

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510081599.7

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1301666C

[22] 申请日 2005.7.15

[21] 申请号 200510081599.7

[30] 优先权

[32] 2004.12.9 [33] CN [31] 200410081448.7

[73] 专利权人 桂林莱茵生物制品有限公司

地址 541308 广西壮族自治区桂林市兴安县湘江路 18 号

[72] 发明人 宋云飞

[56] 参考文献

CN1429622A 2003.7.16

CN1463712A 2003.12.31

审查员 赵世华

[74] 专利代理机构 桂林市持衡专利商标事务所有
限公司
代理人 马 兰

权利要求书 2 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

一种能增强免疫力的保健食品及其制备方法

[57] 摘要

本发明将公开一种能增强免疫力的保健食品及其制备方法，配制本发明能增强免疫力的保健食品的各组份以重量份计为：黄芪 600~900 份、红景天 400~600 份、松茸 400~600 份、西洋参 100~200 份，由于本发明保健食品是采用上述组份科学配制而成，其配方合理，各组份的联合使用，可对机体起到抗耐缺氧、抗寒、抗肿瘤免疫效应，以及调节人体非特异性和特异性免疫力，从而达到全面而系统增强机体免疫力作用，增强免疫功能低下的人群的免疫力。且其均采用天然产品或从天然产品中制取，所以该保健食品是一种安全、完全无任何毒副作用，可长期服用的天然保健食品。

1、一种能增强免疫力的保健食品，其特征在于各组份以重量份计为：黄芪 600~900 份、红景天 400~600 份、松茸 400~600 份和西洋参 100~200 份。

2、根据权利要求 1 所述的能增强免疫力的保健食品，其特征在于各组份以重量份计为：黄芪 700~800 份、红景天 450~550 份、松茸 450~550 份和西洋参 130~180 份。

3、根据权利要求 2 所述的能增强免疫力的保健食品，其特征在于各组份以重量份计为：黄芪 750 份、红景天 500 份、松茸 500 份和西洋参 150 份。

4、根据权利要求 1~3 中任何一项所述的能增强免疫力的保健食品的制备方法，其步骤如下：

1) 称取黄芪、红景天、松茸、西洋参备用；

2) 将红景天置于 4~5 倍于其重量、重量浓度为 45~95%的乙醇中浸泡、提取、过滤，得醇提液；然后回收醇提液中的乙醇，再将其浓缩，得红景天稠膏；

3) 将松茸置于 6~8 倍于其重量的水中浸泡，煎煮，得水提液；然后过滤水提液，并将滤液浓缩，得松茸稠膏；

4) 将黄芪置于 6~8 倍于其重量的水中浸泡，煎煮，得水提液；然后过滤水提液，并将滤液浓缩，得黄芪稠膏；

5) 将西洋参洗净，置于 50~70℃中烘干，粉碎成西洋参细粉；

6) 将所得的红景天稠膏、松茸稠膏、黄芪稠膏、西洋参细粉混合均匀，干燥，包装，得成品。

5、根据权利要求 4 所述的能增强免疫力的保健食品的制备方法，其特征在于：

步骤 2) 中，红景天的浸泡时间为 3~5 小时，提取时间为 1~2 小时，提取次数为 1~3 次；

步骤 3) 中，松茸的浸泡时间为 3~5 小时，提取时间为 1~2 小时，提取次数为 1~3 次；

步骤 4) 中，黄芪的浸泡时间为 3~5 小时，提取时间为 1~2 小时，提取次数为 1~3 次。

6、一种能增强免疫力的保健食品，其特征在于各组份以重量份计为：黄芪提取物 300~400 份、红景天提取物 300~400 份、松茸提取物 300~400 份和西洋参 100~200 份，其中所述红景天提取物的制备方法，如下述步骤：

1) 将红景天置于 4~5 倍于其重量、重量浓度为 45~95%的乙醇中浸泡、提取，过滤，得醇提液；

2) 回收醇提液中的乙醇, 并将其浓缩, 得红景天提取物;

其中所述松茸提取物的制备方法, 如下述步骤:

1) 将松茸置于6~8倍于重量的水中浸泡, 煎煮, 得水提液;

2) 过滤水提液;

3) 将滤液浓缩, 得松茸提取物;

其中所述黄芪提取物的制备方法, 如下述步骤:

1) 将黄芪置于6~8倍于重量的水中浸泡, 煎煮, 得水提液;

2) 过滤水提液;

3) 将滤液浓缩, 得黄芪提取物。

7、根据权利要求6所述的能增强免疫力的保健食品, 其特征在于各组份以重量份计为: 黄芪提取物320~380份、红景天提取物320~380份、松茸提取物320~380份和西洋参120~180份。

