

中草药免疫增强剂的稳定性研究

范莉 倪静 (河北科技师范学院动物科学系, 河北昌黎 066600)

摘要 [目的] 了解温度、湿度、光照对中草药免疫增强剂稳定性的影响。[方法] 用索氏提取器提取免疫增强剂的主要成分, 将提取液分别放置于-15、60 的75%±5%、90%±5%的湿度环境中,(4 000±1 000)lx 强光照射下, 分别于第5、第10 天进行取样分析, 观察颜色变化、测pH 值及其在220~400 nm 的吸光度曲线, 应用分光光度法分析了中草药免疫增强剂在低温、高温、高湿、强光照射的条件下处理后其化学和物理性质的变化。[结果] 免疫增强剂提取液中的主要成分(生物碱、甙类、多糖)在低温、高温、高湿条件下没有明显变化。在强光照射条件下提取液颜色变淡,pH 值降低。[结论] 免疫增强剂提取液在低温、高温、高湿条件下比较稳定, 但应避光保存。

关键词 中草药; 免疫增强剂; 稳定性; 分光光度法

中图分类号 S853.7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)12-04996-03

Research on the Stability of Chinese Herbal Immunopotentiator

FAN Li et al (Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli, Hebei 066600)

Abstract [Objective] The aim was to know about the influences of temperature, humidity and light on the stability of Chinese herbal immunopotentiator. [Method] The main constituents of immunopotentiator were extracted by Soxhlet extractor. The extracts were set in the environments with temperatures of -15 and 60, humidity of 75%±5% and 90%±5% and light intensity of (4 000±1 000)lx, the samples were fetched on the 5th and 10th day for analysis to observe color change and determine pH value and absorbance curve in 220~400 nm. The changes on chemical and physical properties of Chinese herbal immunopotentiator after it was treated with low temperature, high temperature, high humidity and intense light were analyzed by spectrophotometry. [Result] The main constituents (alkaloid, glycosides and polysaccharides) in the extracts of immunopotentiator had no significant change under the condition of low temperature, high temperature and high humidity and the color of extracts was thinned and its pH value was decreased under the condition of intense light. [Conclusion] The extracts of immunopotentiator were relatively stable under the condition of low temperature, high temperature and high humidity, but it should be preserved away from light.

Key words Chinese herb; Immunopotentiator; Stability; Spectrophotometry

目前, 化学免疫增强剂的研究已取得较大发展, 但都不同程度地存在毒副作用和药物残留的弊端。而中草药为天然药物, 具有低毒、副作用少、不易产生抗药性^[1]的特点。资料表明, 许多中草药能增强机体的免疫功能, 激活免疫系统, 促进巨噬细胞提取、处理和传递抗原, 调节和增强T/B 细胞的反应能力, 使数量增多及发育成熟, 使家禽在接种疫苗后能获得高水平的应答反应, 以提高免疫效价, 延长免疫时间。

中草药成分中的多糖类与动物免疫功能密切相关。如多糖中的黄芪多糖可显著增强机体的免疫功能^[2]。据报道, 黄芪能使抗体形成细胞数和溶血素显著提高, 促进机体抗体的生成^[3]。黄芪水提物能明显增强刀豆蛋白A 或美洲商陆素引起的淋巴细胞增殖反应^[4]。传统中医认为黄芪可“补气益气”, 治疗气衰血虚之症^[5]。据试验证明, 黄芪和茯苓拌料不仅可提高T 淋巴细胞阳性率, 延长作用时间, 同时还可以减轻疫苗的应激反应^[6-7]。由于中草药免疫增强剂有以上等优点, 因此, 其研究日趋受到关注。为此, 笔者研制了中草药免疫增强剂, 该制剂主要以黄芪、党参、茯苓、猪苓等多味中草药配制而成, 用于配合疫苗使用, 使家禽在接种疫苗后能获得高水平的应答反应。为了解温度、湿度、光照对免疫增强剂稳定性的影响, 给制剂生产工艺、包装、储存条件提供科学依据, 对免疫增强剂进行了稳定性试验研究。

1 材料与方 法

1.1 仪器 UV755B 型紫外可见分光光度计; ZDS 10 型照度计; DHB600A 电热恒温培养箱; FA2004 型电子天平; 各种玻璃器皿; 自制光照箱。

