

- [17] Zhou M M, Wang Y J, Wu F, et al. Development on porous particles of pueraria lobatae radix for improving its compatibility and dissolution [J]. *RSC Advances*, 2018, 8 (43): 24250-24260.
- [18] Dos Santos K M, De Melo Barbosa R, Meirelles L, et al. Solid dispersion of β -lapachone in PVP K30 and PEG 6000 by spray drying technique [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2021, 146(6): 2523-2532.
- [19] Li J Z, Li Z, Ruan H S, et al. Improved direct compression properties of gardeniae fructus water extract powders via fluid bed-mediated surface engineering [J]. *Pharm Dev Technol*, 2022, 27(6): 725-739.
- [20] Zhao H Y, Zhao L J, Lin X, et al. An update on microcrystalline cellulose in direct compression: Functionality, critical material attributes, and co-processed excipients [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 278: 118968.
- [21] Dominik M, Vraníková B, Svačinová P, et al. Comparison of flow and compression properties of four lactose-based co-processed excipients: Cellactose (R) 80, CombiLac (R), MicroceLac (R) 100, and StarLac (R) [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(9): 1486.
- [22] Al-Zoubi N, Gharaibeh S, Aljaberi A, et al. Spray drying for direct compression of pharmaceuticals [J]. *Processes*, 2021, 9(2): 267.

甘草超滤液中总黄酮络合萃取-反萃取工艺优化

万玲娟, 刘媛媛, 冯晓莉, 刘梅清, 徐镱文, 刘晓霞, 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 优化甘草超滤液中总黄酮络合萃取-反萃取工艺。方法 以总黄酮萃取率为评价指标, 单因素试验筛选络合剂种类和体积分数、稀释剂种类、超滤液 pH、转速; 以总黄酮反萃取率为评价指标, 正交试验筛选反萃取剂种类和体积分数、反萃取时间、转速。结果 最佳络合萃取条件为 10% 三烷基氧化膦 (TRPO) + 90% 碳化煤油在 pH 6、转速 25 r/min 下萃取 10 h, 总黄酮萃取率为 95.04%; 最佳反萃取条件为 0.09% NaOH 溶液在 25 r/min 下反萃取 10 h, 总黄酮反萃取率为 94.46%。结论 该方法可实现总黄酮从甘草超滤液到萃取剂再到反萃取剂的高效转移, 从而对其进行分离制备。

关键词: 甘草; 超滤液; 总黄酮; 络合萃取工艺; 反萃取工艺; 单因素试验; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)10-3422-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.039

甘草是药食两用的传统中药, 具有补气、调养脾胃、缓急止痛、调和诸药等功效^[1], 常用于治疗倦怠乏力、心气虚、咳嗽、痰多、药食中毒、脘腹疼痛等, 其所含的总黄酮具有抗氧化^[2]、美白、抗炎^[3]、抗病毒、抗衰老等活性, 是一种快速、高效、绿色的美白祛斑化妆品添加剂^[4-5], 被广泛应用于食品、医药、美容等行业中, 具有很大的发展前景^[6]。

络合萃取是可逆的化学萃取过程, 可对有机物稀溶液进行高效性和高选择性的萃取^[7], 近年来主要用于废水处理, 而且已实现了工业化应用^[8-10]。黄酮类成分的结构中有酚羟基, 可与中性氧磷类萃取剂发生络合反应后进入到萃取剂中。因此, 本实验将络合萃取应用于甘草超滤液中黄酮类成分的分离, 再采用稀碱溶液调节络合萃取体系的 pH, 利用络合萃取的可逆性将黄酮类成分从萃取剂中反萃

取到稀碱溶液中, 从而实现萃取剂的重复利用。

1 材料

甘草茎对照品 (批号 111610-202209, 纯度 ≥98%, 北京北纳创联生物技术研究院)。磷酸三丁酯 (TBP, 烟台市双双化工有限公司); 石油醚 (天津市进丰化工有限公司); 碳化煤油 (260#, 茂名市正茂石化有限公司); 三烷基氧化膦 (TRPO, 漆阳市凯信化工原料经营部); 氢氧化钾 (广州松柏化工有限公司)。乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

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]; UVWin 6 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司); DD-5M 离心机 (湘仪离心机仪器有限责任公司)。

