

郑义, 陆辉, 陈晓兰, 等. 三七总皂苷 β -环糊精包合物稳定性研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 183-185.

三七总皂苷 β -环糊精包合物稳定性研究

郑义, 陆辉, 陈晓兰, 秦枫, 朱善元

(江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300)

摘要: 考察免疫佐剂——三七总皂苷(PNS) β -环糊精包合物的稳定性。采用比色法, 以PNS含量为指标, 分别对PNS β -环糊精的包合物和混合物进行强光照射、高温、高湿、恒温加速试验。结果表明: 在光、热、湿等因素影响下, 包合物中PNS含量没有明显变化, 而混合物中PNS含量明显下降, 包合物的热失重百分率比混合物小。说明PNS β -环糊精包合物具有一定的抗光照射性、热稳定性和湿稳定性, 其稳定性明显优于单纯PNS。

关键词: 三七总皂苷(PNS); β -环糊精; 包合物; 稳定性

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0183-03

佐剂近年来发展较快, 多种新型佐剂层出不穷, 目前研究比较多的是黏膜佐剂、纳米佐剂和天然佐剂(如中草药)等。中草药免疫佐剂是一类十分重要的有其独到特点的免疫活性物质, 相对于化学药物免疫增强剂而言, 无毒副作用, 无残留污染, 是今后畜禽免疫增强剂研究的趋势^[1]。人们发现许多中药的活性成分(如苷类、多糖等)具有很好的免疫调节作用, 其中QS-21和ISCOM等已进入临床试验阶段^[2]。已有文献报道采用三七总皂苷(PNS)为主要有效成分制备的免疫佐剂可以显著增强抗原的免疫原性, 对机体的免疫功能有广泛的调节作用, 能诱导Th1、Th2免疫应答^[3-4], 但因PNS具有刺激性、味道苦等特点, 限制了其临床应用, 而选用PNS β -环糊精包合物作为免疫佐剂, 可以有效改善其刺激性和适口性。本研究对PNS包合物进行了稳定性考察, 为开发新型的PNS佐剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

β -环糊精, 购于泰州医药公司; 三七总皂苷提取物, 由江苏省兽用生物制药重点实验室制备; 人参皂苷Rg₁, 购自科翔生物科技有限公司; 5%香草醛溶液(500 mg香草醛溶于10 mL冰醋酸, 新鲜配制); 香草醛、冰醋酸、高氯酸等均为分析纯试剂。主要仪器: Beckman DU640紫外-可见分光光度计; METTLER AE240十万分之一天平。

1.2 三七总皂苷包合物的制备^[5]与鉴定

将 β -环糊精配制成饱和水溶液, 调节pH值为7.0, 50℃下按照投料质量比3:1(β -环糊精:三七皂苷)加入三七皂苷溶解后, 立即用超声波清洗机处理溶解, 于水浴摇床中50℃、220 r/min作用3 h包合。取出蒸干溶剂, 用95%乙醇洗涤, 布氏漏斗抽滤, 干燥, 即得佐剂, 包合物收率为

90.58%。采用红外光谱法进行鉴定。取PNS、 β -环糊精、PNS与 β -环糊精的混合物、PNS与 β -环糊精的包合物适量, 在相同条件下进行红外光谱对照试验。

1.3 方法学验证

1.3.1 对照品溶液的配制 精确称取人参皂苷Rg₁对照品适量, 加甲醇制成1 mg/mL的溶液。

1.3.2 标准曲线的绘制 采用比色法测定PNS含量^[6]。精确移取对照品溶液0、50、100、150、200、250、300 μ L分别置于10 mL的具塞离心试管中, 水浴挥干溶剂; 各加0.2 mL 5%香草醛-冰醋酸溶液、0.8 mL高氯酸, 混匀, 盖塞, 置于60℃水浴中加热15 min后, 放在冰水浴中冷却至室温; 然后加冰醋酸5 mL, 摇匀, 以空白试剂为对照, 于545 nm处测定其吸光度。以吸光度为纵坐标、PNS质量(μ g)为横坐标绘制标准曲线。

