



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105285623 B

(45)授权公告日 2017.03.22

(21)申请号 201510643608.0

G01N 30/06(2006.01)

(22)申请日 2015.10.08

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 1718055 A,2006.01.11,

申请公布号 CN 105285623 A

CN 104225411 A,2014.12.24,

(43)申请公布日 2016.02.03

武保国.胡枝子.《农村养殖技术》.2003,(第07期),

(73)专利权人 甘肃复兴厚生物医药科技有限公司

审查员 徐彦

地址 731200 甘肃省临夏回族自治州和政县城关镇三谷村滨河大道北侧循环经济产业园区

(72)发明人 吕承洋 吕随民

(51)Int.Cl.

A23L 2/38(2006.01)

A23L 33/00(2016.01)

G01N 30/88(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

(54)发明名称

一种具有提高免疫功能的保健饮料及其制法

(57)摘要

本发明属于食品加工技术领域,具体涉及一种具有提高免疫功能的保健饮料及其制法。该保健饮料由下述重量份的原料制成:胡枝子花1~5份,柔毛水杨梅花1~5份。其制备方法为:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加5~15倍水煎煮1~2小时,药渣再加5~10倍量水煎煮0.5~1小时,水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为60~75%,搅拌后放于4~8℃静置12~48小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料。

1. 一种具有提高免疫功能的保健饮料,其特征在於该保健饮料是由下述重量份的原料制成:胡枝子花1份,柔毛水杨梅花1份,该保健饮料由下述方法制成:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加5~15倍水煎煮1~2小时,药渣再加5~10倍量水煎煮0.5~1小时,水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为60~75%,搅拌后放于4~8℃静置12~48小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料。

2. 如权利要求1所述的保健饮料,其特征在於该保健饮料由下述方法制成:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5℃静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料。

3. 如权利要求1所述的保健饮料的质量检测方法,其特征在於该保健饮料采用下述方法进行质量检测:采用高效液相色谱法测定紫云英苷含量:

(1) 色谱条件:色谱柱为C18色谱柱;以比例为40~60:40~60的乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相;检测波长300~330nm,柱温25~45℃;

(2) 对照品溶液的制备:精密称取紫云英苷对照品置于容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;移取上述溶液置容量瓶,加甲醇定容,作为对照品贮备液;

(3) 供试品溶液的制备:取本发明保健饮料,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇,密塞,称定重量,超声处理,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液;

(4) 测定:分别精密量取上述供试品溶液、对照品溶液各5~20μL,注入高效液相色谱仪,进行检测。

4. 如权利要求3所述的保健饮料的质量检测方法,其特征在於该保健饮料采用下述方法进行质量检测:采用高效液相色谱法测定紫云英苷含量:

(1) 色谱条件:色谱柱为C18色谱柱;以比例为40:60的乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相;检测波长315nm,柱温25℃;理论板数按紫云英苷峰计算应不低于3000;

(2) 对照品溶液的制备:精密称取紫云英苷对照品10.00mg置于100ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;移取上述溶液10ml置25ml容量瓶,加甲醇定容,作为对照品贮备液;

(3) 供试品溶液的制备:取本发明保健饮料10mL,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10mL,密塞,称定重量,超声处理30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,0.45μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液;

(4) 测定:分别精密量取上述供试品溶液、对照品溶液各10μL,注入高效液相色谱仪,进行检测。

## 一种具有提高免疫功能的保健饮料及其制法

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品加工技术领域,涉及一种保健饮料,具体为一种提高免疫功能的保健饮料。

### 背景技术

[0002] 人体内的内源肽缺乏可引起免疫功能低下,由于免疫功能低下,身体呈现不抵抗状态,感冒病毒乘虚而入,并发感染,特别是流行性感胃并发的感染,病情十分严重,死亡率也很高。

[0003] 随着现代免疫学的进展,人们对肽与免疫的关系逐步得到充分认识。人体中的肽不足可造成免疫器官发育不全、萎缩,对细胞免疫、体液免疫、补体功能和吞噬作用等方面都有着重要影响。

