



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115381920 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202210988260.9	A61K 9/20 (2006.01)
(22) 申请日 2022.08.17	A61K 9/08 (2006.01)
(71) 申请人 长沙市惠瑞生物科技有限公司	A61K 9/52 (2006.01)
地址 410000 湖南省长沙市芙蓉区隆平高科技园雄天路1号湖南金丹科技创业大厦B栋第5层505号房	A61K 47/36 (2006.01)
申请人 湖南佳信佰生物技术有限公司	A61K 47/02 (2006.01)
(72) 发明人 赵振伟	A61P 37/04 (2006.01)
(74) 专利代理机构 长沙知行亦创知识产权代理事务所(普通合伙) 43240	A61P 39/06 (2006.01)
专利代理师 李杰	A61P 35/00 (2006.01)
(51) Int. Cl.	A61P 1/14 (2006.01)
A61K 36/9068 (2006.01)	A61P 13/12 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)	A61P 15/00 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)	A61P 15/08 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)	C12P 21/06 (2006.01)
	C12P 19/04 (2006.01)
	A61K 31/715 (2006.01)
	A61K 31/704 (2006.01)

权利要求书3页 说明书18页

(54) 发明名称

一种铁皮石斛复方制剂及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提出了一种铁皮石斛复方制剂及制备方法和应用,属于生物制剂技术领域,由以下原料按重量份制备而成:铁皮石斛20-40份,白扁豆20-40份,茯苓20-40份,陈皮20-40份,生姜20-40份,广藿香11-31份,甘草10-20份。具有清胃生津,健脾凉血,健脾补肾,利湿消肿,活血通络等效果,能明显提高机体免疫力,提高其抗氧化、抗衰老、抗癌的能力,进入人体后,可以缓慢释放活性组合物,从而起到长效调节,延长反应效果的作用,用于肺肾两虚,气阴不足,蛋白尿、水肿、尿量减少、倦怠乏力、面色不华等水湿不化,腰膝酸痛,咳嗽少痰,咽干口燥,脉虚弱者,脾肾两虚、血瘀不通诸症。

1. 一种铁皮石斛复方制剂,其特征在于,由以下原料按重量份制备而成:铁皮石斛20-40份,白扁豆20-40份,茯苓20-40份,陈皮20-40份,生姜20-40份,广藿香11-31份,甘草10-20份。

2. 根据权利要求1所述铁皮石斛复方制剂,其特征在于,还包括以下重量份的原料:枳壳20-40份,牡丹皮20-40份,赤芍20-40份。

3. 一种如权利要求1或2所述铁皮石斛复方制剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 按比例称取各药材,粉碎,混合均匀,加入等质量的50%-95%乙醇中浸泡12-48h,渗漉装置渗漉,收集漉液;

(2) 将步骤(1)中的药渣浸泡10-50min后,加水回流提取两次,分别为6-10倍水,4-8倍水;控制回流时间为1.5-3.5h,温度为85-100℃;合并两次药液,加入步骤S1中的漉液中,过陶瓷膜过滤器,滤膜孔径为2-8 μ m,滤液减压回收乙醇;剩余药液进行浓缩,至原来体积的1/7-1/10,板框过滤,得到药液;

(3) 将步骤(2)制得的药液制备成胶囊剂、颗粒剂、片剂或口服液;

其中,胶囊剂的制备方法如下:将步骤(3)制得的药液浓缩至相对密度为1.20-1.30,喷雾干燥的干粉,干粉装硬胶囊即得;

颗粒剂的制备方法如下:将步骤(3)制得的药液浓缩至相对密度为1.20-1.30,喷雾制粒,干燥、整粒即得颗粒;

片剂的制备方法如下:将步骤(3)制得的药液浓缩至相对密度为1.20-1.30,喷雾制粒,干燥、整粒得到颗粒,控制水分在4-5%,添加硬脂酸镁,压片即得;

口服液的制备方法如下:另称量羧甲基纤维素钠,海藻酸钠用水溶解,液体呈现无色透明,加入步骤(3)制得的药液,搅拌混合均匀,加入赤藓糖醇、木糖醇,山梨酸钾,搅拌使完全溶解,另将柠檬酸和苹果酸溶于水中,滴加入上述料液中,边加边搅拌,板框过滤,使溶液澄清透明,灌装即得口服液。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述羧甲基纤维素钠、海藻酸钠、赤藓糖醇、木糖醇、山梨酸钾、柠檬酸和苹果酸的质量比为0.1-0.3:0.1-0.3:20-60:20-40:0.5-1.5:0.2-1:0.2-1。

5. 一种如权利要求1或2所述铁皮石斛复方制剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 中药酶解多肽的制备:按比例称取各药材,粉碎,混合均匀,加入水中,加入第一复合酶酶解,超声波处理灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到中药酶解多肽;

S2. 中药酶解多糖的制备:将步骤S1中的滤渣加入水中,加入第二复合酶酶解,加热回流提取,过滤,滤渣留用,滤液中加入乙醇沉淀,离心,得到中药酶解多糖;

S3. 乙醇提取:将步骤S2中的滤渣加入等质量的50%-95%乙醇中浸泡12-48h,渗漉装置渗漉,收集漉液,药渣用水洗净留用,将漉液回收乙醇,剩余液中加入乙酸乙酯-丙酮混合溶液,萃取,除去溶剂,洗涤,得到活性物;

S4. 发酵菌活化:将红曲霉、酿酒酵母、面包酵母分别在高氏培养基中活化培养,得到菌种种子液;

S5. 发酵:将步骤S2制得的中药酶解多糖和步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种

步骤S4中活化的红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,发酵培养,加入活化液,继续发酵培养,冷冻干燥,得到发酵产物;

S6. 活性组合物的制备:将步骤S1中制得的中药酶解多糖、步骤S3制得的活性物、步骤S5制得的发酵产物、枸杞多糖、人参皂苷Rg1和灵芝孢子粉混合均匀,得到活性组合物;

S7. 铁皮石斛复方制剂的制备:将壳聚糖溶于酸液中后,加入 α -酮戊二酸,搅拌反应第一时间段,加入硼氢化钠,继续搅拌反应第二时间段,加入乙醇,过滤,洗涤,干燥,研细,得到羧基化壳聚糖;将步骤S6制得的活性组合物、羧基化壳聚糖、海藻酸钠溶于水中,加入亲水乳化剂,得到水相;将亲油乳化剂溶于食用油中,得到油相;将水相和油相混合后,用SPG膜进行快速膜乳化,形成乳液,加入氯化钙溶液,常温固化,过滤,干燥,得到缓释微胶囊,即为铁皮石斛复方制剂。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤S1中所述第一复合酶为碱性蛋白酶和风味蛋白酶的复配混合物,质量比为1-3:2;酶解温度为45-55 $^{\circ}$ C, pH值为8.5-9,时间为2-4h;步骤S2中所述第二复合酶为纤维素酶和果胶酶,质量比为3-5:2;酶解温度为40-55 $^{\circ}$ C,酶解时间为1-3h;所述乙醇加入至体系乙醇含量为60-70%。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤S3中所述剩余液和乙酸乙酯-丙酮混合溶液的体积比为1:2-3;所述乙酸乙酯-丙酮混合溶液中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1-2:1;步骤S4中所述活化培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C, 50-70r/min,培养18-24h,所述菌种种子液的含菌量为 10^7 - 10^9 cfu/mL;步骤S5中所述中药酶解多糖和药渣的质量比为1-3:5;所述红曲霉、酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为3-5%、1-3%、0.5-1.5%;所述发酵培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C, 50-70r/min,培养24-36h,所述继续发酵培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C, 50-70r/min,培养18-24h;所述活化液为含有5-10wt%甘露糖醇和7-12wt%海藻糖的水溶液,所述活化液的添加量为体系总质量的9-12wt%。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤S6中所述中药酶解多糖、活性物、发酵产物、枸杞多糖、人参皂苷Rg1和灵芝孢子粉的质量比为10:2-3:7-12:1-2:0.05-0.2:0.5-1;步骤S7中所述酸液为3-5wt%的醋酸溶液;所述壳聚糖、 α -酮戊二酸、硼氢化钠的质量比为1:2-3:0.3-0.5;所述第一时间段为15-17h;所述第二时间段为3-7h;所述亲水乳化剂选自十二烷基苯磺酸钠、十二烷基硫酸钠、十二烷基磺酸钠、十六烷基苯磺酸钠、十六烷基磺酸钠、十六烷基硫酸钠、十八烷基磺酸钠、十八烷基苯磺酸钠中的至少一种;所述亲油乳化剂选自司盘-20、司盘-40、司盘-60、司盘-80中的至少一种;所述食用油选自花生油、玉米油、大豆油、菜籽油、亚麻籽油、橄榄油中的至少一种;所述活性组合物、羧基化壳聚糖、海藻酸钠、亲水乳化剂的质量比为3-5:6-8:4-6:0.1-1;所述水相和油相的质量比为3-5:8;所述SPG膜的孔隙为5-10 μ m;所述氯化钙溶液的含量为3-7wt%。

9. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,具体步骤如下:

S1. 中药酶解多肽的制备:按比例称取各药材,粉碎,混合均匀,加入水中,加入第一复合酶酶解,酶解温度为45-55 $^{\circ}$ C, pH值为8.5-9,时间为2-4h,超声波处理灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到中药酶解多肽;所述第一复合酶为碱性蛋白酶和风味蛋白酶的复配混合物,质量比为1-3:2;

