

# 高效液相色谱法评价大孔树脂纯化甘草酸工艺

孙啸涛, 李 柰, 王昌涛\*

(北京工商大学 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048)

**摘要:** 对甘草纯化甘草酸的工艺进行系统研究。通过对DA201-C和AB-8两种型号大孔树脂静态吸附和解吸的比较, 选择AB-8型大孔树脂对甘草酸进行纯化; 静态吸附解吸实验表明, AB-8型大孔树脂纯化甘草酸的最佳工艺条件为上样液pH6.0、上样液质量浓度5.89mg/mL、洗脱液50%乙醇溶液; 应用高效液相色谱法检测甘草酸纯度的方法, 结果显示, 经AB-8型大孔树脂纯化后的甘草酸纯度52.3%, 重结晶后纯度为76.0%。

**关键词:** 甘草酸; 大孔树脂; 高效液相色谱; 紫外分光光度法

## Purification of Glycyrrhizic Acid from Glycyrrhiza Using Macroporous Resin

SUN Xiao-tao, LI Nai, WANG Chang-tao\*

(Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** The purification of glycyrrhizic acid from glycyrrhiza using macroporous resin was study. Static absorption and desorption experiments were carried out to screen the optimal resin from macroporous resins DA201-C and AB-8. AB-8 was found to have better performance than DA201-C. In static adsorption and desorption experiments, the optimal purification conditions of glycyrrhizic acid by resin AB-8 were sample pH 6.0, 5.89 mg/mL sample concentration, and 50% ethanol as the desorption solvent. In addition, the purity of purified glycyrrhizic acid was determined by HPLC to be 52.3%, and was increased to 76.0% after recrystallization.

**Key words:** glycyrrhizic acid; macroporous resin; high performance liquid chromatography (HPLC); ultraviolet spectrophotometry

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)06-0093-05

甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)别名甜草根、红甘草、国老、甜草、甜根子等, 为豆科(Leguminosae)甘草属(*Glycyrrhiza* Linn)多年生草本植物<sup>[1]</sup>。甘草的主要成分为甘草酸或甘草甜酸及甘草次酸等三萜类化合物、甘草黄酮类化合物以及甘草多糖等<sup>[2-4]</sup>。其中, 有效成分甘草酸在保湿软化皮肤、防治色素沉积、止咳平喘、抗肿瘤等方面具有显著功效, 被广泛应用于医药、食品、化妆品等行业中<sup>[5-6]</sup>。甘草酸废渣是工业中从甘草中提取甘草酸后剩余的药渣。

对于甘草酸的精制方法, 主要有超滤法、溶剂法(结晶法)、树脂法、聚酰胺法等, 工业生产中主要应用溶剂法, 但树脂法中的大孔树脂吸附法精制效果好<sup>[7]</sup>, 其纯化原理是借助大孔树脂与物质的范德华力或氢键的作用达到吸附的目的, 由树脂本身的孔型结构决定筛选种类最终达到分离纯化的目的<sup>[8]</sup>。

应用大孔树脂对甘草酸纯化工艺研究已有报道<sup>[8-11]</sup>,

纯度检测方法均为紫外分光光度法, 专一性比较差; 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)具有高速、高效、高灵敏度的特点<sup>[11-15]</sup>, 本实验选用2种商品化的大孔树脂对甘草酸的纯化进行比较研究, 并借助HPLC方法评价AB-8型大孔树脂的纯化工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

甘草酸废渣 新疆中药民族研究所。

DA201-C型大孔树脂 江苏省江阴市有机化工厂;

AB-8型大孔树脂 上海华羚树脂有限公司; 甘草酸单铵盐标准品(95%) 美国Sigma公司。

无水乙醇 分析纯; 乙腈、乙酸、甲醇(以上均为色谱纯) 美国Fisher公司。

收稿日期: 2011-11-16

基金项目: 北京市科技新星项目(2008B08); 北京市属高等学校“中青年骨干人才培养计划”项目(PHR20110873)