8、根据权利要求7所述的能增强免疫力的保健食品, 其特征在于各组份以重量份计为: 黄芪提取物350份、红景天提取物350份、松茸提取物350份和西洋参150份。

9、根据权利要求6所述的能增强免疫力的保健食品, 其特征在于:

在红景天提取物的制备方法步骤1)中, 红景天的浸泡时间为3~5小时, 提取时间为1~2小时, 提取次数为1~3次;

在松茸提取物的制备方法步骤1)中, 松茸的浸泡时间为3~5小时, 提取时间为1~2小时, 提取次数为1~3次;

在黄芪提取物的制备方法步骤1)中, 黄芪的浸泡时间为3~5小时, 提取时间为1~2小时, 提取次数为1~3次。

一种能增强免疫力的保健食品及其制备方法

(一) 技术领域:

本发明涉及一种保健食品,特别是一种能增强免疫力的保健食品;本发明还涉及这种保健食品的制备方法。

(二) 背景技术:

人体内部不但具有一套完整的防护免疫系统,如胸腺、脾脏、淋巴结、肠道呼吸道粘膜下淋巴组织等,而且还具有可产生执行免疫功能的免疫活性细胞,如T细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞等,这些免疫活性细胞,在神经、体液及免疫系统的自身调节下,相互协调执行自己的职能,以保证人体处于一个自身稳定的正常状态。现代免疫学认为,人体的免疫功能有防御传染、自身稳定和免疫监视三大作用,在正常情况下,机体保持平衡状态,并依靠免疫功能,抵抗各种感染,清除体内有害物质,即“自我识别”、“排除异己”,达到自身稳定的生理保护作用。但当免疫功能异常时,自身的稳态就会被打破,而导致多种自身免疫性疾病,如类风湿性关节炎、红斑狼疮、硬皮病、白塞氏病、艾滋病及其它疾病的发生,而且与人体的衰老及肿瘤、高血压、糖尿病等的发生均有密切联系。现代医学所指的免疫力,也与中医学所说的“正气”有相似含义。中医理论认为一切致病因素为邪气,一切抗病能力为正气。正气,又可分为卫气、元气和主要组织器官的脏腑之气等。所谓卫气是能起防御外邪侵犯人体的正气,卫气行于脉外,具有湿润肌肤,滋养腠理,抵御外邪,保卫机体的作用。卫气之所以能发挥作用,主要是依靠肺气的调节与宣发。元气是维持生命活动的原动力,中医认为肾为先天之本,元气藏于肾,肾主骨生髓并生殖,肾中元气能激发和推动全身各组织器官的生理活动,维持人体的生长发育和生命。五脏六腑之气的产生也依赖于元气的资助。此外,脾为后天之本,具有运化水谷精微的功能,承担着消化食物,化生气血,再输布于全身,濡养其他脏腑的重要职责。所以说脾是气血生化之源,与机体的免疫功能也有密切的关系。由此可见,机体的正气强弱与肺、脾、肾三脏密切相关。人体正气的强弱盛衰直接决定疾病的发生、发展和转归,如果正气旺盛,机体就能祛邪外出,免于生病,即所谓“正气内存,邪不可干”。如果正气虚衰,则邪气易侵入机体而引起疾病,即所谓病是由于“邪之所凑,其气必虚”。疾病的发展和转归,也取决于邪正的消长,正胜则邪负,病即向愈;邪胜而正负,病则加剧。因此中医在防病治病过程中提出了扶正祛邪以固本的基本原则,这与增强体免疫力的保健方法是一致的。目前市场上所售的可增强免疫力药物种类众多,例如申请号为:03139711.5,名称为《一种提高免疫力的抗病毒药及制备方法》,公开了一种由肌苷和对

乙酰胺基苯甲酸二甲胺基异丙醇酯的分子比为 1:3 组成的药物,用淀粉包埋的微胶囊剂,它是通过提高提高肌体免疫功能而起抗病毒作用,该产品稳定,药效作用显著,它既有抗病毒作用又有提高肌体免疫功能。但这类可增强免疫力的药物产品其副作用较大,不易长期、大剂量的服用,因此也就不可能达到持续、系统的增强免疫力的效果。

(三) 发明内容:

