

# 甘草总黄酮氨水提取及超滤纯化工艺研究

朱应怀<sup>1,2</sup>, 刘晓霞<sup>1</sup>, 宋晓春<sup>1</sup>, 魏舒畅<sup>1,3\*</sup>, 金辉<sup>1</sup>, 王继龙<sup>1</sup>(1.甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2.甘肃中医药大学附属医院药学部, 兰州 730000; 3.甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室, 兰州 730000)

**摘要:** 目的 建立一种适合于工业化生产的甘草总黄酮提取和纯化方法。方法 以甘草总黄酮的提取率为指标, 采用正交试验确定氨水提取的最佳条件; 并以甘草总黄酮的转移率和除杂率为指标, 采用正交试验优化最佳超滤工艺参数。结果 最佳提取条件: 0.75%氨水 24 倍, 提取 3 次, 每次 60 min, 总黄酮平均提取率达 83.5%; 超滤结果表明: 选用 10 nm 的无机陶瓷膜, 在操作压力 0.12 MPa 和料液温度 25 ℃条件下甘草总黄酮平均转移率和平均除杂率分别达到 95.6%和 23.3%。结论 该联用技术简便可行, 生产成本低, 适合工业化生产。

**关键词:** 甘草; 总黄酮; 提取; 超滤; 转移率; 除杂率

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)04-0492-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.003

## Study on the Extraction of Total Flavonoids from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by Ammonia and the Purification of Ultrafiltration

ZHU Yinghuai<sup>1,2</sup>, LIU Xiaoxia<sup>1</sup>, SONG Xiaochun<sup>1</sup>, WEI Shuchang<sup>1,3\*</sup>, JIN Hui<sup>1</sup>, WANG Jilong<sup>1</sup>(1.College of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3.Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a suitable method for industrialized production of total flavonoids extraction and purification from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. **METHODS** The orthogonal test was used to determine the best extraction conditions within the extraction rate of total flavonoids as the index; and orthogonal experiment was used to optimize the parameters of ultrafiltration process taking the transfer rate of total flavonoids and the ratio of removal of impurity as indexes. **RESULTS** The best extraction conditions were as follows: 24 times of 0.75% ammonia, extract 3 times, 60 min for each time, the average extraction rate of total flavonoids was 83.5%. Ultrafiltration results showed that: 10 nm of inorganic ceramic membrane, in the operating pressure of 0.12 MPa and liquid temperature of 25 ℃, the average transfer rate and average removal rate of total flavonoids were 95.6% and 23.3%. **CONCLUSION** The combined technique is simple and feasible, and the production cost is low, the method is suitable for industrial application.

**KEY WORDS:** Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; total flavonoids; extraction; ultrafiltration; transfer rate; removal rate

甘草为药食兼用品种, 甘草总黄酮为甘草三大主要活性成分之一, 具抗氧化、美白、抗炎、抗病毒、抗衰老等作用<sup>[1]</sup>, 广泛应用于食品、医药、化妆品等行业。甘草总黄酮作为优良的天然抗氧化剂, 对油脂的抗氧化效果明显优于丁基羟基茴香醚、二丁基羟基对甲苯等合成抗氧化剂<sup>[2-3]</sup>; 在美白方面, 具有快速高效的美白、祛斑效果, 其市场应用前景广阔<sup>[4]</sup>。目前市场上甘草总黄酮的价格与其品质高低紧密相关, 如何生产高品质的甘草总黄酮已成为生产企业急需解决的问题。

本实验首次将无机陶瓷膜超滤技术与氨水提取工艺联合应用于甘草总黄酮的提取纯化, 通过工艺条件优化得到适合工业化生产的甘草总黄酮

提取纯化方法。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

SJM 陶瓷超滤设备、10, 20, 50 nm 超滤膜(合肥世杰膜工程有限公司); UV Blue star B 紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司); L400 低速台式离心机(湘仪离心机仪器有限公司); BP211D 电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); CRM-420 纯水制备仪(成都唐氏康科技发展有限公司); DZF-6051 真空干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