甘草购自兰州市黄河中药材专业市场, 经甘肃中医药

收稿日期: 2023-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82062721); 甘肃省创新之星项目 (2022CXZX-740); 甘肃省教育厅“双一流”科研重点项目 (GSSYLMX-05)

作者简介: 万玲娟 (1994—), 女, 博士生, 从事中药制药工艺研究。Tel: 18298419389, E-mail: 2207395753@qq.com

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

大学药学院魏舒畅教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis Fisch.* 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 超滤液制备 参照文献[11-13]报道, 取2 kg药材饮片, 加入24倍量稀氨水, 回流提取3次, 每次1 h, 合并提取液, 在0.12 MPa压力下用10 nm无机陶瓷膜进行超滤, 即得。

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取甘草苷对照品适量, 甲醇溶解, 制成质量浓度为0.157 mg/mL的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液制备 精密吸取甘草超滤液、萃余液、反萃取液各1 mL, 置于25 mL量瓶中, 纯水定容至刻度, 摆匀, 即得。

2.2.3 检测波长确定 精密度量取对照品溶液1.25 mL, 置于25 mL量瓶中, 加入5 mL甲醇、1.25 mL 10% KOH溶液, 室温放置5 min, 甲醇定容至刻度, 摆匀, 即得对照品显色液; 精密度量取供试品溶液1.25 mL, 同法制备供试品显色液; 精密度量取甲醇6.25 mL, 置于25 mL量瓶中, 加入1.25 mL 10% KOH溶液, 室温放置5 min, 甲醇定容至刻度, 摆匀, 即得参比溶液。在200~600 nm波长范围内对上述3种溶液进行扫描, 发现对照品、供试品显色液均在335 nm处有最大吸收, 而参比液在该处无吸收。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 置于25 mL量瓶中, 加入5 mL甲醇、1.25 mL 10% KOH溶液, 室温放置5 min, 甲醇定容至刻度, 摆匀, 以相应溶剂为参比溶液, 在335 nm波长处测定吸光度。以甘草苷质量浓度为横坐标(X), 吸光度为纵坐标(A)进行回归, 得方程为A=0.063 72X+0.080 11(r=0.999 7), 在1.57~15.7 μg/mL范围内线性关系良好。

2.3.2 精密度试验 精密度量取“2.2.1”项下对照品溶液1.25 mL, 按“2.2.3”项下方法测定吸光度6次, 测得其RSD为1.75%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取“2.2.2”项下同一份供试品溶液, 于1、4、8、12、16、24 h按“2.2.3”项下方法测定吸光度, 测得其RSD为1.16%, 表明溶液在显色24 h内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 精密称取同一批药材饮片6份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下方法测定吸光度, 测得其RSD为2.01%, 表明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取黄酮含量已知的供试品溶液9份, 分为3组, 分别按50%、100%、150%水平精密加入甘草苷对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下方法测定吸光度, 计算回收率。结果, 甘草苷平均加样回收率为99.48%, RSD为2.84%。

2.4 络合萃取-反萃取法

2.4.1 络合萃取法 将甘草超滤液与络合萃取剂按1:1

比例混匀, 加到50 mL离心管中, 密塞, 置于旋转混匀仪上, 在一定转速下萃取10 h后3 000 r/min离心15 min, 上层为有机相, 下层为萃余相, 取下层萃余液, 测定总黄酮质量浓度^[14-15], 采用差减法计算总黄酮含量, 计算其萃取率, 公式为萃取率=[(超滤液中总黄酮质量浓度-萃余液中总黄酮质量浓度)/超滤液中总黄酮质量浓度]×100%。

2.4.2 反萃取法 在络合萃取基础上, 往负载萃合物的萃取剂中加入一定量反萃取剂, 混匀后离心, 上层为有机相, 下层为负载目标溶质的反萃取液, 测定后者中总黄酮质量浓度, 计算反萃取率, 公式为反萃取率=[反萃取液中总黄酮质量浓度/(超滤液中总黄酮质量浓度-萃余液中总黄酮质量浓度)]×100%

