第 35 卷 第 2 期
2018 年 6 月

原 子 核 物 理 评 论
Nuclear Physics Review

Vol. 35, No. 2
June, 2018

文章编号：1007-4627(2018) 02-0179-10

碳离子束辐照处理对牛至精油微胶囊的缓释特性及抗鸡球虫病活性的影响

陶 蕾[1,2]，梁 妍[3]，周 翔[4]，姜婷婷[4,5]，李雪虎[4]，衣云鹏[6]，辛志君[4]，陆锡宏[4]，赵凤舞[2]，崔 燕[1,†]，梁剑平[1,4,6,†]

(1. 甘肃农业大学，兰州 730070；
2. 兰州职业技术学院，兰州 730070；
3. 兰州大学药学院，兰州 730070；
4. 中国科学院近代物理研究所，兰州 730000；
5. 中国科学院大学，北京 10049；
6. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所，兰州 730050)

摘要： 利用不同剂量的碳离子束辐照处理牛至精油微胶囊，研究对其缓释特性及抗鸡球虫病活性的影响。研究结果表明，通过碳离子束处理的牛至精油微胶囊，其主要活性成分百里香酚和香芹酚含量未发生变化，辐照处理后反应收率及产品的生物活性均提高，其中 400 Gy 剂量处理的牛至精油微囊的收率和生物活性均最高，收率达 68.44%。通过对感染柔嫩艾美耳球虫的小鸡喂食后，其盲肠和十二指肠肿胀明显减轻，血液性内容物明显减少，血便指数在感染的第七天已降为 0，抗球虫指数 (ACI) 达到 179.39。

关键词： 碳离子；牛至精油；微胶囊；柔嫩艾美耳球虫

中图分类号： Q691　　**文献标志码：** A　　**DOI：** 10.11804/NuclPhysRev.35.02.179

1 引言

牛至 (*Origanum vuLgare L.*) 又称止痢草，是唇形科牛至属的一种草本植物，属传统中草药，在我国主要分布于西北、华北至长江以南各地，属于药食同源植物[1, 2]。通过水蒸气蒸馏提取法、超临界流体萃取法等可实现对牛至精油的提取[3, 4]。追溯人类使用牛至油的历史，远在西元前3000 年前，巴比伦人已经将它用于非常广泛的医药用途[5]。在希腊、希腊人当牛至是草药之首并有“山中的圣品”之称和用于烹调用的调料牛至不同，牛至油来自于野生牛至植物，一般生长在希腊、葡萄牙和土耳其等地中海国家[6]。牛至油由蒸汽蒸馏新鲜或干叶而成，因为非常强力，无论内服和外用都需要和初榨橄榄油稀释。牛至油是人类已知的其中一个最强大和最有效的广泛的广谱天然杀菌剂，可以杀死非常多种的细菌，而且不同于抗生素，不会杀死好菌，不会让细菌产生抗药性[7]。同时，牛至油也可以杀死真菌，寄生虫和病毒。可用于外部和内服。它只需要少量，即可有效地杀死细菌，不会有副作用。牛至精油为淡黄色澄清油状液体，含有 30 种以上的天然化合物可以杀菌，其中以香芹酚和百里香酚功能最强大。牛至精油不仅具有抗菌作用，而且具有抗疟疾原虫和球虫的活性，对毒害、柔嫩、变位、堆型以及布氏艾美尔球虫都有效，非常具有作为天然、理想新兽药的潜力[8]。

鸡球虫病是艾美球虫属 (*Eimeria*) 的球虫寄生于肠上皮细胞引起的疾病，以 0.5~2 月龄鸡最易感染，死亡率可达 80%，自然发病多系混合感染，而以某个种占优势。1936 年出现专用抗球虫药以来，已报道的抗球虫药达 40 多种[9]。在 20 世纪 70 年代前所使用的抗球虫药主要为化学合成类药；70 年代早期，随着第一个聚醚类离子载体抗球虫药——莫能菌素的问世，其它同类抗球虫药在70年代后期和 80 年代相继应用于临床。地克珠利是80年代后期上市的抗球虫新药，其主

收稿日期： 2017-11-21；　**修改日期：** 2018-01-16

基金项目： 甘肃省国际科技合作项目 (1504WKCA098)；兰州市科技计划项目 (2016-3-101)；甘肃省自然科学基金项目(1506RJZA293)；中国科学院西部之光人才培养引进计划-“西部青年学者”A 类项目 (Ke-Fa-Ren-Zi[2015] No.77)；中国农业科学院 2018 年重大产出科研选题项目 (CAAS-ZDXT2018008)；甘肃省中药材产业体系项目

作者简介： 陶蕾 (1974–)，女，甘肃兰州人，博士研究生，讲师，从事中兽药开发；E-mail: 1043989953@qq.com

† **通信作者：** 崔燕，E-mail: cuiyan369@sina.com；梁剑平，E-mail: liangjp100@impcas.ac.cn。

要成分为氯嗪苯乙腈，90 年代初进入我国市场，目前国内已能生产[10]。据报道，在防治笼养鸡球虫病的试验中，用莫能菌素 121 mg/kg 对降低鸡的死亡率、病变记分、增加体重和提高饲料转化率方面均优于氨丙啉、克球粉和球痢灵。谢明权等[11]利用鸡胚模型研究了 3 种聚醚类抗生素及 7 种化学抗球虫药对柔嫩艾美球虫第 2 代裂殖子的效果，当拉萨菌素、盐霉素、莫能菌素、杀球灵、常山酮、氯苯胍分别达 350，150，120，200，500 和 700 μg/mL 以及氯吡酚超过 500 μg/mL 时，所有的裂殖子完全丧失活性。蔡玉梅等[12]报道了地克珠利溶液剂防治鸡球虫病的抗球虫指数为 189.6。临床实践证明，不同品种或同一品种的不同个体鸡的遗传特性不完全相同，因而同种抗球虫药在不同个体的鸡抗球虫感染的能力也不完全一致，由于抗球虫药物易产生耐药性，故需要不断研制安全有效的新兽药。

