

中药制剂发酵前后成分的变化及对肉鸡部分免疫指标和生长的影响

韩春杨, 刘翠艳, 牛钟相*
(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 采用 HPLC 法检测中药制剂发酵前后成分的变化, 通过饲喂肉鸡试验对发酵前后制剂的应用效果进行比较。通过检测分析, 中药中的一些成分经过发酵后含量增加 1~ 4 倍。并且产生了某些新的特征吸收峰, 同时发酵前的几个特征吸收峰消失。肉鸡饲喂试验结果显示, 中药发酵制剂组抗新城疫病毒的抗体效价、免疫器官指数、血细胞中 RBC 数量均高于未发酵制剂组, 差异显著 ($P < 0.05$), 且饲料利用率比未发酵制剂组明显提高。表明中药制剂经过发酵后成分发生了变化, 增加了某些新的药物成分, 应用效果优于未发酵的制剂。

关键词: 中草药发酵制剂; 成分变化; 肉鸡; 生产性能

中图分类号: S853.73

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)11-1223-05

近年来, 中药在动物疾病防治中的应用十分广泛, 发挥了巨大作用。随着中药制剂研究的深入发展, 国内开展了通过微生物发酵手段以改革传统中药炮制方法的研究, 并取得了一定进展^[1-3]。通过微生物的降解作用, 使药物的有效成分、活性物质能最大限度地提取出来, 从而得以增强药效、减少用量、降低原料药的成本。本试验采用具有免疫增强作用的一组中药方剂, 对其进行发酵, 制成中药发酵制剂。利用 HPLC 法对发酵前后成分的变化进行了比较, 并通过肉鸡饲喂试验对中药制剂发酵前后的免疫增强效果等进行了对比, 取得了满意的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 中药制剂: 由黄芪、党参、茯苓、山楂、麦芽和白术组成; 中药发酵制剂系将上述中药制剂进行发酵制成。乙腈(色谱纯); 重蒸水; 磷酸盐缓冲液(pH 3.25); 新城疫 IV 系疫苗(齐鲁动物保健品有限公司生产)。

1.1.2 试验动物 1 日龄艾维茵肉用雏鸡 150 只, 泰安市种鸡厂提供。

1.1.3 主要仪器 Waters515 高效液相色谱仪, 色

谱数据处理: N-2000 双通道色谱工作站; 血液细胞自动分析仪 F-820: 日本希森美康株式会社生产; PHS-2C 型酸度计; 高速离心机等。

1.2 方法

1.2.1 发酵前后成分的检测

1.2.1.1 发酵制剂的制备: 取粉碎的中药制剂 100 g, 加入 200 mL 水, 置于 500 mL 三角瓶中, 121 °C, 15 min 高压灭菌。按照 2% 的接种量接入制备好的菌液, 37 °C 培养 48 h, 备用。

1.2.1.2 待检样品的预处理: 将发酵前后的液体样品分别以 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 备用。

1.2.1.3 液相色谱条件: 色谱柱: 钻石 C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测器: Waters2487 紫外双波长检测器; 流动相: A (pH 3.25 的磷酸溶液), B (乙腈), 二元梯度洗脱, 梯度洗脱条件为: 0~ 5 min, A (%) 10~ 10, B (%) 90~ 90; 5~ 25 min, A (%) 10~ 20, B (%) 90~ 80; 25~ 27 min, A (%) 20~ 30, B (%) 80~ 70; 27~ 38 min, A (%) 30~ 35, B (%) 70~ 65; 38~ 40 min, A (%) 35~ 40, B (%) 65~ 60; 40~ 50 min, A (%) 40~ 40, B (%) 60~ 60, 见表 1; 检测波长: 280 nm; 检测柱温: 25 °C; 灵敏度: 0.8 AUFS; 流速: 1 mL/min; 样品进样量: 5 μL。

1.2.2 动物试验 将 150 只 1 日龄艾维茵肉用雏鸡随机分为 5 组, 每组 30 只。在 2~ 6 日龄和 25~ 30 日龄时分别投药两次, A 组按饲料量 1% 的用量添加中药制剂, B、C、D 组分别按 1%、0.5% 和 0.25% 的用量添加中药发酵制剂, E 组为不添加任何药物的空白对照组, 按常规方法饲养。

收稿日期: 2004-11-04

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2002BA514A-2-1-3)

