

[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 200810143261.3

[51] Int. Cl.

A61K 35/56 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A61K 31/375 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 3 月 25 日

[11] 公开号 CN 101390879A

[22] 申请日 2008.9.22

[21] 申请号 200810143261.3

[71] 申请人 湖南师范大学

地址 410081 湖南省长沙市岳麓区麓山路 36  
号湖南师范大学生命科学学院

[72] 发明人 印大中 高 军 贺 洪 詹 球  
王 硕

[74] 专利代理机构 湖南兆弘专利事务所  
代理人 赵 洪

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种含龟血清的组合物及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种含龟血清的组合物及其应用,该组合物是由 10~50 体积的龟血清、3~15 体积的维生素 C 溶液和 5~20 体积的 pH 值为 6.5~7.5 的缓冲液配制而成,所述组合物中还添加有肌酸干粉,其添加量按每 10ml 龟血清添加 1~4g 计。本发明的含龟血清的组合物不仅能够有效增加体内肌酸的吸收量,而且能增加体内代谢垃圾的清理能力,且无毒副作用,进而能够大大增强机体的运动能力。

1、一种含龟血清的组合物，其特征在于所述组合物是由 10~50 体积的龟血清、3~15 体积的维生素 C 溶液和 5~20 体积的 pH 值为 6.5~7.5 的缓冲液配制而成，所述组合物中还添加有肌酸干粉，其添加量按每 10ml 龟血清添加 1~4g 计。

2、根据权利要求 1 所述的含龟血清的组合物，其特征在于所述维生素 C 溶液的质量分数为 10~20%。

3、根据权利要求 1 所述的含龟血清的组合物，其特征在于所述缓冲液为柠檬酸和磷酸氢二钠溶液的混合液，所述缓冲液的 pH 值为 7。

4、根据权利要求 1 所述的含龟血清的组合物，其特征在于所述龟血清中含有肌酸激酶及同工酶、乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶和谷草转氨酶。

5、根据权利要求 4 所述的含龟血清的组合物，其特征在于所述肌酸激酶及同工酶的活力为 50000~70000U/L，所述乳酸脱氢酶的活力为 10000~30000U/L，所述谷丙转氨酶的活力为 50~300U/L，所述谷草转氨酶的活力为 1000~3000U/L。

6、一种如权利要求 1~5 中任一项所述的含龟血清的组合物在制备增强运动能力的保健营养液上的应用。

7、根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于所述龟血清是按以下步骤提取：

(1) 预处理：将龟养殖在净水中且禁食 3~10 天；

(2) 消毒：在 4~10℃ 的环境下，将龟表皮洗净并用乙醇溶液消毒，剪开其表皮找到血管，再次用乙醇溶液消毒；

(3) 采血：用采血管采血，采血时间不超过 3 分钟，采出的血液低温保存；

(4) 血清提取：将采出的血液进行离心处理，取离心得到的血清后进行滤菌处理，冰冻储藏备用。

8、根据权利要求 6 或 7 所述的应用，其特征在于所述含龟血清的组合物应用于人体时的服用剂量为 30~50ml/天。

9、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于所述含龟血清的组合物应用于人体时的服用剂量为 30ml/天。

## 一种含龟血清的组合物及其应用

### 技术领域

本发明涉及一种含龟血清的组合物及其应用，尤其涉及一种含有龟血清的组合物及其在增强运动能力上的应用。

### 背景技术

随着全民健身运动的开展以及“生命在于运动”理念的深入人心，民众（尤其是运动员）对提高自身运动能力的要求日益迫切，各种方法也层出不穷，其中摄入可增强运动能力的辅助品（非兴奋剂类）尤其受到关注，因为其可以在短时间内有效地提高人体的运动能力。

