

460 °C, 对应的质变峰为 361.59 °C, 其开始分解的温度约为 275.20 °C, 当温度高于 455.92 °C 后, 失重率为 82.68%, 之后基本不再随温度的升高而变化; 而物理混合物谱图中有两个明显的失重区, 在温度为 132.4 °C 时丁香油先开始分解, 到 275.20 °C 同时伴随有 β -CDP 微球的分解, 此时质变率最大。但是到了 286.27 °C 时, 丁香油已基本分解完, 由于只剩下 β -CDP 微球在分解, 此时的质变率明显下降, 所以在谱图中呈现出一个拐点。继续升温到 286.27 °C 时质变率达到了最大, 到了 466.25 °C 时分解基本完成, 可见物理混合物基本是按两个阶段进行分解, 两种不同物质的分解温度进行的。而包含物的热分析图谱表明, 包含物开始分解的温度为 235.86 °C, 当温度高于 456.30 °C 后, 失重率为 86.21%, 之后基本不再随温度的升高而变化, 图中没有明显的熔融峰, 也没有拐点, 说明这已形成一种新的物相。但其失重速率最快时所对应的温度为 362.65 °C, 这与微球基本一致。 β -CDP 微球包含丁香油后, 热稳定性略微下降, 这可能与丁香油的挥发性有关。

3 讨论

本研究确定最佳工艺为丁香油 (mL)- β -CDP 微球 (g) 为 1:1, 包含温度为 35 °C, 包含时间为 1 h, 乙醇可忽略。此时收得率为 94.88%, 包封率为 93.98%, 比文献报道的 80.69%、83.78% 高^[18]。丁香油采用 β -CDP 微球包合进一步提高包含物收得率、包封率, 减少原辅料消耗、降低生产成本, 它在提高中药产品的质量和临床方面有重要意义。同时 β -CDP 微球包含丁香油为部分中药制剂的研究开发提供了一个新的方向。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上册. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] 彭宅彪, 张琼光, 代虹健, 等. 丁香酚的药理学研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 2079.
- [3] 彭晓霞, 李仲, 谈春霞, 等. 丁香挥发油 β -环糊精包含物的制备研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2001, 18(3): 10-13.
- [4] 韩光, 李景华, 郭国超, 等. 14-去氧穿心莲内酯 β -环糊精包含机制的研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 212-214.
- [5] Baile W E, Huang W Q, Nichifor M, et al. Functionalized β -cyclodextrin polymers for the sorption of bile salts [J]. *J Macromol Sci-Pure Appl Chem A*, 2000, 37(7): 677-690.
- [6] 夏春秀, 李宗. 丁香油 β -环糊精包含工艺的影响因素研究[J]. 海峡药学, 2006, 18(2): 21-23.
- [7] 任晓文, 王博, 李洪起, 等. β -环糊精包含阿德福韦的理论研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 173-176.
- [7] Szejtli J, Sebestyen G. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry [J]. *Chem Rev*, 1998, 98(5): 1743-1754.
- [8] Szenté L, Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 36: 17-28.
- [9] Duchene D. *Cyclodextrins and their Industrial Uses* [M]. Paris: Editions de Santé, 1987: 448.
- [10] 许海光, 张铁军, 赵平, 等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路[J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 30-35.
- [10] 胡晖, 刘郁杨, 范晓东, 等. 温度及 pH 敏感的 β 2 环糊精聚合物微球的合成及药物控制释放研究[J]. 高分子学报, 2005(3): 357-358.
- [11] 杜定准, 汪月生, 徐文英. ¹H NMR 研究 β -环糊精与环氧氯丙烷共聚物的反应机理和分子链结构[J]. 波谱学杂志, 1992, 9(2): 121-129.
- [12] 王晓明. 聚 β -环糊精缓释微球的制备、结构表征及其释药性能的研究[D]. 广州: 广东药学院, 2007.
- [13] 伍永富, 吴品江, 魏萍, 等. Box-Behnken 设计效应面法优化木犀草素 β -环糊精包含物的制备工艺研究[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1094-1099.
- [14] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [15] 方开泰. 均匀设计——数论方法在实验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363.
- [16] 徐天生, 刘莉, 梁燕, 等. β -环糊精包含丁香油的工艺研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(9): 162-164.
- [17] 赵阳, 张纯, 郭澄, 等. 丁香油 β -环糊精制备工艺的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(3): 19-21.
- [18] 任淑娟, 陈世虎. 丁香挥发油 β -环糊精包含物制备工艺研究[J]. 制剂技术, 2009, 18(17): 27-28.