1.2 免疫增强剂有效成分的提取 将黄芪、党参、猪苓、茯

苓等中药成分粉碎、混匀。用索氏提取器提取主要成分, 最后将提取物浓缩成含生药1 g/ml。该制剂为棕褐色液体, 略粘稠, 味微苦, 测得pH 值为6。然后分装于密闭小青霉素瓶中备用。

1.3 稳定性考察项目 分别考察免疫增强剂的性状、颜色、pH 值、吸光度。

1.4 稳定性考察方法 对免疫增强剂分别进行影响因素和加速试验。将装有免疫增强剂提取液的小瓶称重后, 进行低温、高温、高湿、强光照射试验^[8-9]。

1.4.1 原始数据的测定。 将1 g/ml 的免疫增强剂提取物稀释500 倍, 用分光光度计测定波长在220~400 nm 的吸光度。

1.4.2 低温试验。 将待测样品放在-15 条件下10 d, 分别于第5、10 天取样, 称重后500 倍稀释, 测波长在220~400 nm 的吸光度(间隔5 nm 测1 次), 并与原始药品的吸光度曲线作对照。观察其性状、颜色, 测定pH 值。

1.4.3 高温试验。 将待测样品放在60 条件下10 d, 分别于第5、10 天取样, 500 倍稀释后测出波长在220~400 nm 的吸光度(间隔5 nm 测1 次), 并与原始药品的吸光度曲线作对照。同时准确称量试验前后免疫增强剂的质量, 判断是否有蒸发。观察其性状、颜色, 测定pH 值。

1.4.4 高湿度试验。 将待测样品放置于恒湿密闭容器中, 在25 分别放于相对湿度(75±5)% 和(90±5)% 条件下10 d, 分别于第5、10 天取样, 500 倍稀释后测波长在220~400 nm 的吸光度(间隔5 nm 测1 次), 并与原始药品的吸光度曲线作对照。同时对试验前后的免疫增强剂称重, 以考察试验前后增强剂的浓度(质量) 是否有变化, 观察其性状、颜色, 测定pH 值。恒湿条件在密闭容器的干燥器下部放置饱和溶液, 选择氯化钠饱和溶液[相对湿度(75±5)% , 25] , 硝酸钾饱和溶液[相对湿度(92.5±5)% , 25] 。

1.4.5 强光照射试验。 将待测样品置于光照箱内, 在光照

基金项目 秦皇岛市科技局资助项目。

作者简介 范莉(1956-), 女, 山东淄博人, 实验师, 从事动物传染病研究。

收稿日期 2008-02-22

度($4\ 000 \pm 1\ 000$)lx 的条件下放置 10 d, 分别于第 5、10 天取样, 500 倍稀释后测波长在 220 ~ 400 nm 的吸光度(间隔 5 nm 测 1 次), 并与原始药品的吸光度曲线作对照。观察其性状、颜色, 测定 pH 值。光照箱内配有光度计, 可随时监测光照箱内的照度, 光照箱不受自然光的干扰, 并保持照度恒定。

2 结果与分析

免疫增强剂提取液经低温、高温、高湿、强光照射试验后观察, 只有强光照射后免疫增强剂提取液颜色由深褐色变为棕绿色, 最后成为黄绿色。其余变化不大。强光照射后免疫增强剂低温、高温、高湿试验后 pH 值不变, 而强光照射后 pH 值比原来减小。

2.1 低温对免疫增强剂的影响 由图 1 可见, 免疫增强剂的提取液在低温环境中, 第 5 和 10 天取样分析, 吸光度曲线与原始曲线近乎平行, 性状、颜色、pH 值都没有明显变化, 所以免疫增强剂的提取液在低温条件下是稳定的。