作者简介: 孙啸涛(1985—), 男, 实验师, 硕士, 研究方向为药物化学。E-mail: sunxiaotao@th.btbu.edu.cn

\*通信作者: 王昌涛(1975—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物技术。E-mail: wangct@th.btbu.edu.cn

## 1.2 仪器与设备

JXD-02型超声波电源(28、40、50、135kHz) 北京金星超声波设备技术有限公司; DSHZ-300型水浴恒温振荡器 江苏太仓市实验设备厂; T6新世纪紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; ALPHA2-4/LSC型冷冻干燥机 德国Christ公司; DHL-A电脑恒流泵、DBS-100电脑全自动部分收集器 上海沪西仪器有限公司; 525高效液相色谱仪(配2707自动进样器、2489紫外检测器) 美国Waters 科技有限公司; RE-52CS/5299旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

## 1.3 方法

### 1.3.1 树脂的活化及预处理

将AB-8和DA201-C型大孔树脂用95%乙醇溶液浸泡24h, 使其充分溶胀, 用蒸馏水反复冲洗至水无白色浑浊为止, 再用4BV的盐酸溶液(1+20)以3BV/h的流速通过树脂层, 浸泡3h, 蒸馏水以同样流速洗至溶液呈中性; 最后用4BV的5g/100mL氢氧化钠溶液以3BV/h的流速通过树脂层, 浸泡3h, 蒸馏水以同样流速洗至溶液呈中性。

### 1.3.2 树脂的物理参数

选择型号为DA201-C、AB-8两种大孔树脂进行静态吸附实验, 2种大孔树脂的物理参数见表1。

表1 2种大孔树脂的型号及物理参数  
Table 1 Physical properties of 2 kinds of macroporous resins

编号	树脂型号	外观特征	极性	比表面积/(m <sup>2</sup> /g)	平均孔径/Å
1	DA201-C	棕色球状	非极性	1000~1300	40
2	AB-8	白色球状	弱极性	480~520	130~140

### 1.3.3 供试品试液的制备

将已干燥的甘草酸废渣粉碎过60目筛, 取适量溶于无水乙醇(固液比为1:10), 超声提取20min, 过滤, 合并滤液, 5000r/min离心10min, 旋转蒸发(50℃, 50r/min)约1/2乙醇, 得到甘草废渣原液。

### 1.3.4 紫外分光光度法对甘草酸质量浓度的测定

精密称取在105℃干燥至质量恒定的甘草酸铵标准品适量, 用95%乙醇溶液溶解, 摇匀, 定容使之成为质量浓度为1mg/mL的甘草酸标准品溶液, 作为贮备液备用。

精密量取上述溶液0.2、0.3、0.4、0.5、0.6mL, 用95%乙醇溶液定容至10mL, 用紫外分光光度计在254nm波长处测吸光度。以标准品质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标做标准曲线, 得甘草酸质量浓度-吸光度方程:  $y = 11.39x + 0.0704$ , 相关系数 $r = 0.9895$ 。

### 1.3.5 高效液相色谱法对甘草酸纯度的测定<sup>[16-17]</sup>

色谱检测条件: Waters Symmetry RP-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6mm×150mm, 5μm); 流动相为甲醇-水(含3%乙酸), 流速1mL/min, 进样体积15μL, 梯度洗脱(梯度如表2所示)。运行时间: 30min; 柱温: 25℃; 双波长检测,

检测波长: 254nm(测定甘草酸)、280nm(测定甘草苷、甘草素或芹糖甘草甙)。

表2 洗脱程序  
Table 2 Elution program

时间/min	流动相体积配比/%	
	乙腈	水(3%乙酸)
0	20	80
4	20	80
19	55	45
25	80	20
27	20	80
30	20	80

### 1.3.6 静态吸附实验筛选树脂

将经预处理的2种大孔树脂各称取3.00g, 置于150mL具塞锥形瓶中, 加入质量浓度为1.0mg/mL的甘草酸废渣浸提液70mL, 中速振荡, 分别在1、2、3、4、5h吸取上层溶液测定其甘草酸质量浓度, 计算两种型号树脂的吸附容量并绘制静态吸附曲线。