茯苓全粉羧甲基化改性工艺研究

胡玉涛^{1,2}, 梅光明^{1,4}, 刘莹¹, 边银丙³, 黄文^{1*}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 2. 江苏联合职业技术学院 连云港中医药分院, 江苏 连云港 222006; 3. 华中农业大学应用真菌研究所, 湖北 武汉 430070; 4. 浙江海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100)

摘要: 目的 确定羧甲基化改性茯苓粉的工艺参数, 提高茯苓粉的水溶性和在中药生产中的应用范围。方法 以茯苓全粉为原料, 通过单因素试验研究羧甲基化改性获得最大产物取代度的条件, 并对改性产物的水溶性进行评价。结果 当反应介质为 85% 乙醇溶液, 反应温度 50 °C, 先碱化反应 2 h 后醚化反应 6 h, 碱酸用量摩尔比控制在 2.5:1~3:1 时, 反应产物达到最大取代度, 且改性粉水溶性有很大提高。结论 利用乙醇反应介质, 两次加

收稿日期: 2010-03-30

基金项目: 湖北省科技攻关计划项目 (2005AA401C50)

作者简介: 胡玉涛 (1976—), 男 (满族), 辽宁凤城人, 讲师, 长期从事药用植物的教学、科研工作。

Tel: (0518) 85854706 E-mail: tomhu915@sohu.com

* 通讯作者 黄文

碱法进行羧甲基化改性工艺生产改性茯苓粉是可行的,其水溶性得到改善。

关键词:茯苓;羧甲基化改性;工艺

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号:0253-2670(2010)12-1977-05

Carboxymethylated modification technology of *Poria cocos* powder

HU Yur-tao^{1,2}, MEI Guang-ming^{1,4}, LIU Ying¹, BIAN Yir-bing³, HUANG Wen¹

(1 College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; 2 Lianyungang

TCM Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang 222006, China; 3. Research Institute

of Applied Fungi, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; 4 Zhejiang

Institute of Maritime Fisheries, Zhoushan 316100, China)

Abstract: Objective To definite the technological parameter of carboxymethylation modified product of *Poria cocos*, improve the water-soluble ability of *Poria cocos* and to expand the processing applications of *P. cocos* in Chinese medicine industry. **Methods** Taking the *P. cocos* powder as raw materials, The single-factor experiment of carboxymethylated modification was carried out to gain the greatest degree of substitution. **Results** Reaction medium, 85% ethanol solution reaction temperature, 50 °C, 6 h of etherification after 2 h of and molar ratio of alkali/acid controlled in 2.5:1-3:1, and the water-soluble ability was improved. **Conclusion** Using ethanol as reaction medium and method of two steps of alkaline addition to obtain carboxymethylation modified product of *P. cocos*, the processing characteristics of modified product could be greatly improved and be used in processing applications.

