图 2 表明总黄酮萃取率随相比(A/O)的增大而下降,这可由式(3)得到解释.在温度、pH、萃取剂浓度等条件固定的情况下,萃取相体积比(V_A/V_o)增大,分母变大,总黄酮萃取率随之降低.一般情况下,为了浓缩水相中的溶质,萃取相比(A/O)一般大于 1.提高萃取相比(A/O),虽可减小后处理的有机相体积,但以降低萃取率为代价,还会使有机相中负载量增大,进而粘度增大,增加分相难度.

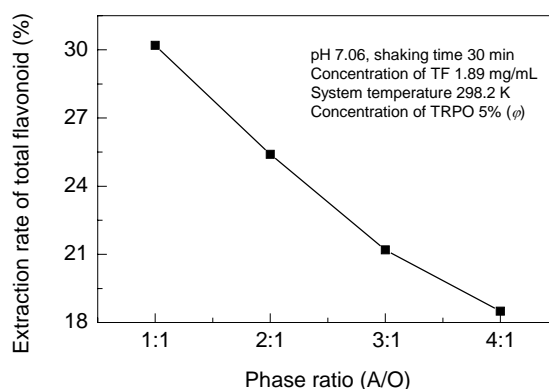


图2 相比对总黄酮萃取的影响
Fig.2 Effect of phase ratio on the extraction rate of total flavonoid (TF) in aqueous leaching solution

3.4 萃取剂浓度的影响

图 3 表明,总黄酮萃取率随萃取剂浓度的增大迅速提高.式(3)的分子与 TRPO 浓度的 n 次方成正比,分母中的第 1 项也与 TRPO 浓度的 n 次方成正比,但分母中还有其他 2 项,在较低 TRPO 浓度时分子、分母随 TRPO 浓度的增加速度不一样,分子增加得快,所以总黄酮萃取率随萃取剂浓度迅速提高.可以预见,随着 TRPO 浓度的逐渐增加,式(3)分子、分母增加的速度逐渐接近,萃取率基本不再增加.一般情况下,为了获得较高的萃取率,总黄酮的萃取应在较高萃取剂浓度下进行,但实验中发现当 TRPO 浓度在 7% (φ) 以上时,萃取过程中形成中间相.为避免中间相的产生,一是控制萃取剂的浓

度在 7% 以下; 二是对甘草浸提液进行妥善处理, 以使当萃取剂的浓度在 7% 以上时萃取过程中也不发生乳化现象.

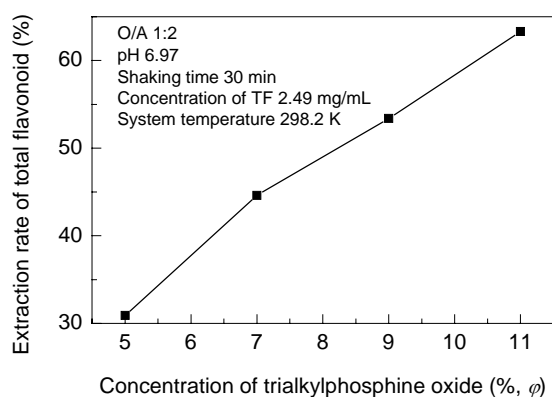


图3 萃取剂浓度对总黄酮萃取的影响
Fig.3 Effect of extractant concentration on the extraction rate of total flavonoid (TF)

3.5 温度的影响

通常情况下, 温度是影响萃取的一个重要因素. 由式(3)可知, 温度对萃取率的影响是由温度对萃取反应平衡常数 K_R 的影响而引起的. 萃取反应平衡常数随温度升高或降低使萃取率增大或减小. 图4表明总黄酮的萃取率随温度的升高而下降, 这说明萃取反应的平衡常数随温度升高而减小, 即萃取黄酮的反应是放热反应. 从热力学角度看, 降低温度有利于萃取, 升高温度有利于反萃.

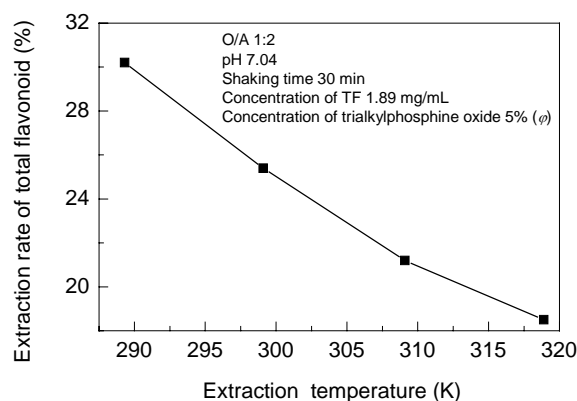


图4 温度对总黄酮萃取的影响
Fig.4 Effect of extraction temperature on the extraction rate of total flavonoid (TF) in aqueous leaching solution