作者简介: 韩春杨(1972-), 男, 河北人, 硕士生, 主要从事兽医微生物与免疫学研究。E-mail: luckyhey@163.com

* 通讯作者: 牛钟相, E-mail: zxnium@sdau.edu.cn

表1 梯度洗脱的条件
Table 1 Conditions of gradient elution

时间 Time/min	磷酸溶液/ Phosphate solution	乙腈/ Acetonitrile
0	10	90
5	10	90
25	20	80
27	30	70
38	35	65
40	40	60
50	40	60

1.2.3 饲喂效果检测指标

1.2.3.1 新城疫抗体水平检测: 于7、21日龄用新城疫IV系疫苗进行常规免疫, 分别在19和35日龄时检测抗新城疫疫苗抗体水平。测定方法采用β微量法所测定的NDV的血凝抑制(HI)抗体, 结果以log₂表示^[4]。

1.2.3.2 免疫器官指数测定: 饲养至45日龄时扑杀所有鸡只, 采集脾脏、法氏囊, 用滤纸吸取表面的水分后, 用精密天平称重, 根据与体质量之比计算脾脏、法氏囊的器官指数。

1.2.3.3 血细胞测定: 45日龄时翅静脉采血, 每只鸡准确吸取新鲜血20 μL, 置于稀释液中混匀, 用血液分类计数仪进行检测。

1.2.3.4 体质量: 分别于1、7、14、21、28、35、45日龄称重, 观察各阶段鸡体质量增长情况。

1.3 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间采用 *t* 检验法进行检验。

2 结果

2.1 发酵前后成分的检测

发酵前结果见图1, 发酵后结果见图2。由图1、图2可见, 中药发酵制剂与未发酵制剂图谱相比较, 绝大多数特征吸收峰的保留时间是一致的; 在一些具有相同保留时间的特征吸收峰上的物质含量升高, 达到发酵前制剂的1~4倍(如图2中1.973、2.582、19.798、20.932、30.665等处保留时间的吸收峰); 发酵制剂出现了一些新的特征吸收峰(如图2中保留时间在1.565、5.252、10.098、16.865、20.932、27.332、28.065、28.998、31.665、47.965处的吸收峰), 同时有几个原有的特征吸收峰(如图1中保留时间在2.095、3.482、22.523、24.323、46.790的吸收峰)消失了。表明发酵过程中, 经过微生物的降解作用, 某些按照常规炮制方法不能够提取出来的成分可以游离出来, 使得药物成分有所增加, 同时发酵使一些药物成分提取更充分, 从而使得其含量比发酵前升高了很多。

2.2 动物试验

2.2.1 各试验组新城疫疫苗免疫后血凝抑制抗体效价, 结果见表2。由表2可知, 在二免前A、B、C和D组鸡的抗体水平与空白对照组相比差异显著($P < 0.05$)。在二免疫后B组抗体水平明显高于A组、C组和D组, 差异显著($P < 0.05$)。而A组、C组均高于D组, 差异显著($P < 0.05$)。表明发酵制剂在提高机体的体液免疫方面优于未发酵制剂, 并且0.5%的剂量就可以达到未发酵制剂1%用量的效果。