市场上增强运动能力的辅助品主要有两大类：以补充蛋白质和能量为主的食物，如大豆蛋白粉、核酸胶囊等；以补充矿物质、维生素和氨基酸为主的食物，如多种复合维生素胶囊等。近年来，营养学家一直在劝告运动员少食蛋白质，因为过多的蛋白质是有害的，它会使身体脱水，造成肾的过早老化。高蛋白饮食还会增加体内钙的排出量，而钙是生成骨头和补充骨质的重要矿物质。美国迈阿密的运动营养学家哈斯说，几乎在任何一个运动员的食谱上，超量最多的都是蛋白质，结果多余部分成了脂肪贮存起来或排出体外。实际上运动员无须比一个坐着的人食用更多的蛋白质。脂肪是人体贮量最为丰富的能源物质，约占体重的10~20%。最近的研究表明，在耐力运动的开始阶段，脂肪供能占10%，而在接近终点时则达到90%左右。由此可见，随着糖元的大量消耗，脂肪在供能中将起着举足轻重的作用。然而研究者也发现，在运动中过多地利用脂肪供能对提高运动水平是不利的。由于在运动过程中人体处于缺氧状态，而脂肪氧化却需要消耗大量的氧，因此造成了脂肪酸氧化不完全，结果在肝脏中产生了称为酮体的中间代谢产物；这些酸性物质在血液和组织中积累过多后，会产生酸中毒。此外，摄入的脂肪过多，在体内积存之后，便会增加肌肉的阻力，降低血管的弹性，影响心脏收缩，加重人体负担。营养学家也多次提出，缺乏维生素C、D和任何一种维生素B，无疑会影响体育成绩，但是没有证据表明，大剂量维生素能增强运动员的耐力。由上可见，市场上增强运动能力的辅助品都或多或少地存在片面性，且服用后的效果还有待进一步提高。

肌酸作为一种增强运动表现的添加剂已经有较长的历史，大多数补充肌酸的运动员会发现，在补充肌酸的初期确实可以增强运动表现；然而，Greenhaff PL, Casey A 等学者早在1993年就曾指出补充肌酸的吸收量随着时间的增长会持续下降，因为肌肉中肌酸的最大含量为150mmol/kg干肌；一旦达到这个量再补充肌酸，肌肉中的肌酸的含量则不会再增加。现有的关于补充肌酸增强运动表现的部分产品也只是补充肌酸的量，而没有增强肌酸的吸收量，所以导致大量的肌酸白白的流失，既不科学也不经济。因此，寻找一种能增强肌酸吸收的天然

提取物并与肌酸配制成营养液，在增强人体的运动能力和运动表现上将具有重要意义。

### 发明内容

2003 年以来，发明人所在的实验室开始着手对龟进行一系列的研究，研究过程中我们发现，龟体内的肌酸浓度大约是人体的 800~1000 倍。为了探究龟体内能保持肌酸高浓度的原因，我们对其吸收机理作了进一步地深入研究，之后我们发现龟体内的肌酸激酶（*creatinkinase*）及肌酸激酶同工酶（CKMB）、乳酸脱氢酶（*lactate dehydrogenase*）、谷丙转氨酶（*glutamic pyruvic transaminase*）和谷草转氨酶（*aspartate aminotransferase*）的活力很高，这些酶对肌酸的吸收起到非常重要的作用。为克服现有增强运动能力的保健品中的不足，本发明在上述实验研究成果的基础上，提供了一种能有效增加体内肌酸的吸收量、能增加体内代谢垃圾的清理能力、能大大提高运动表现、且无毒副作用的含龟血清的组合物及其应用。

为解决上述技术问题，本发明提供的技术方案为一种含龟血清的组合物，其特征在于所述组合物是由 10~50 体积的龟血清、3~15 体积的维生素 C 溶液和 5~20 体积的 pH 值为 6.5~7.5 的缓冲液配制而成，所述组合物中还添加有肌酸干粉，其添加量按每 10ml 龟血清添加 1~4g 计。

上述维生素 C 溶液的质量分数为 10~20%。

上述缓冲液为柠檬酸和磷酸氢二钠溶液的混合液，该缓冲液的 pH 值优选为 7。

上述龟血清中一般都含有肌酸激酶及同工酶、乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶和谷草转氨酶；所述肌酸激酶及同工酶的活力一般应达到 50000~70000U/L，所述乳酸脱氢酶的活力为 10000~30000U/L，所述谷丙转氨酶的活力为 50~300U/L，所述谷草转氨酶的活力为 1000~3000U/L。