2.5 络合萃取工艺优化 采用单因素试验。

2.5.1 络合剂种类筛选 选择对酸性化合物具有络合萃取作用的中性氧磷类物质TRPO和TBP作为络合剂, 碳化煤油作为稀释剂^[16-17], 按“2.4.1”项下方法25 r/min萃取10 h, 计算萃取率, 结果见表1。由此可知, TRPO对总黄酮的萃取率较TBP高, 4%TRPO+96%碳化煤油对其有较好的萃取效果, 故选择TRPO。

表1 络合剂种类对总黄酮萃取率的影响(n=3)

萃取剂	总黄酮质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		萃取率/%	RSD/%
	超滤液中	萃余液中		
4% TBP+96% 碳化煤油	1.502 6	0.957 5	36.28	0.93
4% TRPO+96% 碳化煤油	1.502 6	0.881 0	41.37	0.77

2.5.2 稀释剂种类筛选 TRPO黏度大, 流动性小, 萃取过程中容易产生乳化现象, 故在络合剂中加入一定量稀释剂可解决此问题, 同时其对萃合物的溶解性还可提高萃取效率。以正辛醇、碳化煤油、石油醚为稀释剂, TRPO为络合剂, 按“2.4.1”项下方法25 r/min萃取10 h, 计算萃取率的影响, 结果见表2。由此可知, 以碳化煤油为稀释剂时总黄酮萃取率最高, 而以正辛醇为稀释剂时最低, 故选择碳化煤油。

表2 稀释剂种类对总黄酮萃取率的影响(n=3)

萃取剂	总黄酮质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		萃取率/%	RSD/%
	超滤液中	萃余液中		
4% TRPO+96% 石油醚	1.502 6	0.957 5	36.28	1.76
4% TRPO+96% 碳化煤油	1.502 6	0.881 0	41.37	0.87
4% TRPO+96% 正辛醇	1.502 6	1.065 9	29.06	1.02

2.5.3 超滤液pH筛选 在不同pH下黄酮类成分在超滤液中的存在状态有所差异, 当其以分子形式存在时更容易被络合萃取^[18]。以4%TRPO+96%碳化煤油为萃取剂, 10%HCl分别调节超滤液pH至2、3、4、5、6、7, 计算萃取率, 结果见表3。由此可知, 随着超滤液pH增加萃取率升高, 为7时开始降低; 小于4时超滤液中产生沉淀, 总黄酮含量降低, 故选择6。

2.5.4 络合剂体积分数筛选 为了进一步提高总黄酮萃取

表3 超滤液pH对总黄酮萃取率的影响(n=3)

pH	总黄酮质量浓度/(mg·mL ⁻¹) 超滤液中	总黄酮 萃余液中	萃取率/%	RSD/%
2	0.745 2	0.533 8	28.37	1.73
3	1.024 9	0.704 2	31.29	1.08
4	1.502 6	0.825 5	45.06	1.33
5	1.502 6	0.709 9	52.75	1.38
6	1.502 6	0.514 6	65.75	0.98
7	1.502 6	0.703 1	53.12	1.17

率, 考察络合剂体积分数对其的影响, 结果见表4。由此可知, 随着TRPO体积分数增加萃取率升高, 可能与络合剂结合的溶质变多有关; 大于10%后萃取率变化不显著, 表明萃取已趋于饱和, 为了降低成本, 故选择10% TRPO+90% 磺化煤油。

表4 络合剂体积分数对总黄酮萃取率的影响(n=3)

萃取剂	总黄酮质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		总黄酮 萃余液中	萃取率/%	RSD/%
	超滤液中	萃余液中			
6% TRPO+94% 磺化煤油	1.502 6	0.400 1	73.37	1.21	
8% TRPO+92% 磺化煤油	1.502 6	0.236 1	84.29	1.09	
10% TRPO+90% 磺化煤油	1.502 6	0.104 3	93.06	0.77	
12% TRPO+88% 磺化煤油	1.502 6	0.078 9	94.75	0.74	
14% TRPO+86% 磺化煤油	1.502 6	0.073 3	95.12	0.98	

2.5.5 转速筛选 以10% TRPO+90% 磺化煤油为萃取剂, 超滤液pH为6, 萃取10 h后分别在转速15、25、35 r/min下计算萃取率, 结果见表5。由此可知, 随着转速增加萃取率升高, 为35 r/min时达到最大值, 但此时乳化现象严重, 萃取剂与超滤液不易分层, 离心后出现三相, 导致萃取剂损失, 故选择25 r/min。