吸附容量的计算公式:

$$q = \frac{(C_0 - C_1)V}{W}$$

式中:  $q$ 为吸附容量/(mg/g);  $C_0$ 为吸附前样液中甘草酸质量浓度/(mg/mL);  $C_1$ 为吸附后样液中的甘草酸质量浓度/(mg/mL);  $V$ 为溶液体积/mL,  $W$ 为树脂干质量/g。

解吸率的测定: 将上述静态吸附饱和后的树脂过滤, 用蒸馏水洗涤, 直到流出液体无色后, 再用50%的乙醇溶液解吸, 过滤, 分别在15、30、45、60、90、120、180、240min测定滤液的质量浓度, 计算各树脂的静态解吸率。

解吸率的计算公式:

$$D/\% = \frac{C_d \times V_d}{q \times m} \times 100$$

式中:  $D$ 为解吸率/%;  $C_d$ 为解吸液中的总黄酮质量浓度/(mg/mL);  $V_d$ 为解吸液体积/mL;  $q$ 为吸附容量/(mg/g);  $m$ 为树脂质量/g。

### 1.3.7 静态吸附实验选择最优pH值

取经过预处理的AB-8型大孔树脂, 分别称取树脂3.00g, 置于100mL具塞锥形瓶中, 加入质量浓度为3.5mg/mL的甘草酸废渣浸提液50mL, pH值分别调为4、5、6、7、8, 中速振荡4h后, 依1.3.6节方法计算饱和和吸附容量。

将上述静态吸附饱和后的树脂过滤, 用蒸馏水洗涤, 直到流出液体无色后, 再用50mL 50%乙醇溶液解吸, 过滤, 在2h时测定滤液的质量浓度, 依1.3.6节方法计算解吸率。

### 1.3.8 静态吸附实验选择最优上样液质量浓度

取经过预处理AB-8型大孔树脂, 分别称取树脂3份,

每份3.00g, 置于150mL具塞锥形瓶中, 分别加入质量浓度为8.79、5.89、3.73mg/mL的甘草废渣浸提液70mL(直接提取的甘草废渣原液质量浓度为17.58mg/mL), 调节试液pH 6.0, 中速振荡4h, 吸取上层溶液测定甘草酸质量浓度, 计算吸附率。

### 1.3.9 静态吸附实验选择最优洗脱剂质量浓度

取经过预处理AB-8型大孔树脂, 分别称取树脂5份, 每份5.00g, 置于150mL具塞锥形瓶中, 加入质量浓度为1.0mg/mL的甘草废渣浸提液70mL, 调节试液pH 6.0, 中速振荡4h, 吸取上层溶液测定其甘草酸质量浓度。

将上述静态吸附饱和后的树脂过滤, 用蒸馏水洗涤, 直到流出液体无色后, 分别用40%、50%、60%、70%的乙醇溶液洗脱, 在2h时测定滤液的质量浓度, 计算各种洗脱剂量下的静态解吸率。

### 1.3.10 大孔树脂吸附纯化甘草废渣

在已经确定的最佳吸附洗脱条件下, 取质量浓度为5.89mg/mL甘草废渣溶液15mL, 在pH6.0条件下, 上柱吸附完全, 用4BV蒸馏水洗柱后, 再用体积分数50%的乙醇溶液洗脱, 控制流速为1mL/min, 每10mL收集一管洗脱液, 在紫外分光光度计下测量甘草酸质量浓度, 计算大孔树脂的解吸率。

### 1.3.11 甘草废渣的精制

物质在溶剂中的溶解度与温度有密切关系。利用溶剂对被提纯物质及杂质的溶解度不同, 可以通过控制温度使杂质从热的溶剂中析出而被提纯物依然溶解在溶剂中, 从而达到提纯目的。经大孔树脂纯化后再经重结晶处理, 被提纯物纯度能够显著得到提高。

