

地龙 β -环糊精包合除味工艺研究

王 昶, 魏文峰, 张树明, 王伟明*

黑龙江省中医研究院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘要: 目的 制备地龙 β -环糊精包合物, 改善其溶解性及去除不良气味。方法 以次黄嘌呤为指标, 考察 β -环糊精加入比例、温度及时间对包合工艺的影响, 并进行包合物口感满意度及溶解性检测。结果 地龙(生药)- β -环糊精的比例为 15:1, 70 °C 下超声处理 60 min, 次黄嘌呤平均包合率为 80.31%, 口感满意度为 90% 以上, 溶解度有较大改善。结论 地龙 β -环糊精包合工艺可行, 并可有效解决地龙不良气味问题。

关键词: 地龙; β -环糊精; 次黄嘌呤; 口感满意度; 包合工艺; 不良气味; 溶解性

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)03-0282-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.009

Study on smelly odor removal of earthworm and β -cyclodextrin inclusion

WANG Chang, WEI Wen-feng, ZHANG Shu-ming, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China

Abstract: Objective Preparing the inclusion complex of earthworm / β -cyclodextrin to improve solubility and remove smelly odor.

Methods The effects of different proportions of earthworm and β -cyclodextrin, inclusion temperature, and time on inclusion technology were observed using hypoxanthine as indicator. And the taste satisfaction and solubility of inclusion complex were tested.

Results The optimal process was as follows: the earthworm (raw material)- β -cyclodextrin is 15:1, ultrasonic treatment is 60 min under 70 °C, the inclusion rate of hypoxanthine was 80.31%, the taste satisfaction rate was 90%, and the solubility was greatly improved. **Conclusion** The inclusion process is feasible and the smelly odor problem of earthworm is solved effectively.

Key words: earthworm; β -cyclodextrin; hypoxanthine; taste satisfaction rate; inclusion process; smelly odor; solubility

地龙为环节动物门钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *P. vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* (Michaelsen) 的干燥体。具有清热息风、通络、平喘、利尿等功效, 临床用于高热神昏、惊痫抽搐、关节麻痹及半身不遂等症的治疗^[1-2]。但地龙具有不良气味, 并含有较多油脂性成分, 在制备口服液及颗粒剂时往往口感差、溶解性不佳, 患者依从性差, 尤其是儿童患者服药更加困难。本实验采用 β -环糊精对地龙醇提物进行包合处理^[3-5], 有效掩盖了其腥臭气味, 改善了口感满意度和溶解性, 本方法工艺简便, 在制剂中有较好的推广应用价值。

1 仪器与材料

KQ—300DB 型数控超声清洗器 (昆山市超声

仪器有限公司), RE—52 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), UV—160 紫外分光光度计 (日本岛津公司)。地龙采集自广西容县、梧州, 广东平远、韶关, 福建宁化 5 个产地, 经黑龙江省中医研究院王伟明研究员鉴定均为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) (广地龙); 次黄嘌呤对照品 (批号 10209) 购于中国药品生物制品检定所; 次黄嘌呤购于武汉大华伟业医药化工集团有限公司; β -环糊精购于陕西礼泉化工有限实业公司; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 包合物的制备

取地龙 100 g, 精密称定, 加溶剂提取 2 次, 第 1 次加 6 倍量 70% 乙醇, 回流提取 1.5 h, 滤过, 药

收稿日期: 2012-06-26

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2010ZX09101-104); 哈尔滨市科技局青年科技创新人才项目 (2011RFQYS090)

作者简介: 王 昶 (1977—), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事中药化学研究。Tel: (0451)55665478 E-mail: wangchang89993762@126.com

*通信作者 王伟明 E-mail: zyyjy@163.com

网络出版时间: 2012-11-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121126.1801.009.html>