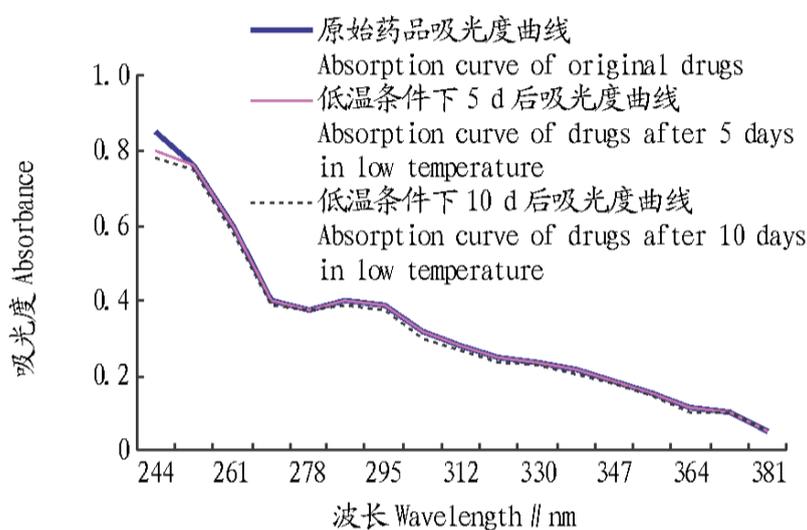


图1 低温对免疫增强剂吸光度曲线的影响

Fig.1 Effects of low temperature stress on absorption curve of immunopotentiator

2.2 高温对免疫增强剂的影响 由图 2 可见, 免疫增强剂在高温条件下, 第 5 天取样分析时, 吸光度曲线与原始曲线近乎平行, 说明在第 5 天免疫增强剂提取液成分没有变化, 在第 10 天取样分析时, 第 10 天曲线与第 5 天曲线近乎重叠, 性状、颜色、pH 值都无明显变化。说明提取液在高温条件下比较稳定。

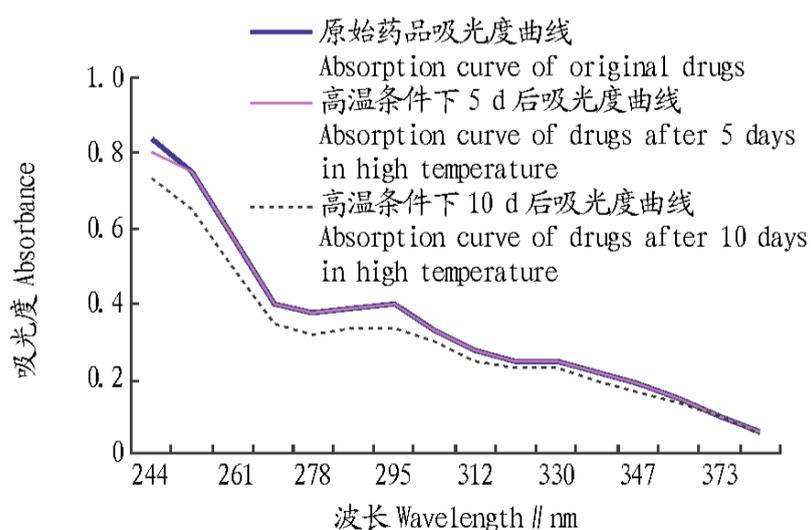


图2 高温对免疫增强剂吸光度曲线的影响

Fig.2 Effects of high temperature stress on absorption curve of immunopotentiator

2.3 高湿对免疫增强剂的影响 由图 3 可见, 免疫增强剂提取液在 75% 湿度的环境中, 第 5 天取样分析, 第 5 和 10 天取样的吸光度曲线在原始曲线上下两侧, 与原始曲线近乎平