将解吸液用旋转蒸发仪浓缩近无水, 冷冻干燥机干燥24h, 得到淡黄色粉末, 依照1.3.5节方法测定甘草酸纯度; 粉末用75%乙醇溶液溶解(固液比为5:1), 加入活性炭(活性炭:甘草酸粉末=1:5), 回流加热30min, 趁热过滤, 将滤液冷却后, 置于5℃冰箱48h, 重结晶, 过滤, 滤渣真空干燥5h, 依照1.3.5节方法测定甘草酸纯度。

## 2 结果与分析

### 2.1 大孔树脂的静态动力学曲线

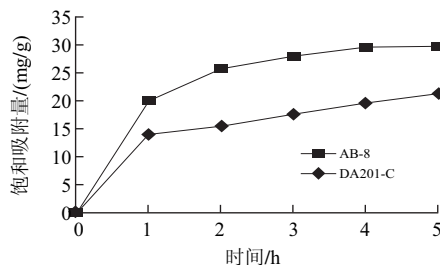


图1 2种大孔树脂的静态吸附饱和曲线

Fig.1 Static adsorption curves of 2 kinds of macroporous resins

树脂的静态动力学特性与吸附操作的生产率密切相关。2种大孔树脂的静态吸附饱和曲线(图1)可以看到, 2种大孔树脂对甘草酸的吸附都为快速平衡型, 在4h内基本达到平衡, 但从总体上来看, AB-8型大孔树脂的吸附容量优于DA-201C树脂, 饱和吸附量为29.49mg/g, 这可能是因其极性与甘草酸相近。

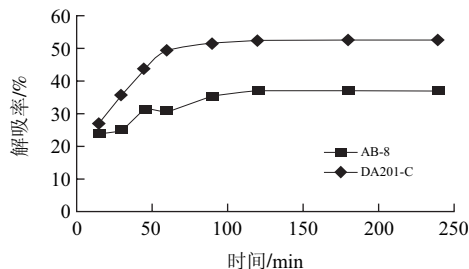


图2 2种大孔树脂的静态解吸曲线

Fig.2 Static desorption curves of 2 kinds of macroporous resins

2种大孔树脂的静态解吸曲线(图2)可以看到, 2种大孔树脂在100min左右即达到最高解吸率, 但AB-8型大孔树脂解吸率明显优于DA-201C树脂, 解吸基本完全时间为2h, 120min时静态解吸率达到52.29%。

AB-8型大孔树脂对甘草酸具有良好的静态吸附动力学特性和较高的解吸率, 所以2种大孔树脂中, AB-8型大孔树脂更适合吸附分离甘草酸。

### 2.2 上样液质量浓度的选择

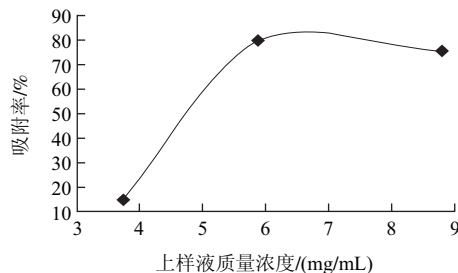


图3 上样液质量浓度对吸附率的影响

Fig.3 Effect of sample concentration on adsorption rate

由图3可以看出, 随着上样液质量浓度的增加, 甘草酸吸附率也增加, 当上样液质量浓度为5.89mg/mL时树脂吸附率最大, 为79.72%。但质量浓度过大, 会堵塞树脂, 影响吸附。所以确定5.89mg/mL为最合适质量浓度。

### 2.3 上样液pH值的选择

由图4可以看出, 在pH值较低的情况下, 大孔树脂对甘草酸的吸附容量较低; 随着pH值的升高, 树脂的吸附容量逐渐增加, 当pH值为6.0时, 吸附容量最大; 而随着pH值的进一步增大, 树脂的吸附容量反而下降。原因可能是甘草酸化合物具有羧基结构, 呈现一定的酸性, 所以在弱酸性条件下容易被吸附。