本发明将公开一种安全、无副作用,并可全面系统的增强人体免疫力的保健食品,本发明还将公开这种保健食品的制备方法。

本发明人依据经过反复试验、综合中、西医理论,选取了安全、无任何副作用并可以直接服用的黄芪、红景天、松茸、西洋参用以制造本发明能增强人体免疫力保健食品。在选取本发明保健食品的各原料进行组合搭配时,必须考虑到它们各自所能发挥的功效及将它们进行搭配所能产生的协调效果。首先,选取黄芪是因为其具有调节机体免疫的功能,且其所含的黄芪总黄酮具有抗氧化性及清除自由基作用,可使免疫细胞避免脂质过氧化的损伤,并可改变免疫细胞能量代谢和促进淋巴细胞分裂作用,因此其对放疗术中免疫系统损伤如淋巴细胞转化率降低、中性粒细胞杀菌活力减弱等有一定的保护作用,可有效的防止肺癌术中放疗所致的组织细胞损伤,使照射后组织的 MDA 含量下降, SOD 活性受到保护,减轻肺组织充血、实变,胸膜粘连和食道粘膜糜烂等反应,对人体免疫功能有增强作用,并可提高抗肿瘤免疫效应。红景天具有抗耐缺氧及保护缺氧心肌作用,可增加血液中色素和红血球水平,提高动脉血氧分压和血氧饱和度,改善机体组织器官的供氧,基于此,红景天能通过降低耗氧量,清除自由基,增加抗氧化酶活性,抑制或降低脂质过氧化反应,从抑制缺氧造成的血液流变学变性改变等来实现其抗氧作用。另外,红景天还可调节低温条件下正常人体非特异性和特异性免疫功能,增强抗寒及抗疲劳能力。而配方中所含的松茸具有提高人体耐缺氧能力,并可提高人体低下的免疫功能,使之保持正常,且松茸提取物多糖成分对非特异性免疫和特异性免疫都显示增强作用,同时还具有抗应激作用。配方中的西洋参中所含的西洋参根粗多糖具有显著拮抗环磷酰胺所致机体白细胞及免疫器官重量减少的作用,可促进免疫功能低下的机体淋巴细胞的转化,并可对机体的非特异性免疫和细胞免疫功能起到增强作用。在本发明保健食品的配方之中,所选取的黄芪、红景天、松茸、西洋参都具有很好的增强免疫力的功效,而且红景天和松茸不仅具有抗耐缺氧作用,还均具有可增强人体非特异性和特异性免疫力的功能,再加上西洋参对机体非特异性免疫力和细胞免疫力功能的调节作用,以及黄芪对人体抗肿瘤免疫效应作用和红景天清除机体内自由基的效果,它们联合使用,可相互促进、影响,发挥协调作用,达到全面而系统的增强免疫力效果。此外,中医理论认为黄氏性甘、微温,具有健脾气,益肺气,扶正固本的功能;而西洋参性苦、寒、微甘,具有益气养阴,

振奋元气之功；红景天则具有健脾益气，活血化瘀之效，而松茸作为食用菌，具有强身，益肠胃，补虚扶正之作用。诸品合用，共奏补脾益肺、大补元气、调畅气血之功，以达补虚扶正祛邪的目的。因此，无论从传统中医还是现代药理两方面的理论均可论证本配方中各组份的综合使用，可达到较好的增强免疫力效果。

本发明能增强免疫力的保健食品各组份的配比量是经过申请人多次科学试验，以及人体可对黄芪、红景天、松茸、西洋参四种组份的摄入量等各种指标为依据制定，各组份的重量份计为：黄芪 600~900 份、红景天 400~600 份、松茸 400~600 份、西洋参 100~200 份，我们所选取的各组份的优选配比以重量份计可为：黄芪 700~800 份、红景天 450~550 份、松茸 450~550 份、西洋参 130~180 份。而本发明保健食品中各组份的最佳配比量以重量份计则为：黄芪 750 份、红景天 500 份、松茸 500 份、西洋参 150 份。

本发明能增强免疫力的保健食品的制备方法，可以如下述步骤：

- 1) 称取黄芪、红景天、松茸、西洋参备用；
- 2) 将红景天置于 4~5 倍于其重量、重量浓度为 45~95% 的乙醇中浸泡、提取、过滤，得醇提液；然后回收醇提液中的乙醇，再将其浓缩，得红景天稠膏；其中所述红景天的浸泡时间一般为 3~5 小时，提取时间一般为 1~2 小时，提取次数一般为 1~3 次；
- 3) 将松茸置于 6~8 倍于其重量的水中浸泡，煎煮，得水提液；然后过滤水提液，再将滤液浓缩，得松茸稠膏；其中所述松茸的浸泡时间一般为 3~5 小时，提取时间一般为 1~2 小时，提取次数一般为 1~3 次；
- 4) 将黄芪置于 6~8 倍于其重量的水中浸泡，煎煮，得水提液；然后过滤水提液，并将滤液浓缩，得黄芪稠膏；其中所述黄芪的浸泡时间一般为 3~5 小时，提取时间一般为 1~2 小时，提取次数一般为 1~3 次；
- 5) 将西洋参洗净，置于 50~70℃ 中烘干，粉碎成西洋参细粉；
- 6) 将所得的红景天稠膏、松茸稠膏、黄芪稠膏、西洋参细粉混合均匀，干燥，包装，得成品。