[0004] 免疫力低下的身体易于被感染或患癌症,免疫力超常也会产生对身体有害的结果,如引发过敏反应、自身免疫疾病等。各种原因使免疫系统不能正常发挥保护作用,在此情况下,极易招致细菌、病毒、真菌等感染,因此免疫力低下最直接的表现就是容易生病。因经常患病,加重了机体的消耗,所以一般有体质虚弱、营养不良、精神萎靡、疲乏无力、食欲降低、睡眠障碍等表现,生病、打针吃药便成了家常便饭。每次生病都要很长时间才能恢复,而且常常反复发作。长此以往会导致身体和智力发育不良,还易诱发重大疾病。深层原因是免疫力低下或免疫力不健全。

[0005] 当人体免疫功能失调,或者免疫系统不健全时,下列问题就会反复发作:感冒反复发作、扁桃体炎反复发作、哮喘反复发作、支气管炎反复发作、肺炎反复发作、腹泻反复发作,所以千万不可小视。

[0006] 近年来,发明人采用本发明保健饮料用于治疗免疫力低下,取得了较好的疗效。

[0007] 在本发明中:

[0008] 胡枝子花为豆科胡枝子属植物胡枝子*Lespedeza bicolor Turcz.*的花。

[0009] 柔毛水杨梅花为蔷薇科水杨梅属植物柔毛路边青*Geum Japonicum Thunb. Var. Chinense F.Bolle*的花序。

### 发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种具有提高免疫功能的保健饮料。

[0011] 本发明的另一目的是提供该保健饮料的制备方法。

[0012] 本发明的目的是通过以下方式实现的:

[0013] 一种具有提高免疫功能的保健饮料,是由下述重量份的原料制成:胡枝子花1~2份,柔毛水杨梅花1~2份。

[0014] 所述的保健饮料优选由下述重量份的原料制成:胡枝子花1份,柔毛水杨梅花1份。

[0015] 所述的保健饮料优选由下述重量份的原料制成:胡枝子花1份,柔毛水杨梅花2份。

[0016] 所述的保健饮料优选由下述重量份的原料制成:胡枝子花2份,柔毛水杨梅花1份。

[0017] 该保健饮料由下述方法制成:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加5~15倍水煎煮1~2小时,药渣再加5~10倍量水煎煮0.5~1小时,水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为60~75%,搅拌后放于4~8℃静置12~48小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料。

[0018] 该保健饮料优选由下述方法制成:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5℃静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料。

[0019] 该保健饮料采用下述方法进行质量检测:

[0020] 采用高效液相色谱法测定紫云英苷(astragaloside)含量:

[0021] (1)色谱条件:色谱柱为C<sub>18</sub>色谱柱;以比例为40~60:40~60的乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相;检测波长300~330nm,柱温25~45℃;

[0022] (2)对照品溶液的制备:精密称取紫云英苷对照品置于容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;移取上述溶液置容量瓶,加甲醇定容,作为对照品贮备液;

[0023] (3)供试品溶液的制备:取本发明保健饮料,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇,密塞,称定重量,超声处理,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液;

[0024] (4)测定:分别精密量取上述供试品溶液、对照品溶液各5~20μL,注入高效液相色谱仪,进行检测。

[0025] 该保健饮料优选采用下述方法进行质量检测:采用高效液相色谱法测定紫云英苷含量:

[0026] (1)色谱条件:色谱柱为C<sub>18</sub>色谱柱;以比例为40:60的乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相;检测波长315nm,柱温25℃;理论板数按紫云英苷峰计算应不低于3000;

[0027] (2)对照品溶液的制备:精密称取紫云英苷对照品10.00mg置于100ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;移取上述溶液10ml置25ml容量瓶,加甲醇定容,作为对照品贮备液;

[0028] (3)供试品溶液的制备:取本发明保健饮料10mL,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10mL,密塞,称定重量,超声处理30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,0.45μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液;

[0029] (4)测定:分别精密量取上述供试品溶液、对照品溶液各10μL,注入高效液相色谱仪,进行检测。

[0030] 所述的保健饮料可以用于制备治疗免疫力低下的保健饮料。

[0031] 实验一:本发明保健饮料增强免疫力的实验研究

[0032] 1 实验材料

[0033] 1.1 受试物

[0034] 本发明保健饮料:处方:胡枝子花5kg,柔毛水杨梅花5kg。制法:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5℃静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到本发明保健茶提取液。

