

正交试验优化桂枝总有机酸乙醇回流提取工艺

叶炳炳, 石森林* (浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 考察得到较优的桂枝总有机酸乙醇回流提取工艺。方法 用正交设计试验, 以总有机酸提取率为指标, 考察乙醇浓度、料液比、提取次数 3 个因素对提取结果的影响。结果 较优的提取工艺为乙醇浓度 90%, 料液比 1:8, 提取次数 3 次。结论 该工艺所得桂枝总有机酸提取率较高, 工艺稳定、重复性好, 适用于桂枝总有机酸的提取。

关键词: 桂枝; 正交试验; 总有机酸

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)04-0428-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.04.010

Optimization of the Extracting Process of Total Organic Acid from Cassia Twig by Orthogonal Experiment with Ethanol Reflux

YE Bingbing, SHI Senlin* (Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the optimum extraction technology of total organic acids in Cassia Twig. **METHODS** Using total organic acid extraction rate as index to investigate the effect of the extraction results by ethanol concentration, dosage of ethanol, extraction times with orthogonal design test. **RESULTS** Optimum extraction process were as follows: ethanol concentration of 90%, 8 times solvent dosage, extraction for 3 times. **CONCLUSION** The process proceeds higher extraction yield, stability, repeatability is good, suitable for the extraction of total organic acids.

KEY WORDS: Cassia Twig; orthogonal test; total organic acid

桂枝为樟科植物肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl)的干燥嫩枝, 具有发汗解肌、温通经脉、助阳化气、平冲降气之功效。桂枝中主要含有甾醇类、黄酮类、三萜皂苷、挥发油、胺类、有机酸等成分, 其中桂皮醛和肉桂酸的药理研究表明: 肉桂酸具有抗菌、消炎作用; 桂皮醛具有镇静、镇痛和解热作用。近年来, 针对其所含甾醇类、皂苷类、黄酮类等成分研究较多, 但有机酸类成分作为其重要组成部分, 还未见关于有机酸类成分提取工艺的研究报道, 故本研究以桂枝为原料, 对其总有机酸类成分进行系统研究, 为深入了解桂枝这一药用植物资源奠定基础。

1 仪器与试剂

UV-Vis2450 型紫外分光光度计(日本岛津); JA2003N 电子天平(上海精密仪器有限公司); XS105 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KH-250DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); DFY-500 高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司); DK-S26 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); DGG-9053A 电热恒温鼓

风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司); Millipore Synergy 超纯水系统(美国密理博公司)。

肉桂酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110786-200503, 含量: 100%)。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯。桂枝药材(浙江中医药大学中药饮片有限公司, 批号: 150201)经浙江中医药大学中药资源与鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为樟科植物肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl)的干燥嫩枝。

2 方法与结果

2.1 桂枝总有机酸的含量测定方法学的建立

2.1.1 对照品溶液的配制 称取肉桂酸对照品约 16.05 mg, 精密称定, 用甲醇定容于 100 mL 量瓶, 备用^[1]。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 60 目)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理(功率 125 W, 频率 40 kHz)45 min, 放冷再称定重量, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得供

作者简介: 叶炳炳, 男, 硕士生 Tel: 15869151091
E-mail: love3336971@126.com
博导 Tel: (0571)86613756 E-mail: pjstone@163.com

E-mail: love3336971@126.com

*通信作者: 石森林, 男, 博士, 教授,

试品溶液。

2.1.3 检测波长的选择 分别吸取适量对照品溶液和供试品溶液于紫外分光光度计上,在 200~700 nm 波长进行光谱扫描,结果见图 1,结果显示供试品溶液与对照品溶液均在 268 nm 波长处有最大吸收,故确定检测波长为 268 nm^[1-2]。

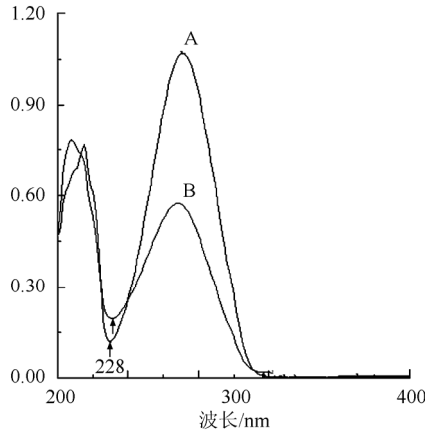


图 1 对照品溶液和供试品溶液波长扫描图

A-供试品溶液; B-对照品溶液。

Fig. 1 The wavelength scanning figure of reference substance solution and the solution of the test

A-sample solution; B-control solution.

