

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00813200.3

[51] Int. Cl.

A61K 36/287 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/36 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 2 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1240403C

[22] 申请日 2000.8.11 [21] 申请号 00813200.3

[30] 优先权

[32] 1999. 9. 30 [33] US [31] 60/157,194

[86] 国际申请 PCT/CA2000/000931 2000.8.11

[87] 国际公布 WO2001/022977 英 2001.4.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.21

[71] 专利权人 要素的研究与开发技术有限公司

地址 加拿大艾伯塔

[72] 发明人 R·J·盖勒 R·E·巴顿

J·V·斯拉玛 C·C·张

审查员 程心 F

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐晓峰

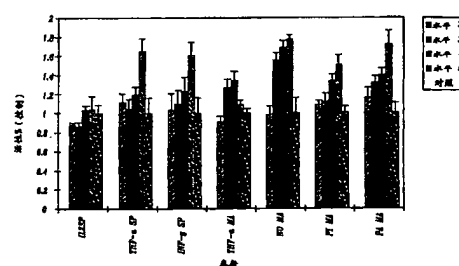
权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图 8 页

[54] 发明名称

紫松果菊属组合物和制备方法

[57] 摘要

在一个方面中, 本发明提供了包括标准化量的至少两种紫松果菊属成分的紫松果菊属组合物。本发明的紫松果菊属组合物更优选包括标准化量的至少三种紫松果菊属成分, 它们是菊苣酸、紫松果菊属烷基酰胺类和紫松果菊属多糖类。在另一个方面中, 本发明提供了紫松果菊属组合物的制备方法, 该方法包括将至少两种紫松果菊属成分、优选三种紫松果菊属成分的用量组合的步骤, 从而足以产生包括各组合紫松果菊属成分中每一种均为标准化量的紫松果菊属组合物。在另一个方面中, 本发明提供了紫松果菊属提取物和紫松果菊属提取物的制备方法。目前优选的紫松果菊属提取物中富含由多糖类、烷基酰胺类和菊苣酸组成的组的一种或多种成分。在另一个方面中, 本发明提供了用于提高哺乳动物体内免疫系统活性的方法。



1.一种用于提高哺乳动物免疫系统活性的紫松果菊属组合物，它包括菊苣酸 0.2mg/ml - 500mg/ml、紫松果菊属烷基酰胺类 0.02mg/ml - 50mg/ml 和紫松果菊属多糖类 10mg/ml - 800mg/ml，其中该组合物为液体形式。

2.权利要求 1 所述的紫松果菊属组合物，其中所述的菊苣酸的量为 0.3mg/ml - 30mg/ml、所述的紫松果菊属烷基酰胺类的量为 0.05mg/ml - 50mg/ml 且所述的紫松果菊属多糖类的量为 20mg/ml - 800mg/ml。

3.权利要求 2 所述的紫松果菊属组合物，其中所述的菊苣酸的量为 5.0mg/ml - 30mg/ml、所述的紫松果菊属烷基酰胺类的量为 0.8mg/ml - 50mg/ml 且所述的紫松果菊属多糖类的量为 50mg/ml - 800mg/ml。

4.一种用于提高哺乳动物免疫系统活性的紫松果菊属组合物，包括菊苣酸 0.01mg/g - 500mg/g、紫松果菊属烷基酰胺类 0.005mg/g - 100mg/g 和紫松果菊属多糖类 5mg/g - 900mg/g，其中该组合物为固体或凝胶形式。

5.权利要求 4 所述的紫松果菊属组合物，其中所述的菊苣酸的量为 0.05mg/g - 500mg/g、所述的紫松果菊属烷基酰胺类的量为 0.1mg/g - 100mg/g 且所述的紫松果菊属多糖类的量为 10mg/g - 900mg/g。

6.权利要求 5 所述的紫松果菊属组合物，其中所述的菊苣酸的量为 15mg/g - 500mg/g、所述的紫松果菊属烷基酰胺类的量为 5mg/g - 100mg/g 且所述的紫松果菊属多糖类的量为 200mg/g - 900mg/g。

7.一种紫松果菊属组合物的制备方法，该方法包括：将一定量菊苣酸、一定量紫松果菊属烷基酰胺类和一定量紫松果菊属多糖类合并，以产生包括菊苣酸 0.2mg/ml - 500mg/ml、紫松果菊属烷基酰胺类 0.02mg/ml - 50mg/ml 和紫松果菊属多糖类 10mg/ml - 800mg/ml，或包括菊苣酸 0.01mg/g - 500mg/g、紫松果菊属烷基酰胺类 0.005mg/g - 100mg/g 和紫松果菊属多糖类 5mg/g - 900mg/g 的紫松果菊属组合物，并任选地加入一种可药用赋形剂。

8.紫松果菊属组合物在生产用于提高哺乳动物体内免疫系统活性的药物中的用途,其中,该紫松果菊属组合物配制成每日剂量提供紫松果菊属菊苣酸 $5\mu\text{g/Kg}$ 体重 - $2000\mu\text{g/Kg}$ 体重;紫松果菊属烷基酰胺类 $0.5\mu\text{g/Kg}$ 体重 - $200\mu\text{g/Kg}$ 体重;且紫松果菊属多糖类 $125\mu\text{g/Kg}$ 体重 - 50mg/Kg 体重。

9.权利要求 8 所述的用途,其中所述的紫松果菊属菊苣酸的日剂量为 $120\mu\text{g/Kg}$ 体重 - $1000\mu\text{g/Kg}$ 体重;所述的紫松果菊属烷基酰胺类的日剂量为 $12\mu\text{g/Kg}$ 体重 - $100\mu\text{g/Kg}$ 体重;且所述的紫松果菊属多糖类的日剂量为 3mg/Kg 体重 - 30mg/Kg 体重。

10.权利要求 9 所述的用途,其中所述的紫松果菊属菊苣酸的日剂量为 $800\mu\text{g/Kg}$ 体重;所述的紫松果菊属烷基酰胺类的日剂量为 $80\mu\text{g/Kg}$ 体重;且所述的紫松果菊属多糖类的日剂量为 20mg/Kg 体重。

11.权利要求 8-10 中任意一项所述的用途,其中所述的药物用于提高巨噬细胞吞噬活性。

12.权利要求 8-10 中任意一项所述的用途,其中所述的药物用于促进巨噬细胞产生氧化氮。

13.权利要求 8-10 中任意一项所述的用途,其中所述的药物用于促进巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 。

14.权利要求 8-10 中任意一项所述的用途,其中所述的药物用于促进脾细胞产生 $\text{IFN-}\gamma$ 。

15.权利要求 8-10 中任意一项所述的用途,其中所述的药物用于促进脾细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 。

紫松果菊属组合物和制备方法

发明领域

本发明涉及由紫松果菊属植物制备的营养补剂。

发明背景

大量研究证明了来源于紫松果菊属植物的提取物有促进健康的特性。例如，参见 A. Awang & D. Kindack, 《加拿大药物杂志》(Canadian Pharmaceutical Journal) 124: 512-516 (1991)。含有认为可促进健康的生物活性成分的紫松果菊属组合物有很强的商品市场。此外，需要配制含有标准化量的来源于紫松果菊属植物的生物活性成分的紫松果菊属组合物。这类标准化的紫松果菊属组合物为消费者提供了持续的有效剂量的一种或多种具生物活性的紫松果菊属成分。

含有认为可促进健康的高浓度的一种或多种生物活性成分的紫松果菊属提取物特别具有很强的商品市场。可以将这类高度富含的提取物直接用作营养强化剂或可以将其与其它紫松果菊属提取物混合来制备含有标准化量的具生物活性的紫松果菊属成分的营养强化剂。

科学研究表明紫松果菊属衍生的多糖类、烷基酰胺类和菊苣酸(一种也称作二咖啡因酒石酸的咖啡酸衍生物, 2,3-*o*-二咖啡酰酒石酸)各自具有促进健康的特性。例如, 已经证实来自紫松果菊属的烷基酰胺类可在约 0.1 份/百万 (ppm) 的浓度下刺激小鼠粒细胞的吞噬作用。Bauer, R. 等, *Arzneim.-Forsch./Drug Research* (《药物研究》), 38: 276-281 (1988)。类似地, 已经证实菊苣酸可提高粒细胞的吞噬作用且可以在低至 0.01ppm 的浓度下刺激免疫系统。例如, 参见 A. Awang 等, 文献同上。已经证实紫松果菊属多糖类可抑制透明质酸酶、增加吞噬作用、诱导干扰素-6 的释放并提高小鼠对 *C. albicans* 感染的耐受性。例如, 参见 A. Awang 等, 文献同上; Wagner, H. 等 *Arzneim.-Forsch./Drug Research* (《药物研

究》), 35: 1069-1075 (1985)。

必须考虑到许多因素并使其最佳化以便生产具有高浓度多糖类、烷基酰胺类和/或菊苣酸的紫松果菊属提取物。例如, 植物的品种、植物的生长时间和植物的生长条件可以影响紫松果菊属植物中多糖类、烷基酰胺类和菊苣酸的量。另外, 用于从紫松果菊属植物中提取多糖类、烷基酰胺类和菊苣酸的溶剂和诸如温度和提取期限的长度这样的工艺参数可以极大地影响这些成分的产量。

因此, 对从紫松果菊属植物中有效提取多糖类、烷基酰胺类和菊苣酸的方法和含有高浓度多糖类、烷基酰胺类和/或菊苣酸的紫松果菊属提取物存在需求。此外, 对含有预定的所需量的紫松果菊属提取物的标准化紫松果菊属组合物存在需求, 所述的紫松果菊属提取物包括多糖、烷基酰胺和/或菊苣酸提取物。

发明概括

在一个方面中, 本发明提供了包括标准化量的至少两种紫松果菊属成分的紫松果菊属组合物。本发明的紫松果菊属组合物更优选包括标准化量的至少三种紫松果菊属成分。在上下文中, 术语“标准化量”或其语法上相同的描述指的是紫松果菊属成分的所需的定量。目前优选的紫松果菊属成分是紫松果菊属多糖类、紫松果菊属烷基酰胺类和菊苣酸。目前优选用于制备本发明紫松果菊属组合物的紫松果菊属提取物是富含菊苣酸(最优选按照本发明制备的菊苣酸)、紫松果菊属烷基酰胺类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类)或紫松果菊属多糖类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类)的提取物。本发明的紫松果菊属组合物可以是液体形式、凝胶形式或固体形式, 诸如粉剂或片剂或胶囊剂, 且优选将本发明的紫松果菊属组合物用于对人给药(更优选口服给药)。

在另一个方面中, 本发明提供了紫松果菊属组合物的制备方法, 该方法包括将至少两种紫松果菊属成分、优选三种紫松果菊属成分的用量组合的步骤, 从而足以产生包括各组合紫松果菊属成分中每一种均为标准化量的紫松果菊属组合物。在上下文中, 术语“标准化量”或其语法上相同的

描述指的是紫松果菊属成分的所需的定量。目前优选的紫松果菊属成分是紫松果菊属多糖类、紫松果菊属烷基酰胺类和菊苣酸。目前优选用于制备本发明紫松果菊属组合物的紫松果菊属提取物是富含菊苣酸(最优选按照本发明制备的菊苣酸)、紫松果菊属烷基酰胺类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类)或紫松果菊属多糖类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类)的提取物。

在另一个方面中,本发明提供了富含至少一种紫松果菊属成分的紫松果菊属提取物的制备方法。用于制备富含的紫松果菊属提取物的本发明方法包括下列步骤:选择具有增加量所需成分(诸如菊苣酸、烷基酰胺类或多糖类)的发育阶段的紫松果菊属植物;选择富含所需成分的植物部位并使所选择的部分与一定量的溶剂接触,所述的溶剂选自乙醇和水组成的组,从而从所述植物部位中有效地提取所需的成分。然后优选浓缩该紫松果菊属提取物。可以将任意品种的紫松果菊属植物用于实施本发明,但目前优选的品种是紫松果菊。紫松果菊属植物物质的提取采用的植物物质与溶剂的比例(按重量计)约为不超过2份植物物质与约1份溶剂的比例。目前优选的植物物质与溶剂的比例(按重量计)约为1份植物物质与约4份溶剂的比例。

在另一个方面中,本发明提供了富含选自紫松果菊属多糖类、紫松果菊属烷基酰胺类和菊苣酸组成的组的一种或多种成分的紫松果菊属液体提取物。目前优选的富含多糖类的紫松果菊属液体提取物包括浓度大于约1%(w/w)、更优选大于约5%(w/w)、最优选大于约10%(w/w)的多糖类。目前优选的富含烷基酰胺类的紫松果菊属液体提取物包括浓度大于约0.1%(w/w)、更优选大于约1.0%(w/w)、最优选大于约3.0%(w/w)的烷基酰胺类。目前优选的富含菊苣酸的紫松果菊属液体提取物包括浓度大于约0.2%(w/w)、更优选大于约0.5%(w/w)、最优选大于约3.0%(w/w)的菊苣酸。

在另一个方面中,本发明提供了富含选自紫松果菊属多糖类、紫松果菊属烷基酰胺类和菊苣酸组成的组的一种或多种成分的紫松果菊属固体提取物。目前优选的富含多糖类的紫松果菊属固体提取物包括浓度大于约

0.01% (w/w)、更优选大于约 0.05% (w/w)、最优选大于约 20% (w/w) 的多糖类。目前优选的富含烷基酰胺类的紫松果菊属固体提取物包括浓度大于约 0.001% (w/w)、更优选大于约 0.01% (w/w)、最优选大于约 0.5% (w/w) 的烷基酰胺类。目前优选的富含菊苣酸的紫松果菊属固体提取物包括浓度大于约 0.005% (w/w)、更优选大于约 0.05% (w/w)、最优选大于约 1.5% (w/w) 的菊苣酸。

例如, 本发明的紫松果菊属提取物用作营养强化剂和用作混合生产本发明的紫松果菊属组合物的多糖类、烷基酰胺类或菊苣酸的来源。例如, 本发明的紫松果菊属组合物用作人体营养强化剂。根据非限制性实施例所述, 本发明紫松果菊属组合物和提取物在对哺乳动物给药时可刺激免疫系统中的下列一个或多个方面: 巨噬细胞吞噬活性; 巨噬细胞产生氧化氮; 巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$; 脾细胞产生 $\text{INF-}\gamma$; 和脾细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 。