当然也可直接采用黄芪、红景天、松茸的提取物再加上西洋参一同配制本发明能增强免疫力的保健食品，其各组份以重量份计可为：黄芪提取物 300~400 份、红景天提取物 300~400 份、松茸提取物 300~400 份、西洋参 100~200 份；而我们优选的各组份配比量以重量份计为：黄芪提取物 320~380 份、红景天提取物 320~380 份、松茸提取物 320~380 份、西洋参 120~180 份；本发明保健食品中各组份的最佳配比以重量份计则为：黄芪提取物 350 份、红景天提取物 350 份、松茸提取物 350 份、西洋参 150 份。

其中，所述的黄芪、红景天、松茸提取物可以是市售的黄芪、红景天、松茸提取物，例如浙江康恩贝制药有限公司生产的黄芪提取物，或是以水

提或其它方法提取的黄芪、红景天、松茸提取物，也可采用上述方法制备的黄芪、红景天、松茸提取物。

本发明能增强免疫力的保健食品是采用黄芪、红景天、松茸、西洋参科学配制而成，其配方合理，各组份的联合使用，可对机体起到抗耐缺氧、抗寒、抗肿瘤免疫效应，以及调节人体非特异性和特异性免疫力，从而达到全面而系统增强机体免疫力作用，增强免疫功能低下的人群的免疫力。且本发明保健食品的原料采用天然产品或从天然产品中制取，所以本发明保健食品是一种安全、完全无任何毒副作用，可长期服用的天然保健食品。

(四) 具体实施方式：

实施例 1：

1) 制备黄芪提取物：

将黄芪置于 8 倍于其重量的水中浸泡 4 小时，煎煮 1.5 小时，滤过，得水提液 A，再将其置于 6 倍于其重量的水中浸泡 4 小时，煎煮 1.5 小时，滤过，得水提液 B；将 A 与 B 合并，进行微滤；然后再进行减压浓缩，得黄芪稠膏备用；

2) 制备红景天提取物：

将红景天置于 5 倍于其重量、重量浓度为 70% 的乙醇中浸泡 4 小时，并进行提取，提取时间为 1.5 小时，过滤，合并两次滤液；然后先减压回收乙醇，再进行减压浓缩，得红景天稠膏备用；

3) 制备松茸提取物：

将松茸置于 6 倍于其重量的水中浸泡 3 小时，煎煮 2 小时，滤过，得水提液；再将水提液进行微滤，然后进行减压浓缩，得松茸稠膏备用；

4) 称取以上述方法制备的黄芪稠膏 300 克、红景天稠膏 300 克、松茸稠膏 300 克，与已经过烘干、粉碎的西洋参 100 克，混合均匀，然后进行减压浓缩，即得本发明能增强免疫力的保健食品药膏。

实施例 2：

1) 制备黄芪提取物：

将黄芪置于 7 倍于其重量的水中浸泡 5 小时，煎煮 2 次，每次煎煮 2 小时，滤过，合并两次水提液，然后将水提液进行微滤，再将其进行减压浓缩，得黄芪稠膏备用；

2) 称取以上述方法制备的黄芪稠膏 350 克、以水提方法制备出的红景天提取物 350 克，与桂林莱茵生物制品有限公司生产的松茸提取物 350 克、已经过烘干、粉碎的西洋参 150 克一同混合均匀，然后进行减压干燥，粉碎，包装，即得本发明能增强免疫力的保健食品胶囊。

实施例 3：

1) 称取黄芪 600 克、红景天 400 克、松茸 500 克、西洋参 150 克备用；

2) 将上述各组份混合均匀, 然后进行减压干燥, 粉碎, 包装, 即得本发明能增强免疫力的保健食品颗粒剂。

实施例 4:

1) 称取黄芪 600 克、红景天 400 克、松茸 400 克、西洋参 100 克。

2) 将红景天置于 5 倍于其重量、重量浓度为 95% 的乙醇中浸泡 5 小时、提取 2 次, 每次的提取时间为 1.5 小时、过滤, 合并两次醇提液; 然后回收醇提液中的乙醇, 再将其浓缩, 得红景天稠膏;