#### 1.2 试剂

甘草药材购于兰州黄河药材市场(经甘肃中医

基金项目: 国家自然科学基金项目(81060345, 81460608); 甘肃省基础研究创新群体项目(1506RJJA034)

作者简介: 朱应怀, 男, 硕士生 Tel: 15593106978 E-mail: zhuyh14@163.com \*通信作者: 魏舒畅, 男, 教授 Tel: 13893467387 E-mail: wsch006@163.com

药大学药学院魏舒畅教授鉴定为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fish.); 甘草苷对照品(批号: 111610-201106, 纯度>93.7%)购于中国食品药品检定研究院, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 甘草总黄酮含量测定方法的建立

**2.1.1 对照品溶液制备** 取甘草苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.159 3 mg 的溶液, 即得。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 准确称取甘草饮片 100 g, 分别加 3%氨水溶液 0.9 L, 回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 过滤, 浓缩至生药浓度为 0.2 g·mL<sup>-1</sup> 药液。精密吸取药液 4 mL, 加水稀释至 100 mL, 摇匀, 即得。

**2.1.3 检测波长确定** 精密吸取甘草苷对照品溶液 2 mL, 加甲醇 5 mL, 再加 10%KOH 溶液 1.25 mL, 室温放置 5 min, 甲醇定容至 25 mL, 以相应溶剂为参比, 于 200~600 nm 处扫描, 结果在 335 nm 处有最大吸收峰, 以同样的方法对甲醇和 10%KOH 溶液进行扫描, 结果发现此处无吸收。

另精密吸取供试品溶液 1.25 mL, 依上述操作, 结果在 335 nm 处同样有吸收峰, 因此确定检测波长为 335 nm。

**2.1.4 标准曲线的制备** 分别精密吸取甘草苷对照品溶液 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇 5 mL, 加 10% KOH 溶液 1.25 mL, 室温放置 5 min, 甲醇定容, 以相应溶剂为参比, 在 335 nm 处测定吸光度。以甘草苷对照品浓度  $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$  为横坐标, 吸光度值  $A$  为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为  $A=0.0617C-0.0209(r=0.9993)$ , 线性范围为 1.593~15.93  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.1.5 仪器精密度考察** 精密吸取对照品溶液 0.5 mL, 按照“2.1.4”项下方法连续测定 6 次, 以吸光度值  $A$  计算 RSD 为 0.18%, 表明仪器精密度良好。

**2.1.6 重复性试验** 取同一批甘草饮片, 共 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.4”项下方法测定其吸光度, 计算 RSD 为 0.25%, 表明方法重复性良好。

**2.1.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别在 1, 4, 8, 12, 16, 24 h 分别测定吸光度, 计算 RSD 为 1.21%, 表明供试液在 24 h 内稳定。

**2.1.8 加样回收率试验** 取已知总黄酮含量的供试液 9 份, 分别精密加入甘草苷对照品适量(按样品含量的 80%, 100%, 120%), 测定平均回收率为 98.92%, RSD 为 1.49%。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery tests

编号	样品中黄酮含量/ $\mu\text{g}$	对照品加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	91.20	72.96	163.05	98.48		
2	91.24	72.96	161.93	96.88		
3	91.16	72.96	164.56	100.60		
4	92.53	92.56	185.33	100.23		
5	92.46	92.56	184.19	99.10	98.92	1.49
6	92.55	92.56	185.21	100.11		
7	93.25	111.83	201.34	96.65		
8	93.30	111.83	203.05	98.14		
9	93.27	111.83	205.16	100.05		

### 2.2 甘草总黄酮的提取工艺研究

**2.2.1 提取溶剂的选择** 根据参考文献报道<sup>[5-6]</sup>, 选取水、3%氨水溶液、0.2 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液和 0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液为提取溶剂, 以甘草总黄酮的得率和出膏率为评价指标进行考察(提取方法均为称取甘草饮片 100 g, 加入溶剂 0.9 L, 回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 浓缩至生药浓度为 0.2 g·mL<sup>-1</sup> 药液, 精密吸取药液 4 mL, 加水稀释至 100 mL, 按“2.1.4”项下方法测定), 结果显示, 3%氨水提取液中总黄酮得率与其他溶剂相差不大, 且出膏率最低, 综合考虑后续的分离、精制成本问题, 最终选取 3%氨水溶液为甘草总黄酮的提取溶剂, 结果见表 2。