在另一个方面中, 本发明提供了用于提高哺乳动物体内免疫系统活性的方法。在一个实施方案中, 该方法包括对哺乳动物给予每日有效剂量的紫松果菊属组合物的步骤, 所述的紫松果菊属组合物包括标准化量的紫松果菊属菊苣酸、紫松果菊属烷基酰胺类和紫松果菊属多糖类。在另一个实施方案中, 该方法包括对哺乳动物给予每日有效剂量的紫松果菊属提取物的步骤, 所述的紫松果菊属提取物选自紫松果菊属烷基酰胺类和紫松果菊属多糖类组成的组。术语“每日有效剂量”及其语法上相同的描述指的是有效提高哺乳动物体内免疫系统活性的每日剂量。

附图简述

当结合附图考虑时, 可以参照下面的详细描述更好而更方便地领会本发明的上述方面和许多附加的优点, 其中:

附图 1 表示不同剂量的本发明紫松果菊属组合物对大鼠各种免疫系统参数的作用。紫松果菊属组合物包括本文实施例 8 中所列的紫松果菊属菊苣酸、烷基酰胺和多糖提取物。剂量水平如本文表 1 中所列。缩写为: IL2 SP: 脾细胞中产生的白细胞介素-2; $\text{TNF-}\alpha$ SP: 脾细胞中产生的肿瘤坏死因子 α ; $\text{INF-}\gamma$ SP: 脾细胞中产生的干扰素 γ ; $\text{TNF-}\alpha$ MA: 肺泡巨

噬细胞中的肿瘤坏死因子 α ; NOMA: 肺泡巨噬细胞中产生的氧化氮; PI MA: 肺泡巨噬细胞中的吞噬指数; PA MA: 肺泡巨噬细胞中的吞噬活性。将结果与对照值校准。

附图2表示不同剂量的本发明紫松果菊属组合物对大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬指数的作用。紫松果菊属组合物包括本文实施例8中所列的紫松果菊属菊苣酸、烷基酰胺和多糖提取物。剂量水平如本文表1中所列。

附图3表示本发明紫松果菊属菊苣酸提取物对大鼠各种免疫系统参数的作用。如本文实施例2中所述制备紫松果菊属菊苣酸提取物。缩写为: IL2 SP: 脾细胞中产生的白细胞介素-2; TNF- α SP: 脾细胞中产生的肿瘤坏死因子 α ; INF- γ SP: 脾细胞中产生的干扰素 γ ; TNF- α MA: 肺泡巨噬细胞中的肿瘤坏死因子 α ; NO MA: 肺泡巨噬细胞中产生的氧化氮; PI MA: 肺泡巨噬细胞中的吞噬指数; PA MA: 肺泡巨噬细胞中的吞噬活性。将结果与对照值校准。

附图4表示本发明紫松果菊属多糖提取物对大鼠各种免疫系统参数的作用。如本文实施例3中所述制备紫松果菊属多糖提取物。缩写为: IL2 SP: 脾细胞中产生的白细胞介素-2; TNF- α SP: 脾细胞中产生的肿瘤坏死因子 α ; INF- γ SP: 脾细胞中产生的干扰素 γ ; TNF- α MA: 肺泡巨噬细胞中的肿瘤坏死因子 α ; NO MA: 肺泡巨噬细胞中产生的氧化氮; PI MA: 肺泡巨噬细胞中的吞噬指数; PA MA: 肺泡巨噬细胞中的吞噬活性。将结果与对照值校准。

附图5表示本发明紫松果菊属烷基酰胺提取物对大鼠各种免疫系统参数的作用。如本文实施例1中所述制备紫松果菊属烷基酰胺提取物。缩写为: IL2 SP: 脾细胞中产生的白细胞介素-2; TNF- α SP: 脾细胞中产生的肿瘤坏死因子 α ; INF- γ SP: 脾细胞中产生的干扰素 γ ; TNF- α MA: 肺泡巨噬细胞中的肿瘤坏死因子 α ; NO MA: 肺泡巨噬细胞中产生的氧化氮; PI MA: 肺泡巨噬细胞中的吞噬指数; PA MA: 肺泡巨噬细胞中的吞噬活性。将结果与对照值校准。

附图6表示本发明紫松果菊属组合物和及其各成分菊苣酸、烷基酰胺个多糖提取物对大鼠肺泡巨噬细胞吞噬指数的作用。紫松果菊属组合物包

括本文实施例 8 中所列的紫松果菊属菊苣酸、烷基酰胺和多糖提取物。紫松果菊属组合物的剂量为本文表 1 中所列的水平 4, 即该紫松果菊属组合物提供了 800 μ g/kg 紫松果菊属菊苣酸、20mg/kg 紫松果菊属多糖类和 80 μ g/kg 紫松果菊属烷基酰胺类的每日剂量。单独给予紫松果菊属菊苣酸的每日剂量为 800 μ g/kg、单独给予紫松果菊属多糖类的每日剂量为 20mg/kg 且单独给予紫松果菊属烷基酰胺类的每日剂量为 80 μ g/kg。将水与乙醇的混合物给予对照组大鼠。

附图 7 表示不同剂量的本发明紫松果菊属组合物对大鼠肺泡巨噬细胞中 TNF- α 产生的作用。紫松果菊属组合物包括本文实施例 8 中所列的紫松果菊属菊苣酸、烷基酰胺和多糖提取物。TNF- α MA: 肺泡巨噬细胞中的肿瘤坏死因子 α 。通过将表 1 中各剂量浓度与表 1 中所列的剂量水平为 2 的浓度进行校准来获得相对浓度。

附图 8 表示不同剂量的本发明紫松果菊属组合物对脾细胞产生白细胞介素-2 的作用。紫松果菊属组合物包括本文实施例 8 中所列的紫松果菊属菊苣酸、烷基酰胺和多糖提取物。给予本文表 1 中所列剂量水平的紫松果菊属组合物。IL2 SP: 脾细胞中产生的白细胞介素-2。将结果与对照值进行校准。通过将表 1 中各剂量浓度与表 1 中所列的剂量水平为 2 的浓度进行校准来获得相对浓度。

优选实施方案的详细描述

本文使用下列缩写: mg/ml (或 mg/mL) 是每毫升中毫克数的缩写; mg/g 是每克中毫克数的缩写。

本发明提供了紫松果菊属组合物、紫松果菊属提取物和本发明组合物和提取物的制备方法。可以将紫松果菊属的任意品种用于实施本发明。植物科学目前识别了 9 种紫松果菊属的品种。E. pallida 是一种具有深色花瓣、毛状叶和白色花粉的四倍体品种。E. angustifolia 一般生长在野外的干燥地区且特征在于短毛状叶和花下垂。紫松果菊优选肥沃的土壤、具有深紫色的花和宽叶。E. atrorubens 在颈上带有繁茂的毛、可返回茎的舌叶和无毛的叶。E. sanguinea 是一种与 E. pallida 具有相似外观而

具有黄色花粉的二倍体植物。*E. simulata* 在形态上看起来与 *E. pallida* 相同，但 *E. simulata* 具有黄色花粉。*E. paradoxa* 具有黄色或粉红色的花和繁茂的毛。*E. teneseensis* 具有向上弯曲的舌叶且是所有紫松果菊属品种中毛最多的。*E. laevigata* 具有类似于 *E. pallida* 的长长下垂的舌叶，但其叶的宽度类似于紫松果菊。尽管可以将紫松果菊属的任意品种用于实施本发明，但是目前优选的紫松果菊属的品种是紫松果菊。

紫松果菊属可以由种子、冠分裂和通过种植根部、优选 10-12cm 长来繁殖。在秋季成熟后立即在户外播种种子并在春季后发芽，但发芽的比例受种子休眠程度的影响，这种休眠程度可随品种的不同而改变。种子发芽受几个因素影响。在室温下 3 年或 3 年以上的长期储存种子的发芽率会降低。种子的大小和开花位置不会影响种子的发芽，不过，在生理成熟但老化之前收获的种子比在脱水后收获的种子发芽率高。在本发明者的实践中，种子的来源（即种子的提供者）是大部分紫松果菊发芽率变化的原因。特别地，在商购批量的种子中存在紫松果菊属的杂交种子是不理想的。目前优选的鉴定紫松果菊属杂交种子的方法如下。通过每日浇水使测试种子在种植器中发芽。在发芽后使幼苗生长 1 周。然后取出幼苗并用水充分洗涤且干燥。接下来使用厨用掺合机将清洁的幼苗加工至使它们精细混合为止。通过经 5 μ m 滤器过滤除去植物物质。通过在真空中蒸发而将剩余的液体浓缩至其原体积的一半且然后通过 0.45 μ m 滤器过滤以用于 HPLC 分析。使用本文实施例 6 中所述的菊苣酸试验法进行的 HPLC 分析显示了非杂交种子的清楚的菊苣酸峰，而在杂交种子中没有菊苣酸峰。

幼苗从直接播种的田间出苗可能并不如分层后的户内发芽一样均匀。目前用于种子分层的一种优选方法是将种子与清洁的沙子在塑料袋中混合（混合比例为 1: 1, v/v）并在约 1 $^{\circ}$ C - 约-4 $^{\circ}$ C 的温度下的 4-6 周期限内维持湿度约为 10%。然后从沙子中分离出分层的种子并可以将它们播种在土壤表面或 0.5cm 深的平地中或充满泥炭和珍珠岩混合物的罐中（混合比例为 1: 1, v/v）。维持在约 18-20 $^{\circ}$ C 下的平地中种植的种子一般在种植后 7-10 天内开始出苗。优选使幼苗生长在温室中或补充了阳光的户内，直到移植到户外为止。就紫松果菊而言，一般约为 257,000

个种子/kg,而就 *E. angustifolia* 而言,最高可达约 319,000 个种子/kg。就 0.5 公顷 (ha) 田地而言,需要约 500g 种子提供移植植物。

通过切断和细胞培养进行无性繁殖也是可能的。无性繁殖可以产生大量遗传上相同的植物,可以将它们通过选择育种或遗传改造进行改进以获得较高产量的活性化合物。

在野地中,紫松果菊属一般生长在全日光下的贫瘠的岩石土壤中。然而,它在中等肥沃和排水良好的沃土或沙地沃土土壤中也会茁壮生长,这种土壤是中性至弱酸性的 (pH 6-7)。紫松果菊属是根部作物,因此,应避免使用岩石或硬土壤。尽管紫松果菊属耐干旱,但是水对其生长来说是重要的且建议定期灌溉。

加强施肥可提高草药产量而降低根的产量。低氮且包括足量磷和钾的平衡肥料通常是足够的。在播种前施用的骨粉或磷灰石 (14.5-20kg/ha) 和木灰 (45-51.5kg/ha) 和在种植后 3 次施用中施用的牛或马粪肥是目前用于使紫松果菊属生长的优选的组合有机肥。以 4mL/L 工作浓度施用的鱼肥 (包括分别为 5-2-2 比例的 $N-P_2O_5-K_2O$) 可促进紫松果菊属的生长。除粪肥和分解的城市废物外,诸如奎葵籽、苧麻或红三叶草这样的绿色复被植物也是有益的。还可以将化学肥料用于非有机栽培。将氮肥用于一般的植物保健且更特别用于生产叶茂盛的深绿色植物。磷酸盐肥料会使开花增加。

另外,植物间距会影响产量。优选应将紫松果菊属在 120cm 宽的地层上间隔 30cm 种植,使得每层中有 5 行且得到约 74,000 株植物/ha。如果使用茁壮的紫松果菊属品种或如果使所述植物生长 4 年以上,那么上述情况属于可能是过于密集的最大密度。

覆盖物用于维持土壤水分和温度的目的且更重要的是控制杂草。幼苗在黑色塑料覆盖物或深色覆盖物下茁壮生长。如果幼苗在户外,那么认为将清洁稻草 (2-3cm) 覆盖于种子上是必需的。紫松果菊属不耐杂草,由此控制杂草是一个重要因素。在本发明者的实践中,就以有机方式使紫松果菊属生长而言,黑色塑料或深色覆盖物是控制杂草的最佳措施,尤其是对新近种植的植物而言更是如此。塑料覆盖物可以将控制杂草的劳动力成

本降低 70-80%。在种植后应立即使用深色覆盖物且它们应是粗糙的(即使用多块具有大于 2cm x 2cm 大小的深色覆盖物)以便使表面干燥并产生不利于杂草发芽的条件。在种植前至少 1 年的土地整理是另一种除去多年生杂草并减少一年生杂草群的方式。当杂草形成时和在种植紫松果菊属植物前,一种优选的整理土地的方法是在春季翻转土壤。在这种方式中,通过暴露杂草的根来破坏杂草。

进行充分土壤培育是使得紫松果菊属生长和产量最佳化必不可少的。通常根不会达到所需大小,直到播种后 3-4 年为止。通过仔细调节的生长条件, *E. angustifolia* 的产量可以高达 2.5 吨/ha。紫松果菊的产量一般高于 *E. angustifolia* 的产量。

本发明的紫松果菊属组合物包括标准化量的至少两种紫松果菊属成分。本发明的紫松果菊属组合物更优选包括标准化量的至少三种紫松果菊属成分。在上下文中,术语“标准化量”或其语法上相同的描述指的是紫松果菊属成分的所需的定量。需要配制含有标准化量的紫松果菊属成分的紫松果菊属组合物,因为这类标准化的紫松果菊属组合物可为消费者提供持久(即不会在各批产品之间发生改变的)有效剂量的生物活性成分。

目前用于制备本发明紫松果菊属组合物的优选紫松果菊属提取物中富含至少一种能够在导入生物体时诱发诸如刺激免疫功能这样的生物反应的紫松果菊属成分。根据非限制性实施例所述,用于制备本发明紫松果菊属组合物的紫松果菊属成分包括:精油、链烷酰胺类(alkamides)(包括烷基酰胺类)、菊苣酸、多糖类、聚炔类和聚烯烃类。紫松果菊属精油的有代表性的实例包括冰片、乙酸冰片酯、十五-8-烯-2-酮、大根香叶烯 D、环氧石竹烯和棕榈酸。例如,紫松果菊属精油描述在引入本文作为参考的 A. Awang & D. Kindack 的《加拿大药物杂志》(Canadian Pharmaceutical Journal) 124: 512-516 (1991) 和 Bauer, R. 的《实用和药用植物研究》(Economic and Medicinal Plant Research) 第 5 卷第 261-267 页(1991)的“作为有潜力的免疫刺激药物的紫松果菊属品种”(“*Echinacea* Species as Potential Immunostimulatory Drugs”)中。目前用于制备本发明紫松果菊属组合物的优选的紫松果菊属成分是菊