1.3.3 精密度试验 重复取对照品溶液50、100、150 μ L, 每个平行2份, 分别测定吸光度, 并计算RSD值。

1.3.4 稳定性试验 取新配制的放置在室温条件下的样品, 按上述方法显色后隔一定时间按“1.3.2”节的方法测定吸收度, 并计算RSD值。

1.3.5 加样回收率 精确称取已知含量的PNS样品18份, 每份650 μ g, 分为3大组, 每组对照和加样组各3份, 3份加样组中分别加入已知浓度80%、100%、120%的Rg₁对照品溶液, 按“1.3.2”节的方法, 于545 nm处测定吸收度, 并计算Rg₁的平均回收率和RSD值。

1.4 包合物中PNS含量测定

精确称30 mg包合物置于10 mL容量瓶中, 加甲醇至刻度, 超声20 min, 冷后用甲醇定容, 过滤, 取续滤液, 稀释后进行检测。

1.5 包合物的稳定性考察^[7]

1.5.1 抗光解性试验 分别称取三七总皂苷包合物和按制备投料比所制得的混合物各若干份, 照射10 d(强度3 000 lx), 于0.1、3.5、10 d时取样, 测定PNS含量。

1.5.2 热稳定性试验 分别称取包合物和混合物各若干份, 密封于玻璃瓶中, 分别于40、60、80℃恒温干燥箱内放置10 d, 于0.1、3.5、10 d时取样, 测定PNS含量。

1.5.3 湿稳定性试验 分别称取包合物和混合物各若干份,

收稿日期: 2012-10-17

基金项目: 江苏高校科研成果产业化推进项目(编号: JHZD09-73)。

作者简介: 郑义(1976—), 女, 江苏泰州人, 硕士, 副教授, 主要从事新兽药的研制工作。E-mail: zysm76@163.com。

通信作者: 朱善元, 博士, 教授, 主要从事病原微生物研究。Tel: (0523)86158001。

置入 2 个密闭器皿中,相对湿度分别为 75% (NaCl) 和 92.5% (KNO₃),室温放置 10 d,于 0、1、3、5、10 d 时取样测定 PNS 含量。