微胶囊技术起源于 20 世纪 30 年代，目前工艺日益成熟，应用范围逐渐扩大，广泛应用于医药、食品等领域[13]。同时该技术能够对药物进行包埋，有效提高天然药物稳定性、降低挥发性和刺激性[14]。常规技术制备的牛至精油微胶囊，虽具有良好的保湿性、流变性和润滑性，但是，临床应用发现该剂型在动物组织中易扩散，易被动物体内的氧化物质或酶降解，很难满足某些特殊情况要求的缓释性和稳定性，限制了牛至精油微胶囊在临床上的应用[15–18]。通过对牛至精油微胶囊进行适当交联，可使牛至精油微胶囊缓释性增强，降解时间延长。目前研究较多的交联方法主要采用高能射线辐照交联反应无需催化剂或引发剂，可获得纯度高且无毒的交联产物，γ 射线直接应用于牛至精油微胶囊交联时，由于能量较高，牛至精油分子链产生大量自由基而断裂，辐照结果往往向降解方向进行[19]。重离子与中性辐射 X, γ 射线和中子等在物理学和生物学上差别很大，也与质量很轻、带负电荷的电子差别很大[20]。重离子在穿越介质过程中具有较高的传能线密度，在其离子径迹上有较大的能量沉积，属致密电离辐射，能够诱发更多的生物损伤，由于其在药物分子与生物分子改性方面的研究，其传能线密度 (LET) 高和独特的电离峰 (Bragg 峰) 可精确控制入射深度和部位等独特优势，而倍受人们的关注，在生命与医药科学研究领域具有重要的位置。综上所述，本研究从牛至精油胶囊制备后使用碳离子辐照进行处理，探讨其牛至精油微胶囊对人工感染鸡球虫病的治疗效果及抗鸡球虫病活性的影响，以期为今后牛至精油微胶囊作为抗球虫新兽药的研发奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料

牛至精油 (分析纯)，华美天然植物油提炼厂生产；β-环糊精(β-CD)(分析纯)，上海山浦化工有限公司提供；无水乙醇 (分析纯)，购自北京化工厂。1 日龄白羽公鸡，甘肃凯悦养鸡场提供，在无球虫条件下饲养至 15 日龄。柔嫩艾美尔球虫 (*Eimeria tenella*) 孢子化卵囊，中国农业科学院兰州兽医研究所寄生虫病研究室赠送。

2.2 分析测定仪器

Agilent1100 高压液相色谱仪系列 (美国)，6890N-5973i 气质联用仪 (美国 Agilent 公司)，HP6890 气相色谱仪与氢火焰离子化火焰检测器 (GC-FID，美国 Agilent 公司)，10 μL 微量进样器，上海高鸽工贸有限公司。Tensor27 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 仪、AVANCE600 核磁共振仪，德国 Bruker 公司；S-4800 场发射扫描电子显微镜 (SEM)，日本 Hitachi High-Technologies 公司。

2.3 辐照方法

辐照实验在兰州重离子研究装置 (HIRFL) 生物辐照终端上进行。初始能量为 80 MeV/u 的碳离子束经过束流管道的镍窗、电离室、空气和降能片后辐照样品 (牛至精油微胶囊)，电离室监测注入量，样品更换和数据获取均由计算机控制，全部过程在室温和大气环境条件下进行，辐照剂量分别为 0，100，200，400，800 Gy，剂量率为 50 Gy/min。

2.4 牛至精油微胶囊的制备

称取 3 g β-CD，用 5 mL，60 ℃ 的水将其溶解，量取 6 mL 牛至精油，用 5 mL 无水乙醇将该牛至精油溶解。然后将 β-CD 的水溶液置于 45 ℃ 的水浴中，在转速为 600 r/min 的条件下，将牛至精油的无水乙醇溶液逐滴滴入到 β-CD 溶液中，搅拌 30 min 后取出，置于 5 ℃ 的冰箱中静置整夜，抽滤，获得牛至精油微胶囊产品，将所得产品放在 HIRFL 生物辐照终端的转盘上，根据不同剂量进行辐照，将辐照后的产品用无水乙醇洗涤 3 次，45 ℃ 真空干燥后得到交联后的微胶囊产品。

2.5 用气质联用仪测定交联前后的牛至精油微胶囊组分

色谱条件：DB-MS 毛细管柱 (30 m×0.25 mm，0.25 μm)，载气为氦气，流速 1 mL/min；进样口温度 260 ℃，分流比为 30:1；升温程序：起始温度 50 ℃

(保留 2 min)，以 8 ℃/min 升至 90 ℃，再以 4 ℃/min 升至 180 ℃，最后以 10 ℃/min 升至 300 ℃。

GC-MS 质谱条件：EI 电离源，电子轰击能量 70 eV；离子源温度 230 ℃；四极杆温度 150 ℃；质量扫描范围 25～450 amu；辅助温度 280 ℃；调谐文件 stune.u；扫描模式 Scan。样品处理过程: 取用 0.5 g 牛至精油微胶囊，加 10 mL 乙醚在 50 mL 圆底烧瓶中加热回流 30 min，固体过滤后，在旋转蒸发仪上蒸馏，去除乙醚。然后通过气质联用仪样品专用膜过滤后，用微量进样针取 0.6 μl 牛至精油注入 GC-MS 进样口，分流比设为 30:1。

2.6　用红外光谱法测定交联前后的牛至精油微胶囊

样品和 KBr 经过干燥处理后，研磨至粒度小于 2 μm，以免散射光影响，然后取适量干燥的 β-CD，辐照前后的牛至精油微胶囊样品约 0.5 mg 在红外灯下充分研磨，再加入约 50 mg 的干燥 KBr 粉末，继续研磨至混合均匀。而后将干燥器中保存的简易模具取出，确认模具洁净。若其表面不洁净，可用棉花沾少许无水乙醇轻轻擦拭 (绝对不可用力，以免模具表面被划伤)，然后在红外灯下干燥，再将混合均匀的粉末置于模具中，用 $(5\sim10)\times10^7$ Pa 压强的油压机将其压成透明薄片，并对牛至精油进行红外光谱扫描，作出红外光谱吸收曲线。

2.7　用扫描电镜法 (SEM) 测定交联前后的牛至精油微胶囊

取少量分散好的未辐照的微囊，和 400 Gy 碳离子束辐照的微囊放于铜片上，干燥后将载有样品的铜片粘在样品座的导电胶带上。对于导电性不好的样品必须蒸镀导电层，通常称为蒸金：将样品座置于蒸金室中，合上盖子，打开通气阀门，对蒸金室进行抽真空。选择好适当的蒸金时间，达到真空度定好时间后加电压并开始计时，保持电流值，时间到后关闭电压，关闭仪器。取出样品后用 SEM 扫描，观察其表面形态特征。

2.8　氢核磁共振 (^{1}H-NMR) 法测定交联前后的牛至精油微胶囊

^{1}H-NMR 法：分别取适量未辐照的微囊，和 400 Gy 剂量碳离子束辐照处理的微囊，以重水 (D_2O) 为溶剂分别溶解，测定它们的 ^{1}H-NMR 谱图。

