

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810200023.1

[51] Int. Cl.

*C08B 37/00 (2006.01)*  
*A61K 31/715 (2006.01)*  
*A61P 3/06 (2006.01)*  
*A23L 1/28 (2006.01)*  
*A23L 1/327 (2006.01)*  
*A23L 1/33 (2006.01)*

[43] 公开日 2009 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 101357952A

[51] Int. Cl. (续)

*A23L 1/09 (2006.01)*

*A23L 1/30 (2006.01)*

[22] 申请日 2008.9.18

[21] 申请号 200810200023.1

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

[72] 发明人 易杨华 李 玲 马明华 张 文  
储智勇 李树林

[74] 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司  
代理人 丁振英

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

一种具有降血脂活性的贻贝多糖 MA 及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及医药技术领域，是一种从紫贻贝中分离到的贻贝多糖 MA 及其制备方法。经动物体内降血脂试验表明，贻贝多糖 MA 对高脂饲料诱导的大鼠高脂血症有明显的治疗作用，可降低大鼠总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白水平，作用与阳性药普伐他汀或血脂康相当。因此，贻贝多糖 MA 可用于制备降血脂的药物或食品。本发明对充分利用海洋生物资源具有重要意义。

1. 贻贝多糖 MA 的制备方法，具体步骤如下：

1)多糖的提取：

将紫贻贝肉鲜品用搅碎机制成匀浆，用水煮沸提取 2 次，第一次加 3 倍体积水，提取 2 小时，第二次加 2 倍体积水，提取 1 小时，离心过滤，合并滤液，将滤液浓缩后加 4 倍体积 95%乙醇，搅匀，放置 5 小时，待沉淀完全析出，倾去上清液，沉淀中加入等体积 95%乙醇，搅匀，离心过滤，沉淀物用等体积无水乙醇洗涤 3 次离心抽干，再经 2 次 Savager 法除蛋白，蒸馏水溶解后，冷冻干燥即得到贻贝多糖粗品；

2)分离纯化：将贻贝多糖粗品溶于  $0.05 \text{ mol/L}$  的 NaCl 溶液中，离心去除不溶物后，上 DEAE-cellulose 柱，用  $0.05 \text{ mol/L}$  的 NaCl 洗至无糖检出时为止，流速  $30 \text{ mL/h}$ ，用硫酸-苯酚法跟踪检测，收集洗脱部分，用截流分子量为 3000 的滤膜超滤杯加压脱盐浓缩，得到均一的贻贝多糖 MA。

2. 权利要求 1 所述方法制备的贻贝多糖 MA，其特征在于由阿拉伯糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖胺、半乳糖胺组成，摩尔比依次为：0.381、0.081、0.080、97.272、0.587、0.968 和 0.631。

3. 权利要求 2 所述贻贝多糖 MA 在制备降血脂药物或食品中的应用。

## 一种具有降血脂活性的贻贝多糖 MA 及其制备方法

### 技术领域

本发明涉及医药技术领域，是一种从海洋生物紫贻贝中分离到的多糖 MA 及其制备方法。

### 背景技术

紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck) 为贻贝科 (Mytilidae) 贻贝属 (*Mytilus*) 的海洋生物，广泛分布于中国沿海。紫贻贝呈楔形，壳质较轻薄，但较坚韧，壳长一般 70~90mm，呈黑褐色或紫褐色，表面光滑。紫贻贝资源丰富，产量高，肉味鲜美，营养丰富，是高级蛋白的重要来源。除可鲜食外，又可制成罐头、贻贝油和干制品等美味食品。在药用方面除用做滋补品和药剂外，它又是提取维生素 D 的重要原料 (王祯瑞. 中国动物志. 软体动物门. 双壳纲: 贻贝目. 第 1 版. 北京: 北京科学出版社. 1997: 50-55)。现代药理学研究认为贻贝有多种药理活性，包括抗动脉粥样硬化，降血脂，抑制血小板的凝聚从而抑制血栓的形成，改善心肌氧和营养物质的供应及保护实验性心肌缺血，改善微循环和降血压等 (邵伯芹等. 贻贝多活素对大鼠肠系膜微循环的影响. 中国药理学通报, 1997, 13(3):260-262)。但至今未见从海洋生物紫贻贝中分离到具有降血脂活性的贻贝多糖 MA 的相关报道。