3) 将松茸置于 8 倍于其重量的水中浸泡 4 小时, 煎煮 1.5 小时, 滤过, 得水提液 A, 再将其置于 6 倍于其重量的水中浸泡 5 小时, 煎煮 1 小时, 滤过, 得水提液 B; 合并两次水提液; 然后过滤水提液, 并将滤液浓缩, 得松茸稠膏;

4) 将黄芪置于 8 倍于其重量的水中浸泡 5 小时, 煎煮 2 小时, 滤过, 得水提液; 然后将水提液进行精滤, 并将滤液浓缩, 得黄芪稠膏;

5) 将西洋参洗净, 置于 50℃ 下烘干, 粉碎成西洋参细粉;

6) 将所得的红景天稠膏、松茸稠膏、黄芪稠膏、西洋参细粉混合均匀, 干燥, 包装, 得本发明能增强免疫力的保健食品粉剂。

实施例 5:

1) 分别称取桂林莱茵生物制品有限公司生产的黄芪提取物 350 克、红景天提取物 380 克、松茸提取物 400 克备用;

2) 取 150 克西洋参洗净, 置于 70℃ 下烘干, 粉碎成西洋参细粉;

3) 将上述黄芪提取物、红景天提取物、松茸提取物与西洋参细粉混合均匀, 进行压片处理, 包装, 得本发明能增强免疫力的保健食品片剂。

实验例:

1、保健食品的用量: 实施例 2 所述的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊, 0.5g/粒, 内容物为灰色粉末, 密封, 置阴凉、干燥处保存。人口服推荐量为每日 2 次, 每次 2 粒, 成人体重按 60kg 计算, 折合剂量 0.0333g/kg · bw。取胶囊内容物进行试验。

2、实验动物与分组: 清洁级昆明种雌性小鼠 120 只, 体重为 18g~22g, 由湖南农业大学动物科技学院实验动物养殖场提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(湘) 2003-0003。每 40 只分为 1 组, 共三组。免疫 I 组, 进行碳廓清实验; 免疫 II 组, 进行脏器比值测定、小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验、迟发型变态反应实验、半数溶血值 (HC₅₀) 的测定和抗体生成细胞数的测定; 免疫 III 组, 进行 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验、NK 细胞的活性测定。

3、实验时保健食品剂量选择及处理: 据人体口服推荐量, 设本发明

能增强免疫力的保健食品胶囊的低、中、高剂量分别为 0.167g/kg·bw、0.333g/kg·bw、0.999g/kg·bw(分别相当于人体推荐剂量的 5、10、30 倍)。分别取实施例 2 所述的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物 1.67g、3.33g、9.99g 加蒸馏水配至 200ml, 不服药的动物予以等体积的蒸馏水, 分别给予受试动物灌胃, 每天灌胃一次, 灌胃体积为 0.2ml/10g·bw, 连续 30 天。

4、实验方法:

(1) 脏器/体重比值测定: 称重后处死小鼠, 取出脾脏和胸腺, 在电子分析天平上称重, 计算脏/体比值。

(2) 迟发型变态反应 (DTH) (足跖增厚法): 小鼠腹腔注射 2% (v/v) SRBC(0.2ml/每鼠)致敏后 4 天, 测量左后足跖厚度, 然后在测量部位皮下注射 20% (v/v) SRBC (20ul/每鼠), 于注射后 24h 测量左后足跖部厚度, 同一部位测量三次, 取平均值。以攻击前后足跖厚度差值 (足跖肿胀度) 来表示 DTH 的程度。

(3) ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验 (MTT 法): 无菌取脾, 置于盛有适量无菌 Hank's 液的小平皿中, 制成细胞悬液, 经 200 目筛网过滤。用 Hank's 液洗 2 次, 每次离心 10 分钟 (1000r/min)。然后将细胞悬浮于 1ml 完全培养液中, 计数活细胞数, 用 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 3×10^6 个/mL。再将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1ml, 在其中一孔加 75 μ L ConA 液 (相当于 7.5 μ g/mL), 另一孔作为对照, 置 5%二氧化碳, 37°C 培养 72h。培养结束前 4h, 每孔轻轻吸去上清液 0.7ml, 加入不含小牛血清的 RPMI1640 培养液, 同时加入 MTT (5mg/mL) 50 μ L/孔, 继续培养 4h。培养结束后, 每孔加入 1ml 酸性异丙醇, 吹打混匀, 使紫色结晶完全溶解。然后分装到 96 孔培养板中, 每个孔作 3 个平行孔, 用酶标仪, 以 570nm 波长测定光密度值。淋巴细胞的增殖能力用加 ConA 孔的光密度值减去不加 ConA 也的光密度值表示。