渣加6倍量水,提取1h,滤过,合并滤液,滤液减压浓缩至100 mL,加入β-环糊精8 g,超声处理60 min,温度70℃,功率300 W,然后移至95℃水浴上边搅拌边加热蒸干,干燥物研细,过200目筛,即可。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取次黄嘌呤对照品2 mg,至10 mL量瓶中,加水配制成0.2 mg/mL的对照品溶液。

2.3 线性关系考察

分别吸取次黄嘌呤对照品溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL置10 mL量瓶中,加水至刻度,以水为空白,在249 nm处测量吸光度值,以吸光度值为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.078 2 X+0.012 1$, $r=0.999 3$,结果表明次黄嘌呤在2.0~10.0 μg/mL线性关系良好。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取对照品溶液,按“2.3”项下方法重复测定6次,结果RSD为1.2%。

2.4.2 稳定性试验 精密称取“2.1”项下地龙包合物500 mg,按“2.3”项下方法测定,在3 h内每30 min测定1次,结果RSD为2.4%,表明供试品溶液在3 h内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批次地龙药材5份,按“2.1”项下方法制备包合物,按“2.3”项下方法测定,结果RSD为3.2%。

2.4.4 回收率试验 精密称取“2.1”项下地龙包合物500 mg,加入次黄嘌呤对照品适量,精密称定,

加95%乙醇超声提取3次,每次20 mL、温度70℃,时间30 min,滤过,合并滤液,定容至100 mL,按“2.3”项下方法进行测定,结果测定6份样品,平均回收率为98.8%,RSD为2.87%。

2.5 包合率测定方法

取“2.1”项下地龙包合物500 mg,精密称定,加水(20℃)洗涤2次,每次20 mL,滤过,合并滤液,加水定容至100 mL,以水为空白在次黄嘌呤最大吸收波长249 nm处测定吸光度值,计算水液中次黄嘌呤的量;将上述滤渣蒸干,加95%乙醇超声提取3次,每次20 mL、温度70℃,时间30 min,滤过,合并滤液,定容至100 mL,置249 nm处测定吸光度值,计算95%乙醇溶液中次黄嘌呤的量,计算次黄嘌呤包合率^[6]。

包合率=95%乙醇溶液中次黄嘌呤的量 / (95%乙醇溶液中次黄嘌呤的量+水液中次黄嘌呤的量)

2.6 地龙β-环糊精包合工艺影响因素考察

2.6.1 β-环糊精加入比例对包合工艺的影响 以地龙生药质量计,分别按地龙(生药)-β-环糊精的比例为5:1、10:1、15:1、20:1、25:1,在“2.1”项下的地龙浓缩液中加入环糊精,在70℃下超声处理60 min,加热蒸干,干燥物取出,研细,过200目筛,按“2.5”项下方法测定包合率,结果见表1。从表中可看出,随着环糊精加入比例的增加,包合率也随之提高,在地龙(生药)-β-环糊精为15:1时,再增加环糊精比例,包合率变化不大,说明包合过程基本饱和,综合考虑,确定β-环糊精最佳加入比例为地龙(生药)-β-环糊精15:1。

表1 地龙β-环糊精包合工艺影响因素实验数据表

Table 1 Effects of different influencing factors on earthworm / β-cyclodextrin inclusion process

地龙(生药)-β-环糊精	包合率 / %	包合温度 / °C	包合率 / %	包合时间 / min	包合率 / %
5 : 1	89.02	50	78.45	15	45.31
10 : 1	88.09	60	84.21	30	78.18
15 : 1	88.02	70	91.05	45	84.12
20 : 1	55.45	80	88.42	60	91.25
25 : 1	45.28	90	82.14	75	91.18

2.6.2 包合温度对包合工艺的影响 按地龙(生药)-β-环糊精为15:1,在“2.1”项下的地龙浓缩液中加入环糊精,分别在50、60、70、80、90℃下超声处理60 min,加热蒸干,干燥物研细,过200目筛,测定包合率,结果见表1。从表中可看出,随着包合温度的增加,包合率也随之提高,在包合温