S2. 中药酶解多糖的制备:将步骤S1中的滤渣加入水中,加入第二复合酶酶解,酶解温度为40-55 $^{\circ}$ C,酶解时间为1-3h,加热回流提取,过滤,滤渣留用,滤液中加入乙醇至体系乙

醇含量为60-70%，沉淀，离心，得到中药酶解多糖；所述第二复合酶为纤维素酶和果胶酶，质量比为3-5:2；

S3. 乙醇提取：将步骤S2中的滤渣加入等质量的50%-95%乙醇中浸泡12-48h，渗漉装置渗漉，收集漉液，药渣用水洗净留用，将漉液回收乙醇，将1体积份剩余液中加入到2-3体积份乙酸乙酯-丙酮混合溶液，所述乙酸乙酯-丙酮混合溶液中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1-2:1，萃取，除去溶剂，洗涤，得到活性物；

S4. 发酵菌活化：将红曲霉、酿酒酵母、面包酵母分别在高氏培养基中，37-39℃，50-70r/min，活化培养18-24h，得到菌种种子液，含菌量为 10^7 - 10^9 cfu/mL；

S5. 发酵：将1-3重量份步骤S2制得的中药酶解多糖和5重量份步骤S3中的药渣混合均匀，加入水中，接种步骤S4中活化的红曲霉、酿酒酵母、面包酵母，所述红曲霉、酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为3-5%、1-3%、0.5-1.5%，37-39℃，50-70r/min，发酵培养24-36h，加入体系总质量的9-12wt%的活化液，继续发酵培养18-24h，冷冻干燥，得到发酵产物；所述活化液为含有5-10wt%甘露糖醇和7-12wt%海藻糖的水溶液；

S6. 活性组合物的制备：将10重量份步骤S1中制得的中药酶解多糖、2-3重量份步骤S3制得的活性物、7-12重量份步骤S5制得的发酵产物、1-2重量份枸杞多糖、0.05-0.2重量份人参皂苷Rg1和0.5-1重量份灵芝孢子粉混合均匀，得到活性组合物；

S7. 铁皮石斛复方制剂的制备：将1重量份壳聚糖溶于3-5wt%的醋酸溶液中后，加入2-3重量份 α -酮戊二酸，搅拌反应15-17h，加入0.3-0.5重量份硼氢化钠，继续搅拌反应3-7h，加入乙醇，过滤，洗涤，干燥，研细，得到羧基化壳聚糖；将3-5重量份步骤S6制得的活性组合物、6-8重量份羧基化壳聚糖、4-6重量份海藻酸钠溶于水中，加入0.1-1重量份亲水乳化剂，得到水相；将亲油乳化剂溶于食用油中，得到油相；将3-5重量份水相和8重量份油相混合后，用孔隙为5-10 μ m的SPG膜进行快速膜乳化，形成乳液，加入3-7wt%氯化钙溶液，常温固化，过滤，干燥，得到缓释微胶囊，即为铁皮石斛复方制剂。

10. 一种如权利要求1或2所述铁皮石斛复方制剂在制备健脾、补肾、增强免疫力相关产品中的应用。

一种铁皮石斛复方制剂及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制剂技术领域,具体涉及一种铁皮石斛复方制剂及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 卵巢早衰是临床常见的与内分泌相关的妇科疾病之一,导致年龄低于40岁的女性出现闭经、促卵泡生成激素水平升高(>40U/L)和雌二醇水平降低,并伴有不同程度的潮热出汗、烦躁易怒、记忆力减退、心悸失眠、腰腿酸痛、胸闷头痛等围绝经期症状,是早发性卵巢功能不全的终末阶段。卵巢早衰的女性常伴随生育力下降或丧失、骨质疏松、心脑血管疾病以及性激素波动,易产生情绪激动、易怒或情绪低落、无法自控等。这些身体和精神上的改变严重影响女性及其家人的生活质量,被视为是一种“社会化生活危机”。卵巢早衰发病率逐年上升,急需寻求有效的治疗方案,尤其是针对其发病机制的靶向治疗,最终改善患者的卵巢功能,已成为临床研究的热点。

[0003] 目前,雌激素替代法仍是卵巢早衰的主要治疗手段,但存在副作用大、作用单一及有较多禁忌症等缺点。除了雌激素替代法外,有报道间充质干细胞对卵巢早衰中的细胞、动物模型都有较好的治疗效果。另外,中医药也已成为卵巢早衰的主要治疗方法之一,并具有独特的疗效优势。中医认为肾主生殖,肾虚血亏,冲任失调是卵巢早衰的主要病机,故治疗卵巢早衰重在调补肾阴肾阳、益养冲任胞宫。调补冲任针刺法辅治卵巢早衰可有效调节激素分泌水平,改善卵巢功能。补肾中药及方剂在治疗卵巢早衰方面也取得了一定的疗效。另外,免疫功能的下降,对于卵巢早衰也有一定的诱导作用。

[0004] 铁皮石斛系兰科植物铁皮石斛的茎,它的药用始载于《神农本草经》并被列为上品。祖国医学认为石斛味甘淡、微咸,性寒,入胃、肾经,无毒,具有生津益胃、清热养阴的功效。适用于热病后期阴津耗伤而虚热不退、烦躁口渴者。可治肝肾阴虚,为养阴清热,益胃生津之要药。李时珍在《本草纲目》中称它有“强阴益精,厚肠胃,补内绝不足,平胃气,长肌肉,定志除惊,轻身延年”的神功奇效。历代医药学著作石斛的奇特功效有明确的记载,认为它是滋阴补虚的极品。现代医药学研究证明石斛中所含的活性成分石斛多糖,具有免疫双向调节作用,对免疫力低下者,可通过调节免疫系统功能抵御疾病的侵袭;对免疫功能亢进者,通过调节免疫系统功能,恢复其正常水平。

[0005] 中国专利申请CN103816390A公开了一种治疗女性不育不孕的铁皮石斛药物,制成所述药物有效成分的原料组成及重量配比:铁皮石斛15-30g、血灵芝10-15g、桑葚10-20g、黄精8-12g、枸杞子8-15g、益母草6-10g、香附6-12g、甘草8-12g、泽兰8-12g、红花6-10g、艾叶4-8g、当归4-8g、人参4-8g、肉桂6-12g、补血草4-10g、女贞子4-8g。该药物采用传统的中草药配制,配方合理,不仅能补血,活血,还能养血调经,可使补而不滞,有调节和养血之功,同时能温肾养肝、舒肝解郁、养血理脾、燥湿化痰、理气调经、活血化瘀,补中益气,补血兼养血,调补肝脾肾脏,使肾脏不失其养,促进女性的生理生化机能,到达阴阳平衡,恢复女性正常的生理孕育功能,治疗不孕病症。该药物能促进血液循环,使生殖器官处于舒张作用,便

于药物吸收,易于受孕,疗效显著。

[0006] 中国专利申请CN1754564A公开了一种含铁皮石斛的药物组合物及其制备方法,首先,将铁皮石斛加蜂蜜制备成蜜汁铁皮石斛浓汁,然后和黄精组合,还包括人参果和灵芝,其重量分别是蜜汁铁皮石斛浓汁10%-50%、黄精汁30%-60%、人参果5%-30%以及灵芝5%-30%。该药物具有活性气血、免疫调节、补养精神的养生功效。

[0007] 中国专利申请CN101371902A公开了一种天然活性糖元保降血糖、降血脂的作用,以铁皮石斛、灵芝、黄精、人参果、蜂胶为主要原料,从天然产物中提取分离具有降血糖、降血脂作用物质成份,经动物实验表明具有增强免疫力的保健功能,用于降血糖、降血脂的天然活性糖元保的作用。该天然保健药品用于糖尿病、高血脂等疾病降血糖、降血脂的作用。

[0008] 上述的现有技术中,虽然均公开了以铁皮石斛为主的各种组分药物,并公开了各种用途,但是对其相互之间协同作用以及补肾壮阳用途均没有公开,本发明对其进行了进一步的拓展研究和应用。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提出一种铁皮石斛复方制剂及制备方法和应用,具有健脾补肾,利湿消肿,活血通络等效果,能明显提高机体免疫力,提高其抗氧化、抗衰老、抗癌的能力,进入人体后,可以缓慢释放活性组合物,从而起到长效调节,延长反应效果的作用,用于肺肾两虚,气阴不足,蛋白尿、水肿、尿量减少、倦怠乏力、面色不华等水湿不化,腰膝酸痛,咳嗽少痰,咽干口燥,脉虚弱者,脾肾两虚、血瘀不通诸症。

[0010] 本发明的技术方案是这样实现的:

本发明提供一种铁皮石斛复方制剂,由以下原料按重量份制备而成:铁皮石斛20-40份,白扁豆20-40份,茯苓20-40份,陈皮20-40份,生姜20-40份,广藿香11-31份,甘草10-20份。

[0011] 作为本发明的进一步改进,还包括以下重量份的原料:枳壳20-40份,牡丹皮20-40份,赤芍20-40份。

[0012] 本发明进一步保护一种上述铁皮石斛复方制剂的制备方法,包括以下步骤:

(1) 按比例称取各药材,粉碎,混合均匀,加入等质量的50%-95%乙醇中浸泡12-48h,渗漉装置渗漉,收集漉液;