行, 在各个波长下吸光度起伏一致, 说明没有新物质生成, 性状、颜色、pH 值和质量也无明显变化, 可以证明免疫增强剂的提取液在 75% 湿度下是稳定的。

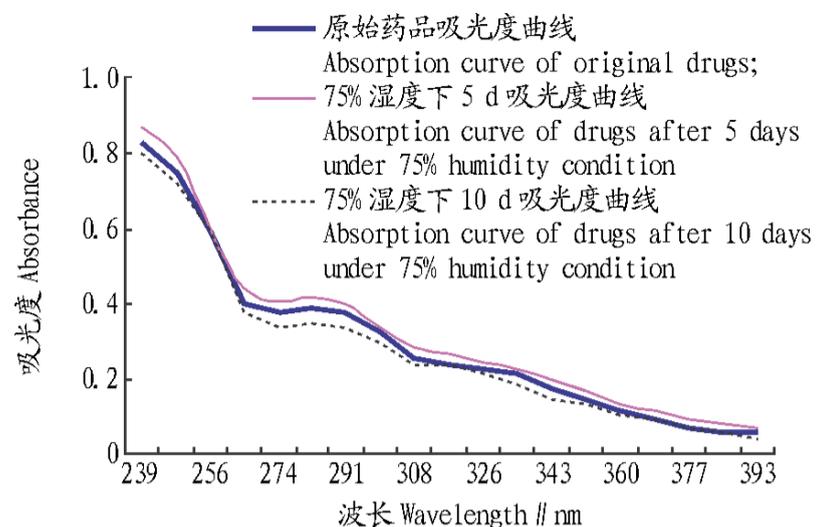


图3 75%湿度下保存的免疫增强剂提取液的吸光度曲线变化
Fig.3 Changes of absorption curve of immunopotentiator extracts stored at 75% humidity condition

由图 4 可见, 免疫增强剂的提取液在 90% 的湿度环境中, 第 5 和 10 天取样的吸光度曲线和原始曲线平行, 性状、颜色、pH 值和质量也无明显变化, 这进一步证明了免疫增强剂的提取液不受湿度影响。

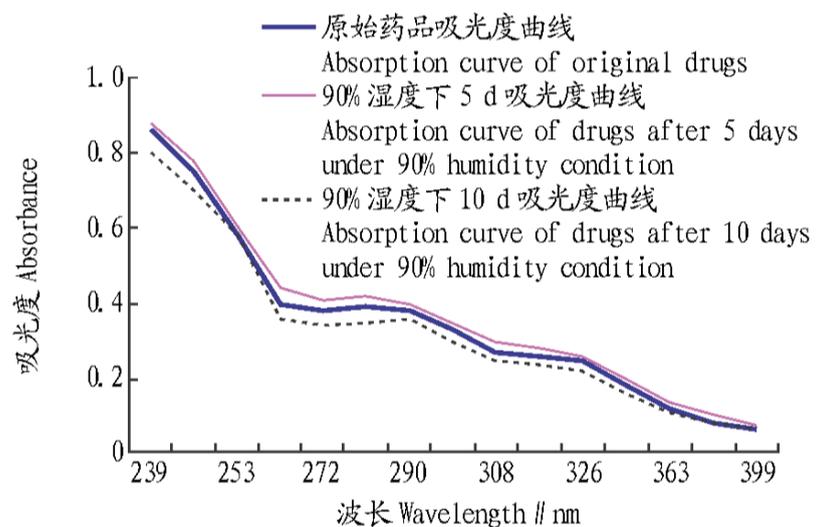


图4 90%湿度下保存的免疫增强剂吸光度曲线变化

Fig.4 Changes of absorption curve of immunopotentiator stored at 90% humidity condition