本发明还提供一种上述含龟血清的组合物在制备增强运动能力的保健营养液上的应用。该保健营养液的服用方式主要为口服，每次服用剂量可以为 30~50ml/天，优选 30ml/天，可每日于运动前半小时服用，也可分次服用，但运动前服用总量建议不超过 50ml。

上述应用中的龟血清可以按以下步骤提取：

（1）预处理：将从养殖场买回的龟（例如巴西龟）养殖在经处理后的净水中且禁食 3~10 天；

（2）消毒：在 4~10℃的环境下，将龟表皮洗净并用乙醇溶液消毒，剪开其表皮找到血管，再次用乙醇溶液消毒；为了其后取血的方便，同时获得比较纯净的血清，我们可以在龟的颈动脉处取血（取血操作如图 1 所示），相应的消毒处理也主要是针对颈部皮肤及颈动脉进行消毒，一般使用的消毒液是 75%的乙醇溶液；

(3) 采血：可以选用一次性灭菌普通采血管进行采血，采血时间不超过 3 分钟，采出的血液在低温（一般为 4~10℃）中保存；

(4) 血清提取：将采出的新鲜血液进行离心处理（2500g），离心处理的时间不短于 5 分钟，取离心出的血清用 0.22μm 的过滤器进行滤菌处理，在零下 20℃ 的条件下冰冻储藏备用。

本发明提取的龟血清中（以巴西龟血清为例），测得龟血清中含有肌酸激酶及同工酶（50000~70000U/L）、乳酸脱氢酶（10000~30000U/L）、谷丙转氨酶（50~300U/L）和谷草转氨酶（1000~3000U/L）。龟血清中所含的高浓度肌酸激酶是肌酸吸收过程中的关键酶，其原因在于：三磷酸腺苷（ATP）是生物体的直接能源物质，它在生物体内的存在时间非常短，肌酸磷酸（或称磷酸肌酸）（CP）是 ATP 的储存仓库，存在时间相对较长，肌酸磷酸含量的多少与耐力和爆发力直接相关；ATP 充足时，在肌酸激酶的催化作用下将肌酸转换为肌酸磷酸，高活性的肌酸激酶将有效促进肌酸的吸收，增加 CP 的含量。乳酸脱氢酶是动物体内乳酸代谢的关键酶，动物肌肉组织在做大强度或长时间的收缩时会产生大量的乳酸，乳酸的积累是运动能力的瓶颈，而高活力的乳酸脱氢酶将有助于及时的降解乳酸、提高运动能力。谷丙转氨酶和谷草转氨酶是生物体内胺类物质降解代谢的关键酶，胺类物质是体内毒性非常大的代谢产物，其一般通过转氨作用再经过尿素循环代谢成尿素、尿酸等排出体外，谷丙转氨酶和谷草转氨酶的高活性有利于此类毒素的降解。

基于上述生物酶的作用机理和代谢功能，上述提取的龟血清与一定浓度的肌酸干粉混合后，不仅能够有效增加体内肌酸的吸收量，而且还能增加体内代谢垃圾的清理能力，进而能够大大提高动物的运动表现。同时，由于龟血清是纯天然龟的提取物，经实验测试后未发现其对实验动物有任何毒副作用，因此利用含龟血清的组合物制备增强运动能力的保健营养液，不仅无毒副作用，而且作用效果明显，对运动营养学将产生重大影响。

#### 附图说明

图 1 为巴西龟取血操作的拍摄照片。

其中 A 为剪开颈部皮肤后的颈动脉拍摄实样，B 为颈动脉取血操作拍摄实样。

#### 具体实施方式

##### 实施例 1：

一种本发明的含巴西龟血清的组合物，所述组合物是由 10ml 的巴西龟血清、5ml 质量分数为 10% 的维生素 C 溶液和 20ml 的 pH=7 的缓冲液（柠檬酸和磷酸氢二钠溶液的混合液）配制而成，所述组合物中还添加有肌酸干粉 1g。