(2) 将步骤(1)中的药渣浸泡10-50min后,加水回流提取两次,分别为6-10倍水,4-8倍水;控制回流时间为1.5-3.5h,温度为85-100℃;合并两次药液,加入步骤S1中的漉液中,过陶瓷膜过滤器,滤膜孔径为2-8 μ m,滤液减压回收乙醇;剩余药液进行浓缩,至原来体积的1/7-1/10,板框过滤,得到药液;

(3) 将步骤(2)制得的药液制备成胶囊剂、颗粒剂、片剂或口服液;

其中,胶囊剂的制备方法如下:将步骤(3)制得的药液浓缩至相对密度为1.20-1.30,喷雾干燥的干粉,干粉装硬胶囊即得;

颗粒剂的制备方法如下:将步骤(3)制得的药液浓缩至相对密度为1.20-1.30,喷雾制粒,干燥、整粒即得颗粒;

片剂的制备方法如下:将步骤(3)制得的药液浓缩至相对密度为1.20-1.30,喷雾制粒,干燥、整粒得到颗粒,控制水分在4-5%,添加硬脂酸镁,压片即得;

口服液的制备方法如下:另称量羧甲基纤维素钠,海藻酸钠用水溶解,液体呈现无色透明,加入步骤(3)制得的药液,搅拌混合均匀,加入赤藓糖醇、木糖醇,山梨酸钾,搅拌使完全溶解,另将柠檬酸和苹果酸溶于水中,滴加入上述料液中,边加边搅拌,板框过滤,使溶液澄清透明,灌装即得口服液。

[0013] 作为本发明的进一步改进,所述羧甲基纤维素钠、海藻酸钠、赤藓糖醇、木糖醇、山梨酸钾、柠檬酸和苹果酸的质量比为0.1-0.3:0.1-0.3:20-60:20-40:0.5-1.5:0.2-1:0.2-1。

[0014] 本发明进一步保护一种上述铁皮石斛复方制剂的制备方法,包括以下步骤:

S1. 中药酶解多肽的制备:按比例称取各药材,粉碎,混合均匀,加入水中,加入第一复合酶酶解,超声波处理灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到中药酶解多肽;

S2. 中药酶解多糖的制备:将步骤S1中的滤渣加入水中,加入第二复合酶酶解,加热回流提取,过滤,滤渣留用,滤液中加入乙醇沉淀,离心,得到中药酶解多糖;

S3. 乙醇提取:将步骤S2中的滤渣加入等质量的50%-95%乙醇中浸泡12-48h,渗漉装置渗漉,收集漉液,药渣用水洗净留用,将漉液回收乙醇,剩余液中加入乙酸乙酯-丙酮混合溶液,萃取,除去溶剂,洗涤,得到活性物;

S4. 发酵菌活化:将红曲霉、酿酒酵母、面包酵母分别在高氏培养基中活化培养,得到菌种种子液;

S5. 发酵:将步骤S2制得的中药酶解多糖和步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种步骤S4中活化的红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,发酵培养,加入活化液,继续发酵培养,冷冻干燥,得到发酵产物;

S6. 活性组合物的制备:将步骤S1中制得的中药酶解多糖、步骤S3制得的活性物、步骤S5制得的发酵产物、枸杞多糖、人参皂苷Rg1和灵芝孢子粉混合均匀,得到活性组合物;

S7. 铁皮石斛复方制剂的制备:将壳聚糖溶于酸液中后,加入 α -酮戊二酸,搅拌反应第一时间段,加入硼氢化钠,继续搅拌反应第二时间段,加入乙醇,过滤,洗涤,干燥,研细,得到羧基化壳聚糖;将步骤S6制得的活性组合物、羧基化壳聚糖、海藻酸钠溶于水中,加入亲水乳化剂,得到水相;将亲油乳化剂溶于食用油中,得到油相;将水相和油相混合后,用SPG膜进行快速膜乳化,形成乳液,加入氯化钙溶液,常温固化,过滤,干燥,得到缓释微胶囊,即为铁皮石斛复方制剂。

[0015] 作为本发明的进一步改进,步骤S1中所述第一复合酶为碱性蛋白酶和风味蛋白酶的复配混合物,质量比为1-3:2;酶解温度为45-55 $^{\circ}$ C, pH值为8.5-9,时间为2-4h;步骤S2中所述第二复合酶为纤维素酶和果胶酶,质量比为3-5:2;酶解温度为40-55 $^{\circ}$ C,酶解时间为1-3h;所述乙醇加入至体系乙醇含量为60-70%。

[0016] 作为本发明的进一步改进,步骤S3中所述剩余液和乙酸乙酯-丙酮混合溶液的体积比为1:2-3;所述乙酸乙酯-丙酮混合溶液中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1-2:1;步骤S4中所述活化培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C, 50-70r/min,培养18-24h,所述菌种种子液的含菌量为 10^7 - 10^9 cfu/mL;步骤S5中所述中药酶解多糖和药渣的质量比为1-3:5;所述红曲霉、酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为3-5%、1-3%、0.5-1.5%;所述发酵培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C, 50-70r/min,培养24-36h,所述继续发酵培养的条件为37-39 $^{\circ}$ C, 50-70r/min,培养18-24h;所述活化液为含有5-10wt%甘露糖醇和7-12wt%海藻糖的水溶液,所述活化液的添加量为体系总

质量的9-12wt%。

[0017] 作为本发明的进一步改进,步骤S6中所述中药酶解多糖、活性物、发酵产物、枸杞多糖、人参皂苷Rg1和灵芝孢子粉的质量比为10:2-3:7-12:1-2:0.05-0.2:0.5-1;步骤S7中所述酸液为3-5wt%的醋酸溶液;所述壳聚糖、 α -酮戊二酸、硼氢化钠的质量比为1:2-3:0.3-0.5;所述第一时间段为15-17h;所述第二时间段为3-7h;所述亲水乳化剂选自十二烷基苯磺酸钠、十二烷基硫酸钠、十二烷基磺酸钠、十六烷基苯磺酸钠、十六烷基磺酸钠、十六烷基硫酸钠、十八烷基磺酸钠、十八烷基苯磺酸钠中的至少一种;所述亲油乳化剂选自司盘-20、司盘-40、司盘-60、司盘-80中的至少一种;所述食用油选自花生油、玉米油、大豆油、菜籽油、亚麻籽油、橄榄油中的至少一种;所述活性组合物、羧基化壳聚糖、海藻酸钠、亲水乳化剂的质量比为3-5:6-8:4-6:0.1-1;所述水相和油相的质量比为3-5:8;所述SPG膜的孔隙为5-10 μ m;所述氯化钙溶液的含量为3-7wt%。

[0018] 作为本发明的进一步改进,具体步骤如下:

S1. 中药酶解多肽的制备:按比例称取各药材,粉碎,混合均匀,加入水中,加入第一复合酶酶解,酶解温度为45-55 $^{\circ}$ C, pH值为8.5-9,时间为2-4h,超声波处理灭酶,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到中药酶解多肽;所述第一复合酶为碱性蛋白酶和风味蛋白酶的复配混合物,质量比为1-3:2;

S2. 中药酶解多糖的制备:将步骤S1中的滤渣加入水中,加入第二复合酶酶解,酶解温度为40-55 $^{\circ}$ C,酶解时间为1-3h,加热回流提取,过滤,滤渣留用,滤液中加入乙醇至体系乙醇含量为60-70%,沉淀,离心,得到中药酶解多糖;所述第二复合酶为纤维素酶和果胶酶,质量比为3-5:2;

S3. 乙醇提取:将步骤S2中的滤渣加入等质量的50%-95%乙醇中浸泡12-48h,渗漉装置渗漉,收集漉液,药渣用水洗净留用,将漉液回收乙醇,将1体积份剩余液中加入到2-3体积份乙酸乙酯-丙酮混合溶液,所述乙酸乙酯-丙酮混合溶液中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1-2:1,萃取,除去溶剂,洗涤,得到活性物;

S4. 发酵菌活化:将红曲霉、酿酒酵母、面包酵母分别在高氏培养基中,37-39 $^{\circ}$ C, 50-70r/min,活化培养18-24h,得到菌种种子液,含菌量为 10^7 - 10^9 cfu/mL;

S5. 发酵:将1-3重量份步骤S2制得的中药酶解多糖和5重量份步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种步骤S4中活化的红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,所述红曲霉、酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为3-5%、1-3%、0.5-1.5%,37-39 $^{\circ}$ C, 50-70r/min,发酵培养24-36h,加入体系总质量的9-12wt%的活化液,继续发酵培养18-24h,冷冻干燥,得到发酵产物;所述活化液为含有5-10wt%甘露糖醇和7-12wt%海藻糖的水溶液;

S6. 活性组合物的制备:将10重量份步骤S1中制得的中药酶解多糖、2-3重量份步骤S3制得的活性物、7-12重量份步骤S5制得的发酵产物、1-2重量份枸杞多糖、0.05-0.2重量份人参皂苷Rg1和0.5-1重量份灵芝孢子粉混合均匀,得到活性组合物;

S7. 铁皮石斛复方制剂的制备:将1重量份壳聚糖溶于3-5wt%的醋酸溶液中后,加入2-3重量份 α -酮戊二酸,搅拌反应15-17h,加入0.3-0.5重量份硼氢化钠,继续搅拌反应3-7h,加入乙醇,过滤,洗涤,干燥,研细,得到羧基化壳聚糖;将3-5重量份步骤S6制得的活性组合物、6-8重量份羧基化壳聚糖、4-6重量份海藻酸钠溶于水中,加入0.1-1重量份亲水乳化剂,得到水相;将亲油乳化剂溶于食用油中,得到油相;将3-5重量份水相和8重量份油相