[0035] 对比保健饮料A:处方:胡枝子花10kg。制法:按处方重量取胡枝子花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5℃静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到对比保健饮料A提取液。

[0036] 对比保健饮料B:处方:柔毛水杨梅花10kg。制法:按处方重量配比取柔毛水杨梅花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5℃静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到对比保健饮料B提取液。

[0037] 1.2 实验动物

[0038] 饲养清洁级昆明种雄性小鼠150只,体质量18~21g,由南京中医药大学实验动物中心提供,在温度18~24℃、湿度40%~70%的环境中饲养。

[0039] 1.3 主要试剂

[0040] 绵羊红细胞(SRBC),HanK液(pH值7.2~7.4),RPMI1640培养液。小牛血清,青链霉素,刀豆蛋白A(ConA),MTT,补体(豚鼠血清),SA缓冲液,印度墨汁,都氏试剂,YAC-1细胞等。

[0041] 1.4 主要仪器

[0042] 洁净工作台,二氧化碳(CO<sub>2</sub>)培养箱,离心机,TU-1901双光束紫外可见光分光光度计(北京普析),酶标仪,显微镜,游标卡尺等。

[0043] 2 实验方法

[0044] 2.1 动物分组及给药方法

[0045] 参照文献(1.中华人民共和国卫生部.保健食品功能学评价程序和检验方法[S].2003.;2.徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1420-1460)。实验分3大组,每组60只小鼠。免疫1组测定迟发型变态反应(DTH)和抗体生成细胞数;免疫2组进行ConA诱导的小鼠淋巴细胞转化实验、NK细胞活性测定;免疫3组进行碳廓清实验。

[0046] 每组50只小鼠随机分为阴性对照组、阳性对照组及本发明保健饮料组、对比保健饮料A组、对比保健饮料B组,每组10只。

[0047] 阴性对照组给予纯化水1mL/10g;阳性对照组给予配制成15.0mg/mL灵芝全粉溶液,给予1mL/10g;本发明保健饮料组给予1mL/10g本发明保健茶提取液,对比保健饮料A组给予1mL/10g对比保健饮料A提取液;对比保健饮料B组给予2mL/10g对比保健饮料B提取液。连续灌胃15d。

[0048] 2.2 细胞免疫功能测定

[0049] 检测给药后各组小鼠迟发型变态反应(DTH)的情况,采用足跖增厚法。每鼠腹腔注射2%(V/V)SRBC悬液0.2mL。致敏后4d,测量左后足跖厚度。在测量部位皮下注射20%SRBC。每鼠20μL,24h后测量左后足跖肿胀厚度,连续测3次,取均值。以前后足跖厚度差值表示DTH程度。

[0050] ConA诱导的小鼠淋巴细胞转化实验,采用MTT法检测小鼠淋巴细胞转化及增殖情况。无菌取脾,于无菌HanK液中制成细胞悬液,200目筛网过滤,HanK液洗3次。用RPMI1640培养液调整细胞浓度为 $3 \times 10^6$ 个 $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。而后分两孔加入24孔培养板,每孔1.0mL,一孔加ConA液50μL,一孔作对照,置5%CO<sub>2</sub>、37℃培养72h。培养结束前4h,每孔吸去上清液0.7mL,加入不

含小牛血清的RPMI1640培养液和MTT( $5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,每孔 $50\mu\text{L}$ )。培养结束后,每孔加入酸性异丙醇 $1\text{mL}$ ,吹打混匀,波长 $570\text{nm}$ 处用酶标仪测定吸光度值(A值)。淋巴细胞的增殖能力用加ConA孔的A值减不加ConA孔的A值表示。