苣荬酸（最优选按照本发明制备的苣荬酸）、紫松果菊属烷基酰胺类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类）和紫松果菊属多糖类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类）。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了包括标准化量的第一种紫松果菊属成分和标准化量的第二种紫松果菊属成分的紫松果菊属组合物，其中所述的第一种和第二种紫松果菊属成分各自独立地选自苣荬酸（最优选按照本发明制备的苣荬酸）、紫松果菊属烷基酰胺类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类）和紫松果菊属多糖类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类）组成的组；且其中所述的苣荬酸的标准化量约为 0.2mg/ml - 约 500mg/ml、更优选约为 0.3mg/ml - 约 30mg/ml、最优选约为 5mg/ml - 约 30mg/ml；所述的紫松果菊属烷基酰胺类的标准化量约为 0.02mg/ml - 约 50mg/ml、更优选约为 0.05mg/ml - 约 50mg/ml、最优选约为 0.8mg/ml - 约 50mg/ml；而所述的紫松果菊属多糖类的标准化量约为 10mg/ml - 约 800mg/ml、更优选约为 20mg/ml - 约 800mg/ml、最优选约为 50mg/ml - 约 800mg/ml。

在第二个目前优选的实施方案中，本发明提供了包括标准化量的苣荬酸（最优选按照本发明制备的苣荬酸）、紫松果菊属烷基酰胺类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类）和紫松果菊属多糖类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类）的紫松果菊属组合物；且其中所述的苣荬酸的标准化量约为 0.2mg/ml - 约 500mg/ml、更优选约为 0.3mg/ml - 约 30mg/ml、最优选约为 5mg/ml - 约 30mg/ml；所述的紫松果菊属烷基酰胺类的标准化量约为 0.02mg/ml - 约 50mg/ml、更优选约为 0.05mg/ml - 约 50mg/ml、最优选约为 0.8mg/ml - 约 50mg/ml；而所述的紫松果菊属多糖类的标准化量约为 10mg/ml - 约 800mg/ml、更优选约为 20mg/ml - 约 800mg/ml、最优选约为 50mg/ml - 约 800mg/ml。

在第三个目前优选的实施方案中，本发明提供了包括标准化量的第一种紫松果菊属成分和标准化量的第二种紫松果菊属成分的紫松果菊属组合物，其中所述的第一种和第二种紫松果菊属成分各自独立地选自苣荬酸（最优选按照本发明制备的苣荬酸）、紫松果菊属烷基酰胺类（最优选按

照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类)和紫松果菊属多糖类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类)组成的组;且其中所述的菊苣酸的标准量约为0.01mg/g-约500mg/g、更优选约为0.05mg/g-约500mg/g、最优选约为15mg/g-约500mg/g;所述的紫松果菊属烷基酰胺类的标准量约为0.005mg/g-约100mg/g、更优选约为0.1mg/g-约100mg/g、最优选约为5mg/g-约100mg/g;而所述的紫松果菊属多糖类的标准量约为5mg/g-约900mg/g、更优选约为10mg/g-约900mg/g、最优选约为200mg/g-约900mg/g。

在第四个目前优选的实施方案中,本发明提供了包括标准量的菊苣酸(最优选按照本发明制备的菊苣酸)、紫松果菊属烷基酰胺类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类)和紫松果菊属多糖类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类)的紫松果菊属组合物;且其中所述的菊苣酸的标准量约为0.01mg/g-约500mg/g、更优选约为0.05mg/g-约500mg/g、最优选约为15mg/g-约500mg/g;所述的紫松果菊属烷基酰胺类的标准量约为0.005mg/g-约100mg/g、更优选约为0.1mg/g-约100mg/g、最优选约为5mg/g-约100mg/g;而所述的紫松果菊属多糖类的标准量约为5mg/g-约900mg/g、更优选约为10mg/g-约900mg/g、最优选约为200mg/g-约900mg/g。

在另一个方面中,本发明提供了紫松果菊属组合物的制备方法,该方法包括将至少两种紫松果菊属成分、优选三种紫松果菊属成分的用量进行组合的步骤,从而足以产生包括各组合紫松果菊属成分中每一种均为标准量的紫松果菊属组合物。在上下文中,术语“标准量”或其语法上相同的描述指的是紫松果菊属成分的所需的定量。目前用于制备本发明紫松果菊属组合物的优选紫松果菊属成分能够在导入活生物体时诱发诸如刺激免疫功能这样的生物反应。根据非限制性实施例所述,用于制备本发明紫松果菊属组合物的紫松果菊属成分包括:精油、链烷酰胺类

(alkamides)(包括烷基酰胺类)、菊苣酸、多糖类、聚炔类和聚烯烃类。目前用于制备本发明紫松果菊属组合物的优选的紫松果菊属成分是菊苣酸(最优选按照本发明制备的菊苣酸)、紫松果菊属烷基酰胺类(最优

选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类)和紫松果菊属多糖类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类)。按照本发明制备的紫松果菊属组合物可以是液体形式、凝胶形式或固体形式,诸如粉剂或胶囊剂;且优选它们适合于对人体给药(更优选口服给药)。

在一个目前优选的实施方案中,本发明提供了紫松果菊属组合物的制备方法,该方法包括将第一种紫松果菊属成分的用量与第二种紫松果菊属成分的用量进行组合的步骤,所述的第一种和第二种紫松果菊属成分各自独立地选自菊苣酸(最优选按照本发明制备的菊苣酸)、紫松果菊属烷基酰胺类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类)和紫松果菊属多糖类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类)组成的组;所述的菊苣酸的用量是足以产生包括下列菊苣酸标准化量的紫松果菊属组合物的用量:约0.2mg/ml-约500mg/ml、更优选约0.3mg/ml-约30mg/ml、最优选约5mg/ml-约30mg/ml;所述的紫松果菊属烷基酰胺类的用量是足以产生包括下列烷基酰胺类标准化量的紫松果菊属组合物的用量:约0.02mg/ml-约50mg/ml、更优选约0.05mg/ml-约50mg/ml、最优选约0.8mg/ml-约50mg/ml;而所述的紫松果菊属多糖类的用量是足以产生包括下列紫松果菊属多糖类标准化量的紫松果菊属组合物的用量:约10mg/ml-约800mg/ml、更优选约20mg/ml-约800mg/ml、最优选约50mg/ml-约800mg/ml。

在第二个目前优选的实施方案中,本发明提供了紫松果菊属组合物的制备方法,该方法包括将菊苣酸(最优选按照本发明制备的菊苣酸)的用量、紫松果菊属烷基酰胺类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类)的用量和紫松果菊属多糖类(最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类)的用量进行组合的步骤;所述的菊苣酸的用量是足以产生中包括下列菊苣酸标准化量的紫松果菊属组合物的用量:约0.2mg/ml-约500mg/ml、更优选约0.3mg/ml-约30mg/ml、最优选约5mg/ml-约30mg/ml;所述的紫松果菊属烷基酰胺类的用量是足以产生包括下列烷基酰胺类标准化量的紫松果菊属组合物的用量:约0.02mg/ml-约50mg/ml、更优选约0.05mg/ml-约50mg/ml、最优选约为0.8mg/ml-约50mg/ml;

而所述的紫松果菊属多糖类的用量是足以产生包括下列紫松果菊属多糖类标准化量的紫松果菊属组合物的用量：约 10mg/ml - 约 800mg/ml、更优选约 20mg/ml - 约 800mg/ml、最优选约 50mg/ml - 约 800mg/ml。

在第三个目前优选的实施方案中，本发明提供了紫松果菊属组合物的制备方法，该方法包括将第一种紫松果菊属成分的用量与第二种紫松果菊属成分的用量进行组合的步骤，所述的第一种和第二种紫松果菊属提取物各自独立地选自菊苣酸（最优选按照本发明制备的菊苣酸）、紫松果菊属烷基酰胺类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类）和紫松果菊属多糖类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类）组成的组；所述的菊苣酸的用量是足以产生包括下列菊苣酸标准化量的紫松果菊属组合物的用量：约 0.01mg/g - 约 500mg/g、更优选约 0.05mg/g - 约 500mg/g、最优选约 15mg/g - 约 500mg/g；所述的紫松果菊属烷基酰胺类的用量是足以产生包括下列烷基酰胺类标准化量的紫松果菊属组合物的用量：约 0.005mg/g - 约 100mg/g、更优选约 0.1mg/g - 约 100mg/g、最优选约 5mg/g - 约 100mg/g；而所述的紫松果菊属多糖类的用量是足以产生包括下列紫松果菊属多糖类标准化量的紫松果菊属组合物的用量：约 5mg/g - 约 900mg/g、更优选约 10mg/g - 约 900mg/g、最优选约 200mg/g - 约 900mg/g。

在第四个目前优选的实施方案中，本发明提供了紫松果菊属组合物的制备方法，该方法包括将菊苣酸（最优选按照本发明制备的菊苣酸）的用量、紫松果菊属烷基酰胺类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属烷基酰胺类）的用量和紫松果菊属多糖类（最优选按照本发明制备的紫松果菊属多糖类）的用量进行组合的步骤；所述的菊苣酸的用量是足以产生包括下列菊苣酸标准化量的紫松果菊属组合物的用量：约 0.01mg/g - 约 500mg/g、更优选约 0.05mg/g - 约 500mg/g、最优选约 15mg/g - 约 500mg/g；所述的紫松果菊属烷基酰胺类的用量是足以产生包括下列烷基酰胺类标准化量的紫松果菊属组合物的用量：约 0.005mg/g - 约 100mg/g、更优选约 0.1mg/g - 约 100mg/g、最优选约 5mg/g - 约 100mg/g；而所述的紫松果菊属多糖类的用量是足以产生包括下列紫松果菊属多糖类标准化量的紫松果菊属组合物的用量：约 5mg/g - 约 900mg/g、更优选约

10mg/g - 约 900mg/g、最优选约 200mg/g - 约 900mg/g。

按照本发明制备的紫松果菊属组合物可以是液体形式、凝胶形式或固体形式，诸如粉剂或胶囊剂；且优选它们适合于对人体给药（更优选口服给药）。一般来说，在混合成本发明的紫松果菊属组合物前，测试紫松果菊属提取物等分试样的功效。通过用合适的填充剂或溶剂（包括水、醇、大豆油或其它油、卵磷脂、甘油等）浓缩或稀释将提取物调整至所需的浓度。可以用氮气净化混合用容器并可以在氮气环境中进行混合步骤以防止氧化。可以用醇或甘油基质来配制紫松果菊属组合物或各紫松果菊属提取物。可以通过喷雾干燥或冻干法来制备粉状的紫松果菊属提取物或组合物。还可以将液体紫松果菊属提取物或组合物包微囊成流动性良好的粉末形式。可以将液体紫松果菊属组合物或提取物直接用作液体软胶囊和硬胶囊中的组分且可以由所述的粉状物质制备片剂。

一般来说，按照本发明制备的紫松果菊属提取物和组合物可以包括一种或多种赋形剂。合适的药物上可接受的赋形剂包括加工助剂和药物转运修饰剂和促进剂，诸如：例如植物油粉、交联羧甲基纤维素钠、合金欢胶和瓜耳胶。其它合适的药物上可接受的赋形剂描述在《Remington 氏药物科学》（Remington's Pharmaceutical Sciences）Mack Pub., New Jersey (1991) 中，将该文献引入本文作为参考。

在另一个方面中，本发明提供了富含的紫松果菊属提取物的制备方法。目前优选的本发明紫松果菊属提取物中富含紫松果菊属烷基酰胺类、紫松果菊属多糖类或菊苣酸。本发明的方法包括下列步骤：选择具有增加量紫松果菊属成分（诸如紫松果菊属烷基酰胺类、紫松果菊属多糖类或菊苣酸）的发育阶段的紫松果菊属植物；选择富含所需成分的植物部位；和使选择的植物部位与一定量的溶剂接触，所述的溶剂选自乙醇和水组成的组，从而从所述植物部位中有效地提取所需的成分。然后优选浓缩该紫松果菊属提取物。可以将紫松果菊属的任意品种用于实施本发明，但目前优选的品种是紫松果菊。目前优选的按照本发明从紫松果菊属植物中提取的成分是多糖类、烷基酰胺类和菊苣酸。当将本发明的方法用于提取多糖类时，优选所提取的紫松果菊属植物生长了约 1 年 - 约 4 年。优选的多糖类

提取自紫松果菊属植物的花、叶、茎和/或根。当将本发明的方法用于提取烷基酰胺类时，优选所提取的紫松果菊属植物生长了约2年-约4年。优选从紫松果菊属植物的成熟花和根中提取烷基酰胺类。当将本发明的方法用于提取菊苣酸时，优选所提取的紫松果菊属植物生长了约1年-约3年。优选从紫松果菊属的幼小植物、从紫松果菊属植物的叶和从未成熟的花中提取菊苣酸。紫松果菊属植物物质的提取采用的植物物质与溶剂的比例（按重量计）约为不超过2份植物物质与约1份溶剂的比例。目前优选的植物物质与溶剂的比例（按重量计）约为1份植物物质与约4份溶剂的比例。

根据本发明的一个方面，多糖类可以提取自选择的紫松果菊属植物物质，该方法通过使所述植物物质与乙醇和水的混合物接触来进行，所述的乙醇和水的混合物中含有约0.1%的乙醇-约50%的乙醇（w/w）、优选含有约5%-约20%的乙醇。多糖类优选提取自紫松果菊属植物的花、叶、茎和/或根。所述植物的气生部位中含有的多糖类浓度一般高于根中含有的多糖类浓度且成熟的花中含有的多糖类浓度一般高于未成熟的花中含有的多糖类浓度。用于提取多糖类的优选提取温度约为20℃-约80℃、更优选约30℃-约70℃、最优选约30℃-50℃。多糖的提取期限优选约48小时-约14天、更优选约3天-约12天、最优选约4天-约8天。在升温条件下提取时间延长可确保尽可能将多糖类提取完全，不过在较高温度下多糖类发生一定程度的水解，但是低温将使得提取过程明显缓慢。必须密切监测含有低浓度乙醇的多糖提取物以便防止细菌、酵母或真菌生长和随后的变质。