(4) 抗体生成细胞检测 (Jerne 改良玻片法): 取羊血, 用生理盐水洗涤 3 次, 每次离心 (2000r/min) 10min, 将压积 SRBC 用生理盐水配成 2% (v/v) 的细胞悬液, 每鼠腹腔注射 0.2ml。将免疫后 4 天的小鼠处死, 取脾, 轻轻撕碎, 用 Hanks 液制成细胞悬液, 200 目筛网过滤, 洗涤、离心 2 次, 最后将细胞悬浮在 5ml Hanks 液中。将表层培养基加热溶解后与等量的 PH7.4、2 倍浓度的 Hanks 液混合, 分装小试管, 每管 0.5ml, 再向管内加入用 SA 液配制的 10%SRBC50ul (v/v)、20ul 脾细胞悬液, 迅速混匀后倾倒入已刷薄层琼脂糖的玻片上, 待琼脂糖凝固后将玻片平扣放在玻片架上, 放入二氧化碳培养箱中温育 1.5h, 将用 SA 液稀释的补体 (1: 10)

加入到玻片凹槽内继续温育 1.5h 后计数溶血空斑数。

(5) 半数溶血值 (HC_{50}) 的测定: 取羊血, 用生理盐水洗涤 3 次, 每只鼠经腹腔注射 2% (v/v, 用生理盐水配制) 压积 RBC0.2mL 进行免疫。5 天后, 摘除眼球取血于离心管内, 放置约 1h, 将凝固血与管壁剥离, 使用权血清充分析出, 2000rpm 离心 10min, 收集血清。用 SA 缓冲液将血清稀释为 200 倍, 取 1mL 置试管内, 依次加入 10%(v/v, 用 SA 缓冲液配制) 压积 SRBC0.5mL, 补体 1mL(用 SA 缓冲液按 1: 10 稀释)。另设不加血清的对照管 (以 SA 缓冲液代替)。置 37°C 恒温水浴中保温 30min 后, 冰浴终止反应。2000rpm 离心 10min, 取上清 1mL, 加都氏试剂 3mL。同时取 10% (v/v, 用 SA 缓冲液配制) 压积 SRBC0.25mL, 加都氏试剂到 4mL 于另量试管中, 充分混匀, 放置 10min 后, 于 540nm 处以对照管作空白, 分别测定各管光密度值。溶血素的量以半数溶血值 (HC_{50}) 表示, 按下式计算:

半数溶血值 (HC_{50}) = 样品光密度值 / SRBC 半数溶血时的光密度值 × 稀释倍数

(6) 小鼠碳廓清实验: 小鼠尾静脉注射以生理盐水稀释 4 倍的印度墨汁, 每 10g 体重注射 0.1mL, 墨汁注入后立即计时, 于注入墨汁后第 2、10min, 分别从内眦静脉丛取血 20ul, 加入到 2mL Na_2CO_3 溶液作空白对照, 用 722 型分光光度计在 600nm 波长处比色测光密度值 (OD)。将小鼠处死, 取肝、脾、称重, 计算吞噬指数 a。

(7) 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验 (半体内法): 小鼠腹腔注射 20% (v/v, 用生理盐水配制) 的压积鸡红细胞 (2000rpm, 10min) 悬液 1mL, 间隔 30min, 颈椎脱臼处死, 取腹腔巨噬细胞洗液 1mL, 滴于载玻片上, 放入垫有湿纱布的搪瓷盒内, 置 37°C 孵箱温育 30min。孵毕, 于生理盐水中漂洗以除去未贴片细胞。晾干, 以甲醇: 丙酮 (1: 1) 固定, 4% (v/v) Giemsa-磷酸缓冲液染色, 用蒸馏水漂洗晾干。油镜下每片计数 100 个巨噬细胞, 按下式计算吞噬率和吞噬指数:

吞噬率% = 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数 / 计数的巨噬细胞数 × 100

吞噬指数 = 被吞噬的鸡红细胞总数 / 计数的巨噬细胞数

(8) NK 细胞流行性的测定 (同位素 3H -TdR 测定法): 取传代后 24h 生长良好的 YAC-1 细胞 (存活率 > 95%) 按 1×10^6 / mL YAC-1 细胞悬液加 3H -TdR $10 \mu Ci$ 进行标记, 于 37°C, 5% 二氧化碳培养箱中培养 2h, 每 30min 振荡 1 次, 标记后的细胞用培养液洗涤 3 次, 重悬于培养液中, 使细胞浓度为 1×10^5 个 / mL。受试小鼠颈椎脱臼处死, 无菌取脾, 制成脾细胞悬液, 用 Hank's 液洗 3 次, 每次 1000rpm 离心 10min, 再用 2mL 含 10%