2.9　牛至精油微胶囊交联前后缓释制剂释放研究

以牛至精油微胶囊交联前后缓释制剂的体外释放 12 h 为研究对象，药物释放度以香芹酚与百里香酚为指标，用高效液相测定其含量，比较释放度。

2.9.1　高效液相色谱条件

流动相：0.05% 磷酸-乙腈 (80：20)，色谱柱：Eclipse XDB C18 柱 (4.6 mm×150 mm，5 μm)，柱温：25 ℃，检测器：DAD，流速：1 mL/min。

2.9.2　对照品溶液的制备

精密称取干燥 (105 ℃) 至恒重的香芹酚、百里香酚对照品适量，加甲醇溶解，制成标准品溶液。

2.10　试验动物的分组与处理

将 70 只 15 日龄雏鸡按体质量随机分成 7 组，包括经过交联后牛至精油微胶囊 (5 个剂量)，感染对照组和健康对照组。15 日龄开始在饲料中添加一定比例的上述药物、牛至精油微胶囊各组添加剂量均按照农业部添加规定量 100 mg/kg。除健康对照组外，其余各组均在 15 日龄时经口感染 *Eimeriatenella* 孢子化卵囊 4.0×10^4/只。然后饲养至 22 日龄。

2.11　药物疗效评定指标和标准

2.11.1　试验鸡测体质量

将全部试验鸡分别于 15 日龄和 22 日龄时逐只测体质量，并按以下公式计算相对增重率：相对增重率=试验组平均增重率/健康对照组平均增重率×100%。

2.11.2　临床和病理学观察

试验期间每日观察各组鸡的精神、食欲、粪便、死亡等情况，并记录结果。对试验期间死亡的鸡进行尸体解剖，观察其病理学变化。

2.11.3　鸡盲肠病变检查

22 日龄时，宰杀全部存活的试验鸡，逐只取盲肠和小肠进行病理检查，按 Johnson 和 Reid 的病变记分方法进行记分，然后按角田清的方法[21]计算病变值：病变值=每组平均病变记分×10。

盲肠病变评分标准：盲肠正常无卵囊为 0 分；有卵囊，盲肠黏膜增厚，有少量散在性出血为 1 分；有卵囊，盲肠黏膜增厚，有明显血液或血液内容物为 2 分；有卵囊，盲肠黏膜增厚，有大量血凝块或血样肠芯为 3 分；有卵囊，盲肠外观呈酱色，明显肿胀，内容物血样为 4 分；因球虫感染死亡也算 4 分。

2.11.4　试验鸡的球虫卵囊检查

用红细胞记数法查卵囊。分别刮取每组试验鸡的盲肠内容物，充分搅拌混匀后用常规方法计数，并计算每克粪便的卵囊数 (O.P.G)，随后按照角田清的方法计算卵囊值。

卵囊值的计算方法：即感染后 7 d 鸡的 O.P.G 值与不给药组鸡的 O.P.G 值的比值小于 1% 时，卵囊值为 0；

http://www.nmrc.com

在 1%~25% 时，卵囊值为 20；在 75%~100% 时，卵囊值为 40。

2.11.5 效果判定

根据各组试验鸡的相对增重率、存活率、病变值和卵囊值，按照 Merck 公司的计算公式计算抗球虫指数 (ACI)：ACI =(相对增重率+存活率)×100−病变值+卵囊值)。

以 ACI 为标准判定其效果：$ACI < 120$ 为无效；$ACI = 120 \sim 160$ 为低效；$ACI = 160 \sim 180$为中效；$ACI > 180$ 为高效。

3 结果与讨论

3.1 GC-MS 气质联用仪鉴定牛至精油微胶囊挥发性成分

以 β-CD 为壁材，碳离子辐照处理牛至精油微胶囊，产品为白色、均匀的小颗粒。GC-MS 鉴定牛至精油微胶囊挥发性成分通过 NIST05 谱库检索结果与人工图谱解析共同确定，以扣除溶剂峰的色谱图全部峰面积作为 100%，按采用峰面积归一化法确定化合物的相对质量分数[22]。 牛至精油微胶囊挥发性化合物种类及其相对含量见表 1，保留指数的计算方法参照文献[23]

表 1 辐照前牛至精油挥发性成分的 GC-MS 分析结果与 NIST05 谱库检索结果

序号	保留时间/min	分子式	化合物名称	相对质量分数/%	匹配度	保留指数	MS 分析与 NIST05 谱库检索结果
1	7.11	$C_{10}H_{16}$	α-侧柏烯	0.11	69	925	相同
2	7.23	$C_{10}H_{16}$	1R-α-蒎烯	0.06	92	932	相同
3	7.61	$C_{10}H_{16}$	檀紫三烯	0.02	75	947	MS
4	7.79	C_7H_6O	苯甲醛	0.03	90	963	相同
5	8.23	$C_{10}H_{16}$	2,6,6-三甲基双环[3.1.1]庚-2-烯	0.88	73	975	MS
6	8.27	$C_{10}H_{16}$	4-亚甲基-1-(1-甲基乙基)-环己烯	0.03	63	976	相同
7	8.51	$C_{10}H_{16}$	β-月桂烯	0.25	45	989	相同
8	9.29	$C_{10}H_{16}$	异松油烯	0.02	94	1 016	相同
9	9.48	$C_{10}H_{14}$	1-甲基-3-(1-甲基乙基)苯	6.48	96	1 031	相同
10	9.71	$C_{10}H_{16}$	D-柠檬烯	6.86	96	10 416	相同
11	10.15	$C_{10}H_{16}$	γ-松油烯	0.03	75	1 053	相同
12	10.43	C_8H_8O	苯乙酮	0.07	89	1 074	相同
13	10.72	$C_{10}H_{18}O$	顺- β-松油醇	0.06	154	1 078	MS
14	11.02	$C_{10}H_{12}$	1-甲基-4-(1-甲基乙基)苯	0.02	93	1 093	相同
15	11.91	$C_{10}H_{16}O$	α-侧柏酮	19.16	91	1 120	相同
16	11.98	$C_{10}H_{16}O$	β-侧柏酮	0.63	59	1 123	相同
17	12.27	$C_{10}H_{16}O$	顺-氧化柠檬烯	0.03	62	1 131	相同
18	13.56	$C_{10}H_{18}O$	牛至醇	0.32	92	1 179	相同
19	14.18	$C_{10}H_{16}O$	二氢香芹酮	0.24	74	1 194	MS
20	14.32	$C_{11}H_2O$	3-十一炔	0.28	61	1 203	MS
21	15.75	C_7H_{12}	3-甲基-1-己炔	6.19	89	1 261	MS
22	16.71	$C_{10}H_{14}O_2$	顺-氧化香芹酮	0.02	76	1 276	相同
23	16.91	C_7H_{16}	4-蓖烯	0.03	71	1 283	MS
24	17.64	$C_{10}H_{14}O$	香芹酚	0.92	85	1 305	相同
25	17.91	$C_9H_{10}O_2$	4-羟基-3-甲基苯乙酮	6.29	91	1 318	MS
26	19.11	$C_{12}H_{16}O_2$	5-甲基-2-(1-甲基乙基)苯酚乙酸酯	0.41	89	1 336	相同
27	19.43	$C_{10}H_{14}O$	百里香酚	0.28	91	1 368	MS
28	21.21	$C_{11}H_{14}O_2$	1,2-二甲氧基-4-(2- 丙烯基)-苯	30.62	96	1 429	相同
29	21.46	$C_{15}H_{24}$	(Z,Z)- α-金合欢烯	0.26	83	1 433	MS
30	22.29	$C_{15}H_{24}$	Z-7,11-二甲基-3- 亚甲基-1,6,10-十二碳三烯	5.41	61	1 469	相同
31	23.31	$C_{15}H_{24}$	香木兰烯	0.08	93	1 491	MS
32	23.49	$C_{15}H_{24}$	(Z,E)-3,7,11-三甲基-1,3,6,10-十二烷四烯	0.02	59	1 502	相同
33	24.21	$C_{11}H_{12}O_3$	2,3-二氢苯并呋喃-3-甲酸乙酯	0.19	72	1 531	MS
34	26.19	$C_{15}H_{24}O$	丁香烯氧化物	2.29	74	1 602	相同
35	26.82	C_7H_{12}	3-庚炔	0.31	82	1 629	MS