### 发明内容

本发明提供一种具有降血脂活性的贻贝多糖 MA 及其制备方法。

本发明从生长于中国浙江海域的紫贻贝中提取分离到的贻贝多糖 MA 的制备方法如下：

#### 1. 多糖的提取

将紫贻贝肉鲜品用搅碎机制成匀浆，用水煮沸提取 2 次，第一次加 3 倍体积水，提取 2 小时，第二次加 2 倍体积水，提取 1 小时，离心过滤，合并滤液，将滤液浓缩后加 4 倍体积 95%乙醇，搅匀，放置 5 小时，待沉淀完全析出，倾去上清液，沉淀中加入等体积 95%乙醇，搅匀，离心过滤，沉淀物用等体积无水乙醇洗涤 3 次离心抽干，再按常规经 2 次 Savager 法除蛋白，蒸馏水溶解后，冷冻干燥即得到贻贝多糖粗品。

#### 2. 分离纯化

将粗品溶于  $0.05 \text{ mol/L}$  的 NaCl 溶液中，离心去除不溶物后，按常规上 DEAE-cellulose

柱, 用  $0.05 \text{ mol/L}$  的  $\text{NaCl}$  洗至无糖检出时为止, 流速  $30 \text{ mL/h}$ , 用硫酸-苯酚法跟踪检测, 收集洗脱部分, 用截流分子量为 3000 的滤膜超滤杯加压脱盐浓缩, 得到均一的贻贝多糖 MA。

贻贝多糖 MA 为白色絮状物, 较易溶于水和二甲基亚砜, 不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂, 硫酸-苯酚反应呈阳性, HPGFC 检测为单一对称峰, MA 的相对分子量为 112,700 左右。IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3423 (羟基), 1636 (乙酰氨基), 1154、1080、1021 (糖环醚键), 847 ( $\alpha$ -糖苷键)。硫酸咔唑法测定 MA 的糖醛酸含量为 6.759%。 $^1\text{H}$ NMR 谱确定 MA 的端基质子为  $\alpha$ -吡喃己糖 ( $\delta$  5.248)。用 GC-MS 法对 MA 的酸水解产物进行组分分析, 结果表明 MA 由阿拉伯糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖胺和半乳糖组成, 摩尔数比例依次为 0.381、0.081、0.080、97.272、0.587、0.968 和 0.631。Smith 降解后做 GC-MS 分析, 检出物有大量的葡萄糖, 少量的氨基糖、甘油及微量的岩藻糖、甘露糖、半乳糖, 没有赤藓醇检出。由此证明多糖 MA 存在的连接方式有 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6, 1 $\rightarrow$ 2 且比例约为 80.390:13.434:6.176, 其主链为 1 $\rightarrow$ 3 连接, 还有少量的 1 $\rightarrow$ 6 连接, 支链为 1 $\rightarrow$ 2 连接。

经动物试验表明, 贻贝多糖 MA 具有明显的降血脂活性, 因此, 可用于制备降血脂的药物或食品。

#### 具体实施方式:

现结合实施例, 对本发明作详细描述。

##### 实施例 1. 贻贝多糖 MA 的制备

取生长于中国浙江嵊泗海域的紫贻贝鲜品 16 千克, 用搅碎机制备成匀浆, 水煮沸提取 2 次, 第一次加 3 倍体积水, 提取 2 小时, 第二次加 2 倍体积水, 提取 1 小时, 离心过滤, 合并滤液, 将滤液浓缩后加 4 倍体积 95%乙醇, 搅匀, 放置 5 小时, 待沉淀完全析出, 倾去上清液, 沉淀中加入等体积 95%乙醇, 搅匀, 离心过滤, 沉淀物用等体积无水乙醇洗涤 3 次离心抽干, 再经 2 次 Savager 法除蛋白, 蒸馏水溶解后, 冷冻干燥即得到贻贝多糖粗品约 960g。取该粗品约 6g 溶于 10ml  $0.05 \text{ mol/L}$  的  $\text{NaCl}$  溶液中, 离心去除不溶物后, 上 DEAE-cellulose 柱, 用  $0.05 \text{ mol/L}$  的  $\text{NaCl}$  洗至无糖检出时为止, 流速  $30 \text{ mL/h}$ , 用硫酸-苯酚法跟踪检测, 收集洗脱部分, 用截流分子量为 3000 的滤膜超滤杯加压脱盐浓缩, 得到均一多糖 MA 约 486mg。