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mL 于 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度线, 混匀, 在 268 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(Y), 肉桂酸浓度 $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标(X), 绘制标准曲线, 计算回归方程为 $Y=0.1350X+0.0092$, $r=0.9988$, 在 $1\sim7\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肉桂酸呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 按“2.1.2”项下方法处理得到同一样品, 连测 6 次, 计算得吸光度的 RSD 分别为 0.982%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 按“2.1.2”项下方法处理得到的同一样品, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 检测 1 次, 共检测 7 次, 记录吸光度, 并计算其吸光度的 RSD 为 0.23%, 表明该样品稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取 6 份生桂枝药材粉末(过 60 目), 每份 0.5 g, 按“2.1.2”项下方法处理, 分别测定, 记录吸光度, 计算得吸光度的 RSD=1.73%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 称取 6 份约 0.2 g 生桂枝粉末, 每份加约 3.75 mg 肉桂酸对照品, 按“2.1.2”项下方法处理, 定容至 25 mL, 结果见表 1, 结果表明, 该方法对有效成分的影响符合要求。

表 1 加样回收率试验(n=6)

Tab. 1 The test of sample recovery rate(n=6)

样品含量/ μg	标准品加 入量/ μg	测定含 量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
3 959.20	3 870.00	7 755.56	98.61		
3 959.20	3 770.00	7 811.11	102.17		
3 959.20	3 730.00	7 792.59	102.77	100.80	1.99
3 959.20	3 770.00	7 718.52	99.72		
3 959.20	3 730.00	7 681.48	98.73		
3 959.20	3 770.00	7 718.52	102.77		

2.2 单因素试验

2.2.1 粉碎度的选择^[3-4] 称取不同粉碎度的蜜桂枝药材粉末 50 g, 各 3 份, 采用 70%乙醇浸泡 1 h, 提取 1.5 h, 过滤去除药渣, 提取液用提取溶剂补足至 500 mL。取 0.1 mL 蒸干, 用甲醇复溶至 25 mL, 测吸光度, 20, 40, 60 目提取率分别为 $(32.7\pm 5.12)\%$, $(55.4\pm 3.23)\%$, $(50.3\pm 5.68)\%$, 结果表明粉碎度在 40 目时提取率最高, 因此选择药材粉碎度为 40 目。

2.2.2 提取溶剂的 pH 的选择 称取过筛(40 目)蜜桂枝药材粉末约 50 g, 各 3 份, 加入 10 倍量 70%乙醇浸泡 1 h, 用氨水调 pH 分别约为 7, 8, 9, 10, 90 °C 提取 1.5 h, 过滤, 放冷, 补足至 500 mL, 取 0.1 mL 用甲醇复溶至 25 mL, 测定吸光度, pH 分别约为 7.01, 8.04, 9.07, 10.02 时提取率分别为 $(46.25\pm 5.08)\%$, $(45.86\pm 1.79)\%$, $(48.83\pm 0.34)\%$, $(42.45\pm 1.37)\%$, 结果表明提取溶剂的 pH 为 9.07 时提取率最高, 因此选择 pH 为 9.07。

2.2.3 料液比的选择 称取过筛(40 目)蜜桂枝药材粉末约 50 g, 各 3 份, 分别按料液比 1:8、1:10、1:12 加入 70%乙醇, 浸泡 1 h, 90 °C 提取 1.5 h, 过滤, 放冷, 补足至 500 mL, 取 0.1 mL 复溶至 25 mL, 测定吸光度, 料液比 1:8、1:10、1:12 提取率分别为 $(44.73\pm 2.35)\%$, $(46.25\pm 5.08)\%$, $(48.10\pm 3.91)\%$, 从结果可知, 随料液比的增加, 总有机酸的提取率逐步提高, 考虑成本及实际工业生产等问题, 选择料液比 1:10 进行提取。

2.2.4 提取溶剂的选择 称取过筛(40 目)蜜桂枝药材粉末约 50 g, 各 3 份, 分别加入 50%, 70%, 90%乙醇调 pH 为 9 浸泡 1 h, 90 °C 提取 1.5 h, 过滤, 放冷, 补足至 500 mL, 取 0.1 mL 复溶至 25 mL, 测定吸光度, 提取率分别为 $(21.42\pm 4.06)\%$, $(46.25\pm 5.08)\%$, $(54.53\pm 2.66)\%$ 。结果表明乙醇