按照本发明制备的多糖提取物一般含有浓度约为0.5mg/mL-约20.0mg/mL的多糖。在实施本发明的过程中，优选将多糖提取物浓缩至多糖的终浓度约为1mg/mL-约900mg/mL、更优选浓缩至多糖浓度约为60mg/mL-约900mg/mL、最优选浓缩至多糖浓度约为100mg/mL-约900mg/mL。目前优选用于浓缩多糖提取物的方法是蒸发法。优选蒸发在约20℃-约85℃的温度下进行约5小时-约6天。使用的真空条件一般约为5毫巴（mbar）-约320mbar的绝对真空。

根据本发明的一个方面, 烷基酰胺类可以提取自选择的紫松果菊属植物物质, 该方法通过使所述植物物质与乙醇和水的混合物接触来进行, 所述的乙醇和水的混合物中含有约 50% 的乙醇 - 约 95% 的乙醇 (w/w)、优选含有约 65% - 约 85% 的乙醇、更优选含有约 70% 的乙醇 - 约 80% 的乙醇。在所有紫松果菊属品种中发现了烷基酰胺类且总烷基酰胺的浓度 (和烷基酰胺部分的复杂度) 为根中高于叶中。异丁基酰胺类是 *E. angustifolia* 和紫松果菊的根中的烷基酰胺部分的主要成分, 不过它们是 *E. pallida* 的根中烷基酰胺部分的最少成分。异丁基酰胺类存在于 *E. angustifolia*、紫松果菊和 *E. pallida* 的气生部位中。优选将紫松果菊属植物的成熟花和根用作制备烷基酰胺提取物的原料, 这是因为这些植物物质的烷基酰胺类含有量最高。烷基酰胺类优选提取自生长约 2 年以上的紫松果菊属植物。

用于提取紫松果菊属烷基酰胺类的优选提取温度约为 4℃ - 约 85℃、更优选约 30℃ - 约 70℃、最优选约 40℃ - 60℃。烷基酰胺的提取期限优选约 24 小时 - 约 7 天、更优选约 1 天 - 约 4 天、最优选约 2 天 - 约 3 天。所选择的烷基酰胺的提取温度部分取决于原料粗植物物质中其它化合物的含量。就含有大比例烷基酰胺类和几乎不含菊苣酸的植物物质而言, 提取过程可以在 85℃ 下进行; 然而, 当原料植物物质中还含有大量菊苣酸且需要对最终提取物中的菊苣酸保护时, 应将提取温度降至低于 40℃ 以便避免菊苣酸降解。

按照本发明制备的烷基酰胺提取物一般含有浓度约为 0.1mg/mL - 约 3.0mg/mL 的烷基酰胺类。在实施本发明的过程中, 优选将烷基酰胺提取物浓缩至烷基酰胺的终浓度约为 0.1mg/mL - 约 300mg/mL、更优选浓缩至烷基酰胺浓度约为 1mg/mL - 约 300mg/mL、最优选浓缩至烷基酰胺浓度约为 20mg/mL - 约 300mg/mL。目前优选用于浓缩烷基酰胺提取物的方法是蒸发法。优选蒸发在约 10℃ - 约 90℃ 的温度下进行约 3 小时 - 约 3 天。使用的真空条件一般约为 5 毫巴 (mbar) - 约 320mbar 的绝对真空。

根据本发明, 菊苣酸可以提取自选择的紫松果菊属植物物质, 该方法通过使所述植物物质与乙醇和水的混合物接触来进行, 所述的乙醇和水的

混合物中含有约 40% 的乙醇 (w/w) - 约 95% 的乙醇 (w/w)、优选含有约 40% 的乙醇 (w/w) - 约 85% 的乙醇 (w/w)、更优选含有约 50% 的乙醇 (w/w) - 约 70% 的乙醇 (w/w)。优选提取含有最高浓度菊苣酸的紫松果菊属植物的部位以便产生含有高浓度菊苣酸的提取物。在紫松果菊中, 在根、花和叶中发现了最高浓度的菊苣酸, 而仅在 *E. angustifolia* 的根中发现了菊苣酸。一般来说, 菊苣酸优选提取自幼小植物、叶和未成熟的花。在本发明的该方面中, 优先选择生长低于 1 年的紫松果菊属植物。

用于提取菊苣酸的优选提取温度约为 4℃ - 约 45℃、更优选约 4℃ - 约 30℃。菊苣酸的提取期限优选约 24 小时 - 约 3 天、更优选约 24 小时 - 约 40 小时、最优选约 24 小时 - 约 36 小时。在约高于 40℃ 的提取温度下, 菊苣酸的降解变得明显。如果提取过程在高于 40℃ 的温度下进行 48 小时以上, 那么开始在植物物质中含有的多达 95% 的菊苣酸可能损失。提取时间更长可能使提取物完全不含菊苣酸。按照本发明制备的菊苣酸提取物一般含有浓度约为 0.2mg/mL - 约 2.0mg/mL 的菊苣酸。在实施本发明的过程中, 优选将菊苣酸提取物浓缩至菊苣酸的终浓度约为 1mg/mL - 约 700mg/mL、更优选浓缩至菊苣酸浓度约为 5mg/mL - 约 700mg/mL、最优选浓缩至菊苣酸浓度约为 30mg/mL - 约 700mg/mL。目前优选用于浓缩菊苣酸提取物的方法是蒸发法。优选蒸发在约 10℃ - 约 45℃ 的温度下进行约 5 小时 - 约 2.5 天。使用的真空条件一般约为 5 毫巴 (mbar) - 约 320mbar 的绝对真空。

在用于制备紫松果菊属提取物的本发明方法中, 紫松果菊属的提取条件优选使多糖类、烷基酰胺类和菊苣酸的降解减少到最低程度。紫松果菊属中的许多生物活性化合物对降解敏感且各化合物或化合物基团对可能导致降解的不同条件敏感。例如, 菊苣酸在溶液中不稳定。菊苣酸的降解可以通过酚氧化酶介导的氧化、通过水解和通过化学降解而快速发生。加热也可以导致菊苣酸降解。类似地, 内源性植物酶 (诸如糖苷水解酶和淀粉酶) 可以通过水解使多糖类降解。此外, 多糖提取物可以便利地被霉菌、酵母和真菌的生长所破坏。一旦烷基酰胺类被干燥或纯化, 则它们会快速降解。

减少提取过程中生物活性化合物降解的一种方法是使用富含氮气或氩气的气体，由此排空氧气。在进行任何液体转移前，可以使用氮气来充分净化所有设备和容器。此外，在储存和提取过程中，氮气可以连续通过紫松果菊属液体提取物发泡。对诸如温度和浓度这样的工艺参数的严格控制也可有助于减少氧化和水解。例如，在 74℃ 下发生将多糖类以酶促方式水解成单糖残基这一过程远比在 40℃ 下发生的相同过程更为容易。化学水解在 75℃ - 120℃ 下发生。通过在加工过程中维持低温可以将水解减少到最低程度。通过较低的加工温度还会减少氧化。帮助降低内源性酶活性的另一种方法是将液体提取物浓缩至水分含量最低。

由于许多消费者要求仅使用无毒性溶剂生产的草药衍生的产品，所以优选不将诸如己烷、氯仿、醚类和酮类这样通常在实验室中使用的许多溶剂用于实施本发明。用于制备紫松果菊属提取物的本发明方法使用水和乙醇作为提取溶剂且将不同的乙醇和水的混合物用于从紫松果菊属植物中提取不同的活性组分。优选在液体溶剂按 1 份植物物质与 4 份液体溶剂的比例（按重量计）提取植物物质。然而，也使用高至 2 份植物物质与 1 份液体溶剂的植物物质与液体溶剂比例进行提取。还按照本发明、通过使用植物物质与液体溶剂的比例为 1 份植物物质与 20 份液体溶剂的比例制备了紫松果菊属提取物。使用高溶剂与植物物质比例进行提取使得能够植物中以更稀的形式提取更多量的活性化合物。优选将稀释的提取物浓缩至多糖类、烷基酰胺类和/或菊苣酸的所需浓度。

另一方面，可以将超临界二氧化碳用作从紫松果菊属植物中提取生物活性化合物的无毒性溶剂。使超临界流体通过植物物质循环，直到提取过程完全根据需要发生为止。使用超临界二氧化碳制备的紫松果菊属提取物含有大部分非极性化合物（诸如油）。可以将各种其它提取溶剂（诸如丙烷和丙酮）加入到超临界液态二氧化碳中以便提取较高比例的极性化合物，但对于具有健康意识的消费者来说能够接受仅添加水和乙醇。

一般来说，用于制备紫松果菊属提取物的本发明方法中使用的提取容器是带有一个或多个开口的大容器，可以通过这些开口方便地添加和取出植物物质和提取溶剂。可以将搅拌结构安装在提取容器上，使得提取在恒

定搅拌下进行以便减少提取时间。已经将小至 500mL 和大至 3000L 的提取容器成功地用于实施本发明。容器应由耐被乙醇降解的物质构成，优选聚丙烯和不锈钢。

在用于制备紫松果菊属提取物的本发明方法的实施过程中，优选浓缩紫松果菊属提取物以便减小储存空间、提高储存稳定性（即通过减少含水量）和获得所需浓度的多糖类、烷基酰胺类和菊苣酸。优选使浓缩步骤最佳化以便将糖类、烷基酰胺类和菊苣酸的生物活性的损失减小到最低限度。由于高温会导致许多化合物快速降解，所以浓缩通常在低温和减压条件下进行。通常使用旋转蒸发器。蒸发反应瓶的一般大小在 20L - 100L 的范围。可以回收用于提取物的 5 - 90% 的溶剂。

在另一个方面中，本发明提供了富含一种或多种选自紫松果菊属多糖类、紫松果菊属烷基酰胺类和菊苣酸组成的组的成分的液体紫松果菊属提取物。目前优选的富含多糖类的紫松果菊属提取物包括浓度大于约 1% (w/v)、更优选浓度大于约 5% (w/v)、最优选大于约 10% (w/v) 的多糖类。目前优选的富含烷基酰胺类的紫松果菊属提取物包括浓度大于约 0.1% (w/v)、更优选浓度大于约 1.0% (w/v)、最优选大于约 3.0% (w/v) 的烷基酰胺类。目前优选的富含菊苣酸的紫松果菊属提取物包括浓度大于约 0.2% (w/v)、更优选浓度大于约 0.5% (w/v)、最优选大于约 3.0% (w/v) 的菊苣酸。

在另一个方面中，本发明提供了富含一种或多种选自紫松果菊属多糖类、紫松果菊属烷基酰胺类和菊苣酸组成的组的成分的固体紫松果菊属提取物。目前优选的富含多糖类的紫松果菊属提取物包括浓度大于约 0.01% (w/v)、更优选浓度大于约 0.05% (w/v)、最优选大于约 20% (w/v) 的多糖类。目前优选的富含烷基酰胺类的紫松果菊属提取物包括浓度大于约 0.001% (w/v)、更优选浓度大于约 0.01% (w/v)、最优选大于约 0.5% (w/v) 的烷基酰胺类。目前优选的富含菊苣酸的紫松果菊属提取物包括浓度大于约 0.005% (w/v)、更优选浓度大于约 0.05% (w/v)、最优选大于约 1.5% (w/v) 的菊苣酸。

目前优选的本发明紫松果菊属多糖提取物包括至少 60% (按重量计)

的阿拉伯糖和半乳糖且所述的多糖分子具有大于约 10,000 的分子量。

目前优选的本发明紫松果菊属烷基酰胺提取物包括大于约 70% (w/w) 的异丁基酰胺类。目前更为优选的本发明紫松果菊属烷基酰胺提取物含有的异丁基酰胺的浓度大于约 70% (w/w) 且包括大于约 30% (w/w) 的 2E、4E、8E、10E/Z 四烯-十二-异丁基酰胺。

在另一个实施方案中, 本发明提供了配制成标准化剂量的至少两种、优选三种紫松果菊属成分的营养组合物。目前优选的紫松果菊属成分是菊苣酸、紫松果菊属多糖类和紫松果菊属烷基酰胺类。目前优选的紫松果菊属烷基酰胺类的标准化剂量约为 0.01mg - 约 100mg、更优选约 0.01mg - 约 40mg、最优选约 0.1mg - 约 1mg; 目前优选的菊苣酸的标准化剂量约为 0.1mg - 约 120mg、更优选约 0.1mg - 约 15mg、最优选约 0.5mg - 约 3mg; 目前优选的紫松果菊属多糖类的标准化剂量约为 1mg - 约 500mg、更优选约 5mg - 约 100mg、最优选约 10mg - 约 50mg。

在另一个方面中, 本发明提供了用于提高哺乳动物体内免疫系统活性的方法。该方法包括对哺乳动物给予每日有效剂量的紫松果菊属组合物的步骤, 该紫松果菊属组合物包括标准化量的紫松果菊属菊苣酸、紫松果菊属烷基酰胺类和紫松果菊属多糖类。有代表性的紫松果菊属菊苣酸的标准化为 5 μ g/Kg 体重 - 2000 μ g/Kg 体重, 诸如 120 μ g/Kg 体重 - 1000 μ g/Kg 体重 (例如 800 μ g/Kg 体重)。有代表性的紫松果菊属烷基酰胺类的标准化量为 0.5 μ g/Kg 体重 - 200 μ g/Kg 体重, 诸如 12 μ g/Kg 体重 - 100 μ g/Kg 体重 (例如 80 μ g/Kg 体重)。有代表性的紫松果菊属多糖类的标准化量为 125 μ g/Kg 体重 - 50mg/Kg 体重, 诸如 3mg/Kg 体重 - 30mg/Kg 体重 (例如 20mg/Kg 体重)。根据非限制性实施例所述, 用于提高哺乳动物体内免疫系统活性的本方法 (使用如上所述的紫松果菊属组合物) 用于提高巨噬细胞的吞噬活性、促进巨噬细胞产生氧化氮、促进巨噬细胞产生 TNF- α 、促进脾细胞产生 IFN- γ 并促进脾细胞产生 TNF- α 。