http://www.npr.ac.cn

进行。

GC-MS 分析法从辐照前牛至精油胶囊中，共分离出 72 个峰，得到鉴定的有 35 个化合物，占色谱总流出峰相对百分含量的 96.70%。从表 1 可以看出，从牛至精油中共分离鉴定出 35 种挥发性化合物，包括 22 种烃 (59.38%)、6 种酮(25.54%)、2 种酚(10.48%)、2 种酯(0.71%)、2 种醇(0.52%)、1 种醛(0.07%)。其中含量较高的成分包括 1,2-二甲氧基-4-(2-丙烯基)-苯(31.23%)、α-侧柏酮(19.43%)、香芹酚(9.16%)、D-柠檬烯(6.87%)、1-甲基-3-(1-甲基乙基)苯(6.67%)、4-羟基-3-甲基苯乙酮(6.41%)、3-甲基-1-己炔(6.32%)、Z-7,11-二甲基-3-亚甲基-1,6,10-十二碳三烯(5.39%) 和丁香烯氧化物 (2.41%)。本实验从辐照后牛至精油胶囊中测得含量最高的化合物是烯烃类，其相对质量分数为 47.23%，包 1,2-二甲氧基-4-(2-丙烯基)-苯(30.62%)、D-柠檬烯(6.86%)、Z-7,11-二甲基-3-亚甲基-1,6,10- 十二碳三烯 (5.41%)、丁香烯氧化物 (2.29%) 和 α-蒎烯 (0.89%) 等。

先用乙酸乙酯超声提取，浓缩后经 PSA 和无水硫酸钠的净化，然后对不同的样品分别进行 6 次测定，结果见表 2。牛至精油微胶囊经过不同剂量的碳离子束辐照处理后，将其中的香芹酚和百里香酚用乙酸乙酯超声提取 95 min 并通过 PSA 分散固相萃取净化，然后用 GC-FID 测定。在 25~1 200 μg/mL 的浓度范围内，香芹酚和百里香酚的峰面积与其浓度呈线性相关 ($R \geqslant 0.998$)，香芹酚和百里香酚检出限为 12 μg/kg，方法回收率在 62.1%~68.44%，相对标准偏差为 1.51%~4.21%。以上试验的相对标准偏差均小于 3.2%，表明该方法具有良好的精密度，能够满足不同剂量辐照后的牛至精油微胶囊中香芹酚和百里香酚的测定。通过选取 1 200，600，300，150，75 和 37.5 μg/mL 6 个点，考察了在此范围内香芹酚和百里香酚的线性情况。香芹酚和百里香酚的线性方程分别是 $Y=23\,986x-45\,345$，$R^2=0.998$，说明在 1 200 μg/mL 到 37.5 μg/mL 的范围内，香芹酚和百里香酚的浓度与仪器响应呈良好的线性相关。以仪器噪声 2.5 倍计算，香芹酚和百里香酚的检出限为 12 μg/kg。

表 2　辐照后牛至精油胶囊制备结果—香芹酚和百里香酚的质量分数和得率

辐照剂量/Gy	香芹酚/%	百里香酚/%	收率/%
0	0.502	0.201	62.11
100	0.503	0.201	64.77
200	0.503	0.201	65.25
400	0.502	0.200	68.44
800	0.501	0.200	65.16

3.2　碳离子辐照后牛至精油微胶囊的红外光谱分析支化度

各种基团的振动频率 (基团频率) 及其位移规律，即可利用基团振动频率与分子结构的关系来确定吸收谱带的归属，确定分子中所含的基团或键，进而由其特征振动频率的位移、谱带强度和形状的改变，来推定分子结构。辐照效应中不饱和度的变化是常见的现象，它和交联反应有一定关系。因此也是表征交联的一种方法，不饱和度可通过红外谱仪测定。

β-CD 牛至精油微胶囊的红外光谱分析如图 1 所示。β-CD 是由 7 个葡萄糖分子组成的环状中空分子，若其成功交联牛至精油形成包埋物，只能是 O-H 键发生作用。3 670~3 230 cm^{-1} 为 O-H 键的伸缩振动吸收峰，1 420~1 260 cm^{-1} 为 O-H 键的弯曲振动吸收峰。β-CD 中，O-H 键的特征伸缩振动吸收峰为 3 388 cm^{-1}，而在交联图 1(c) 中，这个特征峰增加到了 3 389 cm^{-1}；另外，β-CD 中，O-H 键的特征弯曲振动吸收峰为 1 433 cm^{-1}，而交联图 1(c) 中相应的特征峰增加到了 1 437 cm^{-1}。羟基与氢键的结合导致了振动频率下降，红外吸收峰向长波移动，并且羟基与氢键结合强度越大，长波移动越严重。未进行辐照交联的红外谱图 1(d) 明显区别于交联的谱图。由此可见，β-CD 将牛至精油交联成功即已经成功制得交联的 β-CD /牛至精油微胶囊。此外，经过碳离子处理，其分子链结构中的一部分主链或侧链被碳离子辐照切断，产生一定数量的游离基，这种游离基彼此间结合形成交联链，导致分子质量增加，使具有线性状分子结构的大分子化合物转变成具有网状大分子结构的微胶囊，提高了微胶囊的稳定性及体内缓