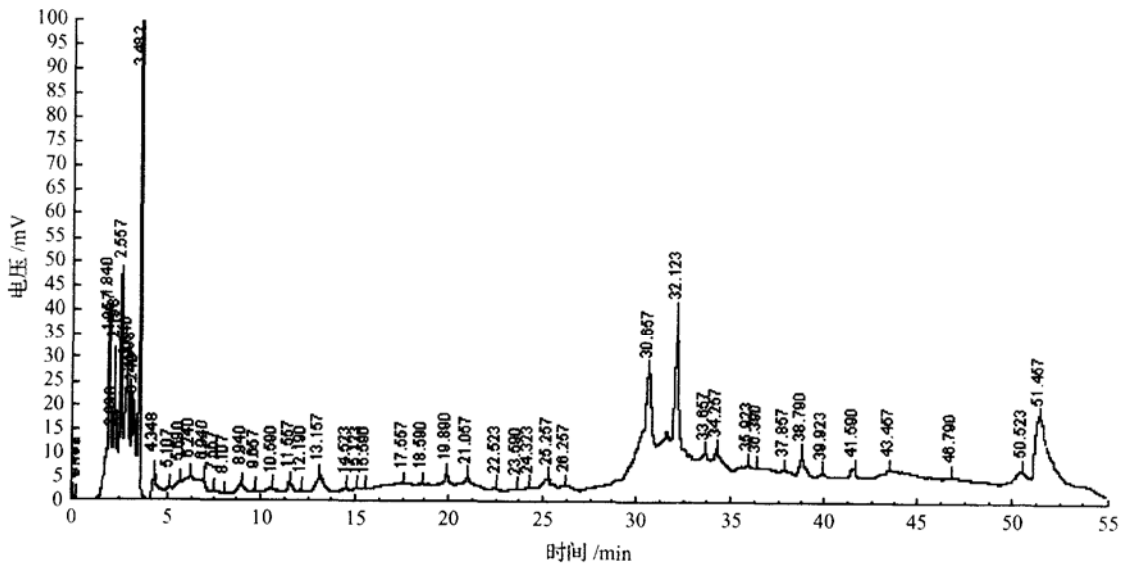


图1 发酵前样品色谱模式

Fig. 1 Chromatogram of pre-fermentation

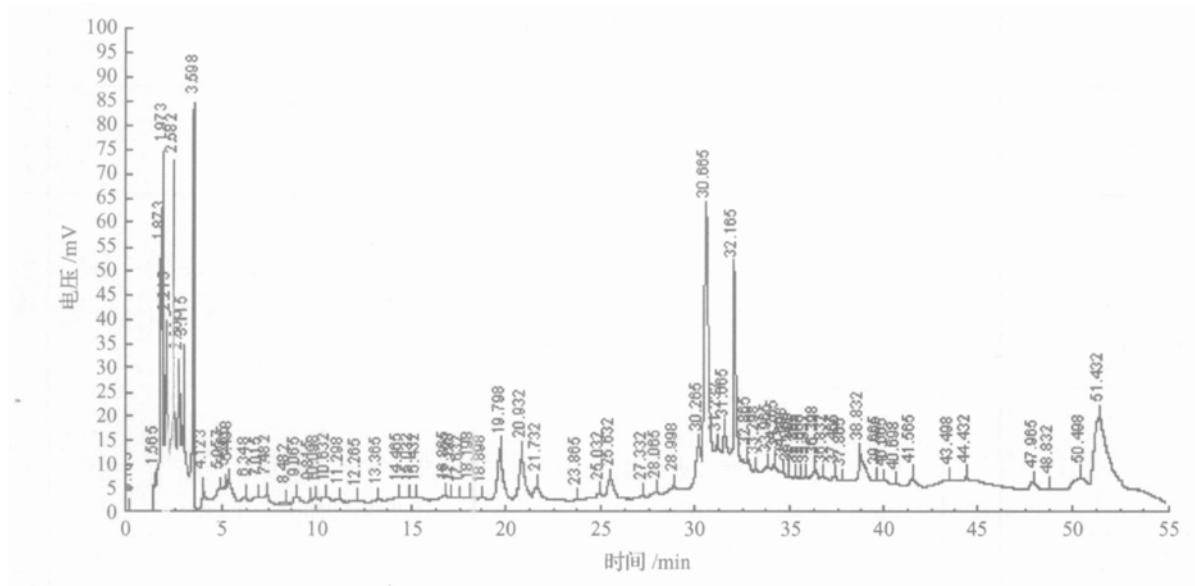


图 2 发酵后样品色谱模式

Fig. 2 Chromatogram of post fermentation

表 2 各组新城疫 HI 抗体效价(\log_2)($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The HI antibody titers of different group

组别 Group	A	B	C	D	E
19d	4.250 \pm 0.130 ^a	4.560 \pm 0.100 ^a	4.250 \pm 0.200 ^a	4.300 \pm 0.200 ^a	3.90 \pm 0.100 ^b
35 d	6.080 \pm 0.400 ^b	6.880 \pm 0.600 ^a	5.850 \pm 0.700 ^b	5.00 \pm 0.600 ^c	5.200 \pm 0.400 ^c

同行数字右肩标有不同字母的表示差异显著,大写字母表示差异极显著,小写字母表示差异显著,下同

Within the same line, data with different letters are different, capital letters mean $P < 0.01$ and small letters mean $P < 0.05$. The same below

2.2.2 免疫器官指数 由表 3 可见, A、B、C 和 D 组法氏囊指数和脾脏指数明显高于 E 组, 差异显著 ($P < 0.05$), B 组和 A、C、D 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。A 组、C 组与 D 组相比差异显著 ($P <$

0.05)。试验表明, 4 个试验组制剂对脾脏和法氏囊这两个免疫器官都具有促进生长的作用, 从而使机体抵抗力增强, 并以发酵制剂组最为突出。

表 3 法氏囊指数和脾脏指数($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Index of Fabricius bursa and index of spleen

组别 Group	A	B	C	D	E
法氏囊指数 Index of Fabricius bursa	1.788 \pm 0.100 ^b	1.965 \pm 0.100 ^a	1.775 \pm 0.200 ^b	1.656 \pm 0.200 ^c	1.273 \pm 0.200 ^d
脾脏指数 Index of spleen	1.479 \pm 0.153 ^c	1.660 \pm 0.200 ^a	1.564 \pm 0.304 ^b	1.457 \pm 0.100 ^c	1.401 \pm 0.100