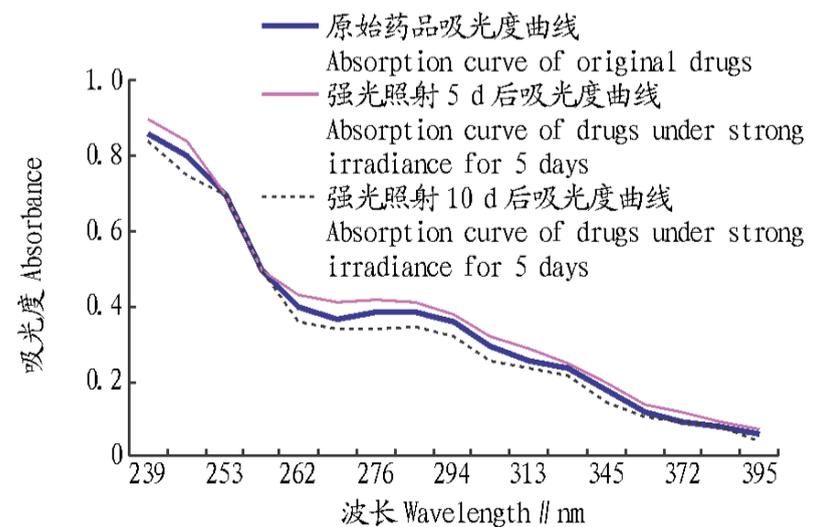


图5 强光照射后免疫增强剂吸光度曲线变化

Fig.5 Changes of absorption curve of immunopotentiator after strong irradiance

2.4 强光照射对免疫增强剂的影响 由图 5 可见, 免疫增强剂的提取液在强光照射的环境中, 第 5 和 10 天取样分析, 吸光度曲线和原始曲线近乎平行, 但其颜色在 5 d 由深褐色变成棕绿色, pH 值为 5.5, 10 d 成为黄绿色, pH 值为 5, pH 值

比刚提取出的6 减小了0.5~1.0,说明免疫增强剂的提取液在强光照条件下产生了酸,因此在强光条件下不稳定。

3 结论与讨论

该试验采用索氏提取法提取免疫增强剂的有效成分,提取剂为95%乙醇,可充分提取其中的多糖、甙类、生物碱、有机酸、挥发油、植物色素等^[10],而中草药对免疫影响的主要成分为多糖、甙类、生物碱及挥发性成分^[11]。分光光度计测得的主要是生物碱、甙类、多糖的混合物在波长220~400 nm的吸光度曲线。

(1) 生物碱、甙类、多糖在低温条件下不易发生化学反应,由图1可知3条吸光度曲线近乎重合,说明在低温下这些对免疫有影响的物质是稳定的。

(2) 提取液中的主要成分除挥发油外都是溶于水又溶于有机溶剂的,在高湿条件下各有效成分不具有发生化学反应的条件,所以在高湿条件下各成分无变化。

(3) 该制剂的提取属于回流提取,采用此方法说明制剂的主要成分遇热不易分解破坏^[10],所以免疫增强剂的提取液在高温条件下是稳定的。

(4) 在强光照条件下,免疫增强剂的提取液颜色明显变化,pH值降低,但其吸光度曲线没有明显变化,而其中的植物色素在强光条件下发生了化学变化,化学产物为弱酸性,在这种情况下,免疫增强剂的效果可能会受到影响,其成分的变化、降解物以及对免疫增强剂效果的影响需要进一步研究。

(5) 由图1~5可知,第10天所测得的吸光度曲线一般低

(上接第4995页)

3 结论

首次比较体内法(SF₆)和体外法(IVGPT),用于估测饲料产生CH₄气体的潜力。结果显示,IVGPT测定的CH₄气体产生量与SF₆示踪技术测定的CH₄气体产生量非常接近,IVGPT法是体内条件的反映,因此,可以用来建立各种反刍动物日粮产生CH₄气体的数据库,并用于验证反刍动物CH₄产生量的减缓策略。但需要更多的样品和多样的日粮结构来进一步研究。

表3 2种技术测定的CH₄损失能占采食总能的比值(MCR)比较

Table 3 Comparison of MCR measured by SF₆ technique and IVGPT

日粮 Diet	SF ₆	IVGPT
D ₁	6.83 ± 0.41 ^b	5.94 ± 0.34 ^b
D ₂	6.77 ± 0.13 ^b	6.25 ± 0.51 ^b
D ₃	6.91 ± 0.32 ^b	6.27 ± 0.24 ^b
D ₄	5.99 ± 0.13 ^a	5.01 ± 0.27 ^a
D ₅	7.12 ± 0.16 ^c	7.19 ± 0.31 ^c
平均 Average	6.72 ± 0.43 ^b	6.13 ± 0.78 ^b

参考文献

- [1] MURRAY P J, MOSS A, LOCKYER D R, et al. A comparison of systems for measuring methane emissions from sheep[J]. J Agric Sci, 1999, 133: 439-444.
- [2] RODHE H. A comparison of the contributions of various gases to the greenhouse effect[J]. Sierne, 1990, 248: 1217-1219.
- [3] STEELE P, DLUGOKENCKY E J, LANG P M, et al. Slowing down of the global accumulation of atmospheric methane during the 1980s[J]. Nature, 1992, 358: 313-316.