3.6 萃取机理分析

三烷基氧化磷的结构简式为 R_3PO , 3 个烷基与磷原子直接相连, 磷原子再以双键与 1 个氧原子相连, 这样氧原子具有 2 对孤对电子. 一般情况下, TRPO 萃取有机物是络合反应, TRPO 中的氧原子与有机物中的羟

基氢以氢键形成萃合物^[23,24]. 为了探讨萃合物的组成, 本工作以内蒙乌拉尔甘草中含量最高的成分甘草甙^[25]为模拟物, 研究了萃取率随 TRPO 浓度的变化. 甘草甙只有 1 个羟基, 假定甘草甙的分子式为 LQOH, 则 TRPO 萃取甘草甙的反应可写为



萃取反应平衡常数 K_R 可由下式计算:

$$K_R = \frac{[\overline{(nTRPO) \cdot LQOH}]}{[\overline{TRPO}]^n [LQOH]}. \quad (5)$$

分配常数 k 为

$$k = \frac{[\overline{(nTRPO) \cdot LQOH}]}{[LQOH]} = K_R [\overline{TRPO}]^n. \quad (6)$$

在温度、pH 值、甘草甙浓度一定的情况下, k 只与 TRPO 的浓度有关. 式(6)两边取对数可得

$$\log k = \log K_R + n \log [\overline{TRPO}]. \quad (7)$$

以 $\log k$ 对 $\log [\overline{TRPO}]$ 作图, 如图 5 所示. 经线性回归得 $n=3.13$, 这说明 TRPO 萃取甘草甙的萃合比为 3.

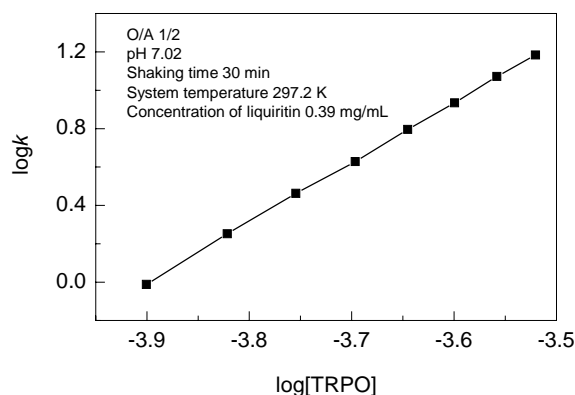


图5 甘草甙的 $\log k$ 随 $\log [\overline{TRPO}]$ 的变化
Fig.5 Dependence of $\log k$ of liquiritin on $\log [\overline{TRPO}]$

4 结论

(1) 以三烷基氧化磷石油醚溶液为萃取有机相, 由甘草浸提液中萃取水溶性甘草黄酮, 三烷基氧化磷浓度是最显著影响因素, 相比(A/O)的影响次之, pH 值的影响最小.

(2) 在 pH 5~7 的范围内总黄酮萃取率随 pH 值升高而缓慢下降, 在 pH 值 5~6 的范围内甘草酸的萃取率迅速降低, pH>6 萃取率几乎降为 0; 水溶性总黄酮的萃取应在 pH 6~7 之间.

(3) 总黄酮萃取率随相比(A/O)的增加而下降。

(4) 总黄酮萃取率随萃取剂浓度的增大迅速提高。

(5) 总黄酮的萃取率随温度的升高而下降, 萃取黄酮的反应是放热反应。

(6) TRPO 萃取甘草甙的萃合比为 3。

(7) 采用溶剂萃取方法可实现甘草浸提液中水溶性黄酮和甘草酸的分离。

参考文献:

- [1] 黄泰康, 丁志遵, 赵守训. 现代本草纲目, 上卷 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000. 662.
- [2] 邢国秀, 李楠, 王童. 甘草中黄酮类化学成分的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 593-597.
- [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] 潘燕. 甘草水溶性总黄酮抗心肌缺血作用的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(2): 173.
- [5] 苑可武, 徐文豪, 白芳, 等. 一种从甘草渣中提取甘草黄酮的方法 [P]. 中国专利: 1544449, 2004-11-10.
- [6] 朱育新, 孙东海. 甘草黄酮的提取纯化方法 [P]. 中国专利: 1477104-A, 2004-02-25.
- [7] 刘钢, 匡军. 从甘草中系统分离、提取甘草黄酮、甘草酸、甘草多糖生产方法 [P]. 中国专利: 1359905-A, 2002-12-15.
- [8] Maruzen Kasei Co. Ltd. Extraction of Licorice-derived Hydrophobic Flavonoid Used as Antioxidant, E-using Mixed Solvent Comprising Hexane and Acetone or Ethyl Alcohol [P]. Japan Pat.: 2204495-A, 1990-08-14.
- [9] 高素莲, 王雪梅. 甘草中皂甙和黄酮类化合物的提取分离与测定 [J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2000, 2(4): 70-74.
- [10] 贺小贤, 陈合. 甘草酸提取工艺研究 [J]. 陕西科技大学学报, 2004, 22(6): 26-29.
- [11] 张玉华, 白风梅, 葛毅强. 甘草酸的提取、精制及影响因素分析 [J]. 食品工业科技, 2003, 24(1): 66-68.
- [12] 曾启华. 从甘草中提取甘草酸和甘草次酸的工艺研究 [J]. 遵义师范学院学报, 2006, 8(1): 62-64.
- [13] 来庚, 张军良, 杨来顺. 大孔树脂法精制甘草酸 [J]. 应用化工, 2006, 3(4): 316-318.
- [14] 刘倩, 仰榴青, 吴向阳. 大孔吸附树脂纯化甘草酸的研究 [J]. 中药材, 2003, 26(5): 357-359.
- [15] 崔杏雨, 崔健, 陈树伟. 甘草酸制备新工艺的研究 [J]. 太原理工大学学报, 2001, 32(3): 271-273.
- [16] 潘福生, 张涵秋, 唐世容. 高纯度甘草酸结晶的分离精制方法 [P]. 中国专利: 850104970, 1989-05-31.
- [17] Niu G G, Xie Y C, Lou J F, et al. Isolation and Purification of Glycyrrhizic Acid with Solvent Extraction [J]. Sep. Purif. Technol., 2005, 44: 189-196.
- [18] 傅博强, 刘士力, 王小如. XDA-1 大孔吸附树脂对甘草酸及甘草总黄酮的吸附分离 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(增刊): 45-50.
- [19] Fu B Q, Liu J, Li H. The Application of Macroporous Resins in the Separation of Licorice Flavonoids and Glycyrrhizic Acid [J]. J. Chromatogr. A, 2005, 1089: 18-24.
- [20] 赵文军. 甘草总黄酮提取方法 [P]. 中国专利: 1207910, 1999-02-17.
- [21] 伍蔚萍, 孙文基, 阎宏涛. 分光光度法测定甘草中总黄酮的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 469-472.
- [22] Pan X J, Liu H Z, Jia G H. Microwave-assisted Extraction of Glycyrrhizic Acid from Licorice Root [J]. Biochem. Eng. J., 2000, 5: 173-177.
- [23] 王运东, 李玉鑫, 李振宇. 三烷基氧膦(TRPO)萃取有机羧酸的研究 [J]. 高校化学工程学报, 2001, 15(2): 174-178.
- [24] 牛国光. 微波辅助提取及溶剂萃取提纯甘草酸的工艺研究 [D]. 北京: 中国科学院过程工程研究所, 2003. 44.
- [25] 杨岚, 刘永隆, 林寿全. 六种甘草属植物根中黄酮类成分的高效液相色谱分析 [J]. 药学报, 1990, 25(11): 840-848.

Separation of Hydrophilic Licorice Flavonoid by Solvent Extraction Method

TIAN Qing-lai^{1,2,3}, XIE Yu-chun¹, ZHANG Bo^{1,3}, LIU Hui-zhou¹

(1. Lab. Sep. Sci. & Eng., Institute of Process Engineering, CAS, Beijing 100080, China;

2. School of Chemical Engineering and Biotechnology, Hebei Polytechnic University, Tangshan, Hebei 063009, China;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Using the mixture of trialkylphosphine oxide (TRPO) and petroleum ether as extractive organic phase, the extraction of hydrophilic flavonoid from the aqueous leaching solution of licorice was carried out. Orthogonal tests showed that the concentration of TRPO was the most remarkable factor for extracting hydrophilic flavonoid, then the phase ratio and the smallest was pH value. It was also found that the extraction rate of total flavonoid (TF) decreased with increasing pH value in the range from 5 to 8. The extraction rate of glycyrrhizic acid rapidly decreased with increasing pH value in the range from 5 to 6, and it almost approached zero above pH 6. The extraction rate of TF rapidly increased with the increase of the concentration of TRPO and decreased with the increase of phase volume ratio (A/O). It decreased with the increase of the system temperature, and the reaction of the extracting TF was exothermic. The ratio of TRPO to solute in extractive complex was 3. The separation between hydrophilic licorice flavonoids and glycyrrhizic acid in the aqueous leaching solution could be achieved by solvent extraction method.

Key words: licorice flavonoid; glycyrrhizic acid; extraction; separation; orthogonal test