浓度为 90% 时提取率最高, 因此选择 90% 乙醇进行提取^[5]。

2.2.5 提取时间的选择 称取过筛(40 目)蜜桂枝药材粉末约 50 g, 各 3 份, 加入 90% 乙醇调 pH 为 9 浸泡 1 h, 90 °C 分别提取 0.5, 1, 1.5, 2 h, 过滤, 放冷, 补足至 500 mL, 取 0.1 mL 复溶至 25 mL, 测定吸光度, 提取率分别为 (22.24±4.16)%, (52.3±0.70)%, (46.25±5.08)%, (51.82±0.50)%, 结果表明, 提取时间为 1 h 时提取率最高。

2.3 正交试验^[6-7]

根据单因素试验, 选取乙醇浓度(A)、料液比(B)和提取次数(C)3 个对提取效果有影响的主要因素, 每个因素选取 3 个水平, 进行 L₉(3⁴)正交试验确定最佳工艺条件, 因素的各水平见表 2, 正交试验结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 2 正交试验因素水平表

Tab. 2 The factor-level of the orthogonal experiment

水平	因素		
	乙醇浓度/%	料液比	提取次数/次
	A	B	C
1	70	1:8	1
2	80	1:10	2
3	90	1:12	3

表 3 L₉(3⁴)正交试验结果

Tab. 3 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验	乙醇浓度/%	料液比	提取次数/次	空白	提取率/%
1	70	1:8	1	1	54.26
2	70	1:8	2	2	57.23
3	70	1:8	3	3	60.21
4	80	1:10	2	3	62.04
5	80	1:10	3	1	65.20
6	80	1:10	1	2	59.98
7	90	1:12	3	2	69.35
8	90	1:12	1	3	61.67
9	90	1:12	2	1	66.27
K ₁	57.233	61.883	58.637	61.910	
K ₂	62.407	61.367	61.847	62.187	
K ₃	65.763	62.153	64.920	61.307	
R	8.53	0.27	6.283	0.88	

表 4 方差分析表

Tab. 4 The results of variance analysis

因素	离差平方和	自由度	F 值	F 临界值	P 值
总和	170.98	8			
乙醇浓度	110.791	2	91.190	19.00	<0.05
料液比	0.959	2	0.789	19.00	
提取次数	59.230	2	48.751	19.00	<0.05
误差	1.215	2			

注: F(0.05)(2,2)=19.

Note: F(0.05)(2,2)=19.

由上表极差及方差分析可以得出, 影响桂枝中总有机酸类化合物提取率条件的主次顺序为 A>C>B, 即乙醇浓度>提取次数>料液比。而料液比的影响较小且没有显著性, 考虑到经济因素, 因此提取桂枝总有机酸的最优提取工艺条件为 A₃B₁C₃, 即乙醇浓度 90%, 料液比 1:8, 提取次数 3 次。

2.4 工艺验证

按试验结果得到的最优工艺进行验证试验^[7], 称取桂枝粉末 50 g, 按最优工艺组合条件进行试验, 测其吸光度, 并计算出粗提取量、总有机酸量、粗提物得率、总有机酸得率、转移率、纯度, 结果见表 5。

表 5 验证试验结果(n=3)

Tab. 5 Results of verification test(n=3)

批次	药材/g	粗提物量/g	总有机酸量/g	粗提物得率/%	总有机酸得率/%	转移率/%	纯度/%
1	50	9.53	0.723	19.06	1.44	69.93	8.03
2	50	9.29	0.731	18.58	1.49	70.70	9.14
3	50	9.35	0.708	18.70	1.41	68.39	9.30

3 分析与讨论

有机酸是指一些具有酸性的有机化合物。本实验在前期尝试了碱性溶液温浸法与超声提取法, 发现与乙醇回流提取法提取桂枝总有机酸提取率相比, 远远低于后者, 相差约 20%。本实验比较了水和 90% 乙醇作为提取溶剂, 发现用水作为提取溶剂提取率只有 20% 左右, 远低于后者。

该实验在对回流提取中影响桂枝总有机酸的提取率的药材的粉碎度、提取溶剂的 pH、提取溶剂、料液比、提取时间等 5 因素进行单因素试验的基础上, 利用三因素三水平正交试验设计, 以桂枝总有机酸提取率为评价指标对桂枝总有机酸提取工艺进行了优化研究, 通过对试验数据的分析, 探讨了各因素对桂枝总有机酸提取率的影响规律, 获得了提取桂枝总有机酸的工艺条件, 在单因素试验中经考察料液比为 1:12 和乙醇浓度为 90% 提取率最高, 但料液比对其影响很小, 考虑到经济因素, 在正交试验中依旧考察料液比相同的水平, 以研究其与其他因素交互的影响, 而乙醇浓度 90% 已经达到较高的浓度, 快接近临界 100%, 所以按表 2 设计的因素和水平进行试验。