混合后,用孔隙为5-10 μ m的SPG膜进行快速膜乳化,形成乳液,加入3-7wt%氯化钙溶液,常温固化,过滤,干燥,得到缓释微胶囊,即为铁皮石斛复方制剂。

[0019] 本发明进一步保护一种上述铁皮石斛复方制剂在制备健脾、补肾、增强免疫力相关产品中的应用。

[0020] 本发明具有如下有益效果:本发明铁皮石斛复方制剂主要包括铁皮石斛,白扁豆,茯苓,陈皮,生姜,广藿香,甘草,另外加枳壳,牡丹皮,赤芍,其中,铁皮石斛,性微寒,味甘。归胃经、肾经,益胃生津,滋阴清热;白扁豆,性微温,味甘。归脾经、胃经,健脾化湿、和中消暑,茯苓,性平,味甘、淡。归心经、肺经、脾经、肾经,利水渗湿、健脾宁心,陈皮,味辛、味苦,性温。归脾经、肺经,理气开胃,燥湿化痰,治脾胃病,生姜,性微温,味辛。归肺经、脾经、胃经,散寒解表,降逆止呕,化痰止咳,广藿香,性微温,味辛。归胃经、脾经、肺经,芳香化浊、开胃止呕、发表解暑,甘草,性平,味甘。归心经、胃经、脾经、肺经,补脾益气、止咳祛痰、缓急定痛、调和药性,枳壳,性温,味苦、辛、酸。归脾经、胃经,理气宽中、行滞消胀,牡丹皮,性微寒,味苦、辛。归心经、肝经、肾经,清热凉血、活血化瘀,赤芍,性微寒,味苦。归肝经、脾经,清热凉血、散瘀止痛。铁皮石斛滋阴生津,配黄精健脾益肾,配白扁豆健脾化湿,茯苓陈皮健脾开胃,合而用之,清胃生津,健脾凉血,健脾补肾,利湿消肿,活血通络,用于肺肾两虚,气阴不足,蛋白尿、水肿、尿量减少、倦怠乏力、面色不华等水湿不化,腰膝酸痛,咳嗽少痰,咽干口燥,脉虚弱者,脾肾两虚、血瘀不通诸症。

[0021] 本发明其中一种制备方法为,首先通过乙醇渗漉提取中药材中的溶于乙醇的非极性活性物质,进一步,经过水提取得到水溶性活性物质,得到的药液进一步制备成胶囊剂、颗粒剂、片剂、口服液,方便患者不同需求的使用。

[0022] 本发明另一种制备方法为,首先将中药材通过蛋白复合酶酶解,碱性蛋白酶作用于羧基侧链上的所有疏水性和芳香族氨基酸羧基端的酰胺键,催化蛋白质分子内的肽键水解产生具有较小分子质量的肽,风味蛋白酶裂解亮氨酸与脯氨酸或脯氨酸与脯氨酸之间的肽键,两者的协同作用下,酶解速度快,酶解效果好,水解产物小肽的得率高,酶解后的多肽活性更好,得到中药酶解多肽;

进一步将滤渣经过糖类复合酶酶解,包括纤维素酶和果胶酶,多种酶的共同作用于细胞壁,造成细胞壁在极短的时间内大量降解,从而促进内容物流出,促进中药药渣中糖类、脂类和微量元素等提取,制得的小分子糖类具有极好的抗衰老、抗应激、抗癌、提高免疫力的功效;

然后药渣经过乙醇渗漉提取,将药渣中易溶于乙醇的皂苷类、多酚类、黄酮类提取出来,从而得到活性物;

将中药酶解多糖和药渣混合后,接种红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,进行发酵,酵母菌能快速将酶解混合物中的还原性糖发酵分解成更小的分子,自身快速增殖,红曲霉的发酵产物包括红曲色素、 γ -氨基丁酸、洛伐他汀等,能明显提高产物的抗氧化、抗癌、抗衰老、提高免疫力等活性,随后,补充加入含有甘露糖和海藻糖的无菌水中,加热活化,采用甘露糖和海藻糖替代葡萄糖获得活化液,酵母菌体吸入甘露糖和海藻糖后细胞内大分子的稳定性增强,提高了菌株的抗性,促进菌株快速增殖达到稳定期,从而能够高效发酵降解酶解混合物,产生大量的活性小分子物质;

枸杞含有丰富的水溶性枸杞多糖,具有非常强大的生理活性,能够很好的增强非

特异的免疫功能,具有促进T、B、CTL、NK和巨噬细胞等免疫功能,增强荷瘤、化疗与辐射损伤小鼠免疫功能及调节神经内分泌免疫调节网络的作用,有调节免疫、延缓衰老多种功效;人参皂苷Rg1,可提高人体力、智力的活动能力,增强机体对有害刺激的非特异性抵抗力,具有抗衰老、抗疲劳、提高免疫力、辅助抗肿瘤、修复性功能等作用;灵芝孢子粉具有增强机体免疫力、保护胃黏膜等作用,将三者与中药酶解多糖、活性物、发酵产物混合后,得到活性组合物,能明显提高机体免疫力,提高其抗氧化、抗衰老、抗癌的能力,还具有健脾补肾,利湿消肿,活血通络等效果。

[0023] 本发明通过将壳聚糖表面的氨基经过反应羧基化后,与海藻酸钠、活性物质溶于水中,与油相混合后,经过快速膜乳化制备油包水乳液,进一步通过氯化钙和海藻酸钠以及羧基化的壳聚糖络合交联反应形成壳层,从而制得包裹了活性组合物的缓释微胶囊,进入人体后,可以缓慢释放活性组合物,从而起到长效调节,延长反应效果的作用。

[0024] 本发明制得的铁皮石斛复方制剂具有清胃生津,健脾凉血,健脾补肾,利湿消肿,活血通络等效果,能明显提高机体免疫力,提高其抗氧化、抗衰老、抗癌的能力,进入人体后,可以缓慢释放活性组合物,从而起到长效调节,延长反应效果的作用,用于肺肾两虚,气阴不足,蛋白尿、水肿、尿量减少、倦怠乏力、面色不华等水湿不化,腰膝酸痛,咳嗽少痰,咽干口燥,脉虚弱者,脾肾两虚、血瘀不通诸症。

具体实施方式

[0025] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0026] 本实施例提供的中药材均购自炎陵县百草中药材开发有限公司。

[0027] 纤维素酶由夏盛(北京)生物科技开发有限公司提供,5000U/g;果胶酶,由夏盛(北京)生物科技开发有限公司提供,2.5万U/g;碱性蛋白酶由南宁东恒华道生物科技有限责任公司提供,20万U/g;风味蛋白酶由南宁东恒华道生物科技有限责任公司提供,5万U/g。

[0028] 红曲霉由上海菀试生物技术有限公司提供;酿酒酵母由河北斐默特生物技术有限公司提供;面包酵母由安琪酵母股份有限公司提供。

[0029] 枸杞多糖,含量为大于90%,由西安瑞盈生物科技有限公司提供;人参皂苷Rg1由上海晨易生物科技有限公司提供;灵芝孢子粉为破壁灵芝孢子粉,含量大于99%,由西安首禾生物科技有限公司提供。

[0030] 实施例1

本实施例提供一种铁皮石斛复方制剂,剂型为胶囊剂。

[0031] (1)称量铁皮石斛20g,白扁豆20g,茯苓20g,橘皮20g,生姜20g,藿香11g,甘草10g;上述药材经挑选,剔除虫害、杂物等杂质;橘皮经粗碎,其他药材经水洗,干燥至水分10%以下,粉碎,混合均匀,得到药粉。

[0032] (2)将步骤(1)所述药材加入1000mL 50%乙醇等量浸泡12h,渗漉装置渗漉,收集漉液。

[0033] (3)将步骤(2)所述药渣加水回流提取两次。分别为6倍水,4倍水;先浸泡10min,分

别回流提取两次,控制回流时间1.5h,温度85℃;合并两次药液,加入上述2中漉液,过陶瓷膜过滤器,滤膜孔径为2 μ m。滤液减压回收乙醇;剩余药液进行浓缩,至加水量的1/10量,板框过滤,得到药液。

[0034] (4)将步骤(3)所述药液浓缩至相对密度1.20,喷雾干燥的干粉,干粉装硬胶囊即得。

[0035] 实施例2

本实施例提供一种铁皮石斛复方制剂,剂型为颗粒剂。

[0036] (1)称量铁皮石斛40g,白扁豆40g,茯苓40g,橘皮40g,生姜40g,藿香31g,甘草20g,枳壳40g,丹皮40g,赤芍40g;上述药材经挑选,剔除虫害、杂物等杂质;橘皮经粗碎,其他药材经水洗,干燥至水分10%以下,粉碎,混合均匀,得到药粉。

[0037] (2)将步骤(1)所述药材加入1000mL 95%乙醇等量浸泡48h,渗漉装置渗漉,收集漉液。

[0038] (3)将步骤(2)所述药渣加水回流提取两次。分别为10倍水,8倍水;先浸泡50min,分别回流提取两次,控制回流时间3.5h,温度100℃;合并两次药液,加入上述2中漉液,过陶瓷膜过滤器,滤膜孔径为8 μ m。滤液减压回收乙醇;剩余药液进行浓缩,至加水量的1/10量,板框过滤,得到药液。