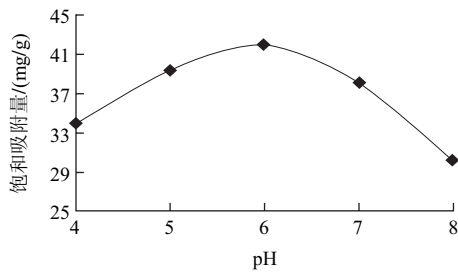


图4 上样液pH值对AB-8型大孔树脂吸附容量的影响  
Fig.4 Effect of pH on adsorption capacity of AB-8 resin

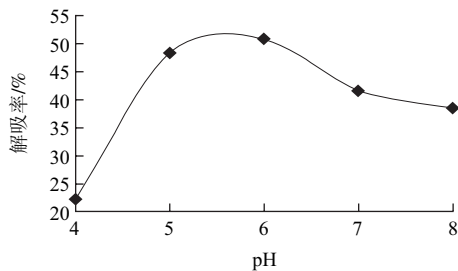


图5 上样液pH值对AB-8型大孔树脂解吸率的影响  
Fig.5 Effect of pH on adsorption rate of AB-8 resin

由图5可以看出, 上样液pH值对AB-8型大孔树脂解吸率的影响与对吸附容量的影响呈现出相近的结果。因此, pH值的最优条件为6。

#### 2.4 乙醇体积分数对解吸率的影响

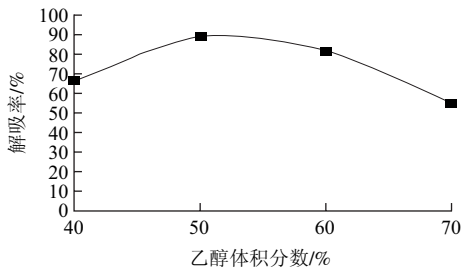


图6 乙醇体积分数对AB-8型大孔树脂解吸率的影响  
Fig.6 Effect of ethanol concentration on desorption ratio of AB-8 resin

由图6可知, 随着乙醇体积分数的增加, 甘草酸的解吸率也逐渐增加; 当乙醇体积分数达50%时, 解吸率达到最大, 为88.6%; 而当乙醇体积分数大于50%时, 解吸率反而呈下降趋势。因此, AB-8型大孔树脂宜用50%的乙醇溶液解吸甘草酸。

#### 2.5 大孔树脂对甘草酸废渣的解吸曲线

在已经确定的最佳吸附洗脱条件下, 取甘草酸废渣溶液上柱、吸附、洗脱, 每10mL收集一管, 共收集25管, 测每管中洗脱液甘草酸的解吸率, 绘制洗脱曲线见图7。

由图7可以看出, 开始洗脱时, 洗脱液中甘草酸解吸

率随着洗脱体积的增加而提高, 当洗脱到第8管, 即洗脱体积达到1.6BV时, 洗脱液中甘草酸解吸率达到最大值为86.37%, 4BV时50%乙醇溶液可将大部分吸附在树脂上的甘草酸洗脱下来, 因此, 用4倍柱体积50%乙醇溶液洗脱。

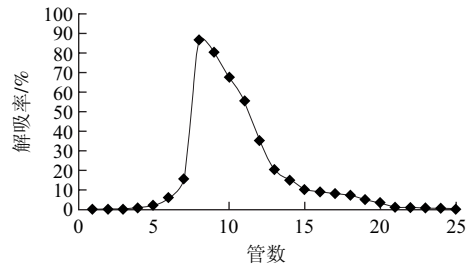
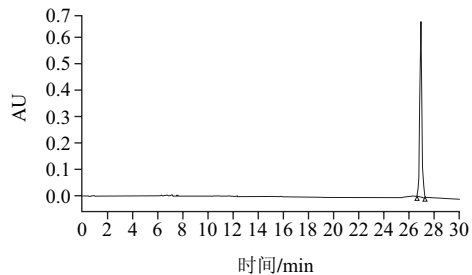