在另一个方面中, 本发明提供了用于提高哺乳动物体内免疫系统活性的方法, 该方法包括对所述的哺乳动物给予每日有效剂量的紫松果菊属提取物的步骤, 该紫松果菊属提取物选自紫松果菊属烷基酰胺类和紫松果菊

属多糖类组成的组。有代表性的紫松果菊属烷基酰胺类的每日有效剂量为 $0.5\mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重 - $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重, 诸如 $12\mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重 - $100\mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重(例如 $80\mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重)。按照本发明的该方面, 每日有效剂量的紫松果菊属多糖类用于提高巨噬细胞的吞噬活性、促进巨噬细胞产生氧化氮和/或促进巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 。

有代表性的紫松果菊属多糖类的每日有效剂量为 $125\mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重 - $50\text{mg}/\text{Kg}$ 体重, 诸如 $3\text{mg}/\text{Kg}$ 体重 - $30\text{mg}/\text{Kg}$ 体重(例如 $20\text{mg}/\text{Kg}$ 体重)。按照本发明的该方面, 每日有效剂量的紫松果菊属多糖类用于提促进巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 。

下列实施例仅用来解释目前关注的本发明的最佳实施方式而不应将它们用于限制本发明。

实施例 1

从紫松果菊属植物中提取烷基酰胺类

使紫松果菊属植物间隔约 2 英尺生长且每周浇一次水, 直到收获花前 1 周为止。优选收获生长两年和/或三年的紫松果菊的花。优选在 8 月下旬采集完全成熟的紫松果菊花且一般从 1 英亩的田间可以采集约 700kg 的花。

将新近收获的 500kg 花用锤磨机软化成约 1.5cm^3 或 1.5cm^3 以下的颗粒大小且然后在 35°C 下用约 2000kg 的 75% 乙醇提取 72 小时。低浓度的乙醇和低温会使产量减少, 而较高浓度的乙醇和较高的温度会增加成本。用间隔 20cm 的旋转机械搅棒以 3 转/分钟搅拌液体和植物物质且从提取容器的中心轴向外扩散。在提取期限结束时, 从提取的花中得到了 2300kg 的液体提取物。

现在该提取物中含有约 $0.6\text{mg}/\text{mL}$ 的烷基酰胺类。在 25mbar 和 40°C 下将该液体提取物浓缩 30 小时这一过程产生约 100kg 的富含烷基酰胺的液体浓缩物, 其中含有的烷基酰胺的浓度约为 $10\text{mg}/\text{mL}$ 。因存在植物叶绿素而使该浓缩物的特征为深绿色且它一般含有低于约 $1\text{mg}/\text{mL}$ 的菊苣酸和低于约 $10\text{mg}/\text{mL}$ 的多糖类。

实施例 2

从紫松果菊属植物中提取菊苣酸

在 2 月下旬到 3 月上旬使幼苗从选择的非杂交的种子中发芽并在 3 月中旬或下旬前移植到田间。使植物间隔约 2 英尺且每周浇水到收获为止。将黑色塑料覆盖物用于减少杂草生长加速植物生长。仔细选择种子，这是因为掺杂 *Echinacea angustifolia* 种子（或来自 *E. angustifolia*/紫松果菊杂种的种子）会由于酶降解增加而将菊苣酸的产量减少 20 倍以上。在 9 月下旬收获作为完整植物的植物并取下植物的茎、叶和花用于提取。一般来说，1 英亩紫松果菊植物约产 1000kg 的植物物质。优选收获生长 1 年的紫松果菊植物。

将新近收获的 500kg 植物用锤磨机软化成约 $1.5\text{cm}^3 - 4\text{cm}^3$ 颗粒大小。在 25°C 下将软化的物质用 2000kg 的 50% 乙醇提取 30 小时。低浓度乙醇和较高提取温度会使得降解增加，而较高的乙醇浓度和较低的温度会降低产量。使氮气持续通过提取液体净化以减少菊苣酸的降解。使用具有容量可达 500L/小时的旋转泵使提取液体经植物糊状物循环。在提取期限结束时，可以获得 2100kg 含有约 2.0mg/ml 浓度的菊苣酸的液体提取物。

在 10mbar 和 35°C 下将该液体提取物浓缩 20 小时这一过程可产生 100kg 的富含菊苣酸的浓缩物，它含有 30mg/mL 浓度的菊苣酸。因存在植物叶绿素而使该浓缩物的特征为深绿色且含有低于 2mg/mL 的烷基酰胺类和低于 20mg/mL 的多糖类。

实施例 3

从紫松果菊属植物中提取多糖类

使紫松果菊属植物间隔约 2 英尺生长且每周浇一次水，直到收获花前 1 周为止。在 8 月下旬采集完全成熟的紫松果菊锥形花。一般来说，从 1 英亩紫松果菊植物的田间可以采集约 700kg 的花。优选收获生长 2 年和/或 3 年的紫松果菊植物。

将新近收获的 500kg 花用锤磨机软化成约 1.5cm^3 或 1.5cm^3 以下的颗

粒大小且然后在 55℃ 下用 2000kg 的 20% 乙醇提取 72 小时。较高的乙醇浓度和较低的温度会使产量减少,而较低的乙醇浓度会增加最终提取物中的微生物污染且较高的温度会增加成本。用间隔 20cm 的旋转机械搅棒以 3 转/分钟搅拌液体和植物物质且从提取容器的中心轴向外扩散。在提取期限结束时,从提取的花中得到了 1900kg 的液体提取物。

现在该提取物中一般含有约 15mg/mL 的多糖类,可以将该提取物在 50mbar、60℃ 下浓缩 15 小时以便产生约 200kg 含有约 120mg/mL 多糖浓度的浓缩物。该浓缩物的特征为深棕色且一般含有低于约 2mg/mL 的烷基酰胺类和低于约 2mg/mL 的菊苣酸。

实施例 4

从紫松果菊属植物中提取的多糖类的测定试验

多糖测定法是一种 AOAC 官方分析方法 (AOAC Official Methods of Analysis) (1995) — AOAC 官方法 988.12 (AOAC Official Method 988.12) 中的“粗甘蔗糖中的葡聚糖” (“Dextran in Raw Cane Sugar”), 44.1.30, “部分-E--苯酚-H₂SO₄ 试验” (Part-E--Phenol- H₂SO₄ Test) 中所述方法的改进形式。可以在 13X 100mm 一次性培养管内进行多糖测定试验。本试验最终的反应体积为 1.5ml。向多糖样品中加入蒸馏水以便产生 400μl 体积的水和多糖样品。然后向稀释的多糖样品中加入 100μl 的 5% (w/v) 试剂级苯酚溶液并混合。接着加入 1ml 浓硫酸 (试剂级, 95 - 98% 浓硫酸) 并通过涡旋快速混合。然后将含有样品的管置于沸水浴上 2 分钟。接下来将该管冷却至室温下 30 分钟并使用分光光度计对照蒸馏水空白测定 485 纳米 (nm) 下样品的吸收度。该分光光度计应能够精确地读取 0 - 1.5 范围内的 A₄₈₅ 吸收度值。

按照下列方式通过水提取紫松果菊属的花、用乙醇沉淀来制备紫松果菊属多糖类的浓缩标准物,如本文实施例 3 中所述获得浓缩的紫松果菊属多糖物质。将该提取物进一步浓缩至约 400mg/mL 的多糖类。然后在 4℃ 下用 4 个体积的 95% 乙醇将该浓缩物沉淀过夜。通过离心取出沉淀物并重新在 35 - 40℃ 的水浴上溶解。将在该阶段不溶解的物质弃去并用 1 个

体积的 30% (w/v) 三氟乙酸沉淀上清液。再次通过离心取出沉淀并用 4 个体积的乙醇沉淀上清液。将沉淀的多糖类溶于 2% 的乙酸钠溶液并用乙醇进行第三次沉淀。弃去上清液并将沉淀溶于水以用于带有 Spectra/Por® 10,000 MW 截止透析袋的透析。将透析进行 3 天以上并将剩余的物质冻干而得到蓬松的固体物质。

将已知重量的冻干多糖溶于已知体积的水而得到已知浓度的多糖类标准物。制备紫松果菊属多糖类标准溶液的稀释液并测定各稀释液的 A_{485} 以便构建 485 纳米下吸收度与多糖浓度的标准曲线。

实施例 5

从紫松果菊属植物中提取的烷基酰胺类的测定试验

目前优选的烷基酰胺类的测定法是一种由 Bauer 在《药用植物》(Planta Meidca) 55, 367-371 (1989) 中公开的方法的改进方法。因样品沉淀问题而将该方法的流动相由乙腈改变成甲醇。该方法使用由梯度泵、自动进样器和 UV-可见光检测器组成的 HPLC (高效液相层析)。优选使用 Hewlett Packard 1100 系列的 HPLC 系统和 Hewlett Packard 1050 系列 HPLC 系统。使用 C-18 柱, 优选使用 125 × 4.0mm Hypersi ODS 柱, 它带有匹配的 4.0mm × 4.0mm 的保护柱。在分析开始时流动相由 60% 的甲醇和 40% 的水 (v/v) 组成, 而在进入分析 12.5 分钟时以线性方式将其改变成 95% 的甲醇和 5% 的水。总运转时间为 19.00 分钟, 其中有 4 分钟的运转后平衡时间。以 1.00mL/分钟抽出流动相。注射 10μl 样品并测定 254nm 下的样品吸收度。在 2.0 分钟 - 9.0 分钟时烷基酰胺被从柱上洗脱下来。更特别的是在 5.0 - 8.0 分钟时洗脱下十二-2E, 4E, 8E, 10E/Z-四烯酸异丁基酰胺。

优选在室温下通过用 500ml 石油醚提取如本文实施例 3 中所述制备的 500ml 富含烷基酰胺的浓缩物来制备烷基酰胺的浓缩标准物。在 1 天后取出石油醚级分并在真空中蒸发至干且产生暗黑色的油状残余物。将该残余物溶于最小量的甲醇 (约 20mL) 并离心而除去沉淀。将十八烷基官能化硅胶固定在玻璃柱上。使用由 70% 的甲醇和 30% 的水 (按体积计) 组成

的流动相进行洗脱。使由液体浓缩物制备的物质上柱并收集 10mL 级分。使用所述的分析法分析级分中烷基酰胺的含量并收集所关注的含有 90% 和 90% 以上纯度的烷基酰胺的级分。然后在 45℃ 下旋转蒸发所收集的级分以减小总体积。在真空中将从柱上洗脱的纯化烷基酰胺级分蒸发至得到一种澄清的（黄色）液体。向残余物中加入石油醚并在热水浴上加温。将残余物和液体进行超声处理以用纯化的烷基酰胺饱和该溶液。收集饱和溶液并使其冷却至室温。然后将溶液移至 -20℃ 的冷冻机中。结晶形成过夜。500mL 饱和溶液产生约 0.1 - 5g 的纯化结晶，这取决于特定烷基酰胺的溶解度。

将纯化的烷基酰胺标准物溶解成各种浓度并使其通过如本文所述的 HPLC 柱。根据产生的峰面积与烷基酰胺标准溶液的浓度构建校准曲线。将来自未知浓度的烷基酰胺样品的峰面积与校准曲线进行比较以便确定各样品中的浓度。

实施例 6

从紫松果菊属植物中提取的菊苣酸的测定试验

菊苣酸的分析方法是一种由 Bauer 在《药用植物》（*Planta Medica*）57, 447-449（1991）中公开的方法的改进方法。因样品沉淀问题而将该方法的流动相由乙腈改变成甲醇。该方法使用由梯度泵、自动进样器和 UV-可见光检测器组成的 HPLC（高效液相层析）。在这种情况下，使用 Hewlett Packard 1100 系列的 HPLC 系统和 Hewlett Packard 1050 系列 HPLC 系统。使用 C-18 柱，优选使用 125 × 4.0mm Hypersil ODS 柱，它带有匹配的 4.0mm × 4.0mm 的保护柱。在分析开始时流动相由 7.0% 的甲醇和 93.0% 的含有 0.1% 磷酸的水（v/v）组成，而在进入分析 11.6 分钟时以线性方式将其改变成 32% 的甲醇和 68% 的水，在 19.1 分钟时将其改变成 40.7% 的甲醇和 59.3% 的含有 0.1% 磷酸的水。总运转时间为 22.00 分钟，其中有 3.50 分钟的运转后平衡时间。以 1.00mL/分钟抽出流动相。注射 10μl 样品并收集 330nm 下的数据。将样品的峰面积与用于定量的纯化学标准品进行比较。在 7.0 分钟 - 18.0 分钟时咖啡酸衍生物被从柱上

洗脱下来。更特殊的是在 14.5 - 17.0 分钟时洗脱下菊苣酸。

按照下列方式制备菊苣酸浓缩标准物。通过在 50℃ 下进行真空蒸馏来进一步减少如本文实施例 2 中所述制备的富含菊苣酸的液体浓缩物。通过使用 2 份异丙醇和 1 份蒸馏的浓缩物进行异丙醇沉淀而提取出多糖类。除去上清液并在 37℃ 下通过真空蒸馏而蒸发出异丙醇。加入 2 倍浓缩物体积的蒸馏水并用浓盐酸将该浓缩物的 pH 调节至 pH 0-1。通过经带有 100% 甲醇作为流动相的亲脂性 Sephadex LH-20 柱的洗脱而进一步纯化菊苣酸。收集通过如上所述方法分析的含有 90% 以上纯度的菊苣酸的级分。在真空中使所收集的级分减少至干且然后重新溶于最小量的沸腾的热水。在冷却时结晶出菊苣酸的短白色针晶。

将纯化的菊苣酸标准物溶解成各种浓度并使其通过如本文所述的 HPLC 柱。根据产生的峰面积与菊苣酸标准溶液的浓度构建校准曲线。将来自未知浓度的菊苣酸样品的峰面积与校准曲线进行比较以便确定各样品中的浓度。