表 2 不同提取溶剂下甘草总黄酮得率和出膏率

Tab. 2 The yield and rate of total flavonoids extracted from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in different solvents

提取溶剂	甘草总黄酮得率/%	出膏率/%
水	1.549	63.81
3%氨水溶液	1.918	43.80
0.2 mol·L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 溶液	2.024	70.41
0.2 mol·L <sup>-1</sup> NaOH 溶液	2.427	71.37

**2.2.2 提取溶剂浓度的筛选** 按“2.2.1”项下的提取方法, 分别选取 0.3%, 0.5%, 0.75%, 1%, 2%, 3%氨水溶剂进一步考察其浓度, 结果显示, 当氨水浓度达到 0.75%时, 总黄酮得率最高, 之后随着氨水浓度的增大, 总黄酮得率基本维持平衡, 从节约生产成本和提高提取效果出发, 确定 0.75%氨水溶液为提取溶剂, 结果见图 1。

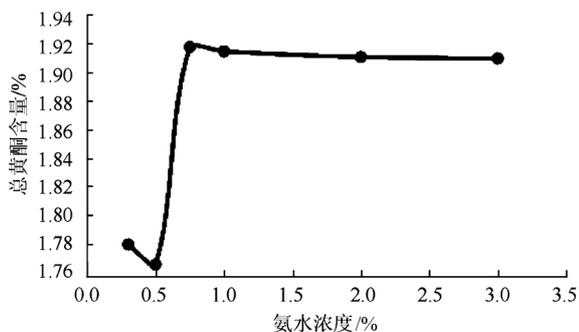


图1 不同氨水浓度下甘草总黄酮得率

Fig. 1 The yield of total flavonoids extracted from *Glycyrrhizae Radit et Rhizoma* under different concentrations of ammonia

**2.2.3 正交提取工艺优选** 以甘草总黄酮的提取率为评价指标(以  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 提取率为100%),选取氨水用量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,采用  $L_9(3^4)$ 正交设计优选总黄酮的最佳提取工艺。实验结果显示,影响提取结果的主次因素:氨水用量(A)>提取时间(B)>提取次数(C),且 A、B、C 3 个因素对总黄酮的提取均具有显著性,得最佳提取工艺为  $A_3B_2C_3$ ,即 24 倍 0.75%氨水,回流提取 3 次,每次 60 min。因素水平表、正交实验结果、方差分析结果分别见表 3~5。

**2.2.4 工艺验证及结果** 分别称取甘草饮片各 300 g,共 3 批,按最佳工艺  $A_3B_2C_3$  平行提取 3 次,测定总黄酮的提取率分别为 83.2%,82.4%,84.9%,平均提取率为 83.5%,RSD<3%,说明该工艺可行且稳定。

表3 因素水平表

Tab. 3 Factors and levels

水平	因素		
	A 氨水用量/倍	B 提取时间/min	C 提取次数/次
1	12	90	1
2	18	180	2
3	24	270	3

表4 正交试验结果

Tab. 4 Results of orthogonal test

序号	A	B	C	D(误差)	总黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	57.5
2	1	2	2	2	61.8
3	1	3	3	3	64.2
4	2	1	2	3	63.5
5	2	2	3	1	72.2
6	2	3	1	2	64.8
7	3	1	3	2	70.4
8	3	2	1	3	71.6
9	3	3	2	1	69.1
$K_1$	183.5	191.4	193.9	198.8	
$K_2$	200.5	205.6	194.4	197.0	
$K_3$	211.1	198.1	206.8	199.3	
R	27.6	14.2	12.9	2.3	