### [0051] 2.3 体液免疫功能测定

[0052] 以抗体生成细胞检测测定药物对小鼠体液免疫功能的影响,采用Jeme改良玻片法。每鼠腹腔注射2%SRBC悬液 $0.2\text{mL}$ ,免疫后4d,处死小鼠,取脾,用HanK液制成细胞悬液,筛孔内径( $75.0 \pm 4.1$ ) $\mu\text{m}$ (200目)筛网过滤,洗涤、离心2次,最后将细胞悬浮在HanK液 $5\text{mL}$ 中。将表层培养基加热溶解后与等量pH值7.4、2倍浓度的HanK液混合,分装小试管,每管 $0.5\text{mL}$ 。再向管内加入用HanK液配制的10%SRBC悬液 $50\mu\text{L}$ 、脾细胞悬液 $20\mu\text{L}$ ,迅速混匀后倾倒入已刷薄层琼脂糖的玻片上,凝固后,放入二氧化碳培养箱中温育 $1.5\text{h}$ ,加HanK液稀释的补体(1:10),继续温育 $1.5\text{h}$ 后计数溶血空斑数。

### [0053] 2.4 单核-巨噬细胞吞噬功能测定

[0054] 采用小鼠碳廓清实验检测小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能。小鼠尾静脉注射 $10\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以0.9%氯化钠溶液稀释4倍的印度墨汁,立即计时,注入墨汁后第2,10分钟,从内眦静脉从取血 $20\mu\text{L}$ ,加到0.1%碳酸钠溶液 $2\text{mL}$ 中,摇匀, $600\text{nm}$ 波长处测A值。处死小鼠,取肝、脾称重,按下式计算吞噬指数:吞噬指数( $\alpha$ )= $K^{1/3} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$ 。式中 $K = (\lg A_1 - \lg A_2) / (t_2 - t_1)$ 。 $A_1$ 为2min时吸光度, $A_2$ 为10min时吸光度, $t_1 t_2$ 分别为2,10min。

### [0055] 2.5 NK细胞活性测定

[0056] 采用乳酸脱氢酶(LDH)测定法检测NK细胞活性。实验前24h将YAC-1细胞进行传代培养,用RPMI1640完全培养液调整细胞浓度为 $4 \times 10^5$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。动物给完药后无菌取脾,置于盛有适量无菌HanK液的小平皿中,用镊子轻轻将脾磨碎,制成单细胞悬液。经筛孔内径( $75.0 \pm 4.1$ ) $\mu\text{m}$ (200目)筛网过滤,加入 $0.5\text{mL}$ 灭菌水20s裂解红细胞,用RPMI1640完全培养液调整细胞浓度为 $2 \times 10^7$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。取YAC-1细胞和脾细胞各 $100\mu\text{L}$ ,加入96孔培养板中;靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 $100\mu\text{L}$ ,靶细胞最大释放孔加靶细胞和2.5%Triton各 $100\mu\text{L}$ ;上述各项均设3个复孔,于 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中培养4h,然后将96孔培养板以 $1500\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5min,每孔吸取上清液 $100\mu\text{L}$ 置平底96孔培养板中,同时加入LDH基质液 $100\mu\text{L}$ ,反应3min,每孔加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 $30\mu\text{L}$ ,在酶标仪 $490\text{nm}$ 处测定A值。

[0057]  $\text{NK细胞活性}(\%) = (\text{反应A值} - \text{自然释放孔A值}) / (\text{最大释放孔A值} - \text{自然释放孔A值}) \times 100\%$ 。

### [0058] 2.6 统计学方法

[0059] 用Excel、SPSS10.0软件进行数据转化和统计分析。方差齐性检验合格后,采用dunnet单因素多重比较统计分析。

## [0060] 3 结果

### [0061] 3.1 本发明保健饮料对小鼠细胞免疫功能实验

[0062] 在小鼠迟发型变态反应实验中,本发明保健饮料组及阳性对照组足跖增厚值与阴性对照组比较,差异有极显著性。表明本发明保健饮料液能增加小鼠迟发型变态反应。对ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化实验,本发明保健饮料组及阳性对照组A值差值高于阴性对照组,差异有显著性。表明本发明保健饮料能提高小鼠脾淋巴细胞转化的能力。结果见表1-1。

[0063] 3.2 对小鼠体液免疫功能的影响

[0064] 对小鼠抗体生成细胞的影响见表1-1。本发明保健饮料组及阳性对照组小鼠溶血空斑数均高于阴性对照组,对比保健饮料A组、对比保健饮料B组、对比保健饮料C组对小鼠体液免疫功能的影响不明显。表明本发明保健饮料能够提高小鼠的抗体生成细胞数,提示本发明保健饮料具有增强小鼠体液免疫的功能。