以下通过动物实验观察上述含巴西龟血清的组合物在增强运动能力上的应用。

实验方法：取昆明小鼠（以下简称小鼠）70只，将其随机分为7组，其中

安静对照组1组：注射生理盐水

运动对照组6组：2组注射生理盐水

2组注射肌酸和生理盐水混合液（即质量分数为1%的肌酸溶液）

2组注射含巴西龟血清的组合物。

安静对照组先随机分配8只小鼠，运动对照组通过以下方法分配小鼠：将小鼠放入跑台仪内（跑台仪类似于常见的跑步机，只是加装了一些跑道以限制小鼠的跑动姿态，尾部安装了电击装置，当小鼠不跑时会被电击，促使它继续向前跑动，另外还设有调速装置和计时装置），适应三天后用跑台仪以10m/min的转速淘汰不适应鼠（不适应鼠是指宁愿被电击也不跑的小鼠、乱跳暴躁的小鼠以及被跑台夹伤的小鼠），取48只适应性较好的小鼠随机分配到6组运动对照组中，每组8只。

小鼠分配完毕后，对运动对照组的小鼠进行为期1个月的训练（每周训练五天，每天训练10分钟），具体训练方式如下：

第一周 13.5m/min × 10min

第二周 15~20m/min × 10min

第三周 20~25m/min × 10min

第四周 25~30m/min × 10min（根据实际情况，为能达到30）；

注射时间：第三周结束时到第四周结束时，注射5次（一天注射一次）；

注射方法：全部为尾静脉注射；

注射剂量：0.6ml/只。

经筛选后（排除差异过大、发炎和死亡的小鼠），实验结果见表1、表3和表5。

#### 1、不同实验组的小鼠丙二醛（MDA）含量的比较。

表1：实验小鼠的MDA含量比较表

MDA 含量 (μmol/L)							
实验组	运动对照组 (训练组)						安静对照组 (不训练)
	力竭组			不力竭组			
	本发明组合物	肌酸溶液	生理盐水	本发明组合物	肌酸溶液	生理盐水	
	A	B	C	D	E	F	
1	30.73	36.08	20.19	19.61	26.93	26.91	14.93
2	29.27	32.56	20.6	23.49	25.36	28.16	20.82
3	28.82	30.2	24.07	18.98	23.35	27.17	20.01
4	23.53	31.83	31.33	19.67	26.9	22.16	17.75
5	30.67	32.7	30.27	20.7	25.97	28.43	14.91

注：上述MDA的检测采用的是现有的TBARS法。

力竭组与不力竭组是在上述运动对照组的48只小鼠中进一步细分的，这两大组都训练了一个月，训练强度很低，力竭组在测试当日（第五周的第一天）进行大强度的跑台训练，跑到小鼠宁愿被电击都不跑为止，取出来放地上后站立不起且腹部贴地为力竭，以此与不力竭组作一个运动前后的对照。（原来每组均为8只小鼠，实验过程中有小鼠死亡，实验后部分数据缺乏可靠性，综合考虑后只取每组5只作为实验数据样本进行分析。）

首先对上述实验数据样本进行卡方检验（简称 $X^2$ 检验），该检验是验证数据的可靠性，只有进行卡方检验且合格的数据才能进行方差分析。上述实验数据分6组进行 $X^2$ 检验，得到现实 $X^2$ 值为6.78，当 $df=5$ 时，查表得 $X^2_{0.05}=11.07$ ，符合正态分布。

再进行方差分析，分析结果如下表2所示：

表2：MDA含量实验数据的方差分析结果

变异来源	df	SS	$s^2$	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
处理间	6	740.9758	123.496	14.28154**	2.45	3.53
处理内	28	242.1228	8.647244			
总变异	34	983.0987				

表2中的“\*\*”表示差异极显著。与其它对照组的实验效果进行对比后，我们得出的结论是差别显著，说明了本发明组合物的作用很明显。MDA是人体内代谢垃圾的前体物质，MDA的含量是身体健康标准的重要指标，大强度运动之后MDA的含量会显著升高，因此力竭组的MDA值要明显大于不力竭组，而注射本发明组合物小鼠的MDA值比注射肌酸溶液组要低，这充分说明注射了本发明组合物的小鼠其体内代谢垃圾的清除能力明显增强。