[0039] (4)将步骤(3)所述药液浓缩至相对密度1.30,喷雾制粒,干燥、整粒即得颗粒。

[0040] 实施例3

本实施例提供一种铁皮石斛复方制剂,剂型为片剂。

[0041] (1)称量铁皮石斛30g,白扁豆30g,茯苓30g,橘皮30g,生姜30g,藿香24g,甘草15g,枳壳30g,丹皮30g,赤芍30g;上述药材经挑选,剔除虫害、杂物等杂质;橘皮经粗碎,其他药材经水洗,干燥至水分10%以下,粉碎,混合均匀,得到药粉。

[0042] (2)将步骤(1)所述药材加入1000mL 75%乙醇等量浸泡30h,渗漉装置渗漉,收集漉液。

[0043] (3)将步骤(2)所述药渣加水回流提取两次。分别为8倍水,6倍水;先浸泡30min,分别回流提取两次,控制回流时间2.5h,温度92℃;合并两次药液,加入上述2中漉液,过陶瓷膜过滤器,滤膜孔径为6 μ m。滤液减压回收乙醇;剩余药液进行浓缩,至加水量的1/10量,板框过滤,得到药液。

[0044] (4)将步骤(3)所述药液浓缩至相对密度1.25,喷雾制粒,干燥、整粒即得颗粒。

[0045] (5)将步骤(4)所述颗粒剂水分控制4.5%,添加体系总质量的2wt%的硬脂酸镁,压片即得。

[0046] 实施例4

本实施例提供一种铁皮石斛复方制剂,剂型为口服液。

[0047] (1)称量铁皮石斛30g,白扁豆30g,茯苓30g,橘皮30g,生姜30g,藿香24g,甘草15g,枳壳30g,丹皮30g,赤芍30g;上述药材经挑选,剔除虫害、杂物等杂质;橘皮经粗碎,其他药材经水洗,干燥至水分10%以下,粉碎,混合均匀,得到药粉。

[0048] (2)将步骤(1)所述药材加入1000mL 75%乙醇等量浸泡30h,渗漉装置渗漉,收集漉液。

[0049] (3)将步骤(2)所述药渣加水回流提取两次。分别为8倍水,6倍水;先浸泡30min,分

别回流提取两次,控制回流时间2.5h,温度92℃;合并两次药液,加入上述2中漉液,过陶瓷膜过滤器,滤膜孔径为6 μ m。滤液减压回收乙醇;剩余药液进行浓缩,至约加水量的1/10量,板框过滤,得到药液。

[0050] (4)另称量羧甲基纤维素钠0.2g,海藻酸钠0.2g,放入烧杯。量取100℃纯化水50mL,加入适量水进入烧杯,边加边搅拌,使物料均匀润湿混合,然后采用等量递增法陆续将水加完,搅拌10min,转速50r/min,使之完全溶解,无块状不溶物;液体呈现无色透明。

[0051] (5)将步骤(3)中所述药液加入步骤(4)所述透明溶液中,边加边加热,加完后搅拌20min,转速40r/min。

[0052] (6)称量赤藓糖醇40g、木糖醇30g,山梨酸钾1g,加步骤(5)所述料液中,搅拌使完全溶解。

[0053] (7)另取20mL 50℃的热水,加入柠檬酸0.6g;苹果酸0.6g,使之完全溶解,滴加入步骤(6)所述的料液中,边加边搅拌,搅拌10min,降温至25℃,然后板框过滤,使溶液澄清透明,灌装即得口服液。

[0054] 实施例5

本实施例提供一种铁皮石斛复方制剂,为缓释微胶囊,具体步骤如下:

S1. 中药酶解多肽的制备:按铁皮石斛30g,白扁豆30g,茯苓30g,橘皮30g,生姜30g,藿香24g,甘草15g,枳壳30g,丹皮30g,赤芍30g;上述药材经挑选,剔除虫害、杂物等杂质;橘皮经粗碎,其他药材经水洗,干燥至水分10%以下,粉碎,混合均匀,得到药粉,加入500mL水中,加入20g第一复合酶酶解,酶解温度为45℃,pH值为8.5,时间为2h,1000W超声波处理灭酶20min,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到中药酶解多肽;所述第一复合酶为碱性蛋白酶和风味蛋白酶的复配混合物,质量比为1:2;

S2. 中药酶解多糖的制备:将步骤S1中的滤渣加入500mL水中,加入20g第二复合酶酶解,酶解温度为40℃,酶解时间为1h,加热至100℃回流提取,过滤,滤渣留用,滤液中加入乙醇至体系乙醇含量为60%,沉淀,5000r/min离心15min,得到中药酶解多糖;所述第二复合酶为纤维素酶和果胶酶,质量比为3:2;

S3. 乙醇提取:将步骤S2中的滤渣加入等质量的50%乙醇中浸泡12h,渗漉装置渗漉,收集漉液,药渣用水洗净留用,将漉液回收乙醇,将20mL剩余液中加入到40mL乙酸乙酯-丙酮混合溶液,所述乙酸乙酯-丙酮混合溶液中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1:1,萃取,除去溶剂,洗涤,得到活性物;

S4. 发酵菌活化:将红曲霉、酿酒酵母、面包酵母分别在高氏培养基中,37℃,50r/min,活化培养18h,得到菌种种子液,含菌量为 10^7 cfu/mL;

S5. 发酵:将10g步骤S2制得的中药酶解多糖和50g步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种步骤S4中活化的红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,所述红曲霉、酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为3%、1%、0.5%,37℃,50r/min,发酵培养24h,加入体系总质量的9wt%的活化液,继续发酵培养18h,冷冻干燥,得到发酵产物;所述活化液为含有5wt%甘露糖醇和7wt%海藻糖的水溶液;

S6. 活性组合物的制备:将10g步骤S1中制得的中药酶解多糖、2g步骤S3制得的活性物、7g步骤S5制得的发酵产物、1g枸杞多糖、0.05g人参皂苷Rg1和0.5g灵芝孢子粉混合均匀,得到活性组合物;

S7. 铁皮石斛复方制剂的制备:将10g壳聚糖溶于50mL的3wt%的醋酸溶液中后,加入20g α -酮戊二酸,搅拌反应15h,加入3g硼氢化钠,继续搅拌反应3h,加入95%的乙醇至体系的乙醇含量为65%,过滤,洗涤,干燥,研细,得到羧基化壳聚糖;将3g步骤S6制得的活性组合物、6g羧基化壳聚糖、4g海藻酸钠溶于50mL水中,加入0.1g十二烷基苯磺酸钠,得到水相;将1g司盘-80溶于100mL玉米油中,得到油相;将30g水相和80g油相混合后,用孔隙为5 μ m的SPG膜进行快速膜乳化,形成乳液,加入20mL 3wt%氯化钙溶液,常温固化,过滤,干燥,得到缓释微胶囊,即为铁皮石斛复方制剂。

[0055] 实施例6

本实施例提供一种铁皮石斛复方制剂,为缓释微胶囊,具体步骤如下:

S1. 中药酶解多肽的制备:按铁皮石斛30g,白扁豆30g,茯苓30g,橘皮30g,生姜30g,藿香24g,甘草15g,枳壳30g,丹皮30g,赤芍30g;上述药材经挑选,剔除虫害、杂物等杂质;橘皮经粗碎,其他药材经水洗,干燥至水分10%以下,粉碎,混合均匀,得到药粉,加入500mL水中,加入20g第一复合酶酶解,酶解温度为55 $^{\circ}$ C, pH值为9,时间为4h,1000W超声波处理灭酶20min,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到中药酶解多肽;所述第一复合酶为碱性蛋白酶和风味蛋白酶的复配混合物,质量比为3:2;

S2. 中药酶解多糖的制备:将步骤S1中的滤渣加入500mL水中,加入20g第二复合酶酶解,酶解温度为55 $^{\circ}$ C,酶解时间为3h,加热至100 $^{\circ}$ C回流提取,过滤,滤渣留用,滤液中加入乙醇至体系乙醇含量为70%,沉淀,5000r/min离心15min,得到中药酶解多糖;所述第二复合酶为纤维素酶和果胶酶,质量比为5:2;

S3. 乙醇提取:将步骤S2中的滤渣加入等质量的95%乙醇中浸泡48h,渗漉装置渗漉,收集漉液,药渣用水洗净留用,将漉液回收乙醇,将20mL剩余液中加入到60mL乙酸乙酯-丙酮混合溶液,所述乙酸乙酯-丙酮混合溶液中乙酸乙酯和丙酮的体积比为2:1,萃取,除去溶剂,洗涤,得到活性物;

S4. 发酵菌活化:将红曲霉、酿酒酵母、面包酵母分别在高氏培养基中,39 $^{\circ}$ C,70r/min,活化培养24h,得到菌种种子液,含菌量为 10^9 cfu/mL;

S5. 发酵:将30g步骤S2制得的中药酶解多糖和50g步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种步骤S4中活化的红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,所述红曲霉、酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为5%、3%、1.5%,39 $^{\circ}$ C,70r/min,发酵培养36h,加入体系总质量的12wt%的活化液,继续发酵培养24h,冷冻干燥,得到发酵产物;所述活化液为含有10wt%甘露糖醇和12wt%海藻糖的水溶液;