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; carboxymethylated modification; technology

茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 是多孔菌科植物的干燥菌核,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎抑菌、镇静利尿、增强免疫等多种药效^[1]。茯苓多糖中含有 90% 以上的碱溶性茯苓多糖,是一种主链为 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 糖苷键、支链为 $\beta(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键连接的葡聚糖,不溶于水且基本上没有抗癌活性^[2],但茯苓多糖经羧甲基化改性后水溶性提高,生物活性增强。目前茯苓多糖羧甲基化改性是利用碱提取茯苓多糖后,先用 Smith 降解部分支链后得到茯苓次多糖,再采用异丙醇媒介法改性。该方法存在着工艺复杂、成本高的缺点,并且异丙醇的毒性也给产品安全带来隐患。为了降低生产成本和缩短工艺周期,提高改性产物安全性,本实验采用全粉进行改性,可以省去碱提多糖的步骤,进而扩大茯苓在制剂中的应用范围。

1 仪器与材料

FZ102 型微型植物试样粉碎机,黄骅市中兴有限责任公司; VISTA-MPX 型等离子体发射光谱仪,美国 Varian 公司; FTIR-Nexus670 型傅立叶红外光谱仪,美国 Nicolet 公司。茯苓由湖北惠涛九资河茯苓公司提供,无水乙醇、氢氧化钠、氯乙酸,均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 茯苓粉的制备:将茯苓块在 105 °C 条件下烘干,粉碎后过 100 目筛,备用。

2.2 羧甲基化茯苓粉取代度的测定:按照灰碱法测定^[3]。将已充分干燥后的改性产品连同瓷坩埚放进高温炉,(700±25) °C 灼烧 30 min,冷却后先用少量水润湿含有焦粒的灰白色粉末,然后洗移至烧杯中(总量不超 150 mL),加入甲基红指示剂 3 滴,用 0.05 mol/L H₂SO₄ 滴到显红色后,再从滴定管放入 10 mL,记下总用量(a),将溶液放在电炉上加热,使之微沸 10 min,不必冷却,即用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定至变黄色为止,记下用量(b),计算取代度(DS)。

$$DS = 0.162B / (1 - 0.08B), B = (aN_1 - bN_2) / W$$

a 为硫酸标准溶液用量(mL),b 为氢氧化钠标准溶液用量(mL),N₁ 为硫酸标准溶液浓度(0.05 mol/L),N₂ 为氢氧化钠标准溶液浓度(0.1 mol/L),W 为样品质量(g)

2.3 茯苓全粉羧甲基化改性工艺优化

2.3.1 乙醇体积分数对反应产物取代度的影响:在反应温度为 40 °C,先碱化 2 h 再醚化反应 4 h, n(葡萄糖基单元,AGU):n(NaOH):n(ClCH₂COOH) = 0.66:2:1 条件下进行反应,测定反应产物取代度,反应介质体积分数与反应产物取代度之间的关系见图 1。可以看出,随着乙醇体积分数的提高,产物取代度先是提高,后又开始下降,当体积分数为 85% 时,达到最高取代度。水合 Na⁺ 与茯苓多糖的葡萄糖基单元上的 ·OH 形成活性中心 [C₆H₇O₂

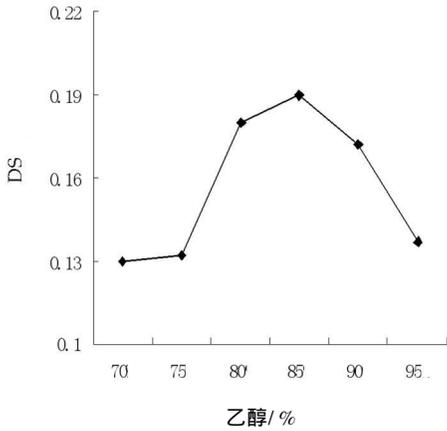


图 1 乙醇体积分数对产物取代度的影响

Fig 1 Influence of ethanol concentration on degree of substitution

$(OH)_2(O^- Na^+)_n$, 在醚化阶段, NaOH 与 $ClCH_2COOH$ 反应生成的 $ClCH_2COONa$ 进攻活性中心生成羧甲基化多糖。随着乙醇体积分数的增加, 体系中含水量逐渐减少, 使得 NaOH 浓度增加, 活性中心生成的数目越多, 产物取代度也随之提高。但是随着乙醇体积分数的进一步提高, 少量的水分使得活性中心的迁移率降低, 因而使羧甲基化反应受阻, 产物取代度反而下降。因此, 反应介质乙醇溶液的体积分数为 85% 较为适宜。