实施例 7

本发明的典型紫松果菊属组合物

根据有代表性的实施例所述, 按照下列方式制备本发明的商品紫松果菊属组合物。分别按照下列体积比组合富含烷基酰胺的浓缩物(按照本文实施例 1 制备)、富含菊苣酸的浓缩物(按照本文实施例 2 制备)和富含多糖的浓缩物(按照本文实施例 3 制备): 0.4:0.2:0.4。将这些浓缩物用电动混合机混合而得到均匀的产品。在一个目前优选的实施方案中, 这种组合的液体浓缩物含有 5.2mg/mL 的烷基酰胺类、7.2mg/mL 的菊苣酸和 56mg/mL 的多糖类。将这种混合的组合物用于制备如下的商品紫松果菊属组合物:

(a) 通过蒸发混合的紫松果菊属组合物以进一步除去乙醇且然后通过添加 9 倍体积的 70% (w/w) 甘油而将蒸发的组合物稀释 10 倍来制备不含醇的商品液体紫松果菊属组合物。将所得的物质充分混合成含有 0.52mg/mL 的烷基酰胺类、0.72mg/mL 的菊苣酸和 5.6mg/mL 的多糖类的

产品。

(b) 通过添加 9 倍体积的 40% (w/w) 乙醇而将混合的紫松果菊属组合物稀释 10 倍来制备含有醇的商品液体紫松果菊属组合物。将所得的物质充分混合成含有 0.52mg/mL 的烷基酰胺类、0.72mg/mL 的菊苣酸和 5.6mg/mL 的多糖类的产品。

(c) 通过添加 9 倍体积的 30% 卵磷脂和 70% 大豆油的混合物而将混合的紫松果菊属组合物稀释 10 倍来制备商品液体紫松果菊属软胶囊。将所得的物质充分混合且然后以 1.0mL/胶囊包成软胶囊而得到含有 0.52mg/胶囊的烷基酰胺类、0.72mg/胶囊的菊苣酸和 5.6mg/胶囊的多糖类的产品。

(d) 通过将混合的紫松果菊属组合物与 9 倍其体积的水混合且然后用 10% (w/w) 磷酸三钙作为载体冻干来制备冻干的紫松果菊属粉末。在冻干 30 小时后获得干燥的滤饼。一旦将该冻干的滤饼通过 100 μ m 锥形磨磨碾, 则获得了包括 2.6mg/g 的酰胺类、3.6mg/g 的菊苣酸和 2.8mg/g 的多糖类的易流动的粉末。

(e) 通过将混合的紫松果菊属组合物与 1% (v/v) 的稳定用维生素 E 混合且然后用纤维素和蜡包衣材料对该混合物包微囊来制备微囊化的紫松果菊属粉末, 其中包衣材料在平均为 100 μ m 大小的胶囊中占 50% (w/w)。该微囊看起来为一种易流动的粉末, 它含有由 2.6mg/g 的酰胺类、3.6mg/g 的菊苣酸和 2.8mg/g 的多糖类组成的组合物。

(f) 通过将冻干的粉末(本实施例(d)部分中所述)或微囊化粉末(本实施例(e)部分中所述)与 5 份(按重量计)的微晶纤维素和 2% (w/w) 硬脂酸镁混合来制备紫松果菊属硬胶囊。将所得的粉末包囊成 1000mg 胶囊而得到 0.52mg/胶囊的烷基酰胺类、0.72mg/胶囊的菊苣酸和 5.6mg/胶囊的多糖类。

(g) 通过将冻干的粉末(本实施例(d)部分中所述)或微囊化粉末(本实施例(e)部分中所述)与 3 份(按重量计)磷酸二钙、2 份(按重量计)的微晶纤维素和 3% (w/w) 硬脂酸镁混合来制备紫松果菊属片剂。将所得粉末冲压成 1000mg 片剂而得到 0.52mg/片的烷基酰胺类、

0.72mg/片的菊苣酸和5.6mg/片的多糖类。

实施例8

本发明紫松果菊属组合物和提取物对免疫功能的作用

本实施例中所述的数据表明本发明的紫松果菊属提取物和组合物可刺激大鼠免疫系统的各个方面。

动物的维持和组织取样：在给予测试物质前将幼小的成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠（每只约 240g）在实验室中驯化 1 周。通过管饲针头对每只动物给予 100 微升本文特定的各种浓度的测试物质，每日两次，持续 4 天。在第 5 天从动物体内取血和组织样品用于分析。每个试验组包括 8 只动物，取它们的测试结果的平均值。

测试物质：对动物给予的对照样品是乙醇和水的混合物。对每只动物给予下列测试物质之一（表 1 中所列的剂量水平，将其表示为微克（ μg ）测试物质/千克（kg）测试动物体重）：4 种剂量水平的紫松果菊属烷基酰胺提取物之一；4 种剂量水平的紫松果菊属菊苣酸提取物之一；4 种剂量水平的紫松果菊属烷基酰胺提取物之一；或 4 种剂量水平的紫松果菊属组合物之一，它包括紫松果菊属烷基酰胺、菊苣酸和多糖类提取物。

紫松果菊属组合物含有用于每日剂量的特定量的表 1 中所列的三种提取物。例如，紫松果菊属组合物的每日剂量水平 1 提供了 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 烷基酰胺、 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 菊苣酸和 $125\mu\text{g}/\text{kg}$ 多糖类。通过混合三种如本文实施例 1-3 中所述制备的紫松果菊提取物（烷基酰胺类、菊苣酸和多糖类）来制备紫松果菊属组合物。

表 1

	水平 1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	水平 2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	水平 3 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	水平 4 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	水平 5 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
烷基酰胺	0.5	4	12	80	200
菊苣酸	5	40	120	800	2000
多糖类	125	1000	3000	20000	50000

血液的处理: 通过心脏穿刺从测试动物中获得血液并将其保存在 EDTA 真空管内, 将该管以 3000rpm 离心 10 分钟 (min.) 以分离血浆。将血浆储存在 -30°C 下的密封塑料管内至使用时为止。

脾细胞的制备: 将来自动物的脾脏压过补充了 0.5% 的牛血清清蛋白 (BSA) 的冷 Krebs-Ringer-HEPES 溶液 (KRH) 中的尼龙筛网并收集在 50mL 试管内。然后在 4°C 下以 2000rpm 将收集的细胞离心 10 分钟并离心上清液。向该细胞中加入 1 毫升的裂解缓冲液 ACK (含有氯化铝和氯化钾)。接着将该细胞用 50mL 的 KRH+BSA 洗涤两次。接下来将细胞重新悬浮于 1mL CCM (含有 RPMI-1640 和 4% 胎牛血清的完全培养基)。RPMI-1640 是一种由 Moore 和 Woods (如在《组织培养协会指南》(Tissue Culture Association Manual) 3: 503-508 (1976) 公开的) 开发的基于碳酸氢盐的缓冲系统, 它含有青霉素、链霉素、两性霉素、谷氨酰胺、2-巯基乙醇和 HEPES, 其中的每一种成分均以 1% (v/v) 的浓度存在。将细胞稀释成 $3.0-5.0 \times 10^6/\text{mL}$ 并用 20 μL 伴刀豆凝集素 A (Con A) ($10\mu\text{g}/\text{mL}$) 活化且保温 48 小时。在 48 小时后, 将该细胞离心并收集上清液且在 -30°C 下冷冻以用于细胞因子和氧化氮测定试验。

肺泡巨噬细胞的制备: 通过用 40mL 磷酸缓冲盐水 (PBS) 灌洗支气管肺泡来获得肺泡巨噬细胞。在 4°C 下以 2000rpm 将该细胞离心 20 分钟并离心上清液。然后将细胞悬浮于 1mL 补充了 10% 胎牛血清的 RPMI 中。将细胞稀释成 $5-10 \times 10^6$ 个细胞/mL 并将 100 μL 的稀释细胞在 37°C 下的 V 型底的微量滴定平板上保温 2 小时。弃去上清液并用 PBS 将所述微量滴定平板洗涤 3 次。加入 200 μL 的 LPS 以活化细胞且然后将该细胞保温 24 小时。在保温后收集上清液并在 -30°C 下冷冻以用于细胞因子和氧化氮测定试验。

吞噬试验: 在 37°C 下将巨噬细胞保温 3 小时以便于粘着。然后将它们用 10% RPMI 洗涤 3 次且然后加入浓度为 2.5×10^6 个珠/200 μl 的胶乳珠。将细胞保温 1 小时以上并用 RPMI 洗涤 5 次。将细胞染色并通过显微镜检查来确定吞噬作用。

氧化氮试验：制备 4mM 亚硝酸钠的储备溶液且仅在使用前用 4% CCM 缓冲液稀释成 1mM。以各种浓度使用亚硝酸钠的储备溶液来构建线性校准曲线。通过将 0.05g 磺胺和 6mL、85% 的磷酸溶于 100mL 水并将 0.05g N-(1-萘基)乙二胺溶于 100mL 水来制备 Griess 试剂。向 Griess 试剂中加入来自巨噬细胞或脾细胞的上清液并使之稳定 10 分钟。在 540nm 处测定吸收度并根据亚硝酸钠标准曲线计算氧化氮的浓度。

TNF- α 、INF- γ 和白细胞介素-2 测定试验：抗体获自下列供应商中的任何一个：Sigma Chemicals, Box 14508 St. Louis, Missouri 63178, U. S. A.; R&D Systems; 或 PharMagen, 6300 Kitimat Road, Unit 1, Mississauga, Ontario L5N 5M1, Canada. 使用标准 ELISA 方案进行本试验。

本发明紫松果菊属组合物和提取物对肺泡巨噬细胞内吞噬活性和吞噬指数的作用：正如附图 1 中所示，本实施例中所示紫松果菊属组合物的所有剂量水平（如表 1 中所列的水平 2-5）均导致肺泡巨噬细胞的吞噬活性和吞噬指数增加。正如附图 2 中更清楚表示的，当剂量增加时，对吞噬活性和吞噬指数的作用也增加同样的等级。

正如附图 3 中所示，如本文实施例 2 中所述制备且对大鼠给予表 1 中所列 1-4 剂量水平的本发明紫松果菊属菊苣酸提取物对大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬活性或吞噬指数没有显著作用。类似地如附图 4 中所示，如本文实施例 3 中所述制备且对大鼠给予表 1 中所列 1-4 剂量水平的本发明紫松果菊属多糖提取物对大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬活性或吞噬指数没有显著作用。

相反，如附图 5 中所示，如本文实施例 1 中所述制备且对大鼠给予表 1 中所列 1-4 剂量水平的本发明紫松果菊属烷基酰胺类提取物与用乙醇和水的混合物处理的对照组大鼠相比可提高大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬活性或吞噬指数。与对照组相比，烷基酰胺提取物特别在剂量水平 3 下显著增加巨噬细胞的活性和吞噬指数、最高可将活性提高 60% 并将指数提高 50%。附图 6 表示本实施例所述的紫松果菊属组合物以及各紫松果菊属菊苣酸、烷基酰胺和多糖提取物对吞噬指数的作用的比较。从附图 6 中清楚

地看出紫松果菊属组合物与各个化合物相比具有统计学显著性的协同活性。

本发明的紫松果菊属组合物和提取物对由肺泡巨噬细胞产生的氧化氮的作用：正如附图 1 中所示，本实施例中所述的如表 1 中所列的紫松果菊属组合物的剂量水平 3-5 导致肺泡巨噬细胞产生的氧化氮增加。当剂量增加时，氧化氮浓度增加同样的等级。

正如附图 3 和 4 中所示，如本文实施例 2 和 3 所述制备的紫松果菊属菊苣酸和多糖提取物没有显著增加由肺泡巨噬细胞产生的氧化氮浓度。相反，如附图 5 中所示，如本文实施例 1 中所述制备的紫松果菊属烷基酰胺类提取物的剂量水平 1-4（尤其是剂量水平 3 和 4）导致由肺泡巨噬细胞产生的氧化氮浓度显著增加。

本发明的紫松果菊属组合物和提取物对巨噬细胞中 $\text{TNF-}\alpha$ 产生的作用：正如附图 1 中所示，本实施例中所述的如表 1 中所列的紫松果菊属组合物在剂量达到水平 4 时导致由肺泡巨噬细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 增加。最初 $\text{TNF-}\alpha$ 的产生量随紫松果菊属组合物剂量的增加而增加，然后该反应减少。正如附图 7 中所示，紫松果菊属组合物的最佳剂量出现在水平 4-水平 4 之间。

正如附图 3 中所示，如本文实施例 2 中所述制备的紫松果菊属菊苣酸提取物不会显著增加由肺泡巨噬细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 水平。相反，正如附图 4 和 5 中所示，如本文实施例 3 和 1 中所述制备的紫松果菊属多糖提取物和紫松果菊属烷基酰胺提取物均可显著增加由肺泡巨噬细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 水平。烷基酰胺提取物的刺激作用在剂量水平 3 下特别强烈。然而，烷基酰胺在剂量水平 4 下使产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 恢复到对照组的水平。这可能是在该剂量下氧化氮的产生明显增加的结果。

本发明的紫松果菊属组合物和提取物对脾细胞中 $\text{TNF-}\gamma$ 产生的作用：正如附图 1 中所示，本实施例中所述的紫松果菊属组合物的所有剂量水平（如表 1 中所列的水平 2-5）均导致由脾细胞产生的 $\text{TNF-}\gamma$ 增加。这种作用在剂量水平 4 和 5 下最为明显。