小牛血清的 RPMI1640 完全培养液悬浮，用台酚兰染色计数（活细胞数应在 95%以上），调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL。在 96 孔板中每孔加 $100 \mu\text{L}$ Triton X-100。每个洞设 3 个复孔，置 5%二氧化碳， 37°C 培养 4h。用多头细胞收集器收集于玻璃纤维滤纸上，用液闪仪测定每分钟脉冲数（cpm）。

NK 细胞活性 = $(1 - \text{实验孔 cpm} / (\text{空白对照孔 cpm} - \text{最大释放孔 cpm})) \times 100\%$

5、实验结果：

(1) 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠体重的影响，见表 1、2、3：

表 1 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊增强免疫力功能实验 (I) 组小鼠 (雌) 体重

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	初始体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	中期体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	末期体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	增重 $\bar{x} \pm s$ (g)
0.000	10	19.28±1.15	28.07±1.68	35.76±2.19	16.48±1.74
0.167	10	19.27±1.18	28.12±1.76	35.50±2.10	16.23±1.76
0.333	10	19.31±1.08	28.27±1.77	35.82±2.17	16.51±1.85
0.999	10	19.87±1.45	28.42±1.88	36.37±1.55	16.50±1.69

表 2 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊增强免疫力功能实验 (II) 组小鼠 (雌) 体重

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	初始体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	中期体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	末期体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	增重 $\bar{x} \pm s$ (g)
0.000	10	20.26±1.47	28.86±1.99	36.56±2.23	16.30±1.42
0.167	10	20.25±1.40	28.66±1.59	35.43±1.85	15.18±1.38
0.333	10	20.33±1.18	28.17±1.37	35.81±1.64	15.48±1.72
0.999	10	20.38±1.35	29.07±1.87	36.09±1.69	15.71±1.70

表 3 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊增强免疫力功能实验 (III) 组小鼠 (雌) 体重

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	初始体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	中期体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	末期体重 $\bar{x} \pm s$ (g)	增重 $\bar{x} \pm s$ (g)
0.000	10	19.95±1.27	28.77±1.66	36.19±1.67	16.24±1.42
0.167	10	19.88±1.21	28.49±1.85	35.95±2.32	16.07±1.46
0.333	10	19.90±1.09	28.60±1.84	35.89±1.55	15.99±1.02
0.999	10	19.99±1.24	28.04±1.86	35.79±1.92	15.80±1.22

由表 1-3 可见，各剂量组实验初、实验中期、实验末小鼠体重及实验期间小鼠体重增长对照组比较，差异无显著性 ($P > 0.05$)

(2) 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠免疫器官脏器/体重比值的影响，见表 4：

表4 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠免疫器官脏器/体重比值的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	脾脏/体重		胸腺/体重	
		$\bar{x}\pm s(\%)$	P 值	$\bar{x}\pm s(\%)$	P 值
0.000	10	0.479±0.028	---	0.284±0.043	---
0.167	10	0.492±0.032	0.752	0.302±0.052	0.806
0.333	10	0.507±0.036	0.199	0.315±0.075	0.447
0.999	10	0.516±0.043	0.063	0.311±0.039	0.542

由表4可见,经口给予小鼠不同剂量的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物30天,对小鼠脾脏/体重比值和胸腺/体重比值无显著影响($P>0.05$)

(3) 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠细胞免疫功能的影响,见表5、6:

A: 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响,见表5:

表5 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	注射后24h足跖肿胀度	
		$\bar{x}\pm s(\text{mm})$	P 值
0.000	10	0.275±0.066	---
0.167	10	0.313±0.064	0.315
0.333	10	0.340±0.054	0.036
0.999	10	0.351±0.036	0.012

由表5可知,经口给予小鼠不同剂量的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物30天,中、高剂量组足跖肿胀度明显高于对照组,差异具有显著性($P>0.05$)。

B: 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠ConA诱导的小鼠淋巴细胞转化能力实验的影响,见表6:

表6 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠淋巴细胞转化能力实验的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	淋巴细胞增殖能力(OD差值)	
		$\bar{x}\pm s$	P 值
0.000	10	0.053±0.017	---
0.167	10	0.080±0.054	0.271
0.333	10	0.074±0.029	0.461
0.999	10	0.070±0.036	0.620