2.3.2 NaOH 与 $ClCH_2COOH$ 的摩尔比对反应产物取代度的影响: 在反应温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、乙醇体积分数 85%, 先碱化 2 h 再醚化反应 4 h, 结果 $n(AGU)$: $n(ClCH_2COOH) = 0.53:1$ 的反应条件下进行反应, 测定反应产物取代度, 碱酸摩尔比与反应产物取代度之间的关系见图 2。可以看出, 随着 NaOH 用量的增加, 产物取代度逐渐提高, NaOH 一方面用于茯苓多糖钠盐的生成, 另一方面又中和 $ClCH_2COOH$ 。因此 NaOH 与 $ClCH_2COOH$ 应保持一定的摩尔比, 当碱酸比过低时, 反应中生成的活性中心数目较少, 但碱用量过多, 则会导致碱性条件下多糖的降解和 $ClCH_2COOH$ 副反应产生, 降低 $ClCH_2COOH$ 利用率, 因此要控制碱酸比用量在 2.5:1~3:1 为宜。

2.3.3 茯苓多糖与 $ClCH_2COOH$ 摩尔比对羧甲基化取代度的影响: 在反应温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、乙醇体积分数 85%, 碱化 2 h 和羧甲基化反应 4 h, $n(NaOH)$: $n(ClCH_2COOH) = 2.6:1$ 的反应条件下进行反应, 测定反应产物的取代度, $ClCH_2COOH$ 与茯苓多糖摩尔比与反应产物取代度之间的关系见图 3。可以看出, 在确定的茯苓碱酸比和茯苓多糖量添加量下, 随着 $ClCH_2COOH$ 加入的量增加, 反应产物

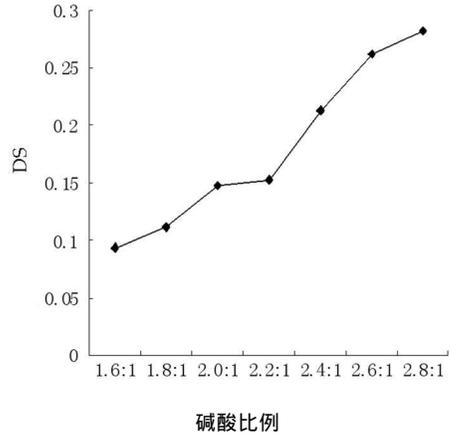


图 2 碱酸比例对产物取代度的影响

Fig 2 Influence of acid and base percentage on degree of substitution

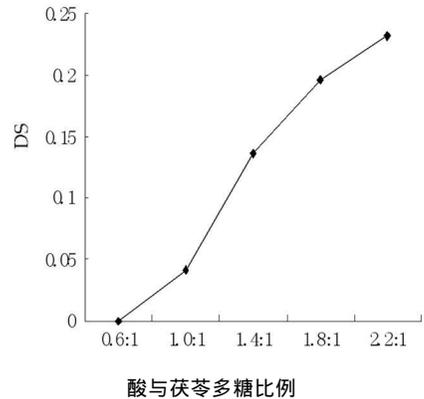


图 3 酸与茯苓多糖比例对产物取代度的影响

Fig 3 Influence of acid and *P. cocos* polysaccharide percentage on degree of substitution