1.5.4 恒温加速试验 分别称取包合物和混合物适量,置于玻璃瓶中,在 40 °C 恒温箱内、相对湿度 75% 条件下放置 3 个

月,于 0、1、2、3 个月各取样测定 1 次。

2 结果与分析

2.1 包合物的红外光谱法鉴定结果
包合物的红外光谱法鉴定结果见图 1。

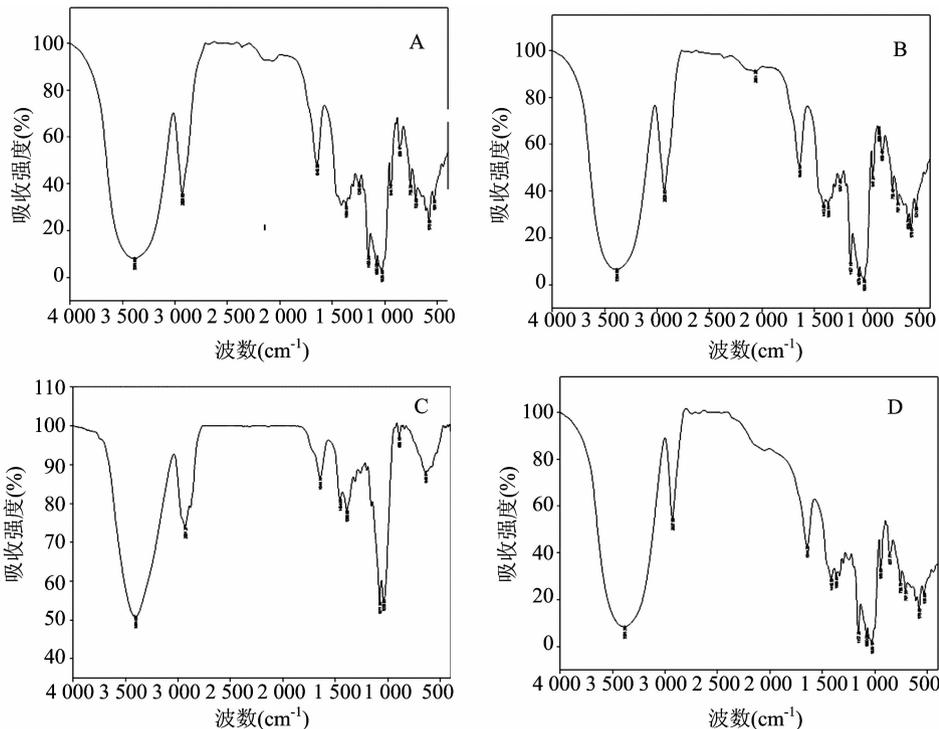


图1 PNS与β-环糊精的包合物(A)、PNS与β-环糊精的混合物(B)、PNS(C)、β-环糊精(D)的红外光谱

由图 1 可知,混合物和包合物均显示出 β-环糊精的特征峰,1 645 cm⁻¹ 处的吸收为 β-环糊精的特征吸收;3 376 cm⁻¹ 处的宽、强吸收峰对应为羟基伸缩振动吸收峰;在 1 080、858 cm⁻¹ 处分别为 β-环糊精的 C—O—C 的反对称伸缩峰和对称伸缩振动峰,表明包合过程并没有破坏 β-环糊精的结构^[8]。混合物的红外光谱只是 β-环糊精与 PNS 红外光谱的简单叠加,说明 β-环糊精与 PNS 只是简单机械混合,并未发生作用;而包合物的图谱中未见 PNS 的特征吸收峰,表明 β-环糊精已经包合了 PNS,产生了屏蔽作用,证明了包合物形成。包合物图谱中也未出现新的吸收峰,表明包合物中无新的化学键产生,它们之间只是分子间力或氢键相互作用。

2.2 方法学验证

2.2.1 标准曲线制备 按“1.3.2”项下方法处理后,得标准曲线方程为 $y = 0.0036x - 0.0264$ ($r^2 = 0.9913$)。y 代表吸光度,x 代表 PNS 质量 (μg)。

2.2.2 精密度试验 表 1 结果表明,6 个测定结果的 RSD 值

表 1 精密度试验结果

对照品	吸光度			RSD (%)
	第 1 份	第 2 份	平均值	
1	0.142	0.272	0.474	1.21
2	0.143	0.276	0.491	
3	0.142	0.287	0.492	
4	0.143	0.278	0.491	
5	0.145	0.281	0.479	
6	0.144	0.279	0.481	

为 1.21%,仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 表 2 结果表明,总皂苷在显色 2 h 内基本稳定,RSD 值为 2.53%。

表 2 稳定性试验结果

时间 (min)	吸光度	RSD (%)
0	0.424 0	2.53
20	0.445 4	
40	0.429 5	
60	0.446 9	
90	0.443 0	
120	0.423 1	

2.2.4 加样回收率试验 表 3 结果表明,平均加样回收率为 98.06%,RSD 值为 1.12%。

表 3 人参皂苷 Rg₁ 加样回收率试验结果

样品	含量 (mg)	添加量 (mg)	测定值 (mg)	加样回收率 (%)	RSD (%)
1	0.639	0.511	1.138	97.61	
2	0.628	0.502	1.125	98.93	
3	0.650	0.520	1.154	96.92	
4	0.644	0.644	1.269	97.05	
5	0.626	0.626	1.248	99.36	
6	0.635	0.635	1.262	98.74	
7	0.649	0.779	1.422	99.17	
8	0.624	0.749	1.361	98.42	
9	0.633	0.760	1.365	96.37	
平均				98.06	1.12

2.3 包合物的稳定性考察^[8]