[0065] 表1-1 各组小鼠迟发型变态反应和脾淋巴细胞转化和抗体生成细胞数结果( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | 剂量/<br>(mL/10g) | 足跖厚度/<br>mm      | A 值差值              | 溶血空斑数<br>[ $\times 10^3 \cdot (\text{全脾})^{-1}$ ] |
|------------|-----------------|------------------|--------------------|---|
| 本发明保健饮料组   | 1               | 0.78 $\pm$ 0.25* | 0.521 $\pm$ 0.125* | 20.56 $\pm$ 8.98**                                |
| 对比保健饮料 A 组 | 1               | 0.22 $\pm$ 0.20  | 0.256 $\pm$ 0.089  | 11.76 $\pm$ 9.56                                  |
| 对比保健饮料 B 组 | 1               | 0.24 $\pm$ 0.17  | 0.261 $\pm$ 0.074  | 12.18 $\pm$ 8.56                                  |
| 阳性对照组      | 1               | 0.75 $\pm$ 0.30* | 0.458 $\pm$ 0.089* | 19.23 $\pm$ 6.56**                                |
| 阴性对照组      | -               | 0.18 $\pm$ 0.12  | 0.246 $\pm$ 0.052  | 11.12 $\pm$ 6.23                                  |

[0066] 注:与阴性对照组比较,\*P<0.01,\*\*P<0.05

[0067] 3.3 本发明保健饮料对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响

[0068] 经方差分析和统计学两两比较,发现本发明保健饮料组及阳性对照组小鼠的碳廓清吞噬指数A均高于阴性对照组,差异有极显著性(P<0.01),表明本发明保健饮料具有增强小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的作用,对比保健饮料A组与对比保健饮料B组作用不明显,见表1-2。

[0069] 3.4 本发明保健饮料对小鼠NK细胞活性的影响

[0070] 经方差分析和统计学两两比较,发现本发明保健饮料组及阳性对照组小鼠的NK细胞活性均高于阴性对照组,差异有显著性。表明本发明保健饮料各剂量具有增强小鼠NK细胞活性的作用。结果见表1-2。

[0071] 表1-2 各组小鼠单核-巨噬细胞碳廓清和NK细胞活性的检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | 小鼠/只 | 剂量/<br>(mL/10g) | 吞噬指数(A)          | NK 细胞活性/%        |
|------------|------|-----------------|------------------|------------------|
| 本发明保健饮料组   | 10   | 1               | 6.56 $\pm$ 1.89* | 30.2 $\pm$ 10.8* |
| 对比保健饮料 A 组 | 10   | 1               | 4.89 $\pm$ 1.23  | 10.2 $\pm$ 6.5   |
| 对比保健饮料 B 组 | 10   | 1               | 4.25 $\pm$ 1.05  | 8.5 $\pm$ 5.2    |
| 阳性对照组      | 10   | 1               | 5.56 $\pm$ 1.52* | 24.5 $\pm$ 12.5* |
| 阴性对照组      | 10   | -               | 3.89 $\pm$ 0.95  | 8.2 $\pm$ 3.5    |

[0072] 注:与阴性对照组比较,\*P<0.05

[0073] 4 讨论与结论

[0074] 本发明保健饮料能增加小鼠迟发型变态反应,可增强ConA诱导的小鼠脾淋巴细胞转化增殖能力,有增强细胞免疫功能作用;提高小鼠的抗体生成细胞数,有增强体液免疫功能作用;有增强小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能及增强小鼠NK细胞活性的作用。表明本发明保健饮料具有增强小鼠细胞和体液免疫功能及非特异性的作用。

[0075] 特别是,本发明保健饮料的作用效果明显优于对比保健饮料A与对比保健饮料B,说明本发明保健饮料中两种药味之间的配伍精良,缺一不可,两种药味之间的组合产生了明显的协同增效作用,产生了一加一大于二的技术效果。