于原始药品和第5天测得的吸光度曲线,与预计不符,因为在保存过程中,乙醇有挥发,免疫增强剂的浓度升高,所测得的吸光度曲线应在原始药品和第5天之上。出现这种现象的原因可能是所用稀释剂与95%的乙醇不是同一批产品,由浓度差异造成的。

(6) 通过此试验只能判断出在不同条件下是否有新物质产生,但具体产生什么物质、产生的量是多少不能判断,需要进一步的试验研究。

参考文献

- [1] 雷红, 祁成年. 中草药增强免疫器官功能[J]. 中兽医学杂志, 2002(2): 37-38.
- [2] 称智斌, 葛长荣, 韩剑众, 等. 中草药有效成分与畜禽免疫功能关系[J]. 兽药与饲料添加剂, 2001, 6(6): 22-24.
- [3] 黄会玲, 张智蕾. 黄芪对鸡免疫器官和T淋巴细胞E花环的影响[J]. 兽医医学杂志, 1996(1): 8-9.
- [4] 孙燕, 李秀如. 扶正中药的临床和试验研究: 黄芪、女贞子水提剂促进免疫功能的试验研究[J]. 中华微生物及免疫学杂志, 1983, 3(4): 211-216.
- [5] 北京农业大学. 中兽医学[M]. 2版. 北京: 农业出版社, 1985: 252-253.
- [6] 冀贞阳. 应用免疫增强剂提高常见禽病免疫力概况[J]. 禽病防制, 2001, 18(1): 18.
- [7] TIZARDI R. Neural regulation of immunity[C]// Veterinary Immunity, An Introduction(5th ed), Bedford: Saunders Company, 1996: 214-215.
- [8] 农业部畜牧兽医局. 兽药稳定性试验技术规范(试行)[J]. 中国兽药杂志, 1999, 33(3): 41-44.
- [9] 胡海燕. 简述新兽药稳定试验的一般方法[J]. 中国兽医杂志, 1998, 30(4): 47-49.
- [10] 谢仲权, 牛树琦, 刘风华. 天然物中草药饲料添加剂研究方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001: 207-224.
- [11] 丁巧玲, 柴家前. 中草药免疫研究概述[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1998(7): 43-44.
- [4] MOSS A R. Environmental control of methane production by ruminants[C]// TAKAHASHI J, YOUNG B A. Greenhouse Gases and Animal Agriculture. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands: [s.n.], 2001: 67-76.
- [5] JOHNSON K, HUYLER M, WESTBERG H B, et al. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique[J]. Environ Sci Technol, 1994, 28: 359-362.
- [6] GREATORIX J M. A review of methods for measuring methane, nitrous oxide and odour emissions from animal production activities[M]. Uppsala, Sweden: JTI-Institutet för jordbruks- och miljöteknik, 2000.
- [7] GETACHEW G, BLUMMEL M, MAKKAR H P S, et al. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review[J]. Anim Feed Sci Technol, 1998, 72: 261-281.
- [8] JOHNSON K A, HUYLER M T, WESTBERG H H, et al. Measurement of methane emission from ruminant livestock using SF₆ tracer technique[J]. Environ Sci & Technol, 1994, 28: 359.
- [9] NRC. Nutrient requirements of goat: argora, dairy and meat goats in temperate and tropical countries[M]. Washington: National Academy Press, 1981: 91.
- [10] 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.
- [11] MENKE K H, STEINGASS H. Estimation of the energetic feed values obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid[J]. Anim Res Develop, 1988, 28: 7-55.
- [12] GETACHEW G, ROBINSON P H, DEPEIERS E J, et al. Methane production from commercial dairy rations estimated using an in vitro gas technique[J]. Anim Feed Sci Technol, 2005, 123/124: 391-402.
- [13] SHIBATA M, TERADA F, IWASAKI K, et al. Methane production in heifers, sheep and goats consuming diets of various hay-concentrate ratio[J]. Anim Sci Technol, 1992, 63: 1221-1227.
- [14] AGUILERA J F, PRIETO C. Methane production in goats given diets based on Lucerne hay and barley[J]. Arch Tierernahr, 1991, 41(1): 77-84.
- [15] KHAN M Y, D C JOSHI. A new simplified open circuit respiration equipment for sheep and goat[J]. Indian J Anim Prod, 1983, 15: 34-36.