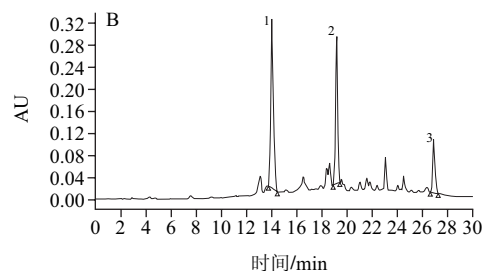
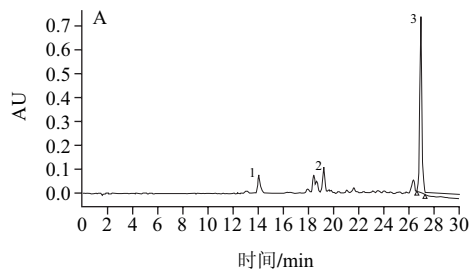
图7 解吸曲线  
Fig.7 Dynamic desorption curve

#### 2.6 经大孔树脂纯化和重结晶对甘草酸纯度的影响



$t_R=26.9\text{min}$ 为甘草酸; 波长254nm。

图8 甘草酸铵标准品色谱图  
Fig.8 Chromatogram of glycyrrhizic acid ammonium salt standard  
( $t_R = 26.9 \text{ min}$  means glycyrrhizic acid)



$t_R=14.1\text{min}$ 和 $t_R=19.2\text{min}$ 可能为甘草苷、甘草素(或芹糖甘草甙);  $t_R=26.9\text{min}$ 为甘草酸; A. 波长254nm; B. 波长280nm。

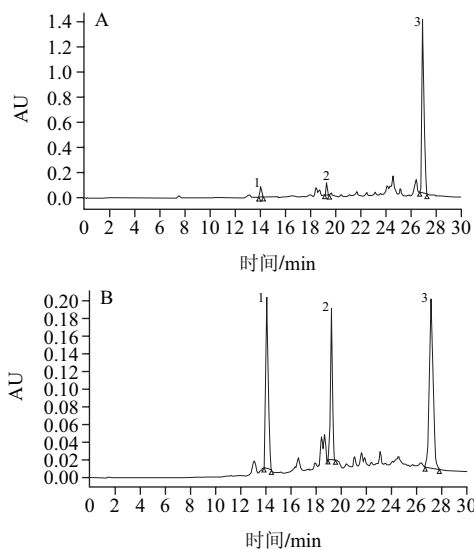
图9 经AB-8大孔树脂纯化后甘草酸色谱图  
Fig.9 Chromatogram of glycyrrhizic acid purified by AB-8 resin



甘草酸铵标准品经甲醇溶解,依1.3.5节方法进行HPLC分析,如图8所示,保留时间26.9min的为甘草酸,纯度大于98%。

将经大孔树脂纯化后的样品收集,依1.3.5节方法进行HPLC分析,结果如图9所示,编号为1、2和3色谱峰的保留时间分别为14.1、19.2min和26.9min,色谱峰1和2依文献报道可能为甘草苷、甘草素或芹糖甘草甙<sup>[16]</sup>,其紫外最大吸收波长为280nm;色谱峰3的保留时间与甘草酸铵标准品的色谱峰相符,确证为甘草酸,其紫外最大吸收波长为254nm。通过面积归一化方法,计算得到经大孔树脂纯化后甘草酸纯度为52.3%。

将经1.3.11节重结晶方法处理过的甘草酸依1.3.5节方法进行HPLC分析,结果如图10所示,通过面积归一化方法,计算得到经重结晶纯化后甘草酸纯度为76.0%,纯度显著提高。



$t_R=14.1\text{min}$ 和 $t_R=19.2\text{min}$ 可能为甘草苷、甘草素(或芹糖甘草甙);  $t_R=26.9\text{min}$ 为甘草酸。A.波长254nm; B.波长280nm。