表5 方差分析结果

Tab. 5 Analysis of variance

来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	129.236	2	64.618	142.47	$P<0.01$
B	33.642	2	16.821	34.485	$P<0.05$
C	35.602	2	17.801	36.494	$P<0.05$
D(误差)	0.976	2	0.488		

## 2.3 超滤工艺研究

**2.3.1 甘草总黄酮提取液的制备** 按最佳提取工艺验证方法,称取甘草饮片 1.6 kg 制备甘草总黄酮提取液,放置过夜后取上清液,剩余药液经  $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min,收集上清液,将 2 次上清液合并,备用。

**2.3.2 超滤工艺参数优化** 根据课题组前期的研究<sup>[7-8]</sup>,以甘草总黄酮的转移率、除杂率为评价指标,采用  $L_9(3^4)$ 正交表对超滤膜孔径(A)、操作压力(B)、料液温度(C)进行优化,除杂率和转移率按下式计算。

除杂率(%)=[(原药液样品出膏率-超滤液样品出膏率)/原药液样品出膏率] $\times 100\%$ 。

转移率(%)=(超滤液中总黄酮含量/原药液总黄酮含量) $\times 100\%$ 。

实验结果显示,影响总黄酮转移率的主次因素为  $B>C>A$ ,优化水平为  $A_2B_2C_1$ ,因素 B 有显著性;影响除杂率的主次因素为  $A>B>C$ ,优化水平为  $A_1B_2C_3$ ,因素 A 和 B 均有显著性。

对于各指标:因素 B 均以第 2 水平为佳;因素 A 只对除杂效果有显著性,所以选择第 1 水平;因素 C 对各指标均无显著性,并结合生产实际生产的便利和节约能源,选择第 1 水平。综上分析,最终确定超滤最佳工艺为  $A_1B_2C_1$ ,即采用 10 nm 的无机陶瓷膜在压力 0.12 MPa 和料液温度为 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下进行超滤。其因素水平表、正交试验结果、方差分析结果见表 6~8。

**2.3.3 超滤工艺验证** 分别称取同一批甘草药材 3.2 kg,共 3 批,分别按“2.3.1”项下操作,并以最佳超滤工艺  $A_1B_2C_1$  进行平行验证 3 次,得总黄酮转移率分别为 95.4%,95.1%,96.3%,除杂率分别为 22.9%,23.3%,23.7%,总黄酮平均转移率达 95.6%,超滤过程平均除杂率达 23.3%,RSD<3%,说明该工艺稳定可操作。

表 6 因素水平表

Tab. 6 Factors and levels

水平	因素		
	A 膜孔径/nm	B 操作压力/MPa	C 料液温度/℃
1	10	0.08	25
2	20	0.12	30
3	50	0.16	40

表 7 正交试验结果

Tab. 7 Results of orthogonal test

序号	A	B	C	D(误差)	总黄酮转移率/%	除杂率/%
1	1	1	1	1	91.4	20.1
2	1	2	2	2	95.2	22.4
3	1	3	3	3	85.1	20.8
4	2	1	2	3	91.6	14.2
5	2	2	3	1	94.3	17.2
6	2	3	1	2	87.0	12.8
7	3	1	3	2	90.2	7.2
8	3	2	1	3	94.6	8.1
9	3	3	2	1	86.0	6.2
转	$K_1$	271.7	273.2	273.0	271.7	
移	$K_2$	272.9	284.1	272.8	272.4	
率	$K_3$	270.8	258.1	269.6	271.2	
	R	2.1	26.0	3.4	1.2	
除	$K_1$	63.3	41.5	41.0	43.5	
杂	$K_2$	44.2	47.7	42.8	42.4	
率	$K_3$	21.5	39.8	45.2	43.1	
	R	41.8	7.6	4.2	0.4	

表 8 方差分析结果

Tab. 8 Analysis of variance

考察指标	来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
总黄酮转移率	A	0.740	2	0.370	3.581	无显著性
	B	113.647	2	56.823	549.903	$P < 0.01$
	C	2.427	2	1.213	11.742	无显著性
	D(误差)	0.207	2	0.103		
除杂率	A	291.927	2	145.963	1412.548	$P < 0.01$
	B	11.527	2	5.763	55.774	$P < 0.05$
	C	2.960	2	1.480	14.323	无显著性
	D(误差)	0.207	2	0.103		