表5 转速对总黄酮萃取率的影响(n=3)

转速/(r·min ⁻¹)	总黄酮质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		总黄酮 萃余液中	萃取率/%	RSD/%
	超滤液中	萃余液中			
15	1.502 6	0.149 5	90.05	1.37	
25	1.502 6	0.094 2	93.73	1.29	
35	1.502 6	0.072 3	95.19	1.11	

2.6 反萃取工艺优化 采用正交试验。

2.6.1 反萃取剂种类筛选 以0.1% NaOH溶液、10% 氨水、纯水为反萃取剂, 考察其对反萃取率的影响, 结果见表6。由此可知, 以0.1% NaOH溶液反萃取时萃取率较高, 故选择该溶液。

2.6.2 试验设计 以反萃取剂体积分数(A)、转速(B)、反萃取时间(C)为影响因素, 总黄酮反萃取率(Y)为评价指标, 进行 $L_9(3^4)$ 设计, 因素水平见表7, 结果见表

表6 反萃取剂种类对总黄酮反萃取率的影响(n=3)

反萃取剂	总黄酮质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		总黄酮反 萃取率/%	RSD/%
	萃取剂中	反萃取剂中		
10% 氨水	1.398 3	0.176 0	12.59	1.96
纯水	1.398 3	0	0	0
0.1% NaOH溶液	1.398 3	1.139 7	81.51	1.07

8, 方差分析见表9。由此可知, 各因素影响程度依次为A>C>B; 因素A、C有显著性影响($P<0.05$), B无显著影响($P>0.05$); 最优工艺为 $A_2B_2C_2$, 即反萃取剂体积分数0.09%, 转速25 r/min, 反萃取时间10 h。

表7 正交试验因素水平

水平	因素		
	A 反萃取剂 体积分数/%	B 转速/(r·min ⁻¹)	C 反萃取 时间/h
1	0.04	15	8
2	0.09	25	10
3	0.14	35	12

表8 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D(空白)	Y 总黄酮 反萃取率/%
1	1	1	1	1	78.73
2	1	2	2	2	84.62
3	1	3	3	3	85.91
4	2	1	2	3	92.24
5	2	2	3	1	94.16
6	2	3	1	2	89.63
7	3	1	3	2	85.37
8	3	2	1	3	83.29
9	3	3	2	1	87.86
K_1	83.087	85.447	83.883	86.917	—
K_2	92.010	87.357	88.240	86.540	—
K_3	85.507	87.800	88.480	87.147	—
R	8.923	2.353	4.597	0.607	—

表9 方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	127.776	2	63.888	222.027	0.004
B	9.383	2	4.691	16.671	0.057
C	40.167	2	20.084	71.368	0.014
D(误差)	0.563	2	0.281	—	—

2.7 验证试验 取超滤液3份, 按“2.5”项下优化工艺络合萃取, 再按“2.6”项下优化工艺反萃取, 结果见表10。由此可知, 总黄酮平均萃取率为95.04%, 平均反萃取率为94.46%, RSD分别为0.74%、0.48%, 表明该工艺稳定可靠, 重复性良好。

表10 验证试验结果(n=3)

超滤液体积/mL	总黄酮质量浓度/(mg·mL ⁻¹)			总黄酮萃取率/%	总黄酮反萃取率/%
	超滤液中	萃取剂中	反萃取剂中		
15	1.502 6	1.439 5	1.352 8	95.80	93.98
15	1.502 6	1.426 1	1.347 6	94.91	94.50
15	1.502 6	1.418 7	1.346 2	94.42	94.89

3 讨论与结论

络合萃取在分离极性有机物稀溶液时具有高选择性^[19]。本实验将络合萃取应用于分离甘草超滤液中的黄酮类成分, 对络合萃取和反萃取工艺进行了研究, 确定了络合萃取反萃取分离甘草超滤液中总黄酮的最佳工艺条件, 为黄酮类化合物的分离提供了一种新方法。