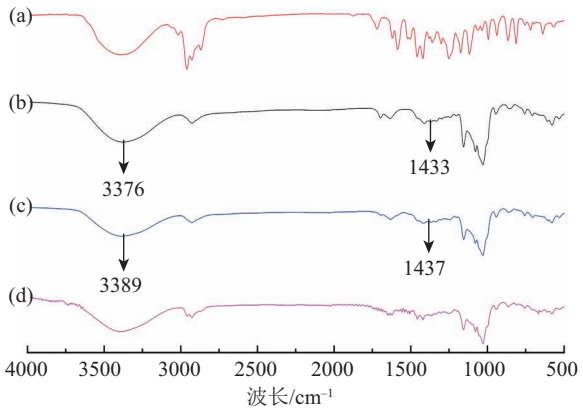

图 1　(在线彩图) 辐照后牛至精油微胶囊分子链结构的红外光谱表征

(a) 牛至精油；(b) β-CD 辐照；(c) 辐照后牛至精油微胶囊；(d) 牛至精油微胶囊的红外光谱。

释性等，微胶囊的生物活性随辐照剂量的增加而增大，但到一定剂量后，就不会提高了，反而会影响药物的活性成分的含量[24–26]。碳离子辐照必然会产生大分子自由基、小分子自由基等，要使这些自由基之间的反应朝着有利于我们所期望的交联方向发展，必须充分考虑大分子自由基的活动性，自由基之间的距离等因素，适当地改变浓度、剂量从而达到交联的目的。通过碳离子辐照交联克服了常规方法制备的牛至精油微胶囊包埋率较低，重现性差的问题，为制备植物精油微胶囊提供了一种全新的方法。

3.3 扫描电镜法 (SEM) 观察交联前后的牛至精油微胶囊形态特征

碳离子辐照交联作用致使微囊晶格排列发生变化，产生形态学差异。如图 2 所示，未辐照的微囊、通过 400 Gy 处理的微囊的电镜行为有明显不同。未辐照的微囊表面疏松，而通过 400 Gy 处理的微囊表面光滑，可能是精油与环糊精聚合过程中形成了多个支化点，因此得到了具有较好亲合度、良好稳定性的产物。辐照处理过程中发生交联反应，同时微囊晶格度有所下降，在很高剂量时可变成完全无定形高分子。同时，实验结果表明交联还会引起结晶形态的变化。

碳离子束作用在微囊上，引起聚合物发生交联与降解。两者是共同存在的动态过程，要使得反应朝着我们所需要的交联或者降解的方向发展，必须深入研究影响该过程的因素。实验表明，微囊晶格排列、温度及辐照剂量等，均是影响辐照交联的重要因素。高分子链结构对辐射化学引发的化学变化有特别大的影响，由于聚合物链具有刚性特性，有时仍然不能出现交联。温度变化主要影响高分子链的活动能力。因为当聚合物为凝聚态时，大分子自由基可动性很小，它们必须通过物理扩散或化学接力使两个大分子自由基运动到临近可以发生反应的位置。提高温度,有利于高分子链的运动，自然也使大分子自由基的可动性增加，因而有利于交联。碳离子束辐射交联反应主要靠高分子链自由基复合，而这种自由基复合直接取决于高分子链的活动能力。温度升高，有利于分子链的活动能力，即有利于交联反应。

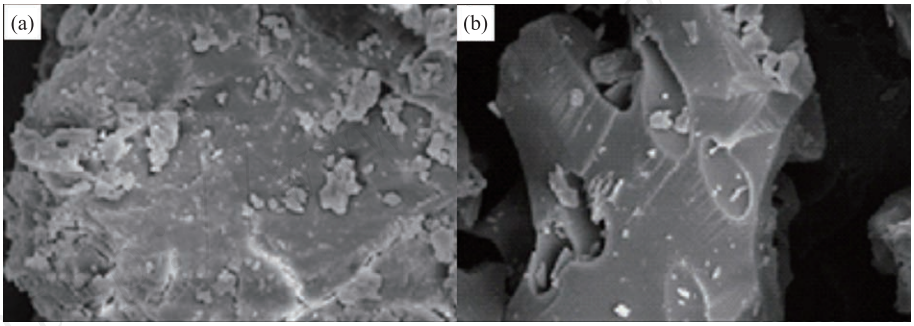

图 2 重离子辐照交联作用致使微囊晶格排列变化
(a) 未辐照的微囊; (b) 400 Gy 辐照的微囊。

3.4 ^{1}H-NMR 法测定重离子辐照后牛至精油微胶囊峰形变化

以 D_2O 为溶剂分别溶解辐照前后牛至精油微胶囊，测定它们的 ^{1}H-NMR 谱图。如图 3 所示，牛至精油微胶囊受辐照处理的影响均发生位移。在辐照后牛至精油微胶囊的 ^{1}H-NMR 谱图中出现了 6 组新的化学位移，其中高场区化学位移值 (δ_H) 约在 0.88~2.26 出现的 5 组新峰是牛至精油 α-H 原子，而化学位移值 (δ_H) 在 5.31 时，出现的新峰是牛至精油上的 α-H 原子。以上证据都能证明 β-CD 中含有 β-CD。除此以外，还可以通过 β-CD 的化学位移变化说明牛至精油已经包覆进入 β-CD 的空腔内。包合物的 ^{1}H-NMR 谱图中可以看出 β-CD 的化学位移发生了明显的变化。首先，牛至精油和 β-CD 空腔内的 H-3, H-5 作用，使得其化学位移均发生了变化，向低场移动，说明客体分子进入了空腔内部，且客体分子插入较深，甚至位于空腔小口端的 H-6 也发生化学位移。同时其他峰也都有所不同，位于 β-CD 分子空腔外

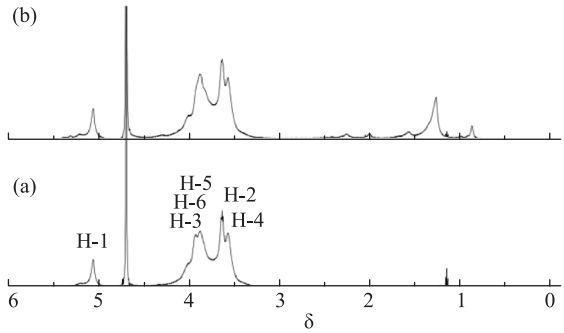

图 3 ^{1}H-NMR 法测定的峰形谱图
(a) 未辐照处理精油微囊; (b) 400 Gy 辐照处理后精油微囊。

部的 H-1, H-2, H-4 也发生化学位移，这进一步证明牛至精油已经进入到 β-CD 内，形成了目标微胶囊。^{1}H-NMR 法是一种运用较为广泛的分析检测和验证的方法，如图 3 所示，图中化学位移值 (δ_H) 约在 3.55～4.00 的吸收峰为 β-CD 氢的化学位移，化学位移值 (δ_H) 在 4.02、3.97 (双峰) 时，为 β-CD 与精油发生交联反应后出现的新峰，说明发生了交联反应从而出现了新的羟基峰；当化学位移值 (δ_H) 为 5.15 (单峰) 时，为碳链上 -OH 的峰，所以出现谱图上的峰形。