取代度也增加。

2.3.4 反应温度对羧甲基化取代度的影响: 在乙醇体积分数 85%、先碱化 2 h, 再醚化反应 4 h, $n(AGU)$: $n(NaOH)$: $n(ClCH_2COOH) = 0.53:2.6:1$ 的反应条件下进行反应, 测定反应产物的取代度, 反应温度与反应产物取代度之间的关系见图 4。可以看出, 随着反应温度的增加, 反应产物取代度提高, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 达到最大值, 随着温度的进一步提高, 取代度反而降低, 这是因为开始随着温度的提高, 反应速率增加, 但随着温度的进一步提高, 副反应速率也在增加, 使得 $ClCH_2COOH$ 的利用率反而降低, 并且当温度高于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 反应产物颜色加深, 温度过高还可能导致多糖的降解, 因此反应应在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 以下进行。

2.3.5 碱化反应时间对羧甲基化取代度的影响: 在反应温度 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、乙醇体积分数 85%、醚化 4 h, $n(AGU)$: $n(NaOH)$: $n(ClCH_2COOH) = 0.53:2.6:1$ 的反应条件下进行反应, 测定反应产物的取代

度, 碱化时间与产物取代度之间的关系见图 5。可以看出, 随着碱化时间的延长, 反应产物取代度大小逐渐增加, 当碱化时间超过 2 h 后, 取代度增加缓慢, 原因是此时茯苓多糖已充分碱化, 生成的活性中心数目已达到最大值, 因此确定最佳碱化时间为 2 h。

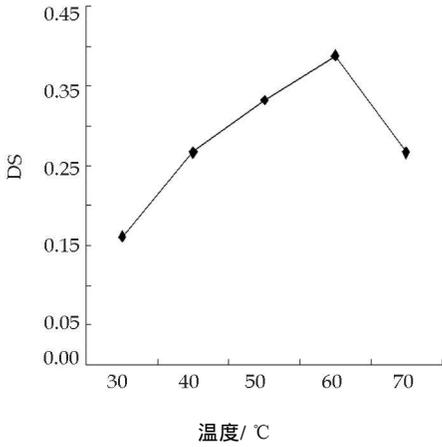


图 4 反应温度对产物取代度的影响

Fig 4 Influence of reaction temperature on degree of substitution

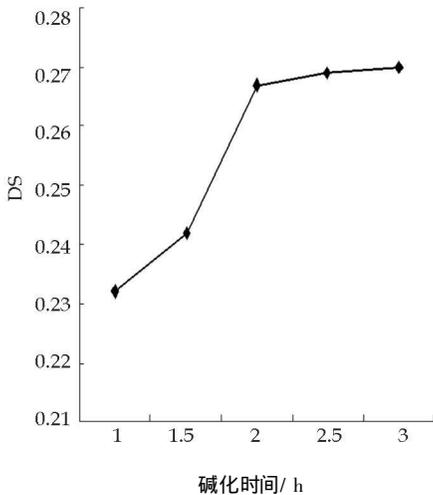


图 5 碱化反应时间对产物取代度的影响

Fig 5 Influence of alkalinization reaction time on degree of substitution

2.3.6 醚化反应时间对羧甲基化取代度的影响: 在反应温度 40 °C、乙醇体积分数 85%、碱化 2 h、 $n(\text{AGU}) : n(\text{NaOH}) : n(\text{ClCH}_2\text{COOH}) = 0.53 : 2.6 : 1$ 的反应条件下进行反应, 测定反应产物的取代度, 醚化反应时间与反应产物取代度之间的关系见图 6。可以看出, 随着羧甲基化反应时间的延长, 产物取代度逐渐增加。当超过 6 h 后, 趋于稳定, 因此羧甲基化时间确定为 6 h。

2.4 不同取代度的改性产物抗 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 能力比较: 在不同反应条件下得到不同取代度的反应产物, 利用

化学发光法测定其抗 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 活性, 结果见图 7。结果表明, 取代度为 0.4 时抗 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 活性是最高的, 说明抗氧化活性与取代度之间有着密切的关系, 并非取代度越高, 反应产物活性也越高。