### 3 讨论

本实验选用 0.75%氨水为溶剂提取甘草总黄酮,其提取效果与乙醇提取<sup>[9-10]</sup>效果相当,但氨水提取液中溶入的杂质多,会造成后续纯化困难,使所得总黄酮纯度降低。针对上述缺点,本实验将超滤技术与氨水提取工艺联用,在保留总黄酮成分的同时有效地除去了提取液中大分子杂质。该工艺生产成本低,安全性好,适合工业化生产。

由于中药提取液成分复杂,部分大分子亲水物质以及无机离子易对膜造成不可逆污染,制约了超滤技术在中药领域的应用。已报道甘草总黄

酮的超滤纯化研究<sup>[11-13]</sup>多选用有机超滤膜,但有机膜热稳定性差、机械强度低,易形成永久性污染,膜的使用寿命短,工艺成本极高,所得工艺缺乏工业化适用性。本实验采用的无机陶瓷超滤膜机械强度高,化学稳定性好,用苛性化学清洗剂冲洗可有效解决膜污染问题,适合工业化生产。

### REFERENCES

- [1] LUO L P, LI Y J, ZHANG H, et al. Determination of antioxidant activity in licorice vitro metabolites by DPPH spiking coupled with HPLC-Q-TOF MS/MS [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2013, 22(21): 2547-2552.
- [2] LIU Y, WEN Z C, HUANG Z G, et al. Simultaneous determination of liquiritigenin and licochalcone A in licorice flavohoids disperse tablets by HPLC [J]. Pharm Today(今日药学), 2016, 26(1): 19-21, 26.
- [3] CUI Y M, YU L J, AO M Z, et al. Study on antioxidative effects of total flavonoids of Glycyrrhiza on edible oils [J]. Food Sci(食品科学), 2007, 28(11): 119-121.
- [4] 刘雨萌. 甘草活性成分提取及其在美白化妆品中的应用研究[D]. 河南大学, 2015.
- [5] MA Z J, XU Y, LIU J, et al. Study on Extraction process of licorice flavonoids from licorice waste residue [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(15): 15-19.
- [6] ZHAO Y L, SHI Q Z, TANG X. Study on the extraction and purification for glycyrrhizic acid and liquiritin from Radix et Rhizoma Glycyrrhizae [J]. J Chin Pharm(中国药房), 2009, 20(6): 426-429.
- [7] WEI S C, YUAN W J, YU Y, et al. Purification of ultrafiltration for the extract of *Hedysarum polybotrys* [J]. Chin Tradit Patent Med(中成药), 2011, 33(4): 599-603.
- [8] WANG J L, LIU X X, WEI S C, et al. Prediction of critical flux and pressure of enzymolysis extraction-ultrafiltration purification for Fibrous Rhizome Herbs based on BP neural network [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016(4): 586-590.
- [9] ZOU Y H, KOU X Y, HAN Q X. Study on extraction of total flavonoids from licorice with ultrasonic assistance and oxidation resistance [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2011, 39(14): 8345.
- [10] KAN W N, TAN T W. Microwave-assisted extraction of active components from Radix Glycyrrhiza [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006, 37(1): 61-64.
- [11] GU C, LIANG Y N, TANG Z S, et al. Effect of different separation and purification technologies on components in water extract of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(20): 5-8.
- [12] WANG Y Y, LIU L J. Using ultrafiltration membrane technologies purified licorice flavonoids [J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2012, 24(4): 646-649.
- [13] XU H K, LI C Y, PENG G P, et al. Study of preparing diammonium Glycyrrhizinate injection based on ultrafiltration [J]. J Liaoning Tradit Chin Med Univ(辽宁中医药大学学报), 2011, 13(7): 76-78.

收稿日期: 2016-06-22

(本文责编: 李艳芳)