2.2.3 血细胞计数 由表 4 可知, A、B、C 和 D 组 RBC(红细胞)和 Hb(血红蛋白)水平明显高于 E

组, 差异极显著 ($P < 0.01$)。B 组与 A、C、D 组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

表4 各试验组血细胞计数结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The result of blood cell count

组别 Group	A	B	C	D	E
RBC/($\times 10^6/\text{mm}^3$)	2.24 \pm 0.12 ^b	2.36 \pm 0.16 ^a	2.28 \pm 0.200 ^b	2.22 \pm 0.19 ^b	2.12 \pm 0.12 ^c
Hb/(g/L)	108.17 \pm 1.60 ^b	120.00 \pm 4.00 ^a	111.50 \pm 6.50 ^b	106.00 \pm 2.50 ^b	99.30 \pm 2.85 ^c

2.4 对肉鸡生产性能的影响 由表5可知,5个试验组之间初始体质量没有显著差异,出栏体质量和料肉比A、B、C、D组与E组相比,差异显著($P < 0.05$)。B组和A、C、E组相比差异显著($P <$

0.05),A、C组和D组相比差异显著。表明该中药制剂经过发酵,明显提高了饲料利用率,同时可以降低单纯中药的使用量。

表5 体重增长情况及料肉比($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Growth of the body weight and feed conversion efficiency(gain/feed)

组别 Group	A	B	C	D	E
1日龄体质量 1 d BW/g	55.00 \pm 2.00	57.00 \pm 3.00	56.80 \pm 1.42	56.80 \pm 1.42	56.00 \pm 3.00
45日龄体质量 45 d BW/g	1791.30 \pm 9.50 ^b	1833.89 \pm 7.00 ^a	1800.00 \pm 8.50 ^b	1761.30 \pm 7.00 ^c	1692.00 \pm 8.00 ^d
料肉比 Gain/feed	2.100 ^b	2.040 ^a	2.088 ^b	2.124 ^c	2.211 ^d

3 讨论

3.1 发酵是中药材传统炮制方法之一。早在千余年前,我国已开始用发酵的方法制药,如淡豆豉、沉香曲、五倍子、红曲等都是发酵而得到的药物^{5,6}。这些都是利用微生物具有强大的生物转化能力来实现的。现代发酵过程研究表明,微生物具有氧化、酯化、甲基化、羟基化、还原化等多种能力,中草药经发酵后,其有效成分能被充分分离、提取,使其更具有生物活性,并含有大量的活性酶,服用后能被机体组织细胞迅速吸收,达到祛病、健体、增强免疫调节的功能,更好地发挥中草药这一天然药物的药效作用。同时还可以将某些成分分解转化成新的成分,这些新成分成为增强药理作用或出现新的药理作用的物质基础。因此可以利用其进行发酵制药,从而降低用药成本,提高功效⁷。

3.2 动物试验表明,该制剂经过发酵后,抗新城疫的血凝抑制抗体效价、免疫器官指数、血细胞中RBC水平均高于发酵前的制剂,增重效果(饲料利用率)亦非常明显。法氏囊、脾脏、胸腺的质量可用来评价雏鸡的免疫状况⁸;红细胞不仅运送氧气和二氧化碳,同时也具有识别、黏附、浓缩、杀伤抗原、清除免疫复合物和参与机体免疫调控的功能⁹。本研究表明用微生物发酵处理制得的制剂,在对肉鸡的免疫增强作用和生产性能上均优于未发酵的制剂。由此可知,中药制剂经过微生物发酵处理后,功

效明显增强,在相同剂量条件下,发酵制剂组的免疫功能和饲料利用率明显提高。而且应用0.5%中药发酵制剂即可达到使用1%的中药制剂的效果,但是0.25%的中药发酵制剂效果不如应用1%未发酵中药制剂,表明其间有一定的量效关系。因此该中药制剂经过发酵后,提高了药效,可以明显降低用药剂量,具有较高的经济效益。

3.3 本研究采用HPLC法以梯度洗脱的方式测定了发酵前后制剂的成分变化。由检测结果可知,该中药制剂经过微生物发酵后,出现了一些新的特征吸收峰,同时原有的几个吸收峰消失了,表明微生物在发酵过程中可能将其利用、分解成为其它新的化合物。发酵前后的制剂相比较,具有相同保留时间的一些特征吸收峰的物质含量也有明显升高,达到原来含量的1~4倍。在动物试验中,中草药发酵制剂对机体的免疫力和生产性能有所增强,并且应用50%的中草药的剂量就可以达到原来的效果,可能与这些成分含量的增加有关。但是究竟产生了何种新的物质以及发生作用的机理还有待于进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 王少贤.台湾重视中药科学化及中草药新药开发[J].河北中医,2003,25(2):113.
- [2] 吴志勇.发酵中药-现代生物技术与传统中药配方的结合[J].现代中医药,2003,2:22~27.