正如附图 3-5 中所示，紫松果菊属菊苣酸、烷基酰胺和多糖提取物

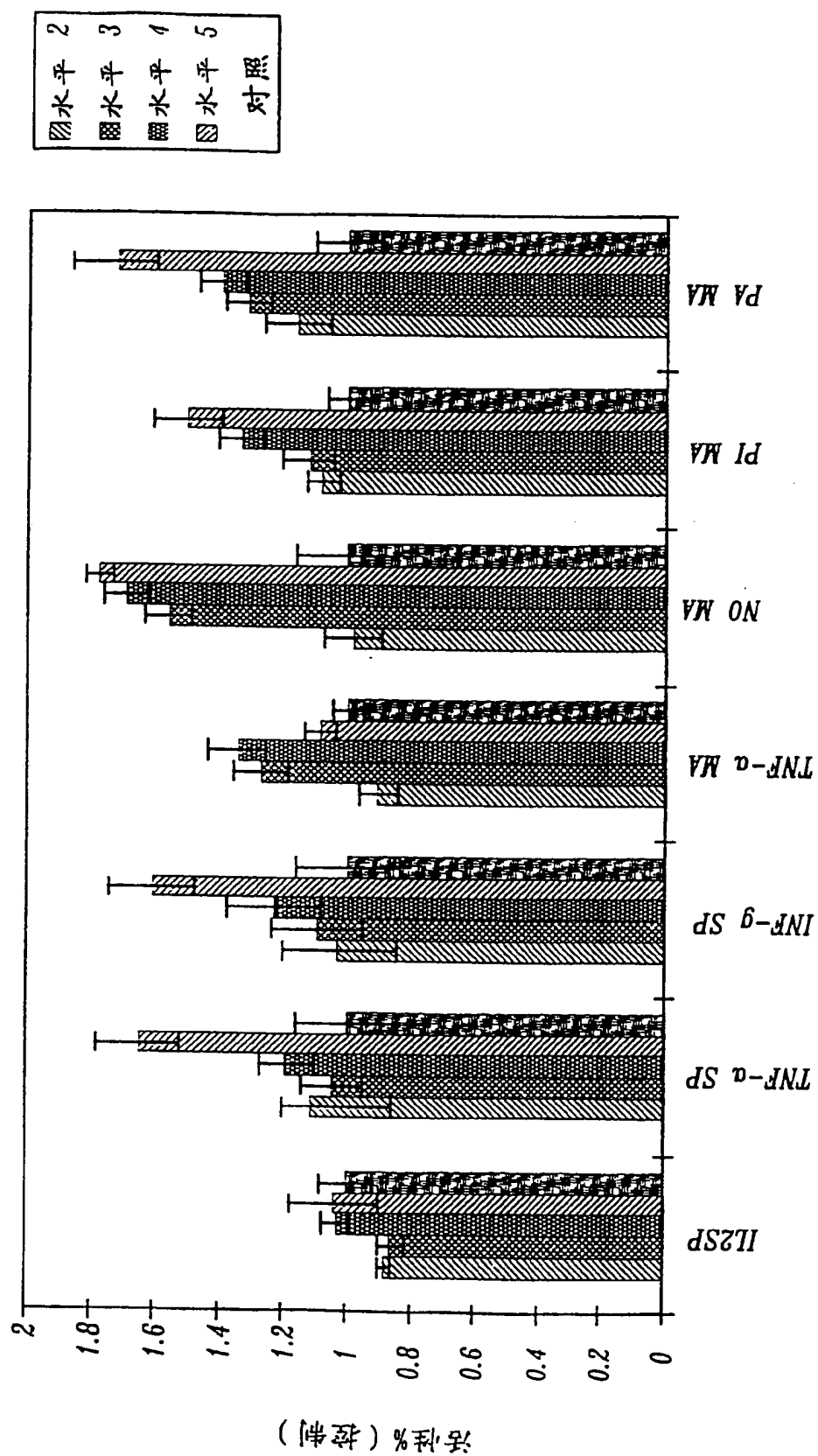
不会导致由脾细胞产生的 $\text{IFN-}\gamma$ 显著增加。

本发明的紫松果菊属组合物和提取物对脾细胞中 $\text{TNF-}\alpha$ 产生的作用：正如附图 1 中所示，本实施例中所述的紫松果菊属组合物的剂量水平 5 导致由脾细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 显著增加。

本发明的紫松果菊属组合物和提取物对脾细胞中 IL-2 产生的作用：正如附图 1 中所示，本实施例中所述的紫松果菊属组合物的剂量水平 2 和 3 抑制脾细胞中 IL-2 的产生，而剂量水平 4 和 5 产生的值接近于对照组 IL-2 产生的值。在表示大鼠脾细胞中 IL-2 的产生与紫松果菊属组合物的相对浓度的图的附图 8 中更清楚地观察到了这种抑制作用。对 IL-2 的抑制作用导致炎症反应得到抑制，这可以缓解炎症疾病症状的严重程度（且可以改善糖尿病晚期发作的症状）。

正如附图 3-5 中所示，紫松果菊属菊苣酸、烷基酰胺和多糖提取物不会影响脾细胞中 IL-2 的产生。

尽管已经解释和描述了本发明的优选实施方案，但是可以理解的是可以对其中的内容进行各种改变而不会脱离本发明的实质和范围。



参数
图 1.

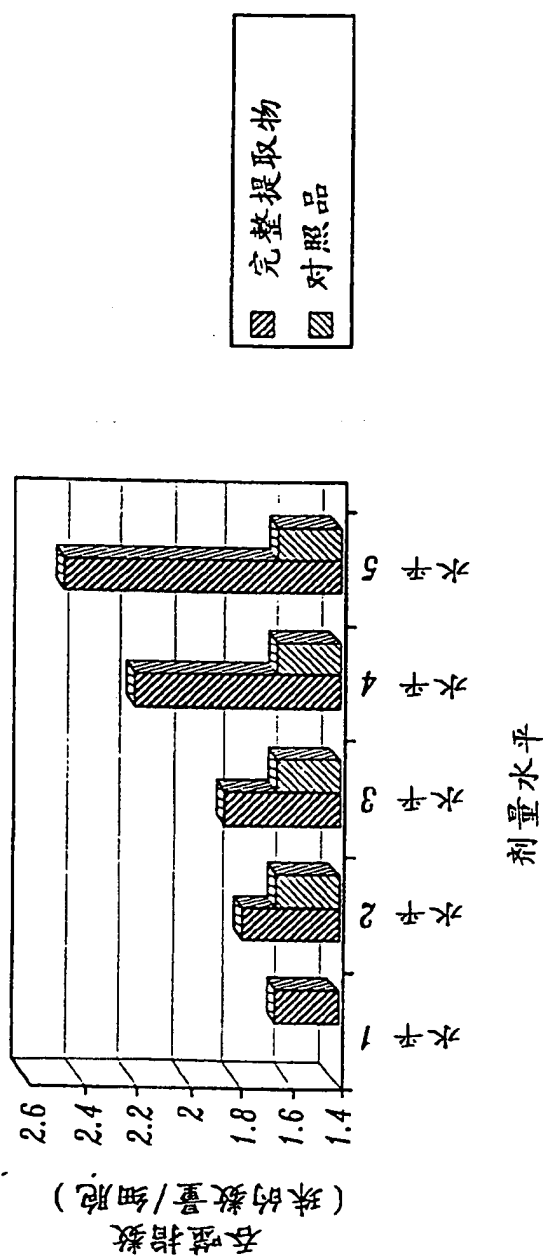
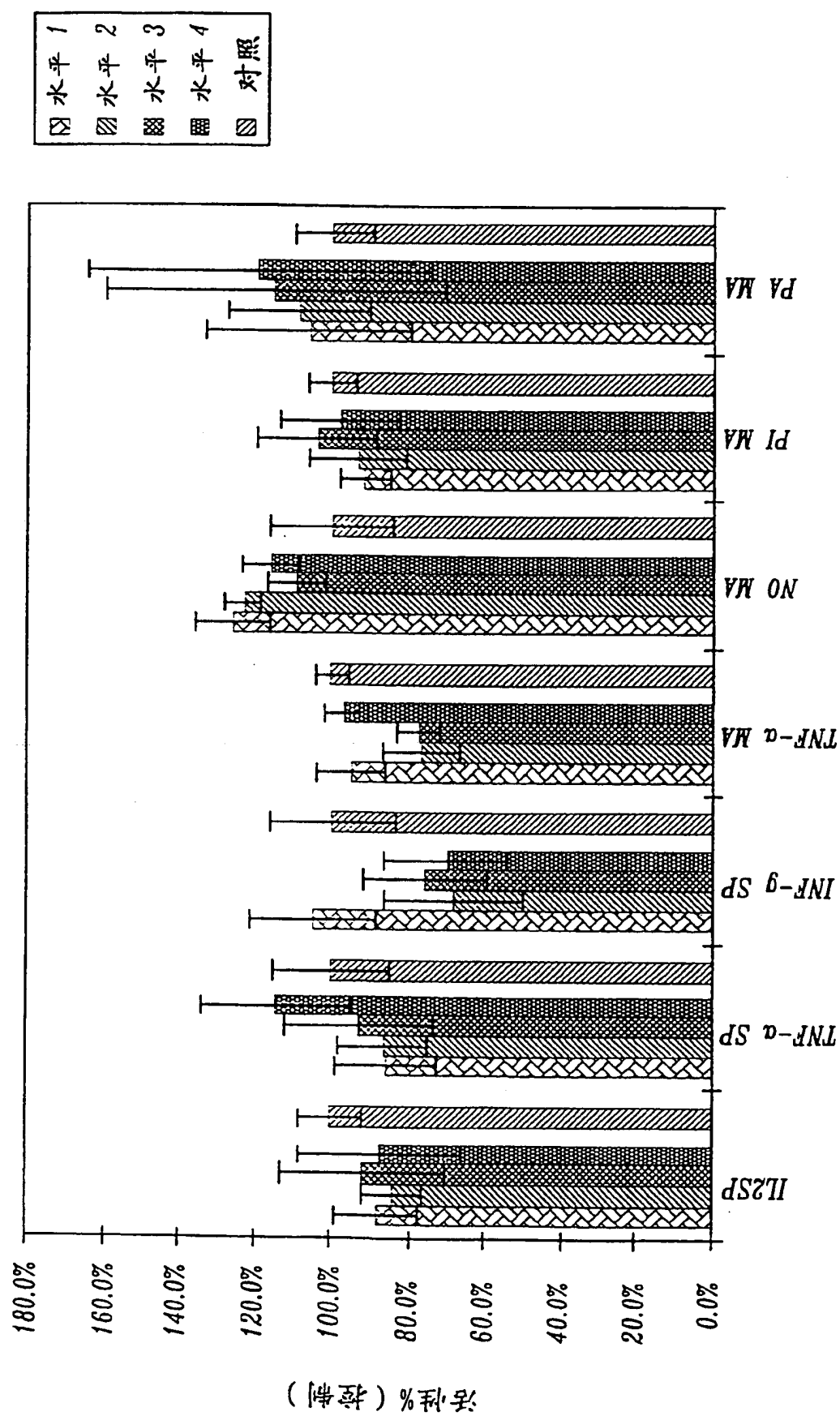
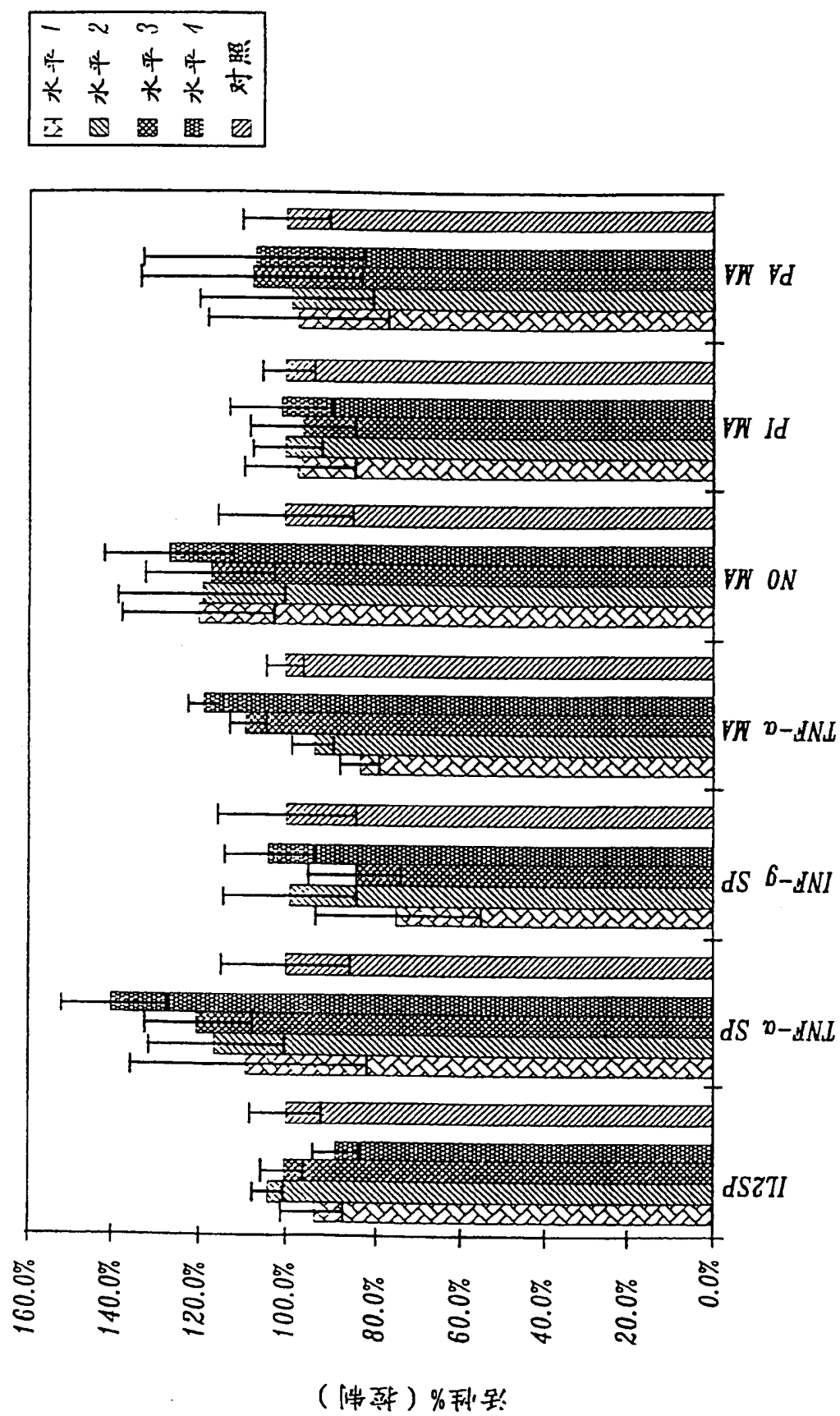