图10 经重结晶后甘草酸色谱图

Fig.10 Chromatogram of glycyrrhizic acid after recrystallization

### 3 结论

通过对DA201-C和AB-8两种型号大孔树脂静态吸附和解吸的比较,发现AB-8型大孔树脂对甘草酸的吸附量大、吸附率高、易解吸,具有较高的吸附性能和解吸率,适用于甘草酸的纯化研究。AB-8型大孔树脂纯化甘草酸的最佳工艺条件为上样液pH6.0、上样液质量浓度

5.89mg/mL、洗脱液50%乙醇溶液。此外,采用高效、高速HPLC-UV方法检测甘草酸纯度,克服了紫外分光光度法专一性较差的缺点,结果显示:经AB-8型大孔树脂纯化后甘草酸纯度为52.3%,重结晶后纯度为76.0%。

### 参考文献:

- [1] 苏俊喜,周颖,闫文军,等.甘草有效成分应用的研究进展[J].畜牧与饲料科学,2010,31(8):111-113.
- [2] 王海峰,邱芳萍.甘草中甘草酸的提取工艺研究[J].长春工业大学学报:自然科学版,2010,31(1):66-69.
- [3] 张继,姚健,丁兰,等.甘草的利用研究进展[J].草原与草坪,2000,89(2):12-17.
- [4] 王亚红,李战英.甘草酸的提取和精制法研究现状[J].天津化工,2003,17(6):34-36.
- [5] 赵雅欣,高文远,张连学,等.甘草在化妆品中的应用[J].香料香精化妆品,2010,8(4):45-48.
- [6] WU Yueting, SHEN Chong, YIN Jian, et al. Azathioprine hepatotoxicity and the protective effect of liquorice and glycyrrhizic acid[J]. Phytotherapy Research, 2006, 20(8): 640-645.
- [7] 余金明,刘有势,谢显珍,等.甘草酸提取与精制工艺优化[J].湖南理工学院学报,2010,23(3):55-59.
- [8] 来庚,张军良,杨来顺,等.大孔树脂法精制甘草酸[J].应用化工,2006,35(4):316-318.
- [9] 袁怀波,叶明,刘文宏.甘草总三萜酸的大孔树脂分离纯化[J].食品工业科技,2008,29(2):212-214.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] HENNEL J R, LEE S, KHOO C S, GRAY M J, et al. The determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC. (Zhi Gan Cao) root and the dried aqueous extract by LC-DAD[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 47(3): 494-500.
- [13] RISNER C H. Evaluation of HPLC mobile phases and extracts for the determination of glycyrrhizic acid in licorice and tobacco[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008, 31(9): 1337-1345.
- [14] TIAN M, YAN H, ROW K. Extraction of glycyrrhizic acid and glabridin from licorice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(4): 571-577.
- [15] HASHEMI P, BEYRANVAND S, MANSUR R S, et al. Development of a simple device for dispersive liquid-liquid microextraction with lighter than water organic solvents: Isolation and enrichment of glycyrrhizic acid from licorice[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 655(1/2): 60-65.
- [16] SEO C, LEE J A, JUNG D, et al. Simultaneous determination of liquiritin, hesperidin, and glycyrrhizin by HPLC-photodiode array detection and the anti-inflammatory effect of Pyungwi-san[J]. Archives of Pharmacal Research, 2011, 34(2): 203-210.
- [17] SHEN Shufeng, CHANG Zhidong, LIU Ji, et al. Simultaneous determination of glycyrrhizic acid and liquiritin in glycyrrhiza uralensis extract by HPLC with ELSD detection[J]. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2006, 29(16): 2387-2397.
- [18] TIAN M, BI W, ROW K H. Solid-phase extraction of liquiritin and glycyrrhizic acid from licorice using ionic liquid-based silica sorbent[J]. Journal of Separation Science, 2009, 32(23/24): 4033-4039.