3.5　碳离子辐照处理前后牛至精油微胶囊缓释制剂释放度比较

取同一批碳离子辐照处理前后的牛至精油微胶囊，精密称重微胶囊。按照《中国药典》附录 XD 释放度测定第一法：以 1 000 mL 水为溶出介质，转速 100 r/min，温度 (37.0±0.5) ℃；转篮进入释放池计时，于 12 h 取样，取样 10 mL (同时补充相同温度体积的水)。其中，5 mL 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，通过测定，计算 12 h 的累积释放度。

从碳离子辐照处理前后牛至精油微胶囊缓释制剂释放度的数据差异可以看出 (表 3)，经过不同剂量辐照处理后，牛至精油微胶囊的人工胃液释放度降低，且辐照剂量与释放度降低成相关性，说明经过碳离子辐照处理后的制剂具有明显的缓释作用。

表 3　牛至精油微胶囊在人工胃液释放度结果

辐照剂量/Gy	香芹酚%	百里香酚%	累积释放度%
0	0.495	0.198	98.74
100	0.473	0.189	94.13
200	0.447	0.178	88.87
400	0.444	0.177	88.44
800	0.483	0.171	85.51

3.6　重离子辐照前后牛至精油微胶囊临床药效试验

接种球虫后 3 d，除健康对照组外其他试验组鸡均表现出不同程度的临床症状，如采食量减少、羽毛蓬乱、两翼下垂、缩头缩颈、闭眼昏睡、不愿走动、离群呆立、排出血便等。接种球虫后 4 d，感染对照组鸡排出大量的血便，所有给药组试验鸡的血便明显减少，精神状况和采食量明显好转，整个试验过程中各组鸡均未出现死亡 (图 4)。

辐照处理后牛至精油微胶囊临床药效试验表明 (图 4)，纯度为 1.32% 的精油按照 80 mg/kg 饲料添加给药可以明显提高试验鸡的增重率，对人工接种球虫染发病的试验鸡有很好的治疗效果。碳离子处理后牛至精油微胶囊在纯度和剂量都很低的情况下表现出良好的抗球虫效果，且作为一类中药组分，具有成本低廉、安全高效和绿色环保的特点，有望成为新型抗球虫药物。然而，辐照处理后牛至精油如何发挥抗球虫作用，对其它种属的鸡球虫病和其它动物的球虫病是否同样具有抑杀作用，还有待研究。另外，今后借助现代分离纯化手段，获得纯度更高的牛至精油，进一步探讨其对鸡球虫病的防治作用，将有助于解决球虫耐药性和加快新型抗球虫药物的研发。

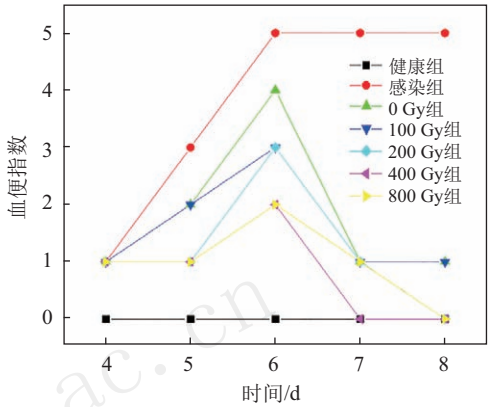

图 4　(在线彩图) 感染后4～8 d血便指数

3.7　病理解剖学变化及牛至精油微胶囊的抗球虫效果

如图 5 所示，试验鸡于 22 日龄全部扑杀，病理解剖发现，健康对照组鸡所有脏器均正常；感染对照组鸡盲肠和十二指肠显著肿胀，内含大量血样内容物；所有给药组试验鸡盲肠和十二指肠尽管也出现肿胀、血样性内容物，但病变程度明显减轻，试验鸡其他脏器未见明显眼观病变。

综合试验鸡的临床症状和病理解剖学变化，通过相对增重率、存活率、卵囊值和病变值等指标计算 ACI，结果证明，通过碳离子辐照处理后牛至精油微胶囊的 ACI 均在 160～180，具有中等抗球虫效力，而未辐照的精油微胶囊的 ACI 均在 151.81，属低抗球虫效力。说明通过重离子辐照交联后，体内具有一定的缓释作用，抗球虫指数提高，但辐照剂量大于 800 Gy 时，精油的化学成分可能会遭到破坏 (表 4)。

我国发现的鸡球虫有柔嫩艾美球虫 (*E.tenella*)、毒害艾美球虫 (*E.necatrix*)、堆形艾美球虫 (*E.acervulina*)、巨型艾美球虫 (*E.maxima*)、哈氏艾美球虫 (*E.hagani*)、和缓艾美球虫 (*E.mitis*) 和基前艾美球虫 (*E.praecox*) 等。本试验在鸡已感染柔嫩艾美耳球虫 (*E.tenella*) 的情况下，观察了不同辐射剂量下牛至精油微胶囊的抗球虫药的防治效果。试验结果表明，对已感染球虫的鸡给予抗球虫药，可减少血粪，延缓血粪出

