

超高压提取甘草酸的工艺研究

张峻松¹, 张常记¹, 潘存宽^{1,2}, 王修铭², 毛多斌¹, 杨公明¹

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 红云红河集团新疆卷烟厂, 新疆 奎屯 833200)

摘 要: 对常温下超高压提取甘草中甘草酸的工艺进行探讨。以甘草酸提取率为评价指标, 考察提取时间、乙醇体积分数、液固比和超高压对甘草酸提取率的影响。通过单因素试验和响应面分析法确定最佳工艺条件: 提取时间 15min, 乙醇体积分数 49.50%, 液固比 13:1, 提取压力 382MPa, 甘草酸提取率的最大预测值为 14.61%。按最佳工艺验证试验 5 次, 甘草酸平均提取率为 14.67%, 相对标准偏差(RSD)为 0.29%($n=5$)。

关键词: 甘草; 甘草酸; 超高压提取; 响应面分析法

Ultra High Pressure-assisted Extraction of Glycyrrhizic Acid from *Glycyrrhiza uralensis* Roots

ZHANG Jun-song¹, ZHANG Chang-ji¹, PAN Cun-kuan^{1,2}, WANG Xiu-ming², MAO Duo-bin¹, YANG Gong-ming¹

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;

2. Xinjiang Cigarette Factory, Hongyun and Honghe Group, Kuitun 833200, China)

Abstract: Ultra high pressure treatment was used to assist the ethanol extraction of glycyrrhizic acid from *Glycyrrhiza uralensis* roots at normal temperature. The effects of extraction time, ethanol concentration, pressure and liquid/solid ratio on extraction yield of glycyrrhizic acid were analyzed using single-factor experiments. Response surface methodology (RSM) based on a three-level, three-variable central composite rotatable design (CCRD) was employed to optimize three crucial variables except extraction time. The optimum extraction conditions were determined as follows: ethanol concentration 49.50%, liquid/solid ratio 13:1, extraction pressure 382 MPa for an extraction duration of 15 min. Under the optimized conditions, a extraction yield of glycyrrhizic acid of 14.61% was predicted, and the average value of 5 repeated experiments was 14.67%, with a relative standard deviation of 0.29%.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*; glycyrrhizic acid; ultra high pressure-assisted extraction; response surface methodology

中图分类号: TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)18-0075-05

甘草(*Glycyrrhiza*), 又名甜草根、粉草根, 系豆科(Leguminosae)甘草属(*Glycyrrhiza*)植物, 其根在我国已有四千多年的药用史。现代研究证实, 甘草酸(glycyrrhizic acid, GA)是甘草中最有效的成分之一, 具有抗炎、抗病毒、保肝解毒及增强免疫力等功能^[1]。尤其是近年来甘草酸对艾滋病病毒和 SARS 病毒有特殊功效的报道^[2-3], 受到越来越多国内外学者的重视。

目前, 有关甘草酸提取方法的报道^[4-9]比较多, 但这些方法都不同程度地存在提取时间长、操作量大、杂质溶出率高、溶剂倍量多、能耗高等缺点。本实验在借鉴超高压在食品中运用的基础上, 对超高压提取甘草中甘草酸的工艺进行研究。超高压萃取技术(ultra high pressure extraction, UPE)^[8-13]就是指超高压技术在天然产

物萃取中的应用技术。是将原料及萃取剂以一定形式包装以后, 放入密封的、高压容器中, 在常温下施加 100~1000MPa 的压力保压一段时间后卸压, 取出样品就完成了整个萃取过程。该技术的特点是常温超高压浸取, 有效成分基本无损失, 活性高, 提取时间短, 提取率高, 可以使用各种溶剂, 且对分离、纯化有利, 无污染, 经济性和安全性好。

本实验研究超高压提取过程中各主要因素对甘草酸提取率的影响, 通过单因素和响应面试验^[14-15]得出最优提取工艺条件, 以期为深化甘草酸的提取提供理论依据。

1 材料与方法

收稿日期: 2009-05-18

基金项目: 郑州轻工业学院博士基金项目 (05014)

作者简介: 张峻松 (1971—), 男, 副教授, 博士, 主要从事烟草、食品香味成分的合成和分析研究。

E-mail: 13283712413@163.com

1.1 材料、试剂与仪器

甘草切片 河南省药材药业有限公司。

甘草酸对照品 替斯艾中 中药研究所；无水乙醇和硫酸等试剂均为分析纯。

UHP 900 × 2 超高压装置(超高压处理室的有效体积为 1L) 内蒙古包头文天科技有限公司；UV-2100 型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司；菲恰尔 TDL-5A 型台式离心机 上海菲恰尔分析仪器有限公司；DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司；METTLER 4E200 型电子分析天平 上海沛欧分析仪器有限公司。