2.3.1 抗光解性 表4结果表明,包合物抗光解性优于混合物。

表4 PNS β -环糊精包合物和 PNS β -环糊精混合物的抗光解性试验结果

光照时间 (d)	PNS 含量(%)	
	包合物	混合物
0	17.73	17.42
1	17.21	16.89
3	16.98	15.64
5	16.87	15.21
10	16.57	15.01

2.3.2 热稳定性试验 表5结果表明,包合物的热稳定性明显优于混合物。

表5 PNS β -环糊精包合物和 PNS β -环糊精混合物的热稳定性试验结果

温度 ($^{\circ}$ C)	受热时间 (d)	PNS 含量(%)	
		包合物	混合物
40	0	17.73	17.42
	1	16.17	15.05
	3	15.76	14.49
	5	11.53	9.87
	10	11.42	9.67
60	0	17.73	17.42
	1	17.65	17.21
	3	15.43	12.65
	5	11.63	8.67
	10	11.48	8.51
80	0	17.73	17.42
	1	16.76	15.32
	3	16.49	12.68
	5	11.48	7.93
	10	11.21	7.43

2.3.3 湿稳定性试验 表6结果表明,在高湿条件下包合物较混合物稳定。

2.3.4 恒温加速试验 表7结果表明,包合物比混合物稳定,由此推测包合物室温有效期为2年。

3 讨论

采用饱和水溶液电动搅拌法制备 PNS 佐剂,包合物回收率为 90.58%,经红外光谱法鉴定,PNS 与 β -环糊精已形成一种新的物相,包合物确已形成。稳定性试验结果表明,PNS 被 β -环糊精包合后增加了其在光、热、湿条件下的稳定性,

表6 PNS β -环糊精包合物和 PNS β -环糊精混合物的湿稳定性试验结果

湿度 (%)	取样时间 (d)	PNS 含量(%)	
		包合物	混合物
75	0	17.73	17.42
	1	17.11	16.11
	3	16.81	15.43
	5	15.21	14.87
	10	14.32	8.90
92.5	0	17.73	17.42
	1	17.12	16.11
	3	16.92	13.21
	5	16.21	9.98
	10	16.15	6.25

表7 PNS β -环糊精包合物和 PNS β -环糊精混合物的恒温加速试验结果

时间 (月)	PNS 含量(%)	
	包合物	混合物
0	17.73	17.42
1	17.11	14.52
2	16.57	7.98
3	15.43	3.25

降低了其挥发性,包合物的抗光解性、热稳定性和湿稳定性明显高于混合物,可见 β -环糊精包合可有效提高 PNS 的稳定性,为下一步进行 PNS 佐剂临床试验奠定基础。

参考文献:

- [1]吴群彬,陈俊鹏,林树育. 中草药免疫佐剂的研究应用概况[J]. 养禽与禽病防治,2011(10):4-5.
- [2]夏芳,罗满林,郭林,等. 免疫佐剂的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(10):150-152.
- [3]Sun H X, Pan H J, Pan Y J. Haemolytic activities and immunologic adjuvant effect of *Panax notoginseng* saponins[J]. Acta Pharmacol Sin,2003,24(11):1150-1154.
- [4]梁勇,秦枫,唐肖雷. 三七不同部位总皂苷溶血性及体外免疫活性研究[J]. 湖北农业科学,2011,50(23):4905-4907.
- [5]范庆国. 丹皮酚 β -环糊精包合物的制备工艺研究[J]. 安徽中医学报,2009,28(4):73-75.
- [6]郑义,陆辉. 三七总皂苷的测定及提取工艺的优化研究[J]. 南京晓庄学院学报,2008(3):56-58.
- [7]秦冬彦,宋洪涛,郭涛,等. 冰片 β -环糊精包合物的稳定性考察[J]. 中草药,2000,31(4):255-257.
- [8]许清清,田克情,成桂田,等. 维生素 A₁- β -环糊精包合物的制备及其稳定性研究[J]. 河北化工,2009,32(8):9-11.