http://www.npr.ac.cn

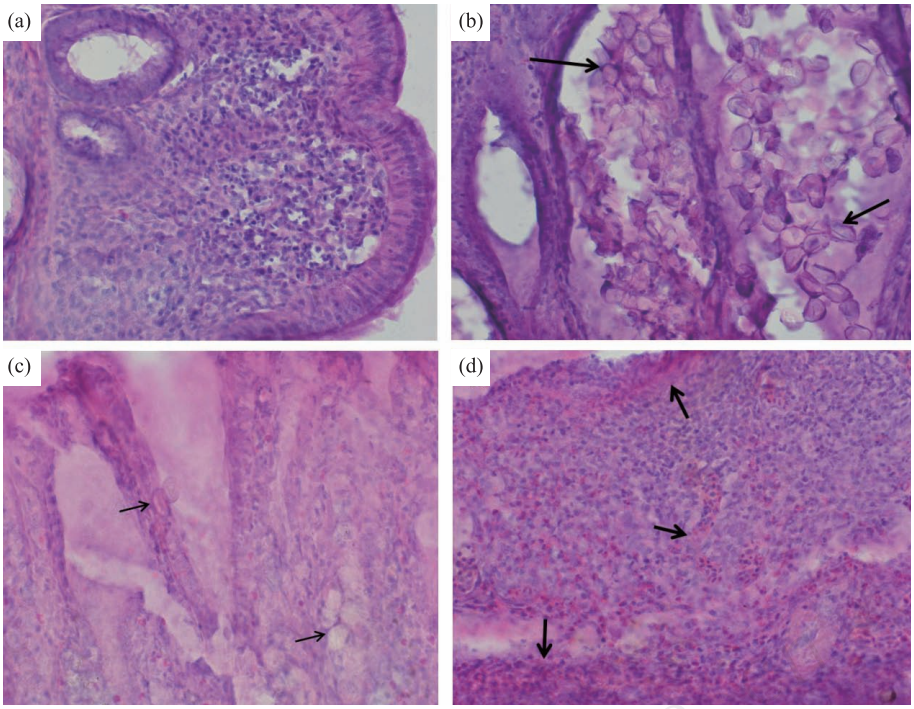

图 5 (在线彩图) 小肠病理切片图

(a) 空白对照组小肠病理切片：视野中并未发现球虫卵囊，肠结构正常，上皮细胞无变性脱落，固有层未见充血，肠腺体结构也正常；(b) 感染组小肠病理切片：固有层发现大量球虫卵囊，固有层充血、出血，肠长皮细胞几乎全部变性脱落，肠腺体消失且被卵囊占据；(c) 400 Gy 组小肠病理切片：固有层零星可见几个球虫虫卵；(d) 400 Gy 组小肠病理切片：组肠上皮细胞变性脱落。

表 4 牛至精油微胶囊的抗球虫效果

辐照剂量/Gy	平均始重/g	平均末重/g	平均增重/g	存活率%	相对增重率%	病变值	卵囊值	ACI	判断结果
800	93.55	182.23	88.68	100%	95.56	21	5	169.56	中效
400	96.23	188.46	92.23	100%	99.39	15	5	179.39	中效
200	96.98	181.67	84.69	100%	91.26	19	5	167.26	中效
100	96.89	179.68	82.79	100%	89.21	21	8	160.21	中效
0	99.79	182.21	82.42	100%	88.81	27	10	151.81	低效
感染对数	98.19	150.76	52.57	100%	56.65	33	40	–	–
健康对数	96.31	189.11	92.80	100%	100	–	–	–	–

现的时间，防止体重急剧下降，具有重要的临床价值。

4 结论与展望

本文研究了不同剂量的碳离子束处理对微胶囊的缓释特性及抗鸡球虫病活性的影响。结果表明：经 400 Gy 辐照处理的牛至精油微囊收率和生物活性均最高，收率达 68.44%，从释放度的差异可以看出，经 400 Gy 剂量处理后，牛至精油微胶囊的人工胃液释放度明显降低，说明经过碳离子处理后，该制剂具有明显的缓释作用。通过对感染柔嫩艾美耳球虫的小鸡喂食后，其盲肠和十二指肠肿胀明显减轻，血液性内容物明显减少血便指数在感染的第七天已降为 0。 抗球虫指数 (ACI) 达到 179.39。利用不同剂量碳离子束对牛至精油微胶囊进行辐照处理，不仅得到较理想的结果，而且创新了一种制备植物精油微胶囊的方法，同时也为该类药物的研制开拓了一种新的研发思路。

新药物创制的统计发现，在具有治疗作用的活性化合物中，超过 40% 化合物不能制成合适的制剂从而限制其应用[27]。碳离子束与药物靶标的相互作用是一个十分复杂的过程，主要包括电离作用、激发作用、散射作用、吸收作用等，其主要过程就是将带电粒子注入到药物靶标内，带电粒子同靶材料中的电子和原子发生一系列的碰撞，这一过程随着离子能量的逐渐降低而变化。当入射离子的能量较高时，药物分子或原子主要发生非弹性碰撞，使药物分子发生电离或激发，导致药物分子电离而发生交联。在下一步工作中，将对低能重离子在化合药物中辐照的效应进行研究，从而筛选出新的药物有效部位及骨架等；重点关注当重离子能量损失达

到峰值即 Bragg 峰时，对靶分子发生变化或结合成为大分子的概率是否最大。

总之，碳离子束对药物分子的处理作用包括能量传递、质量沉积、电荷中和与交换等综合作用，最终导致药物分子之间的序列和结构发生改变。通过碳离子束处理牛至精油微胶囊，不仅增加了该药物的缓释作用，使其分子间化学键很好地结合，而且在鸡的体内也可以非常好地吸收，提高了微胶囊的抗球虫活性。由于类似研究工作报道较少，且受制于碳离子束流的特性，因此前期工作还需要进行更系统的研究，这有助于解决球虫耐药性和加快新型抗球虫药物的研发及产业化应用。

参考文献：

[1] HAN Fei, LI Jin, PAN Xiaoxiao, *et al.* Chinese Journal of New Drugs, 2015, **3**(6): 303. (in Chinese)
(韩飞, 李瑾, 潘悄悄, 等. 中国新药杂志, 2015, **3**(6): 303.)

[2] HE Lanhua. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2004, **36**(5): 22. (in Chinese)
(何兰花. 畜牧与兽医, 2004, **36**(5): 22.)

[3] LI Jianxin, SUN Yuqing, GAO Xueqin, *et al.* Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, **39**(5): 3070. (in Chinese)
(李建新, 孙于庆, 高雪琴, 等. 安徽农业科学杂志, 2011, **39**(5): 3070.)

[4] HOU Caixia, LI Shufen. Chemical Industry and Engineering Progress, 2007, **26**(1): 42. (in Chinese)
(侯彩霞, 李淑芬. 化工进展, 2007, **26**(1): 42.)

[5] SHU Xiulin, SHI Qinshan, OUYANG Yousheng, *et al.* Biotechnology, 2006, **16**(6): 89. (in Chinese)
(疏秀林, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 生物技术, 2006, **16**(6): 89.)

[6] WANG Xinjie, CHEN Jinmei, LI zhu, *et al.* Journal of Scientific Research, 2015, **10**(62): 9. (in Chinese)
(王鑫杰, 谌京梅, 李竹. 科研, 2015, **10**(62): 9.)

[7] WANG Dan, ZHOU Caiqiong. Science and Technology of Food Industry, 2014, **35**(1): 349. (in Chinese)
(王丹, 周才琼. 食品工业科技, 2014, **35**(1): 349.)