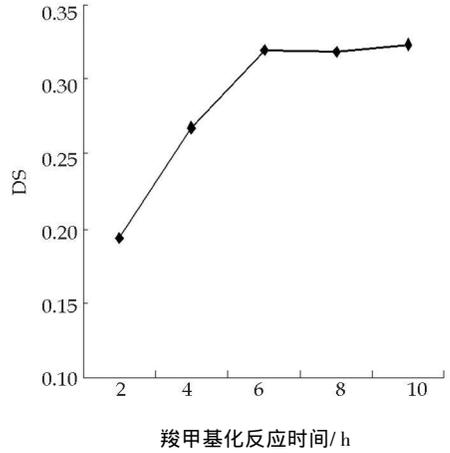


图 6 羧甲基化反应时间对产物取代度的影响

Fig 6 Influence of carboxymethylated reaction time on degree of substitution

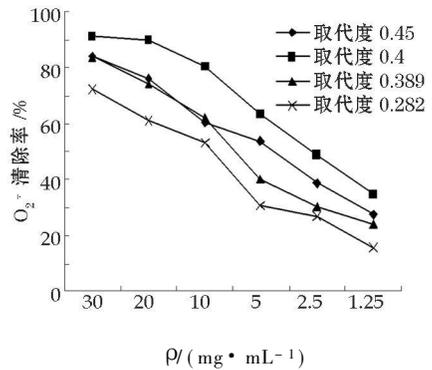


图 7 不同取代度产物与抗 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 活性的关系

Fig 7 Relationship between inhibition activity of $\text{O}_2^{\cdot -}$ and products with different substitution

2.5 改性茯苓粉的工艺确定: 在单因素试验和取代度与抗 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 活性关系研究试验基础上, 确定直接采用茯苓全粉进行羧甲基化改性的条件: 反应介质为 85% 乙醇溶液、反应温度 60 °C、先碱化 2 h 后醚化 6 h、 $n(\text{AGU}) : n(\text{NaOH}) : n(\text{ClCH}_2\text{COOH}) = 0.53 : 2.6 : 1$ 。在此试验条件下得到反应产物取代度为 0.4。

2.6 改性粉的傅立叶红外扫描分析^[4]: 取少量的干燥样品 1~2 mg 加 100 mg 的 KBr 压片测量, 通过扫描图谱比较原粉和改性粉的结构差异, 见图 8。可以看出, 改性前后的茯苓粉红外图谱存在明显的差异, 改性粉红外图谱中出现了 1601 cm^{-1} (强) 和 1425 cm^{-1} (中) 两个新的吸收峰, 前者为 C=O 键伸缩振动峰, 后者为与羧基相连的次甲基剪式振动, 1074 cm^{-1} 左右的吸收峰增强, 为醚键 C-O-C 与 C-

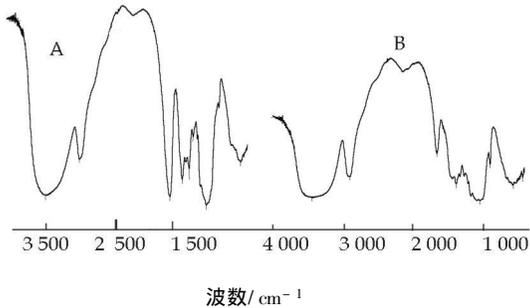


图8 改性粉体(A)和未改性粉体(B)的红外光谱图

Fig 8 FTIR spectram of modified powder (A) and non modified powder (B)

OH键的叠加峰。此外原茯苓多糖中表征 β 吡喃糖环的 889 cm^{-1} 的吸收峰改性后消失。

2.7 改性粉的溶解性研究: 在50 mL蒸馏水中加入5 g被测样品, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温搅拌1 h, 悬浮液离心($3\ 000\text{ r/min}$)20 min, 上清液旋转蒸发浓缩、干燥后得固形物, 计算溶解度(上清液固形物质量/样品总质量 $\times 100\%$)。结果原粉和改性粉的溶解度分别为1.3%、88.5%。结果表明, 改性茯苓粉水溶性大大提高, 主要是接入了亲水性基团羧甲基的缘故, 水溶性的提高改善了粉体在中药制剂中的加工特性, 因而可以得出改性粉体加工特性提高的结论。