度为70℃时,包合率达到最大值,而后随着温度升高,包合率有所下降,这可能与温度升高,分子热运动加剧,不易包合有关。故综合考虑,确定最佳包合温度为70℃。

2.6.3 包合时间对包合工艺的影响 按地龙(生药)-β-环糊精为15:1,在“2.1”项下的地龙浓缩

液中加入环糊精, 在 70 °C 下, 分别超声处理 15、30、45、60、75 min, 加热蒸干, 干燥物研细, 过 200 目筛, 测定包合率, 结果见表 1。从表中可看出, 随着包合时间的增加, 包合率也随之提高, 在 60 min 时, 包合率趋于平缓, 说明此时包合过程已趋于饱和, 再增加包合时间对包合率影响不大, 综合考虑, 确定最佳包合时间为 60 min。

2.6.4 次黄嘌呤相溶解度试验 精密称取 β -环糊精 0.850 g 置于 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水适量溶解并稀释至刻度, 摇匀。然后将 β -环糊精溶液以蒸馏水稀释成浓度分别为 0、2、4、6、8、10 mmol/L 的溶液。取上述 β -环糊精溶液各 10 mL, 均加入地龙提取物干膏粉末 0.5 g 及过量的次黄嘌呤, 恒温 20.0 °C 下振摇 72 h, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 滤液加蒸馏水适当稀释, 摇匀。以蒸馏水为空白, 在 249 nm 波长处测定吸光度值, 计算次黄嘌呤的质量浓度。从表 2 可以看出, 次黄嘌呤的质量浓度随着 β -环糊精浓度增大而增大, 从数据分析表明其相溶解度曲线为 A_L 型^[7]。为真实反映地龙中其他成分对次黄嘌呤 β -环糊精增溶作用的影响, 本实验在 β -环糊精溶液中同时加入地龙提取物及次黄嘌呤。从表中可以看出, 在有地龙提取物的情况下, β -环糊精对次黄嘌呤仍有较好的增溶作用。

表 2 次黄嘌呤相溶解度试验数据

β -环糊精 / (mmol·L ⁻¹)	次黄嘌呤 / (mg·mL ⁻¹)	增溶比
0	0.724	—
2	0.804	1.12
4	0.891	1.24
6	0.983	1.37
8	1.068	1.48
10	1.148	1.59

2.7 工艺验证

取不同产地地龙药材各 100 g, 按“2.1”项下方法制备地龙浓缩液及 β -环糊精包合物, 包合物制备条件为地龙(生药)- β -环糊精为 15:1, 包合温度 70 °C, 超声 60 min。分别测定次黄嘌呤包合率及包合物水溶液口感及溶解性, 验证以上包合工艺的可行性。

2.7.1 包合率测定 从表 3 中可看出, 5 批不同产地地龙次黄嘌呤平均包合率为 80.31%, 说明地龙 β -环糊精包合工艺可行。

表 3 不同产地地龙 β -环糊精包合试验

产地	采集时间	包合率 / %
广西容县	2010 年 05 月	81.12
广西梧州	2010 年 07 月	82.45
广东平远	2010 年 08 月	78.47
广东韶关	2010 年 01 月	80.32
福建宁化	2010 年 03 月	79.17

2.7.2 口感满意度测定 本实验的主要目的之一为采用 β -环糊精包合工艺改善地龙不良气味及口感, 但此项指标只能主观评判, 故本实验采用 30 人品尝包合前后地龙提取物的水溶液, 分为儿童、青年、老年 3 组, 每组各 10 人, 以代表不同患者群体, 根据个人感受打分, 分数分为 5 个档次, 不满意, 有所改善、基本满意, 满意, 非常满意, 每档 20 分, 满分 100 分, 个人根据具体感受确定档次, 并给出最后分数, 结果见表 4。从表 4 可看出, 未包合地龙各组满意度为 20% 左右, 基本为不满意, 而包合后各组的满意度均在 90% 以上, 达到非常满意的效果, 说明地龙经包合后有效改善了不良气味及口感, 更满足制剂要求, 扩大了地龙制剂的选择范围。