REFERENCES

- [1] NIU J G, LIANG X J, LIU X, et al. Spectrophotometric determination of carboxylic acids in aqueous solutions [J]. *Chin J Appl Chem(应用化学)*, 2010, 27(3): 342-346.
- [2] MA L, WEI Y P, LIU X M. Determination of acetophenone and cinnamic acid in bioconversion broth by dual-wavelength ultraviolet spectrophotometry [J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2009, 30(6): 336-337, 359.
- [3] 何文江, 陈向东, 王文涛, 等. 肉桂提取工艺及其挥发油包合制备工艺的研究[J]. *中药材*, 2012, 35(9): 1511-1515.
- [4] LI N, JIN J H, JIANG H F, et al. Purification of total organic acids from *Chaenomeles speciosa* and study on their analgesic and anti-inflammatory effects [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2011, 17(1): 113-119.
- [5] 文皓, 周孟, 张贞发, 等. 肉桂精油提取工艺及检测方法的研究进展[J]. *科技信息*, 2013, 30(21): 49, 38.
- [6] CHEN Q, WANG S. The extraction and determination of total organic acids in *Centipeda minima* (L.) A. Br. et Aschers [J]. *Chin J Mod Drug Appl(中国现代药物应用)*, 2010, 4(18): 10-11.
- [7] WANG J X, CHEN L, CHEN F, et al. Optimum extracting procedure of fanggan granules by orthogonal design [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2015, 32(4): 428-432.

收稿日期: 2015-11-16

舒更葡糖钠的合成工艺

魏词¹, 王红²(1.湖北省妇幼保健院药剂科, 武汉 430070; 2.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

摘要: 目的 改进舒更葡糖钠的合成工艺。方法 以 γ -环糊精为原料, 先用关键中间体(2)经过选择性溴代, 然后再经成醚反应, 合成舒更葡糖钠。结果 目标化合物经 ¹H-NMR 和 HRMS 确证结构, 反应总收率>30%。结论 该合成路线成本低廉, 操作简便, 有良好的工业化生产前景。

关键词: 合成工艺; γ -环糊精; 舒更葡糖钠

中图分类号: R914.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)04-0431-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.04.011

Synthetic Process of Sugammadex Sodium

WEI Ci¹, WANG Hong²(1. Pharmacy of Maternal and Child Health Care Hospital of Hubei, Wuhan 430070, China; 2. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize synthetic process of sugammadex sodium. **METHODS** Sugammadex sodium was synthesized from γ -cyclodextrin through selective bromination using the key immediate **2** and subsequent thioetherification. **RESULTS** The goal product was structurally identified by ¹H-NMR and HRMS, and the total yield was >30.0%. **CONCLUSION** This process has the advantages of low-cost, simple operation and good prospects for commercial scale-up.

KEY WORDS: synthetic process; γ -cyclodextrin; sugammadex sodium

舒更葡糖钠(1)是由荷兰 Organon 公司研发的一种新型肌松药逆转剂, 在临床上作为逆转罗库溴铵或维库溴铵神经肌肉阻滞作用的常规药应用, 具有良好的疗效, 并有极好的安全性^[1]。它从 2008 年至今先后在欧洲、韩国、日本和中国获准上市。因此, 研究其合成工艺, 寻求收率高、易于工业化的合成路线具有重要意义。

在全面系统的文献调研基础上, 本实验以 *N,N'*-二环己基碳二酰亚胺(*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)为原料, 首先与草酰氯反应生成

卤代试剂 2, 2-二氯-1, 3-二环己基咪唑啉-4, 5-二酮(2,2-dichloro-1,3-dicyclohexylimidazolidin-4,5-dione, DCD, **2**), 然后联用四丁基溴化铵选择性溴代 γ -环糊精的伯醇羟基生成关键中间体 6-溴-6-脱氧- γ -环糊精(**3**), 最后与 3-巯基丙酸通过硫醚化反应得到目标物(1), 合成路线见图 1。

1 仪器与试剂

BRUKERAV-500 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司); SGW X-4 显微熔点仪(上海精密科学仪器有限公司); LCQ Advantage MAX 高效多级离子阱液

作者简介: 魏词, 女, 主管药师 Tel: (027)87640230 E-mail: weic120@sina.com