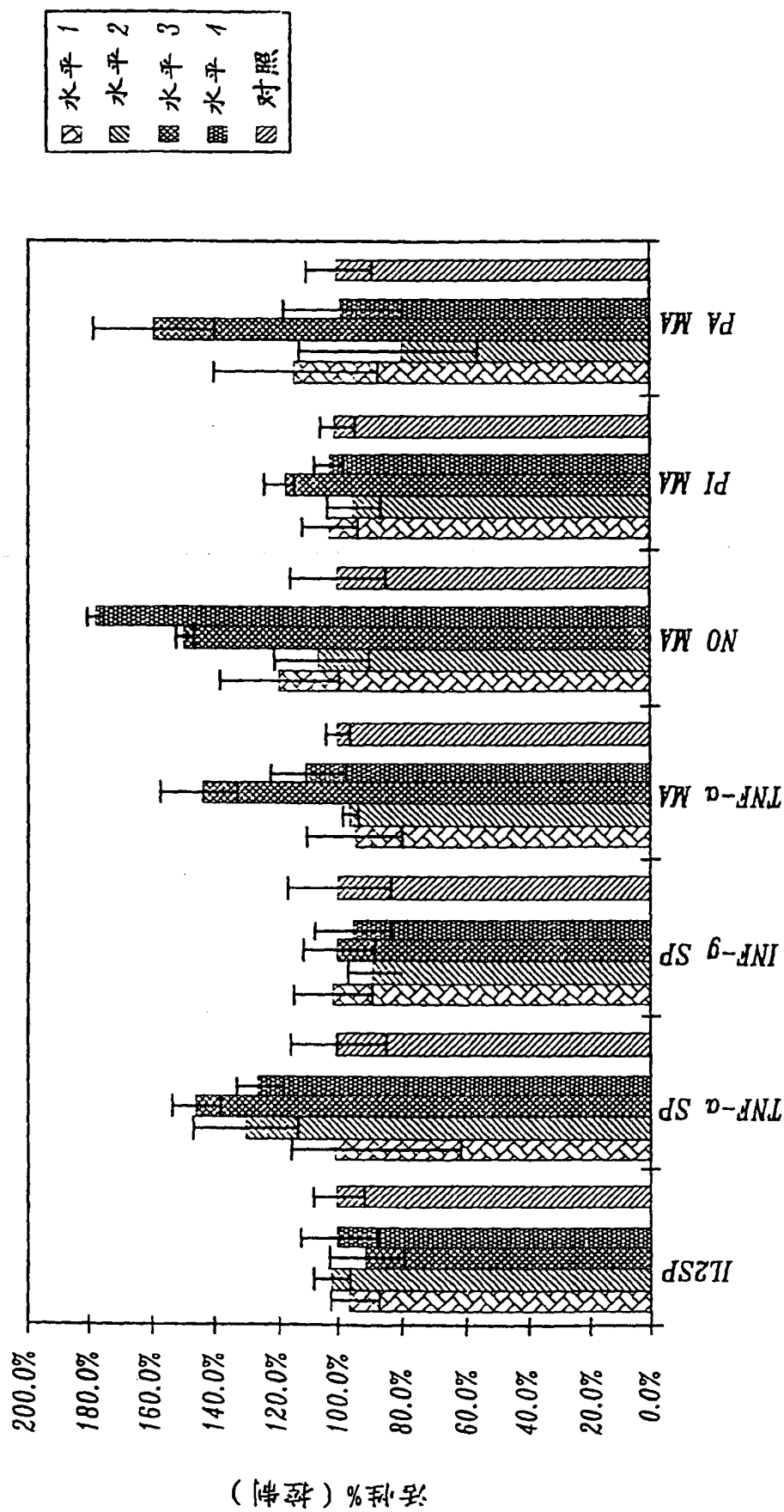
图2.



参数
图 3.



参数
图 4.



参数
图5.

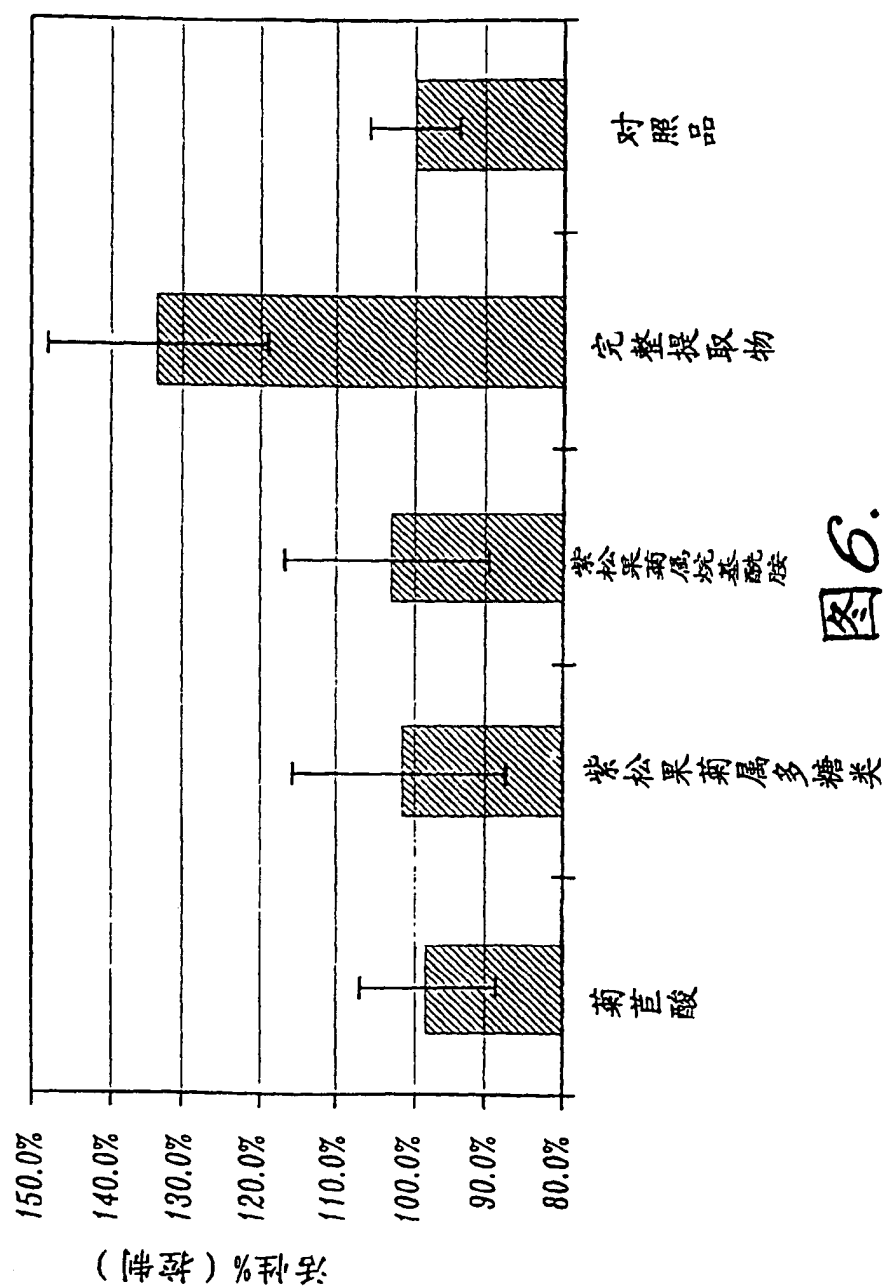


图6.

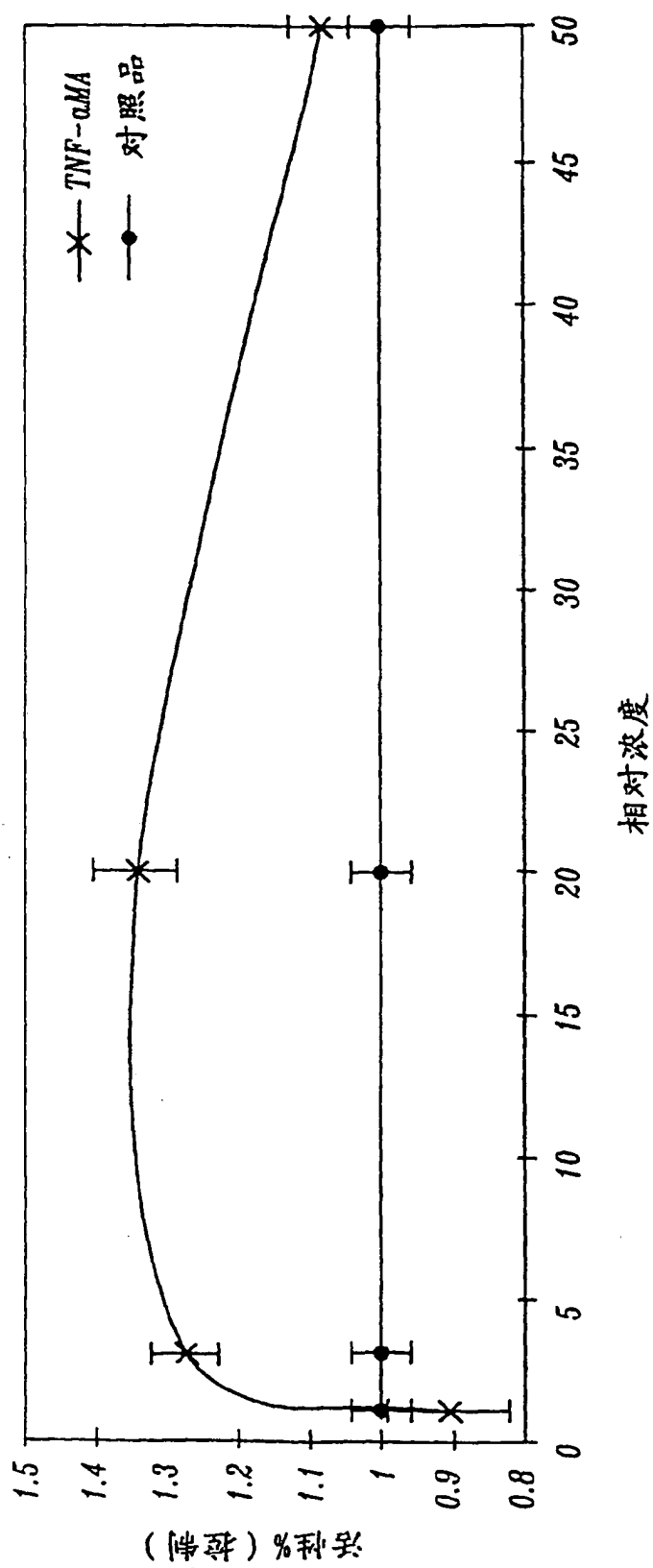


图7.

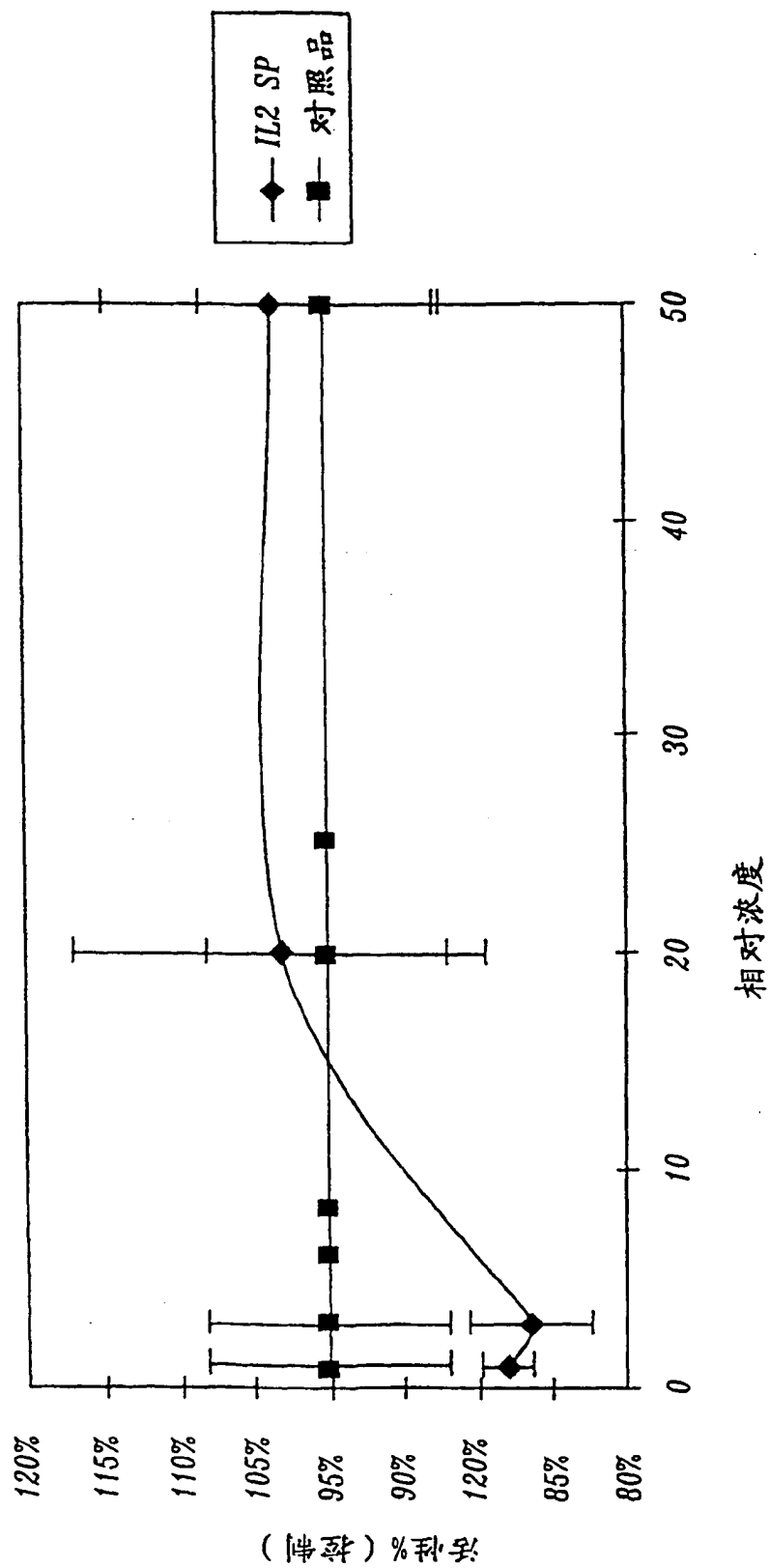


图8.