S6. 活性组合物的制备:将10g步骤S1中制得的中药酶解多糖、3g步骤S3制得的活性物、12g步骤S5制得的发酵产物、2g枸杞多糖、0.2g人参皂苷Rg1和1g灵芝孢子粉混合均匀,得到活性组合物;

S7. 铁皮石斛复方制剂的制备:将10g壳聚糖溶于50mL的5wt%的醋酸溶液中后,加入30g α -酮戊二酸,搅拌反应17h,加入5g硼氢化钠,继续搅拌反应7h,加入95%的乙醇至体系的乙醇含量为65%,过滤,洗涤,干燥,研细,得到羧基化壳聚糖;将5g步骤S6制得的活性组合物、8g羧基化壳聚糖、6g海藻酸钠溶于50mL水中,加入1g十六烷基磺酸钠,得到水相;将1g司盘-40溶于100mL大豆油中,得到油相;将50g水相和80g油相混合后,用孔隙为10 μ m的SPG膜进行快速膜乳化,形成乳液,加入20mL 7wt%氯化钙溶液,常温固化,过滤,干燥,得到缓释

微胶囊,即为铁皮石斛复方制剂。

[0056] 实施例7

本实施例提供一种铁皮石斛复方制剂,为缓释微胶囊,具体步骤如下:

S1. 中药酶解多肽的制备:按铁皮石斛30g,白扁豆30g,茯苓30g,橘皮30g,生姜30g,藿香24g,甘草15g,枳壳30g,丹皮30g,赤芍30g;上述药材经挑选,剔除虫害、杂物等杂质;橘皮经粗碎,其他药材经水洗,干燥至水分10%以下,粉碎,混合均匀,得到药粉,加入500mL水中,加入20g第一复合酶酶解,酶解温度为50℃,pH值为8.7,时间为3h,1000W超声波处理灭酶20min,过滤,滤渣留用,滤液冷冻干燥,得到中药酶解多肽;所述第一复合酶为碱性蛋白酶和风味蛋白酶的复配混合物,质量比为2:2;

S2. 中药酶解多糖的制备:将步骤S1中的滤渣加入500mL水中,加入20g第二复合酶酶解,酶解温度为47℃,酶解时间为2h,加热至100℃回流提取,过滤,滤渣留用,滤液中加入乙醇至体系乙醇含量为65%,沉淀,5000r/min离心15min,得到中药酶解多糖;所述第二复合酶为纤维素酶和果胶酶,质量比为4:2;

S3. 乙醇提取:将步骤S2中的滤渣加入等质量的75%乙醇中浸泡30h,渗漉装置渗漉,收集漉液,药渣用水洗净留用,将漉液回收乙醇,将20mL剩余液中加入到50mL乙酸乙酯-丙酮混合溶液,所述乙酸乙酯-丙酮混合溶液中乙酸乙酯和丙酮的体积比为1.5:1,萃取,除去溶剂,洗涤,得到活性物;

S4. 发酵菌活化:将红曲霉、酿酒酵母、面包酵母分别在高氏培养基中,38℃,60r/min,活化培养21h,得到菌种种子液,含菌量为 10^8 cfu/mL;

S5. 发酵:将20g步骤S2制得的中药酶解多糖和50g步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种步骤S4中活化的红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,所述红曲霉、酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为4%、2%、1%,38℃,60r/min,发酵培养30h,加入体系总质量的10wt%的活化液,继续发酵培养21h,冷冻干燥,得到发酵产物;所述活化液为含有7wt%甘露糖醇和10wt%海藻糖的水溶液;

S6. 活性组合物的制备:将10g步骤S1中制得的中药酶解多糖、2.5g步骤S3制得的活性物、10g步骤S5制得的发酵产物、1.5g枸杞多糖、0.1g人参皂苷Rg1和0.7g灵芝孢子粉混合均匀,得到活性组合物;

S7. 铁皮石斛复方制剂的制备:将10g壳聚糖溶于50mL的4wt%的醋酸溶液中后,加入25g α -酮戊二酸,搅拌反应16h,加入4g硼氢化钠,继续搅拌反应5h,加入95%的乙醇至体系的乙醇含量为65%,过滤,洗涤,干燥,研细,得到羧基化壳聚糖;将4g步骤S6制得的活性组合物、7g羧基化壳聚糖、5g海藻酸钠溶于50mL水中,加入0.5g十八烷基苯磺酸钠,得到水相;将1g司盘-60溶于100mL橄榄油中,得到油相;将40g水相和80g油相混合后,用孔隙为7 μ m的SPG膜进行快速膜乳化,形成乳液,加入20mL 5wt%氯化钙溶液,常温固化,过滤,干燥,得到缓释微胶囊,即为铁皮石斛复方制剂。

[0057] 对比例1

与实施例7相比,步骤S1中第一复合酶由单一的碱性蛋白酶替代,其他条件均不改变。

[0058] 对比例2

与实施例7相比,步骤S1中第一复合酶由单一的风味蛋白酶替代,其他条件均不改

变。

[0059] 对比例3

与实施例7相比,未进行步骤S1中第一复合酶酶解,其他条件均不改变。

[0060] 对比例4

与实施例7相比,步骤S2中第二复合酶由单一的纤维素酶替代,其他条件均不改变。

[0061] 对比例5

与实施例7相比,步骤S2中第二复合酶由单一的果胶酶替代,其他条件均不改变。

[0062] 对比例6

与实施例7相比,未进行步骤S2中第二复合酶酶解,其他条件均不改变。

[0063] 对比例7

与实施例7相比,未进行步骤S3,其他条件均不改变。

[0064] 对比例8

与实施例7相比,步骤S5中未接种红曲霉,其他条件均不改变。

[0065] 具体包括以下步骤:

S5. 发酵:将20g步骤S2制得的中药酶解多糖和50g步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种步骤S4中活化的酿酒酵母、面包酵母,所述酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为6%、1%,38℃,60r/min,发酵培养30h,加入体系总质量的10wt%的活化液,继续发酵培养21h,冷冻干燥,得到发酵产物;所述活化液为含有7wt%甘露糖醇和10wt%海藻糖的水溶液。

[0066] 对比例9

与实施例7相比,步骤S5中未接种酿酒酵母、面包酵母,其他条件均不改变。

[0067] 具体包括以下步骤:

S5. 发酵:将20g步骤S2制得的中药酶解多糖和50g步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种步骤S4中活化的红曲霉,所述红曲霉的接种量为7%,38℃,60r/min,发酵培养30h,加入体系总质量的10wt%的活化液,继续发酵培养21h,冷冻干燥,得到发酵产物;所述活化液为含有7wt%甘露糖醇和10wt%海藻糖的水溶液。

[0068] 对比例10

与实施例7相比,步骤S5中未加入活化液,其他条件均不改变。

[0069] 具体包括以下步骤:

S5. 发酵:将20g步骤S2制得的中药酶解多糖和50g步骤S3中的药渣混合均匀,加入水中,接种步骤S4中活化的红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,所述红曲霉、酿酒酵母、面包酵母的接种量分别为4%、2%、1%,38℃,60r/min,发酵培养51h,冷冻干燥,得到发酵产物;所述活化液为含有7wt%甘露糖醇和10wt%海藻糖的水溶液。

[0070] 对比例11

与实施例7相比,未进行步骤S5发酵,其他条件均不改变。

[0071] 对比例12

与实施例7相比,步骤S6中未添加枸杞多糖,其他条件均不改变。

[0072] 具体包括以下步骤:

S6. 活性组合物的制备:将10g步骤S1中制得的中药酶解多糖、2.5g步骤S3制得的

活性物、10g步骤S5制得的发酵产物、0.1g人参皂苷Rg1和0.7g灵芝孢子粉混合均匀,得到活性组合物。

[0073] 对比例13

与实施例7相比,步骤S6中未添加人参皂苷Rg1,其他条件均不改变。

[0074] 具体包括以下步骤:

S6.活性组合物的制备:将10g步骤S1中制得的中药酶解多糖、2.5g步骤S3制得的活性物、10g步骤S5制得的发酵产物、1.5g枸杞多糖和0.7g灵芝孢子粉混合均匀,得到活性组合物。

[0075] 对比例14

与实施例7相比,步骤S6中未添加灵芝孢子粉,其他条件均不改变。

[0076] 具体包括以下步骤:

S6.活性组合物的制备:将10g步骤S1中制得的中药酶解多糖、2.5g步骤S3制得的活性物、10g步骤S5制得的发酵产物、1.5g枸杞多糖、0.1g人参皂苷Rg1混合均匀,得到活性组合物。

[0077] 对比例15

与实施例7相比,步骤S6中未添加枸杞多糖、人参皂苷Rg1和灵芝孢子粉,其他条件均不改变。

[0078] 具体包括以下步骤:

S6.活性组合物的制备:将10g步骤S1中制得的中药酶解多糖、2.5g步骤S3制得的活性物、10g步骤S5制得的发酵产物混合均匀,得到活性组合物。

[0079] 对比例16

与实施例7相比,步骤S7中壳聚糖未经过羧基化处理,其他条件均不改变。

[0080] 具体包括以下步骤:

S7.铁皮石斛复方制剂的制备:将4g步骤S6制得的活性组合物、7g壳聚糖、5g海藻酸钠溶于50mL 4wt%的醋酸溶液中,加入0.5g十八烷基苯磺酸钠,得到水相;将1g司盘-60溶于100mL橄榄油中,得到油相;将40g水相和80g油相混合后,用孔隙为7 μ m的SPG膜进行快速膜乳化,形成乳液,加入20mL 5wt%氯化钙溶液,常温固化,过滤,干燥,得到缓释微胶囊,即为铁皮石斛复方制剂。