由表6可见,经口给予小鼠不同剂量的本发明能增强免疫力的保健食品

品胶囊内容物 30 天，各剂量组小鼠淋巴细胞转化能力与对照组比较，差异无显著性 ($P>0.05$)。

(4) 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对体液免疫的影响，见表 7、8：

A：本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠抗体生成细胞数的影响，见表 7：

表 7 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠抗体生成细胞数的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	溶血空斑数 $\bar{x}\pm s$ ($\times 10^3$ /全脾)	P 值
0.000	10	22.6 \pm 8.5
0.167	10	30.4 \pm 11.8	0.404
0.333	10	38.9 \pm 10.6	0.022
0.999	10	46.6 \pm 18.8	0.001

由表 7 可知，经口给予小鼠不同剂量的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物 30 天，中、高剂量组小鼠抗体生成细胞数明显高于对照组，差异具有显著性 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

B：本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠半数溶血值 (HC₅₀) 的影响，见表 8：

表 8 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠半数溶血值 (HC₅₀) 的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	半数溶血值 $\bar{x}\pm s$	P 值
0.000	10	181.05 \pm 28.73
0.167	10	197.28 \pm 18.63	0.334
0.333	10	201.99 \pm 18.23	0.159
0.999	10	220.11 \pm 30.46	0.003

由表 8 可见，经口给予小鼠不同剂量的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物 30 天，高剂量组小鼠半数溶血值与对照组比较，差异有显著性 ($P<0.01$)。

(5) 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠单核一巨噬细胞吞噬功能的影响，见表 9、10、11：

A：本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠单核一巨噬细胞碳廓清的影响，见表 9：

表9 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠单核-巨噬细胞碳廓清的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	吞噬指数 (a)	
		$\bar{x}\pm s$	P 值
0.000	10	5.538±0.851	---
0.167	10	6.055±0.550	0.304
0.333	10	6.411±0.769	0.037
0.999	10	6.534±0.818	0.015

由表9可见,经口给予小鼠不同剂量的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物30天,中、高剂量组小鼠吞噬指数显著高于对照组,差异有显著性($P<0.05$)。

B: 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力的影响,见表10、11:

表10 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞吞噬率的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	吞噬率		P 值
		$\bar{x}\pm s$ (%)	反正弦转换值 $\bar{x}\pm s$	
0.000	10	28.2±7.6	31.9±4.8	---
0.167	10	29.6±7.5	32.8±4.7	0.950
0.333	10	34.0±8.5	35.5±5.2	0.227
0.999	10	34.9±7.0	36.1±4.2	0.133

表11 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞吞噬指数的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	吞噬指数	
		$\bar{x}\pm s$	P 值
0.000	10	0.929±0.184	---
0.167	10	0.988±0.212	0.868
0.333	10	1.075±0.257	0.300
0.999	10	1.086±0.186	0.247

由表10-11可见,经口给予小鼠不同剂量的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物30天,各剂量组对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力未见明显影响。

(6) 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠NK细胞活性的影响,见表12:

表 12 本发明能增强免疫力的保健食品胶囊对小鼠 NK 细胞活性的影响

剂量组 (g/kg BW)	动物数 (只)	NK 细胞活性 $\bar{x} \pm s$ (%)	NK 细胞活性平方 根反正弦转换值 $\bar{x} \pm s$	P 值
0.000	10	34.0±11.3	35.4±7.1	---
0.167	10	38.0±7.9	37.9±5.0	0.792
0.333	10	38.2±12.6	38.0±7.5	0.771
0.999	10	46.4±16.3	42.9±9.7	0.079

由表 12 可见，经口给予小鼠不同剂量的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物 30 天，各剂量组对小鼠 NK 细胞活性与对照组比较，差异无显著性 ($P > 0.05$)。

6、实验结论：

经口给予小鼠 0.167g/kg·bw、0.333g/kg·bw、0.999g/kg·bw 剂量的本发明能增强免疫力的保健食品胶囊内容物 30 天，0.333g/kg·bw、0.999g/kg·bw 剂量能增强小鼠迟发型变态反应、提高小鼠的抗体生成细胞数，提高小鼠单核-巨噬细胞碳廓清的能力，0.999g/kg·bw 剂量能提高小鼠血清半数溶血值。与对照组比较， $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。对小鼠体重增长、脾脏/体重比值、胸腺/体重比值、ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化能力及小鼠 NK 细胞活性、小鼠巨噬细胞鸡红细胞的能力无明显影响。提示本发明能增强免疫力的保健食品具有增强免疫力的功能。