在络合萃取中, 首要的是络合剂和稀释剂。其中, 络合剂与被萃取溶质应能通过化学键结合成萃合物, 而且键能大小要适宜, 本实验选择分离酚酸类物质常用的中性氧磷类物质TBP和TRPO, 发现后者对总黄酮萃取效果更高, 这是因为其P=O结构对该类成分中酚羟基的氢键缔合能力更强^[20]; 稀释剂可改变络合萃取体系的物性参数, 减小体系黏度, 促使萃合物向萃取相中转移^[21], 本实验确定为碘化煤油。

在不同超滤液pH下黄酮类成分在超滤液中的存在形式有所差异, 而络合萃取时萃取溶质主要是以分子形式被萃取。本实验发现, 超滤液pH为6时总黄酮萃取率最高, 表明此时该类成分主要以分子形式存在于超滤液中, 而络合萃取后存在于有机相中, 故可利用络合萃取的可逆性将其反萃出来。

参考文献:

- [1] 黄凯勇, 王其龙, 杨景森, 等. 甘草主要活性成分及其在动物生产中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(6): 48-52.
- [2] 杨怡萌, 陈星宇, 吴 娅, 等. 蒲公英黄酮抗氧化活性的构效关系分析[J]. 化学通报, 2020, 83(11): 1031-1037.
- [3] 孙甲琛, 孙文涛, 孙 慧, 等. 甘草黄酮合酶Ⅱ催化甘草素特异性合成7, 4'-二羟基黄酮[J]. 化工学报, 2022, 73(7): 3202-3211.
- [4] 张兴琪, 何敬渝, 龚盛昭, 等. 不同种类甘草成分及美白抗敏活性差异研究[J]. 日用化学工业, 2021, 51(7): 648-654.
- [5] Kang M H, Jang G Y, Ji Y J, et al. Antioxidant and anti-melanogenic activities of heat-treated licorice (Wongam, *Glycyrrhiza glabra* × *G. uralensis*) extract[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2021, 43(2): 1171-1187.
- [6] 申美伦, 梁业飞, 刘广欣, 等. 甘草黄酮提取分离方法的研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(1): 154-159.
- [7] 陈怀涛. 酚类废水的络合萃取预处理研究[J]. 世界农药, 2022, 44(4): 41-44.
- [8] 王 秋, 查振兴, 李 影, 等. 2, 4-二氯苯氧乙酸生产废水中氯酚的络合萃取处理[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2020, 43(1): 49-54.
- [9] 屈泽鹏, 孙东明, 安路阳, 等. 络合萃取法处理高浓度含酚兰炭废水[J]. 工业用水与废水, 2020, 51(5): 9-13.
- [10] Xie F, Wang W. Recovery of copper and cyanide from waste cyanide solutions using emulsion liquid membrane with LIX 7950 as the carrier [J]. *Environ Technol*, 2017, 38 (15): 1961-1968.
- [11] 朱应怀, 刘晓霞, 王继龙, 等. 氨水提取联合陶瓷膜超滤技术纯化甘草苷工艺研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(6): 71-74.
- [12] 魏舒畅, 袁文珺, 余 琰, 等. 红芪提取液的超滤纯化工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(4): 599-603.
- [13] 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.
- [14] 刘媛媛, 冯晓莉, 刘晓霞, 等. 络合萃取-反萃取制备甘草超滤液中芹糖甘草苷的工艺研究[J]. 中草药, 2022, 53(14): 4317-4322.
- [15] 石盘棋, 刘晓霞, 魏舒畅, 等. 络合萃取-反萃法制备异甘草素的工艺研究[J]. 高校化学工程学报, 2020, 34(4): 939-945.
- [16] 周 博, 蒲红利, 王继龙, 等. 甘草超滤液中甘草苷的络合萃取研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(6): 645-649.
- [17] 李德亮, 杨长钰, 余夔廷, 等. 羧酸(-COOH)的络合萃取[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2021, 51(1): 58-74; 94.
- [18] 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.
- [19] 宋永会, 魏 健, 马印臣, 等. 络合萃取法处理金刚烷胺制药废水[J]. 环境科学研究, 2014, 27(12): 1513-1518.
- [20] 张普杰. 以选钼尾矿为原料制取APT制备工艺的改进[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2016.
- [21] 蒲红利, 周 博, 魏舒畅, 等. 甘草超滤液中甘草酸的络合萃取研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 157-160; 166.