- [0078] 实验二:本发明保健饮料的质量标准研究
- [0079] 采用高效液相色谱法测定本发明保健饮料中紫云英苷含量
- [0080] 1 样品溶液的制备
- [0081] 1.1 对照品溶液的制备
- [0082] 精密称取紫云英苷对照品10.00mg置于100ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。移取上述溶液10ml置25ml容量瓶,加甲醇定容,作为对照品贮备液(紫云英苷40.80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。
- [0083] 1.2 供试品溶液的制备
- [0084] 处方:胡枝子花5kg,柔毛水杨梅花5kg。
- [0085] 制法:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5 $^{\circ}\text{C}$ 静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加适量蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料20L。
- [0086] 取本发明保健饮料10mL,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10mL,密塞,称定重量,超声处理30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,0.45 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。
- [0087] 1.3 阴性对照液的制备
- [0088] 取处方组成中除胡枝子花外的其余成分制成不含胡枝子花的阴性对照品,按“1.2”制得阴性对照溶液。在紫云英苷出峰位置未出现吸收峰,说明本发明保健饮料中的其他成分对紫云英苷的含量测定没有干扰。
- [0089] 2 色谱条件
- [0090] 色谱柱为SHIMADZU C<sub>18</sub>色谱柱(5 $\mu\text{m}$ ,4.6mm $\times$ 150.0mm,岛津公司);以乙腈-1%冰醋酸溶液(40:60)为流动相;检测波长315nm,柱温25 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按紫云英苷峰计算应不低于3000;在此条件下,本发明保健饮料中紫云英苷分离良好。
- [0091] 3 方法学考察
- [0092] 3.1 线性范围
- [0093] 精密吸取上述紫云英苷对照品溶液,加甲醇稀释成紫云英苷浓度分别为0.816、1.632、3.264、4.896、6.528、8.160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,依次进样10 $\mu\text{l}$ 。以峰面积(Y)为纵坐标,以进样浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程:
- [0094]  $Y=3.638 \times 10^4 X - 1.068 \times 10^4$ ,相关系数 $r=0.9996$ 。表明紫云英苷浓度在0.816~8.160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内与色谱峰面积呈良好线性关系。
- [0095] 3.2 精密度试验
- [0096] 取浓度为4.890 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的紫云英苷对照品溶液10 $\mu\text{l}$ 连续测定5次,RSD为0.15%,表明仪器精密度良好。
- [0097] 3.3 稳定性试验
- [0098] 取同一供试品溶液在0、2、4、6、8h分别进样10 $\mu\text{l}$ ,记录峰面积,结果表明:供试品溶液在室温放置8h内稳定,紫云英苷峰面积RSD为1.60%。
- [0099] 3.4 重复性试验
- [0100] 将本发明保健饮料,平行提取制备6份供试品溶液,分别进样测定,RSD为1.23%(n=



6),表明该方法重复性良好。

[0101] 3.5 加样回收率试验

[0102] 精密称取已知含量的本发明保健饮料各9份,加入相应量的紫云英苷对照品,按供试品溶液的制备方法处理并测定。加样回收率试验结果见表2-1。紫云英苷平均回收率为97.7%,RSD为1.66%,表明该方法准确、可靠。

[0103] 表2-1 回收率试验结果(n=9)

| 编号 | 样品重/g  | 紫云英苷量/g | 加入量/g | 测得量/g | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|----|--------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|
| 1  | 1.4973 | 34.38   | 32.65 | 66.26 | 97.6  | 97.9    | 1.63  |
| 2  | 1.5024 | 34.47   | 48.95 | 82.97 | 99.1  |         |       |
| 3  | 1.5013 | 34.46   | 48.94 | 82.56 | 98.3  |         |       |
| 4  | 1.5054 | 34.55   | 48.95 | 82.54 | 98.1  |         |       |
| 5  | 1.5085 | 34.64   | 32.63 | 67.54 | 100.7 |         |       |
| 6  | 1.4986 | 34.42   | 16.34 | 50.35 | 97.7  |         |       |
| 7  | 1.5002 | 34.43   | 32.65 | 65.68 | 95.6  |         |       |
| 8  | 1.4956 | 34.34   | 16.33 | 49.96 | 95.9  |         |       |
| 9  | 1.5045 | 34.54   | 16.31 | 50.24 | 96.3  |         |       |

[0105] 3.6 样品含量测定。取本发明保健饮料样品4批,照供试品溶液制备的方法,0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤后进样,不同批号本发明保健饮料含量见表2-2。