[0081] 对比例17

与实施例7相比,步骤S7中未添加羧基化壳聚糖,其他条件均不改变。

[0082] 具体步骤如下:

S7.铁皮石斛复方制剂的制备:将4g步骤S6制得的活性组合物、12g海藻酸钠溶于50mL水中,加入0.5g十八烷基苯磺酸钠,得到水相;将1g司盘-60溶于100mL橄榄油中,得到油相;将40g水相和80g油相混合后,用孔隙为7 μ m的SPG膜进行快速膜乳化,形成乳液,加入20mL 5wt%氯化钙溶液,常温固化,过滤,干燥,得到缓释微胶囊,即为铁皮石斛复方制剂。

[0083] 测试例1

将1.5g本发明实施例5-7和对比例16、17制得的铁皮石斛复方制剂分别加入到10mL人工模拟胃液和10mL人工模拟肠液中,在37 $^{\circ}$ C、70r/min条件下分别反应2h和3h,另外,取1.5g铁皮石斛复方制剂加入到10mL人工模拟胃液中,先置于摇床中,在37 $^{\circ}$ C、70r/min条

件下反应2h后,离心,再加入10mL人工模拟肠液继续反应3h。反应结束后,计算释放率。

[0084] 按照以下公式计算释放率:

$$\text{释放率}(\%) = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$$

式中, W_t 为样品起始重量; W_0 为样品孵育一定时间后重量。

[0085] 结果见表1。

[0086] 表1

组别	释放率 (%)		
	人工模拟胃液 2h	人工模拟肠液 3h	先人工模拟胃液 2h, 后人工模拟肠液 3h
实施例 5	1.5	90.2	94.5
实施例 6	1.6	91.5	95.1
实施例 7	1.4	92.0	95.7
对比例 16	8.2	87.4	98.9
对比例 17	10.7	65.4	78.8

由上表可知,本发明实施例1-3制得的铁皮石斛复方制剂在人工模拟胃液中能够保持较好的完整性,释放率较低,转移至人工模拟肠液中后,微胶囊结构大量崩塌,说明该微胶囊具有pH敏感性,能抵抗酸性胃液,在碱性肠液中大量释放,将大量的小分子活性成分定向输送到肠道,被肠壁吸收,具有较好的靶向输送活性组分的效果。

[0087] 测试例2

将本发明实施例5-7和对比例1-15制得的产品进行营养成分测定,结果见表2。

[0088] 总酸含量(以乳酸计):参照GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》测定。

[0089] 有机酸含量:参照GB 5009.157-2016《食品中有机酸的测定》,采用高效液相色谱法检测。

[0090] 红曲色素含量:参照GB5009.150-2016《食品安全国家标准食品中红曲色素的测定》测定。

[0091] Monacolin K含量:参照HPLC法测定测定。

[0092] 总蛋白含量:GB 5009.5-2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》测定。

[0093] 表2

组别	总酸含量 (g/kg)	丁酸含量 (g/kg)	乙酸含量 (g/kg)	总蛋白含量 (g/kg)	红曲色素含 量 (mg/kg)	Monacolin K 含 量 (mg/kg)
实施例 5	22.4	0.57	5.42	125.2	3452	5754
实施例 6	22.7	0.59	5.45	125.7	3460	5767
实施例 7	23.0	0.62	5.49	125.9	3465	5772
对比例 1	20.2	0.52	5.37	102.1	3372	5672
对比例 2	19.8	0.51	5.32	97.2	3321	5621
对比例 3	19.0	0.49	5.29	89.3	3275	5587
对比例 4	19.4	0.47	5.25	115.2	3215	5512
对比例 5	19.1	0.45	5.23	118.2	3209	5492
对比例 6	18.4	0.41	5.18	112.4	3188	5452
对比例 7	21.2	0.51	5.31	123.5	3410	5712
对比例 8	19.9	0.42	5.11	112.1	352	557
对比例 9	16.7	0.29	3.52	98.8	3028	5241
对比例 10	20.1	0.45	5.02	115.2	2982	4892
对比例 11	12.4	0.14	2.52	78.5	272	492
对比例 12	21.4	0.52	5.40	122.1	3312	5566
对比例 13	21.8	0.54	5.38	120.5	3382	5521
对比例 14	22.0	0.51	5.34	123.2	3401	5610
对比例 15	21.1	0.50	5.32	121.8	3411	5535

由上表可知,本发明实施例5-7和对比例1-15制得的产品含有丰富的总酸,包括丰富的短链脂肪酸,短链脂肪酸(SCFAs)作为重要的菌群代谢产物,可以驱动宿主与肠道微生物之间的相互作用,并与G蛋白偶联受体结合提高宿主免疫力,为上皮细胞提供能量以刺激细胞增殖、分化和成熟,减少细胞的凋亡。同时,还含有丰富的红曲色素和Monacolin K。

[0094] 测试例3 对免疫性卵巢功能衰退小鼠的影响

将162只健康雌性BALB/C小鼠随机分为27组,每组6只,分别为空白组、模型组、倍美力组和实施例1-7组,对比例1-17组每组10只。除空白组外,其余各组建立免疫性卵巢功能衰退小鼠模型:取10mg小鼠透明带3粉末(购于杭州中肽生化有限公司),加入10mL双蒸水配成溶液,与弗氏完全佐剂(购于Sigma 公司)按质量比为1:1配置成免疫试剂,与弗氏不完全佐剂(购于Sigma 公司)按质量比为1:1配置成免疫强化试剂。每只小鼠在腹腔皮下给予0.15mL免疫试剂注射,14天后以免疫强化试剂0.15mL再次注射于腹腔皮下。空白组每次造模时小鼠予以等量的生理盐水注射于腹腔皮下。

[0095] 将实施例1-7组,对比例1-17制得的产品配制成1g/mL,给予相应组小鼠灌胃,每次灌胃0.3mL,倍美力组给予等量倍美力片溶液(浓度配制为0.002mg/mL)灌胃;空白组和模型

组均予等量生理盐水灌胃。于造模后1周开始灌胃给药,连续90天。

[0096] (1)激素水平检测

在实验结束后8h后,从小鼠颌下静脉丛采血0.5mL,离心分离血清,根据试剂盒说明书操作测试血清中FSH、LH、E2水平,结果见表3。

[0097] 表3

组别	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	E ₂ (ng/L)
空白组	0.52±0.12	2.91±0.28	25.41±3.12
模型组	1.17±0.09#	4.77±0.37#	10.02±1.15#
倍美力组	0.63±0.15*	3.07±0.29*	23.12±2.60*
实施例 1	0.70±0.11*	3.24±0.30*	22.88±2.48*
实施例 2	0.68±0.07*	3.21±0.32*	22.90±2.51*
实施例 3	0.67±0.14*	3.22±0.27*	22.89±2.61*
实施例 4	0.68±0.17*	3.20±0.28*	22.91±2.59*
实施例 5	0.61±0.13*	3.01±0.23*	23.98±2.49*
实施例 6	0.60±0.11*	2.98±0.22*	24.02±2.37*
实施例 7	0.58±0.12*	2.97±0.24*	24.10±2.53*
对比例 1	0.69±0.13	3.25±0.25	22.84±2.51
对比例 2	0.70±0.11	3.28±0.21	22.87±2.52
对比例 3	0.73±0.12	3.30±0.23	22.78±2.54
对比例 4	0.71±0.14	3.31±0.20	22.80±2.49
对比例 5	0.74±0.15	3.29±0.26	22.81±2.61
对比例 6	0.78±0.13	3.34±0.25	22.72±2.57
对比例 7	0.75±0.12	3.23±0.24	22.98±2.64
对比例 8	0.79±0.11	3.29±0.22	22.68±2.61
对比例 9	0.82±0.13	3.30±0.21	22.65±2.58
对比例 10	0.74±0.12	3.26±0.23	22.82±2.60
对比例 11	0.90±0.08	3.41±0.25	22.02±2.55
对比例 12	0.89±0.10	3.45±0.23	22.07±2.53
对比例 13	0.87±0.09	3.42±0.21	22.05±2.31
对比例 14	0.91±0.11	3.39±0.24	22.00±2.44
对比例 15	0.97±0.12	3.51±0.22	21.89±2.49
对比例 16	0.73±0.14	3.27±0.21	22.82±2.38
对比例 17	0.77±0.09	3.29±0.19	22.78±2.51

注释:#为与空白组相比,P<0.05;*为与模型组相比,P<0.05。

[0098] 由上表可知,本发明实施例1-7制得的铁皮石斛复方制剂能显著降低卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)水平,升高雌二醇(E2)水平。

[0099] (2) 卵巢重量检测和卵母细胞数

在采血后,将小鼠脊髓离断处死,剪开腹膜,分别找到双侧卵巢,摘取双侧卵巢,去除表面脂肪组织,称重,然后将卵巢固定后经充分水洗2h,先后经60%、75%、90%、100%酒精梯度脱水,二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋后,连续切片,切片厚度4 μ m,分别进行HE染色,随机取5处镜下视野,计数卵母细胞数。