1.2 原料预处理

将甘草切片粉碎成粗粉，称取 10g 甘草粗粉，加入一定量溶剂，在一定压力下保压一定时间后迅速(2s)卸压，离心提取液，滤液浓缩至原体积的 1/5，浓缩液冷却至室温后加入 1/2 体积的 95% 乙醇，静置过夜，过滤，滤液边搅拌边滴加 3mol/ml 浓硫酸至 pH1~2，放冰箱静置后，4000r/min 离心 10min，沉淀冻干成粉，得甘草酸粗品。

1.3 甘草酸含量的测定

绘制标准曲线：准确称取 25mg 甘草酸对照品，用 50% 的乙醇定容至 25ml，混匀后分别吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml 于 50ml 容量瓶中，再用 50% 乙醇定容。以 50% 乙醇做空白，在 254.0nm 波长处测定吸光度，作标准曲线，以吸光度(A)为横坐标，浓度(C, mg/ml)为纵坐标，得回归方程： $C=10.537A-0.0066$ ， $r=0.9996$ ($n=5$)。该标准曲线在 0.0006~0.1008mg/ml 范围内呈线性关系。

甘草酸含量的测定：准确移取离心后提取液 1ml 转移到 10ml 容量瓶中，用 50% 乙醇定容，准确移取上述溶液 1ml 于 50ml 容量瓶中，用 50% 乙醇定容，静置 5min 后，以空白为参照，于 254.0nm 处测定其吸光度。根据标准曲线计算甘草酸提取率。

1.4 单因素影响试验

主要考察提取时间、提取溶剂、液固比、以及提取压力等因素对甘草酸提取率的影响。

1.5 响应面分析法试验设计

在单因素试验的基础上，选择对响应值(甘草酸的提取率)有显著影响的三个因素进行响应面试验。采用 Design-Expert 7.0.2 对试验数据进行回归分析^[9]。每一自变量的低、中、高实验水平分别以 -1、0、1 进行编码，该模型通过最小二乘法拟合二次多项方程。

2 结果与分析

2.1 单因素分析

2.1.1 提取时间对甘草酸提取率的影响

在提取温度为室温，提取溶剂 30% 乙醇，液固比 10:1(ml/g)，提取压力 300MPa 的条件下，考察了不同提取时间对甘草中甘草酸提取率的影响，实验结果如图 1 所示。由图 1 可知，提取时间对甘草酸提取率的影响不大，因此本研究选择提取时间为 15min。

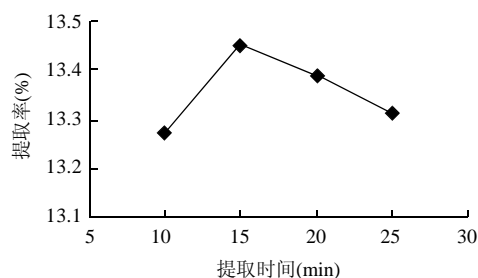


图 1 提取时间对甘草酸提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on the extraction yield of glycyrrhizic acid

2.1.2 乙醇体积分数对甘草酸提取率的影响

在提取温度为室温，提取时间为 15min，提取压力 300MPa，液固比选取 10:1(ml/g)条件下，考察了乙醇体积分数对甘草酸提取效果的影响，实验结果如图 2 所示。从图 2 可以看出，乙醇体积分数为 50% 时，甘草酸提取率最高。

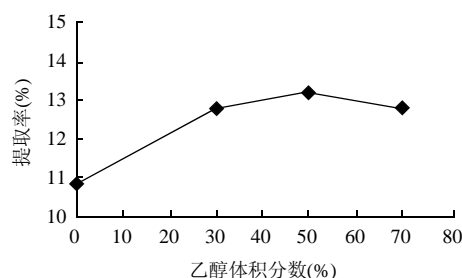


图 2 乙醇体积分数对甘草酸提取率的影响

Fig.2 Effects of ethanol concentration on the extraction yield of glycyrrhizic acid

2.1.3 提取压力对甘草酸提取效果的影响

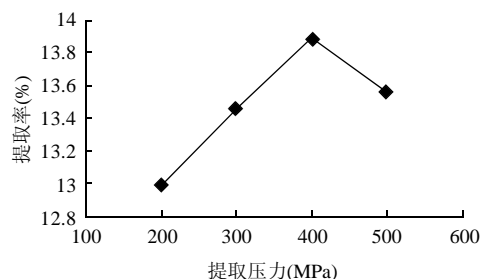


图 3 提取压力对甘草酸提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction pressure on the extraction yield of glycyrrhizic acid