3 讨论

采用乙醇溶液为反应介质, 在单因素优化的工艺条件下制备的最终改性产物取代度在0.4左右, 这比其他采用异丙醇溶液媒介法改性的文献资料所报道的产物取代度略低, 究其原因可能是天然高分

子结构中结晶区和非结晶区共存, 结晶区的存在不利于羧甲基化反应进行, 因此必须破坏其结晶区, 才能使羧甲基在茯苓多糖中分布均匀, 从而获得高取代度的改性产物, 这一点上异丙醇溶液的溶胀效果可能优于乙醇溶液。取代度0.4的改性茯苓粉水溶性比原茯苓粉提高很大, 乙醇反应介质法得到的改性粉生物活性也大幅增加, 完全可以满足中医药的应用要求, 而异丙醇试剂价格高, 且存在安全毒性, 则限制了其在中医药中的应用。另外, 因茯苓中90%为茯苓多糖, 改性中省略了先碱提多糖的工艺, 直接采用茯苓菌核全粉改性, 减少了工艺流程和降低了生产成本。综上所述, 采用乙醇溶液媒介法改性是可行的。

通过单因素试验确定了直接采用茯苓全粉进行羧甲基化改性的条件: 反应介质为85%乙醇溶液, 反应温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 先碱化2 h后醚化6 h, 碱酸用量摩尔比控制在2.5:1~3:1时, 反应产物可得到最大取代度, 为扩大茯苓在中药制剂中的应用范围奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王爱云, 陈群, 李成付, 等. 茯苓多糖修饰物抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中草药, 2009, 40(2): 268-271.
- [2] 丁琼, 张俐娜, 张志强. 茯苓菌丝体多糖的分离及结构析[J]. 高分子学报, 2000(2): 224.
- [3] 楼益明. 羧甲基纤维素生产及应用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.
- [4] 严衍祿. 现代仪器分析[M]. 第2版. 北京: 中国农业大学出版社, 1995.

山茱萸饮片的高效毛细管电泳指纹图谱研究

李俊松¹, 宋建平², 刘训红^{1*}, 张月婵¹, 蔡宝昌¹, 尹娣¹

(1. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210029; 2. 盐城卫生职业技术学院, 江苏 盐城 224006)

摘要: 目的 建立山茱萸饮片高效毛细管电泳指纹图谱分析方法。方法 应用未涂渍标准熔融石英毛细管(64.5 cm \times 75 μm , 有效长度56 cm), 以50 mmol/L硼砂-40 mmol/L十二烷基硫酸钠-5%乙腈(pH 9.5)为缓冲液, 检测波长240 nm, 运行电压10 kV, 柱温 $18\text{ }^{\circ}\text{C}$; 以马钱苷为参照物(IS), 测定指纹图谱, 并做聚类分析和相似度评价。结果 初步建立了以9个共有峰为特征指纹信息的山茱萸饮片高效毛细管电泳指纹图谱, 且方法学考察符合规定的标准。结论 该法准确简便, 可作为控制山茱萸饮片内在质量的有效手段。

关键词: 山茱萸; 马钱苷; 高效毛细管电泳; 指纹图谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-1981-05

收稿日期: 2010-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873438); 江苏省中药炮制重点实验室开放课题(ZYPZ007)

作者简介: 李俊松(1964-), 男, 江苏宜兴人, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药制剂、中药炮制研究。

Tel: (025)86798281 E-mail: lijunsong1964@163.com

* 通讯作者 刘训红 Tel: (025)86798281 E-mail: liuxunh1959@sohu.com