[0100] 结果见表4。

[0101] 表4

组别	卵巢质量 (mg)	卵母细胞数目 (个)
空白组	21.42 \pm 2.98	147.2 \pm 10.2
模型组	13.12 \pm 3.12#	51.4 \pm 4.7#
倍美力组	20.52 \pm 3.62*	134.8 \pm 9.7*
实施例 1	18.92 \pm 3.45*	128.9 \pm 10.8*
实施例 2	18.99 \pm 3.28*	130.2 \pm 9.4*
实施例 3	18.95 \pm 3.16*	129.5 \pm 9.1*
实施例 4	19.02 \pm 3.65*	129.7 \pm 8.9*
实施例 5	20.89 \pm 3.78*	139.2 \pm 9.5*
实施例 6	20.94 \pm 3.61*	140.1 \pm 10.4*
实施例 7	21.01 \pm 3.42*	140.7 \pm 10.1*
对比例 1	18.94 \pm 3.02	129.2 \pm 9.2
对比例 2	18.92 \pm 3.11	129.9 \pm 9.5
对比例 3	18.86 \pm 3.24	128.8 \pm 9.3
对比例 4	18.91 \pm 3.05	129.0 \pm 9.7
对比例 5	18.88 \pm 2.98	129.1 \pm 9.6
对比例 6	18.84 \pm 3.15	127.8 \pm 10.2
对比例 7	18.99 \pm 3.21	131.5 \pm 10.1
对比例 8	18.80 \pm 3.19	125.7 \pm 10.3
对比例 9	18.78 \pm 3.20	124.7 \pm 9.4
对比例 10	18.88 \pm 3.17	130.4 \pm 10.4
对比例 11	18.67 \pm 3.24	121.2 \pm 9.8
对比例 12	18.69 \pm 3.15	122.0 \pm 10.1
对比例 13	18.70 \pm 3.12	122.3 \pm 9.7
对比例 14	18.69 \pm 3.17	121.8 \pm 9.2
对比例 15	18.56 \pm 3.22	117.4 \pm 10.0
对比例 16	18.89 \pm 3.10	127.2 \pm 9.5
对比例 17	18.78 \pm 3.12	126.5 \pm 9.0

注释:#为与空白组相比, $P<0.05$;*为与模型组相比, $P<0.05$ 。

[0102] 由上表可知,本发明实施例1-6制得的铁皮石斛复方制剂能明显增加卵巢重量,增加其发育中的卵泡数目。

[0103] 卵巢功能逐渐衰退属于生理现象,但生育年龄阶段由于疾病或其他因素可能导致卵巢功能衰退,现代中医学家对于卵巢功能衰退病因主要是因为肾虚脾弱。

[0104] 在卵巢功能衰退早期,雌二醇的水平升高,卵泡刺激素、促黄体生成素维持在正常水平;当卵泡耗竭过多,卵巢储备明显下降时,雌二醇明显降低。另外,卵泡刺激素升高,促黄体生成素降低,或卵泡刺激素/促黄体生成素的比值升高,预示着卵巢储备降低、卵巢低反应的发生,促黄体生成素水平降低可能影响卵巢对促性腺激素的反应性。

[0105] 经过本次小鼠试验我们发明,本发明实施例1-7制得的铁皮石斛复方制剂,能显著降低卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)水平,升高雌二醇(E2)水平,增加卵巢重量,增加其发育中的卵泡数目,以实施例5-7制得的产品效果更佳,说明本发明产品不仅增加卵母细胞数目,而且可以提高卵子质量,有利于精卵结合,从而提高患者的受孕率。

[0106] 对比例1、2与实施例7相比,步骤S1中第一复合酶由单一的碱性蛋白酶或风味蛋白酶替代。对比例3与实施例7相比,未进行步骤S1中第一复合酶酶解,其卵泡刺激素、促黄体生成素水平升高,雌二醇水平降低,卵巢质量、卵母细胞数量下降。将中药材通过蛋白复合酶酶解,碱性蛋白酶作用于羧基侧链上的所有疏水性和芳香族氨基酸羧基端的酰胺键,催化蛋白质分子内的肽键水解产生具有较小分子质量的肽,风味蛋白酶裂解亮氨酸与脯氨酸或脯氨酸与脯氨酸之间的肽键,两者的协同作用下,酶解速度快,酶解效果好,水解产物小肽的得率高,酶解后的多肽活性更好,得到中药酶解多肽。

[0107] 对比例4、5与实施例7相比,步骤S2中第二复合酶由单一的纤维素酶或果胶酶替代。对比例6与实施例7相比,未进行步骤S2中第二复合酶酶解,其卵泡刺激素、促黄体生成素水平升高,雌二醇水平降低,卵巢质量、卵母细胞数量下降。本发明将滤渣经过糖类复合酶酶解,包括纤维素酶和果胶酯酶,多种酶的共同作用于细胞壁,造成细胞壁在极短的时间内大量降解,从而促进内容物流出,促进中药药渣中糖类、脂类和微量元素等提取,制得的小分子糖类具有极好的抗衰老、抗应激、抗癌、提高免疫力的功效。

[0108] 对比例7与实施例7相比,未进行步骤S3,然后药渣经过乙醇渗漉提取,卵泡刺激素、促黄体生成素水平升高,雌二醇水平降低,卵母细胞数量下降;将药渣中易溶于乙醇的皂苷类、多酚类、黄酮类提取出来,从而得到活性物,具有很好的健脾补肾,调节卵巢功能的作用;

对比例8与实施例7相比,步骤S5中未接种红曲霉,制得的产品中红曲色素、Monacolin K含量大量降低,总酸、短链脂肪酸含量降低,卵泡刺激素、促黄体生成素水平升高,雌二醇水平降低,卵母细胞数量下降;对比例9与实施例7相比,步骤S5中未接种酿酒酵母、面包酵母,总酸、短链脂肪酸含量降低,卵泡刺激素、促黄体生成素水平升高,雌二醇水平降低,卵母细胞数量下降;对比例11与实施例7相比,未进行步骤S5发酵,红曲色素、Monacolin K含量大量降低,总酸、短链脂肪酸含量降低,卵泡刺激素、促黄体生成素水平升高,雌二醇水平降低,卵巢质量、卵母细胞数量明显下降。将中药酶解多糖和药渣混合后,接种红曲霉、酿酒酵母、面包酵母,进行发酵,酵母菌能快速将酶解混合物中的还原性糖发酵分解成更小的分子,自身快速增殖,红曲霉的发酵产物包括红曲色素、 γ -氨基丁酸、洛伐他

汀等,能明显提高产物的抗氧化、抗癌、抗衰老、提高免疫力等活性。

[0109] 对比例10与实施例7相比,步骤S5中未加入活化液,红曲色素、Monacolin K、总酸、短链脂肪酸含量降低,补充加入含有甘露糖和海藻糖的无菌水中,加热活化,采用甘露糖和海藻糖替代葡萄糖获得活化液,酵母菌体吸入甘露糖和海藻糖后细胞内大分子的稳定性增强,提高了菌株的抗性,促进菌株快速增殖达到稳定期,从而能够高效发酵降解酶解混合物,产生大量的活性小分子物质。

[0110] 对比例12、13、14与实施例7相比,步骤S6中未添加枸杞多糖、人参皂苷Rg1或灵芝孢子粉,卵泡刺激素、促黄体生成素水平升高,雌二醇水平降低,卵巢质量、卵母细胞数量下降,对比例15与实施例7相比未添加添加枸杞多糖、人参皂苷Rg1和灵芝孢子粉,其卵泡刺激素、促黄体生成素水平明显升高,雌二醇水平降低,卵巢质量、卵母细胞数量明显下降。枸杞含有丰富的水溶性枸杞多糖,具有非常强大的生理活性,能够很好的增强非特异的免疫功能,具有促进T、B、CTL、NK和巨噬细胞等免疫功能,增强荷瘤、化疗与辐射损伤小鼠免疫功能及调节神经内分泌免疫调节网络的作用,有调节免疫、延缓衰老多种功效;人参皂苷Rg1,可提高人体力、智力的活动能力,增强机体对有害刺激的非特异性抵抗力,具有抗衰老、抗疲劳、提高免疫力、辅助抗肿瘤、修复性功能等作用;灵芝孢子粉具有增强机体免疫力、保护胃黏膜等作用,将三者与中药酶解多糖、活性物、发酵产物混合后,得到活性组合物,能明显提高机体免疫力,提高其抗氧化、抗衰老、抗癌的能力,还具有健脾补肾,利湿消肿,活血通络等效果。

[0111] 对比例16与实施例7相比,步骤S7中壳聚糖未经过羧基化处理,其pH敏感性下降,在胃酸溶液中就大量溶胀释放活性物质,对比例17与实施例7相比,步骤S7中未添加羧基化壳聚糖,其在胃酸溶液中就较多的释放活性物质,两组对比例对卵巢早衰小鼠卵巢功能的调节改善作用下降。本发明通过将壳聚糖表面的氨基经过反应羧基化后,与海藻酸钠、活性物质溶于水中,与油相混合后,经过快速膜乳化制备油包水乳液,进一步通过氯化钙和海藻酸钠以及羧基化的壳聚糖络合交联反应形成壳层,从而制得包裹了活性组合物的缓释微胶囊,进入人体后,可以缓慢释放活性组合物,从而起到长效调节,延长反应效果的作用。羧基化的壳聚糖在酸性胃液中不容易溶胀解交联,而是在碱性肠液中大量溶胀,从而释放活性物质。

[0112] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。