在提取温度为室温, 提取时间 15min, 乙醇体积分数为 50%, 液固比选取 10:1(ml/g)的条件下, 考察了提取压力对甘草酸提取率的影响, 实验结果如图 3 所示。由图 3 可知提取压力为 400MPa 时, 甘草酸提取率最高。

2.1.4 液固比对甘草酸提取效果的影响

在提取温度为室温, 提取时间 15min, 乙醇体积分数 50%, 提取压力 400MPa 的条件下, 考察了不同液固比对提取效果的影响, 结果如图 4 所示。从图 4 可以看出, 液固比选取 12:1(ml/g)时, 甘草酸提取率最高。

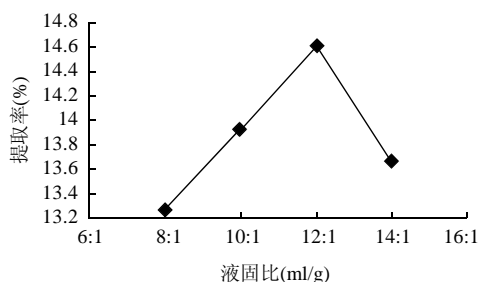


图4 液固比对甘草酸提取效果的影响

Fig.4 Effect of liquid/solid ratio on the extraction yield of glycyrrhizic acid

2.2 响应面优化试验及结果分析

2.2.1 响应面分析试验

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 以乙醇体积分数、液固比、提取压力三个因素为自变量(分别以 A、B、C 为代表), 以甘草酸提取率(以 Y 为代表)为响应值设计三因素三水平共 17 个试验点的响应面分析试验^[14-15], 其因素水平选取如表 1 所示, 试验方案与结果如表 2 所示。

利用 Design-Expert 软件对表 2 数据进行二次多元回归拟合, 得到甘草酸提取率的二次多项回归方程:

$$Y=14.61+0.015A+0.088B-0.048C-0.063AB-0.043AC-0.012BC-0.57A^2-0.49B^2-0.54C^2$$

对上述回归模型进行方差分析。回归模型方差分析结果见表 3, 结果表明, 模型显著($P=0.0002$), 回归模型的决定系数为 0.9697, 说明该模型能够解释 97.0% 的变化, 因此, 可用此模型对甘草酸提取率进行分析和预测。

表1 响应面设计因素与水平

Table 1 Variables and levels of the three-variable, three-level central composite rotatable design

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数(%)	30	50	70
B 液固比 (ml/g)	10:1	12:1	14:1
C 提取压强(MPa)	300	400	500

表2 响应面分析方案与试验结果

Table 2 Arrangement and results of the three-variable, three-level central composite rotatable design

试验点	A	B	C	Y 甘草酸提取率(%)
1	1	0	1	13.33
2	0	0	0	14.69
3	0	1	-1	13.75
4	0	-1	-1	13.55
5	-1	0	-1	13.57
6	0	0	0	14.54
7	1	0	-1	13.46
8	1	-1	0	13.65
9	-1	0	1	13.61
10	0	1	1	13.58
11	1	1	0	13.7
12	0	0	0	14.54
13	-1	1	0	13.57
14	0	0	0	14.68
15	0	0	0	14.58
16	0	-1	1	13.43
17	-1	-1	0	13.27

表3 回归模型方差分析结果

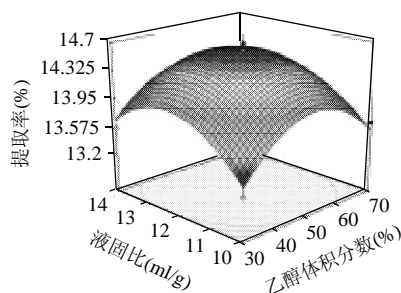
Table 3 Analysis of variance for the regression model developed

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	7.65	9	0.46	25.10	0.0002
A	1.800×10^{-3}	1	1.800×10^{-3}	0.098	0.7632
B	0.061	1	0.061	3.35	0.1101
C	0.018	1	0.018	0.99	0.3538
AB	0.016	1	0.016	0.85	0.3863
AC	7.225×10^{-3}	1	7.225×10^{-3}	0.39	0.5498
BC	6.250×10^{-3}	1	6.250×10^{-3}	0.034	0.8587
A ²	1.38	1	1.38	75.17	<0.0001
B ²	1.00	1	1.00	54.48	0.0002
C ²	1.24	1	1.24	67.49	<0.0001
残差	0.13	7	0.018		
总变异	4.26	16			