##### 动物降血脂试验

取 70 只 SD 大鼠（购自复旦大学实验动物科学部），体重  $180 \pm 10\text{g}$ ，随机分组，每组 10 只，雌雄各半，共分 7 组：正常对照组、模型对照组、阳性药普伐他汀组、阳性药血脂康组以及贻贝多糖 MA 低、中、高剂量组。各组以基础饲料喂养一周，分别眼眶取血少量，检测血清总胆固醇（TCH）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白（HDL）、低密度脂蛋白（LDL）。然后，除正常对照组仍喂食基础饲料外，其余各组喂食高脂饲料 4 周，使其成为高脂动物模型。将药物分别用蒸馏水配成相应浓度的溶液，除正常对照组每鼠灌胃 1 毫升蒸馏水外，其余各组每鼠灌胃 1 毫升相应药液，按体重给药剂量为：普伐他汀  $2\text{mg/kg}$ 、血脂康  $1\text{mg/kg}$ 、贻贝多糖 MA 低、中、高剂量组分别为  $25\text{mg/kg}$ 、 $50\text{mg/kg}$  和  $100\text{mg/kg}$ ，每天一次，连续 4 周，每周称重一次。最后一次给药后大鼠隔夜禁食，腹腔注射戊巴比妥钠  $30\text{mg/kg}$  眼眶取血，分离血清，测血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白。结果见表 1：

表1. 各组大鼠血清中血脂水平测定结果比较 ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=10$ ) (单位:  $\text{mmol/L}$ )

组 别	实验前				实验后			
	血清总胆固醇 (TCH)	甘油三酯 (TG)	高密度脂蛋白 (HDL)	低密度脂蛋白 (LDL)	血清总胆固醇 (TCH)	甘油三酯 (TG)	高密度脂蛋白 (HDL)	低密度脂蛋白 (LDL)
正常对照	$1.414 \pm 0.130$	$0.556 \pm 0.144$	$1.203 \pm 0.181$	$0.481 \pm 0.096$	$1.431 \pm 0.213$	$0.539 \pm 0.117$	$1.202 \pm 0.206$	$0.488 \pm 0.111$
模型对照	$1.544 \pm 0.157$	$0.570 \pm 0.158$	$1.045 \pm 0.100$	$0.473 \pm 0.067$	$6.152 \pm 1.225^{##}$	$1.009 \pm 0.146^{##}$	$1.178 \pm 0.184$	$2.501 \pm 0.650^{##}$
普伐他汀	$1.559 \pm 0.148$	$0.543 \pm 0.115$	$1.125 \pm 0.104$	$0.493 \pm 0.042$	$3.451 \pm 1.183^{**}$	$0.671 \pm 0.128^{**}$	$1.174 \pm 0.129$	$1.381 \pm 0.286^{**}$
血 脂 康	$1.544 \pm 0.122$	$0.579 \pm 0.144$	$1.114 \pm 0.137$	$0.471 \pm 0.051$	$3.702 \pm 1.259^{**}$	$0.701 \pm 0.134^{**}$	$1.198 \pm 0.188$	$1.878 \pm 0.520^{*}$
MA 低剂量	$1.414 \pm 0.313$	$0.596 \pm 0.085$	$1.282 \pm 0.164$	$0.469 \pm 0.113$	$3.799 \pm 0.877^{**}$	$0.708 \pm 0.097^{**}$	$1.316 \pm 0.245$	$1.918 \pm 0.688$
MA 中剂量	$1.510 \pm 0.259$	$0.543 \pm 0.094$	$1.269 \pm 0.173$	$0.474 \pm 0.132$	$3.606 \pm 0.850^{**}$	$0.635 \pm 0.155^{**}$	$1.256 \pm 0.280$	$1.617 \pm 0.620^{**}$
MA 高剂量	$1.475 \pm 0.232$	$0.565 \pm 0.109$	$1.290 \pm 0.151$	$0.470 \pm 0.115$	$3.503 \pm 1.095^{**}$	$0.615 \pm 0.091^{**}$	$1.264 \pm 0.301$	$1.342 \pm 0.427^{**}$

$^{##}P<0.01$  与正常对照组比较； $^{*}P<0.05$   $^{**}P<0.01$  与模型对照组比较。

由表 1 可见,大鼠喂饲高脂饲料 4 周后,模型对照组总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白较喂饲基础饲料的正常对照组有非常显著的升高( $P<0.01$ )。各药物治疗组与模型对照组比较,能降低大鼠总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白水平,差异显著或非常显著( $P<0.05$ 或  $P<0.01$ )。贻贝多糖 MA 低、中、高三个剂量组(25mg/kg、50mg/kg、100mg/kg)与阳性对照药普伐他汀、血脂康组相比,降低总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白水平相当,表明贻贝多糖 MA 具有良好的降血脂作用,因此可用于制备降血脂的药物或食品。本发明对开发利用海洋药用生物资源具有重要意义。