[8] LIU Guangfa, WANG Jianqing, ZHAO Yazhu. Packaging Engineering, 2012, **33**(3): 19. (in Chinese)
(刘光发, 王建清, 赵亚珠. 包装工程, 2012, **33**(3): 19.)

[9] XIAO Shizhong, MIAO Yunqing. Poultry Husbandry and Disease Control, 2000(3): 10. (in Chinese)
(肖世忠, 苗云清. 养禽与禽病防治, 2000(3): 10.)

[10] YIN Peiyun, LIN Kunhua, ZHANG Weiwei, *et al.* Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1986, **12**(5): 2. (in Chinese)
(殷佩云, 林昆华, 张伟薇, 等. 中国兽医杂志, 1986, **12**(5): 2.)

[11] XIE Mingquan, WU Huixian, ZHANG Jian, *et al.* Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 1994, **2**(1): 22. (in Chinese)
(谢明权, 吴惠贤, 张健, 等. 中国动物传染病学报, 1994, **2**(1): 22.)

[12] CAI Yumei, WU Shaoqiang. Chinese Veterinary Science, 2000, **30**(1): 29. (in Chinese)
(蔡玉梅, 吴绍强. 中国兽医科技, 2000, **30**(1): 29.)

[13] YU Lu, Tan Shuming, Wang Beibei, *et al.* (Science and Technology of Food Industry, 2013, **34**(6): 31(in Chinese).
(余露, 谭书明, 王贝贝, 等. 食品工业科技, 2013, **34**(6): 31.)

[14] CHEN Yan, CHEN Jiluan, TIAN Jinhu, *et al.* Food Industry, 2014, **35**(4): 32. (in Chinese)
(陈燕, 陈计峦, 田金虎, 等. 食品工业, 2014, **35**(4): 32.)

[15] XU Jing, LIU Huan, XIA Guanghui, *et al.* Food Science, 2014, **35**(14): 82. (in Chinese)
(徐晶, 刘欢, 夏光辉, 等. 食品科学, 2014, 35(14): 82.)

[16] SONG Hongtao, GUO Tao, ZHAO Minghong, *et al.* Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, **33**(6): 500. (in Chinese)
(宋洪涛, 郭涛, 赵明宏, 等. 中草药, 2002, **33**(6): 500.)

[17] WANG Di, XU Hui, WANG Zhang Gui, *et al.* Food Science, 2013, **34**(6): 60. (in Chinese)
(王娣, 许晖, 汪张贵, 等. 食品科学, 2013, **34**(6): 60.)

[18] LI Wenyu, LI Peiguo, ZHANG Yanying, *et al.* Chin J vet Sci, 2011, **31**(3): 449. (in Chinese)
(李蕴玉, 李佩国, 张艳英, 等. 中国兽医学报, 2011, **31**(3): 449.)

[19] CHEN Shenjun, ZHANG Liye. Journal of Beijing University of Chemical Technology: Natural Science, 2009, **36**(3): 46. (in Chinese)
(陈森军, 张丽叶. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2009, **36**(3): 46.)

[20] WEI Zengquan. Acta LaserBiology Sinica, 2003, **12**(5): 321. (in Chinese)
(卫增泉. 激光生物学报, 2003, **12**(5): 321.)

[21] WANG Weiwei, WANG Xinzhuang, ZHANG Baolong, *et al.* Acta Griculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2009, **18**(6): 56. (in Chinese)
(王伟伟, 王新庄, 张宝龙. 西北农业学报, 2009, **18**(6): 56.)

[22] ZHU Bin, CHEN Xiangwei, LIU Yinxin. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007, **30**(8): 1038. (in Chinese)
(朱斌, 程向炜, 刘迎新. 中药材, 2007, **30**(8): 1038.)

[23] CHOI H S, KYUNG C. Flavor and Fragrance Journal, 2008, **23**: 58.

[24] DENKBAS E B, KILICAY E, BIRLIKSEVEN C, *et al.* Reactive & Functional Polymers, 2002, **50** (3): 225.

[25] PENICHE H, OSORIO A, ACOSTA N, *et al.* Journal of Applied Polymer Science, 2010, **98**(2): 651.

[26] LAI C. Separation Science & Technology, 2012, **47**(4): 641.

[27] LI Puwang, WANG Tichao, ZHENG Peng, *et al.* Carbohydrate Polymers, 2011, **85**: 698.

http://www.nbs.ac.cn

Effect of Using Carbon-ion Beam Irradiation on Sustained-release Characteristic and Anti-coccidial Activity of Oregano Essential Oil Microcapsules

TAO Lei[1,2], LIANG Yan[3], ZHOU Xiang[4], JIANG Tingting[4,5], LI Xuehu[4], YI Yunpeng[6], XIN Zhijun[4], LU Xihong[4], ZHAO Fengwu[2], CUI Yan[1,†], LIANG Jianping[1,4,6,†]

(*1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China*;
2. Lanzhou Vocational Technical College, Lanzhou 730070, China;
3. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;
4. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;
5. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
6. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The purpose of this study is using different doses of carbon ion beam irradiation on oregano essential oil microcapsules, to investigate function of control release and anticoccidial activity in chickens. The results showed that the content of main components in oregano essential oil microcapsules after carbon ion beam irradiation, thymol and carvacrol, have little change. Moreover, it can obtain more object products and better bioactivity after the irradiation treatment. Among these different doses of irradiation, our findings showed that Microcapsule groups with 400 Gy dose irradiation showed the highest yield (68.44 %) and the best anticoccidial activity. After feeding chickens infected with *Eimeria tenella*, the swelling of caecum and duodenum were significantly mitigated and blood contents were also significantly reduced. The bloody stool index of chickens was as low as zero on the seventh day of infection, and the anticoccidial index (ACI) is 179.39.

Key words: carbon-ion; oregano essential oil; microcapsule; *Eimeria tenella*;

http://www.pnr.ac.cn

Received date: 21 Nov. 2017; **Revised date:** 16 Jan. 2018

Foundation item: International S&T Cooperation Program of Gansu Province, China (1504WKCA098); Science and Technology Project of Lanzhou, China (2016-3-101); Natural Science Foundation of Gansu Province, China (1506RJZA293); CAS "Light of West China" Program (Ke-Fa-Ren-Zi [2015] No.77); CAAS Topic Selection Project for Major Output in 2018 (CAAS-ZDXT2018008); Project of Traditional Chinese Medicinal Materials Industrial System in Gansu

† **Corresponding author:** CUI Yan, E-mail: cuiyan369@sina.com; LIANG Jianping, E-mail: liangjp100@impcas.ac.cn.