注: $R^2=0.9699$, $R_{adj}=0.9313$ 。

2.2.2 甘草酸提取率响应面分析优化

利用 Design-Expert 软件对表 2 数据进行二次多元回归拟合, 所得到的二次回归方程的响应面及其等高线乙醇体积分数和液固比交互作用对甘草酸提取率的影响见图 5, 乙醇体积分数和提取压力交互作用对甘草酸提取率的影响见图 6, 液固比和提取压力交互作用对甘草酸提取率的影响见图 7。



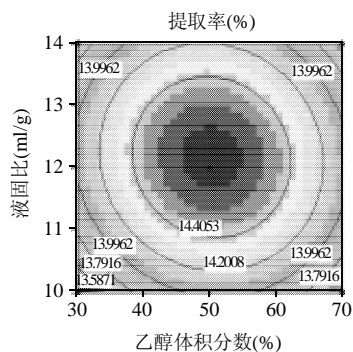


图5 乙醇体积分数和液固比交互作用对甘草酸提取率的影响

Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of ethanol concentration and liquid/solid ratio on the extraction yield of glycyrrhizic acid

从图5等高线图可以看出,提取压力为400MPa时,乙醇体积分数和液固比的交互作用显著。因为等高线的形状反映交互效应的强弱大小,近圆形表示两因素交互作用显著。在乙醇体积分数为30%时,得到较高甘草酸提取率需要液固比15:1;乙醇体积分数提高到50%时,液固比只需要12:1,且甘草酸提取率最高。这表明,在本实验水平范围内,适当提高乙醇体积分数有利于甘草酸的溶出并可减少提取溶剂。

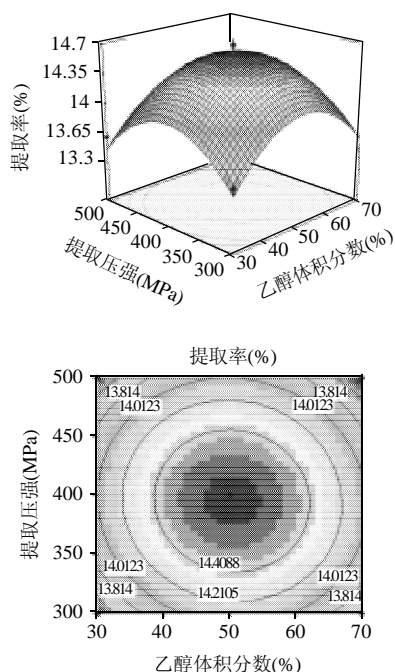


图6 乙醇体积分数和提取压强交互作用对甘草酸提取率的影响

Fig.6 Response surface and contour plots showing the effects of ethanol concentration and extraction pressure on the extraction yield of glycyrrhizic acid

从图6可看出,液固比为12:1时,乙醇体积分数和提取压力对甘草酸提取率的交互作用显著。在乙醇体积分数为30%时,得到较高甘草酸提取率需要提取压强

500MPa;乙醇体积分数提高到50%时,提取压强只需要400MPa,且甘草酸提取率最高。这表明,在本实验水平范围内,适当提高乙醇体积分数有利于甘草酸的溶出并可减少提取压强。

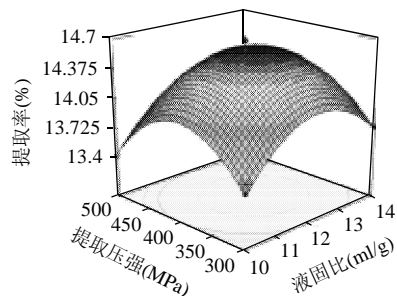


图7 液固比和提取压强交互作用对甘草酸提取率的影响

Fig.7 Response surface and contour plots showing the effects of liquid/solid ratio and extraction pressure on the extraction yield of glycyrrhizic acid

从图7可看出,乙醇体积分数为50%时,液固比和提取压力比对甘草酸提取率的交互作用显著。随着液固比的增加,达到甘草酸最大提取率所需要的提取压力降低。在一定的液固比范围内,随着液固比的增大,甘草酸提取率增加;液固比超过12:1时,甘草酸提取率反而下降。

2.3 最佳工艺验证实验

表4 验证实验

Table 4 Results of 5 repeated verification experiments under the optimized extraction conditions