表 4 地龙 β -环糊精包合前后气味及口感比较

组别	未包合满意度 /		包合满意度 /	
	%	RSD / %	%	RSD / %
儿童	18.41	2.62	92.17	2.78
青年	19.12	2.13	93.25	2.65
老年	20.08	2.46	93.47	2.48

2.7.3 溶解性测定 取未包合的地龙浓缩液, 蒸干, 按比例称取与包合物相当的干膏, 加热水溶解。再取等量地龙包合物加水溶解, 搅拌, 观察溶解情况, 按表 5 中的指标进行评价, 结果见表 5。从表 5 可以看出, 地龙包合后溶解性有较大改善, 基本解决了未包合地龙水溶液混浊、液面有油层的现象, 更有利于制剂应用。

3 讨论

本实验进行的地龙 β -环糊精包合工艺研究未见相关文献报道, 同时关于地龙除味的文献也并不多见, 但经笔者实验发现, 当地龙用于颗粒剂时, 在加热水冲开过程中, 其溶解性, 不良气味问题随即

表5 地龙包合前后溶解性对比

Table 5 Comparison on solubility of earthworm before and after inclusion

样品	溶解情况	澄明度	悬浮物	液面是否有油层
未包合	2 min 不能完全溶解	不澄明, 溶液混浊	有	有
包合	2 min 内可溶解	澄明	无	无

出现, 尤其是冲开瞬间, 地龙腥味尤其明显, 容易致呕, 一般患者不易接受, 儿童更难以服药, 采用β-环糊精包合后, 其冲开时不良气味明显减少, 甚至基本消失, 溶解性也得到较好改善, 说明包合工艺有较好增溶及掩盖不良气味作用。同时, 本工艺为了使地龙有效成分的全部提取, 采用醇提水提结合方法进行处理, 保证了疗效及工艺的通用性。

地龙不良气味的产生多因蛋白质经微生物分解而产生的一类含氮杂环化合物所致, 包括吲哚、尸胺等多种成分^[8], 但由于其并非单一化合物, 直接对其检测有较大难度, 而次黄嘌呤为地龙中主要活性成分, 有降压、平喘的作用^[9], 同时其结构也为含氮杂环类物质, 包合的行为与蛋白分解产物相似, 故以次黄嘌呤为指标进行包合率的测定可在一定程度反映β-环糊精对地龙不良气味成分的包合效果。

本工艺具有一定的示范作用, 中药中的动物药大都存在不良气味问题, 含此类药材的制剂往往不宜制成液体和冲服形式, 限制其使用范围, 而β-环糊精包合工艺可能为动物药材的制剂应用限制提供

更有效的解决办法。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
 [2] 耿 晖. 地龙药理作用研究进展 [J]. 山东中医杂志, 2000, 19(9): 550-551.
 [3] 胡海霞, 王效山, 彭代银, 等. 新藤黄酸包合物冻干粉针制备及工艺优化 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 65-69.
 [4] 张学农, 苗爱东, 周 慧, 等. 维生素D3-β环糊精包合物的理化性质及包合作用研究 [J]. 中国药学杂志, 2001, 36(11): 742-744.
 [5] 张卫敏, 任晓文, 徐为人, 等. 分子模拟技术在释药技术中的应用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(2): 86-89.
 [6] 胡 馨, 黄文辉. 各种产地地龙与广州地龙中次黄嘌呤的测定和比较 [J]. 中成药, 1994, 16(1): 42-43.
 [7] Higuchi T, Connors K A. Phase solubility techniques [J]. *Adv Anal Chem Instrum*, 1965, 4: 117-172.
 [8] 邢秀芹. 微生物与肉类腐败变质 [J]. 肉类研究, 2007, 101(7): 14-15.
 [9] 刘亚明, 郭继龙, 刘必旺, 等. 中药地龙的活性成分及药理作用研究进展 [J]. 山西中药, 2011, 27(3): 44-45.