[0106] 表2-2 样品测定结果(n=3)

| 批号     | 紫云英苷含量( $\mu$ g/g) | RSD/% |
|--------|--------------------|-------|
| 140101 | 41.12              | 1.41  |
| 140406 | 45.34              | 1.34  |
| 140523 | 49.32              | 1.32  |
| 140615 | 46.43              | 1.43  |

[0108] 具体实施方式:

[0109] 实施例1:

[0110] 处方:胡枝子花5kg,柔毛水杨梅花5kg。

[0111] 制法:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5 $^{\circ}$ C静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加适量蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料20L。

[0112] 检测方法:采用高效液相色谱法测定紫云英苷含量:

[0113] (1)色谱条件:色谱柱为SHIMADZU C<sub>18</sub>色谱柱;以比例为40:60的乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相;检测波长315nm,柱温25 $^{\circ}$ C;理论板数按紫云英苷峰计算应不低于3000;

[0114] (2)对照品溶液的制备:精密称取紫云英苷对照品10.00mg置于100ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;移取上述溶液10ml置25ml容量瓶,加甲醇定容,作为对照品贮备液;

[0115] (3)供试品溶液的制备:取本发明保健饮料10mL,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10mL,密塞,称定重量,超声处理30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重

量,摇匀,0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液;

[0116] (4)测定:分别精密量取上述供试品溶液、对照品溶液各10 $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,进行检测;

[0117] (5)结果:每10mL本发明保健饮料中紫云英苷含量为52.34 $\mu$ g。

[0118] 实施例2:

[0119] 处方:胡枝子花6.6kg,柔毛水杨梅花3.3kg。

[0120] 制法:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5 $^{\circ}$ C静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加适量蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料20L。

[0121] 检测方法:采用高效液相色谱法测定紫云英苷含量:

[0122] (1)色谱条件:色谱柱为SHIMADZU C<sub>18</sub>色谱柱;以比例为40:60的乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相;检测波长315nm,柱温25 $^{\circ}$ C;理论板数按紫云英苷峰计算应不低于3000;

[0123] (2)对照品溶液的制备:精密称取紫云英苷对照品10.00mg置于100ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;移取上述溶液10ml置25ml容量瓶,加甲醇定容,作为对照品贮备液;

[0124] (3)供试品溶液的制备:取本发明保健饮料10mL,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10mL,密塞,称定重量,超声处理30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液;

[0125] (4)测定:分别精密量取上述供试品溶液、对照品溶液各10 $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,进行检测;

[0126] (5)结果:每10mL本发明保健饮料中紫云英苷含量为32.34 $\mu$ g。

[0127] 实施例3:

[0128] 处方:胡枝子花3.3kg,柔毛水杨梅花6.6kg。

[0129] 制法:按处方重量配比取胡枝子花、柔毛水杨梅花,加10倍水煎煮1.5小时,药渣再加6倍量水煎煮1小时,两次水煎液合并,过滤,滤液浓缩,冷却,加入体积浓度为95%的乙醇至乙醇浓度为70%,搅拌后放于5 $^{\circ}$ C静置24小时,过滤,滤液回收乙醇,得到保健茶提取液,加适量蔗糖、加水,灭菌,制成保健饮料20L。

[0130] 检测方法:采用高效液相色谱法测定紫云英苷含量:

[0131] (1)色谱条件:色谱柱为SHIMADZU C<sub>18</sub>色谱柱;以比例为40:60的乙腈-1%冰醋酸溶液为流动相;检测波长315nm,柱温25 $^{\circ}$ C;理论板数按紫云英苷峰计算应不低于3000;

[0132] (2)对照品溶液的制备:精密称取紫云英苷对照品10.00mg置于100ml容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;移取上述溶液10ml置25ml容量瓶,加甲醇定容,作为对照品贮备液;

[0133] (3)供试品溶液的制备:取本发明保健饮料10mL,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇10mL,密塞,称定重量,超声处理30min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液;

[0134] (4)测定:分别精密量取上述供试品溶液、对照品溶液各10 $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,进行检测;

[0135] (5)结果:每10mL本发明保健饮料中紫云英苷含量为64.34 $\mu$ g。

[0136] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。