- [3] 王兴红, 李祺德, 曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容[J]. 中草药, 2001, 32(3): 267~ 268.
- [4] 徐为燕. 兽医病毒学[M]. 北京: 农业出版社, 1992. 220~ 221.
- [5] 郑利华, 焦素珍. 五倍子发酵炮制简介[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(1): 26~ 27.
- [6] 高 慧, 贾天柱. 神曲的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(8): 491~ 493.
- [7] 郭 芳, 刘秀书, 孟祥琴, 等. 六味地黄发酵液的免疫调节作用[J]. 河北医科大学学报, 2001, 22(2): 72~ 74.
- [8] Rivas A, Fabricant J. Indication of immunodepression in chickens infected with various strain of Marek's disease virus[J]. Avian Dis, 1988, 32: 1~ 8.
- [9] 杜念兴. 兽医免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 31.

Component Changes of Chinese Herb before and after Fermentation and the Effect on Some Immune Indices and Growth Performance of Broiler Chickens

HAN Chunyang, LIU Cuiyan, NIU Zhongxiang*

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: The component changes of Chinese herb before and after fermentation were analysed by HPLC and the efficacy was compared based on their application to broiler chickens. According to chromatographical analysis, the amount of some components in fermented Chinese herb decoction was 1~ 4 times as much as those in non-fermented decoction, and some new absorptive peaks appeared while some specific absorptive peaks in non-fermentative herb disappeared. The results showed that HI titer of anti-ND antibody, index of immune organs and RBC level of erythrocytes in fermented group were all significantly higher ($P < 0.05$) than those in non-fermented group; and the utility rate of fermented fodder increased obviously. It showed that some new components appeared in fermented Chinese herb decoction and its efficacy was better than non-fermented herb.

Key words: fermented preparation of Chinese herb; compositional change; broiler chicken; performance trait

* Corresponding author

2006 年互登启事

期刊名称	邮发代号	刊期	年定价/元	编辑部地址	邮编	联系电话
现代畜牧兽医	8-75	月刊	84.00	辽宁省沈阳市和平区南四经街 143 号	110003	024-23264599
养猪	8-100	双月刊	60.00	辽宁省沈阳市东陵路 120 号	110161	024-88412371
兽药与饲料添加剂	28-180	双月刊	24.00	江苏省南京市北京西路 17 号江苏化工大厦	210024	025-83328117
畜牧与兽医	28-42	月刊	57.60	江苏省南京市卫岗 1 号南京农业大学内	210095	025-84395701
中国养兔	28-85	双月刊	30.00	南京市草场门大街 124 号	210036	025-86263458
肉类工业	自办发行	月刊	60.00	武汉市江岸路 12 号	430011	027-82319036
农村实用技术与信息	38-185	月刊	22.80	武汉华中农业大学	430070	027-87287369
养殖与饲料	38-381	月刊	45.60	武汉市华中农业大学校内	430070	027-87287369
湖北畜牧兽医	38-352	月刊	48.00	武汉市武昌南湖瑶苑 2 号湖北省农科院内	430064	027-87389634
畜禽业	62-184	月刊	66.00	四川省成都市人民南路 4 段 53 号嘉云台乙 8A	610041	028-85252331
四川畜牧兽医	62-43	月刊	60.00	四川成都市武侯祠大街 4 号附 1 号	610041	028-85554305
家畜生态学报	52-112	双月刊	36.00	陕西杨凌西北农林科技大学动物科技学院	712100	029-87091130
黄牛杂志	52-113	双月刊	42.00	陕西杨凌西北农林科技大学	712100	029-87091423
畜牧兽医杂志	52-56	双月刊	42.00	陕西杨凌西北农林科技大学	712100	029-87092806
动物医学进展	52-60	月刊	120.00	陕西杨凌西北农林科技大学动物科技学院	712100	029-87092574
饲料科技	自办发行	月刊		河北石家庄市翟营南大街 385 号	050031	0311-5880833
北方牧业	18-323	半月刊	76.80	河北石家庄市翟营南大街 385 号	050031	0311-5889829