实验次数	1	2	3	4	5	平均值	RSD(%)
甘草酸提取率(%)	14.60	14.55	14.63	14.67	14.57	14.60	0.29

通过甘草酸提取率的二次多项数学模型解逆矩阵,得出在乙醇体积分数49.50%、液固比13.07:1、提取压力382MPa的工艺条件下,甘草酸最大提取率预测值为14.61%。考虑到实验的可操作性,最佳工艺条件修正为:乙醇体积分数49.50%、液固比13:1、提取压力382MPa。为考察上述优化工艺条件的稳定性,取甘草粉10g,在最佳提取条件下进行5次重复实验,甘草酸

的提取率见表4。平均提取率为14.67%，相对标准偏差为0.29% ($n=3$)，说明该工艺稳定可靠。甘草酸的提取率优于其他常规方法^[4-9]。

2.4 对比实验

表5 超高压和热回流提取方法的比较

Table 5 Comparison between ultra high pressure treatment and thermal reflux for the extraction of glycyrrhizic acid

方法	溶剂	液固比(ml/g)	提取时间(min)	甘草酸提取率(%)
热回流提取	49.5% 乙醇	13:1	180	8.9
超高压提取	49.5% 乙醇	13:1	15	14.59

采用热回流和超高压提取方法提取甘草中甘草酸，甘草酸提取率如表5所示。由表5可知超高压提取时间最短，是常规热回流提取时间的0.83%，而提取率比热回流高63.9%。

3 结 论

3.1 本研究通过单因素和响应面分析法对甘草酸的提取工艺参数进行了优化，确定超高压提取甘草酸和总黄酮的最佳工艺条件为：乙醇体积分数50%，液固比13:1，提取压力400MPa，保压时间15min，提取温度20℃，在此条件下，甘草酸的提取率分别为14.61%。

3.2 超高压提取技术是提取甘草中甘草酸的高效方法，具有提取率高、周期短、无污染、杂质溶出少。经超高压处理后，蛋白质、淀粉等已经变性，方便了溶液的分离、纯化。

参考文献：

[1] 史桂兰, 胡志浩. 甘草酸药理作用及临床应用研究进展[J]. 天津药

学, 2001, 13(1): 10-12.

- [2] MASAHICO I, AKIHIKO S, KAWLURO H, et al. Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin, replication of human immunodeficiency virus(HIV)[J]. Antiviral Res, 1988, 10(6): 289-298.
- [3] 林晓兰, 崔琪, 王育琴, 等. 复方甘草酸苷对SARS患者激素撤药综合征的影响[J]. 中国药房, 2004, 15(60): 357-359.
- [4] CUI S F, FU B Q, LI C, et al. Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprint of licorice (*Glycyrrhiza* spp.)[J]. J Chrom., 2005, 828(1/2): 33-40.
- [5] PAN X L, LIU H Z, JIA G H, et al. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root[J]. Biochem Eng J, 2000, 5(3): 173-177.
- [6] DENIS R L, DWAYNE J J, JAMES A D, et al. Efficient method for determining the glycyrrhizin content of fresh and dried roots, and root extracts, of *Glycyrrhiza* species[J]. Phytochem Anal, 2001, 12(5): 332-335.
- [7] ENGA A T W, HENGA M Y, ONG B E S. Evaluation of surfactant assisted pressurized liquid extraction for the determination of glycyrrhizin and ephedrine in medicinal plants[J]. Anal Chim Acta, 2007, 583(2): 289-295.
- [8] 谢果, 霍丹群, 侯长军, 等. 超声波法从甘草中提取甘草酸的工艺研究[J]. 食品科技, 2000, 23(4): 42-44.
- [9] 杨帅才, 庄书蓓, 肖风华, 等. 甘草中甘草酸的含量测定[J]. 黑龙江医学, 2004, 17(4): 251-252.
- [10] ZHANG S Q, ZHU J J, WANG C Z. Novel high pressure extraction technology[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 278(2): 471-474.
- [11] 陈瑞战, 张守勤, 张永宏, 等. 超高压提取丹参素的研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(1): 291-295.
- [12] 张峻松, 张文叶, 谭宏祥, 等. 超高压处理对桃汁挥发性化学成分的影响[J]. 精细化工, 2007, 24(3): 265-268.
- [13] GÓMEZ-GUILLÉN M C, GIMÉNEZ B, MONTERO P. Extraction of gelatin from fish skins by high pressure treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(5): 923-928.
- [14] 范龚健, 韩永斌, 顾振新. 用响应面法优化红甘蓝色素提取工艺参数[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(1): 103-107.
- [15] WEN H, LI Z S, NIU H, et al. Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology[J]. J Food Eng, 2008, 89(3): 298-302.