2、不同实验组的小鼠肌酸磷酸（CP）含量的比较。

表3：实验小鼠的CP含量比较表

CP 含量 (μmol/L)							
实验组	运动对照组 (训练组)						安静对照组 (不训练)
	力竭组			不力竭组			
	本发明 组合物	肌酸 溶液	生理 盐水	本发明 组合物	肌酸 溶液	生理 盐水	
	A	B	C	D	E	F	
1	0.00061	0.00077	0.00075	0.0017	0.0015	0.001	0.00088
2	0.00063	0.00079	0.00073	0.0016	0.0011	0.0011	0.00095
3	0.00067	0.0008	0.00076	0.0017	0.0012	0.0012	0.00093
4	0.00068	0.0007	0.00074	0.0016	0.0011	0.0011	0.0008
5	0.00059	0.00084	0.00072	0.0016	0.0013	0.0011	0.00086

注：上述CP的检测采用的是现有的磷钼酸比色法。

上述实验数据分5组进行 $X^2$ 检验,得到现实 $X^2$ 值为3.42,当 $df=4$ 时,查表得 $X^2_{0.05}=9.49$ ,符合正态分布。再进行方差分析,分析结果如下表所示:

表4: CP含量实验数据的方差分析结果

变异来源	df	SS	$s^2$	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
处理间	6	3.7E-06	6.16E-07	98.1869**	2.45	3.53
处理内	28	1.76E-07	6.27E-09			
总变异	34	3.87E-06				

表4中的“\*\*”表示差异极显著。与其它对照组的实验效果进行对比后,我们得出的结论是差别显著,说明了本发明组合物的作用效果很明显。肌酸磷酸在大强度运动后会快速消耗,消耗越多,说明运动强度和持续时间越长。由表3可以看出,力竭组的肌酸磷酸含量低于不力竭组,说明在大强度运动后消耗了大量的肌酸磷酸;力竭组中注射本发明组合物小鼠的肌酸磷酸含量也略低于注射肌酸溶液的小鼠,而运动时间要远远大于注射肌酸溶液的小鼠,这说明本发明组合物为小鼠大强度运动中肌酸磷酸的大量消耗提供了来源;在不力竭组的对照中发现,注射本发明组合物小鼠的肌酸磷酸的含量是最高的,这说明本发明组合物增强了肌酸的吸收,提高了小鼠体内肌酸磷酸的含量。

### 3、力竭实验组的小鼠跑台时间的比较

表5: 力竭组小鼠跑台时间比较表

跑台时间 (min)		
训练组		
力竭		
本发明组合物	肌酸溶液	生理盐水
A	B	C
118	75	39
127	69	56
136	125	49
147	110	53
138	105	63

注: 计时工具为跑台自带。

上述实验数据分5组进行 $X^2$ 检验,得到现实 $X^2$ 值为3.93,当 $df=4$ 时,查表得 $X^2_{0.05}=9.49$ ,符合正态分布。再进行方差分析,分析结果如下表所示:

表6: 跑台时间实验数据的方差分析结果

变异来源	df	SS	$s^2$	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
处理间	2	16542.4	8271.2	32.10454**	3.89	6.93
处理内	12	3091.6	257.6333			
总变异	14	19634				



表 6 中的 “\*\*” 表示差异极显著，由表 5、表 6 可见注射本发明组合物小鼠的运动时间远远超出注射肌酸溶液和注射生理盐水的小鼠。

实施例 2:

选择 30 位年龄为  $20\pm 1$  岁、体重为  $65\pm 5\text{Kg}$  的男性体育专业健康大学生参加测试，测试采取以自身作对照的方法，通过观察服用本发明组合物前后的 100 米成绩的变化来判断本发明组合物在增强人体运动能力上的服用效果。测试时间为 20 天，在测试的 20 天内除统一安排饮食外其他一切如平常生活，第 1~3 天测试 9 次 100 米成绩，分别安排在每天的 8~9 点，12~13 点，16~17 点，每位大学生取 9 次测试的平均成绩，如下表 7 中记录的服用前数据；然后将这 30 位大学生随机分为 6 组，每组 5 人，A 组不服用本品，B 组每天服用 10ml，C 组每天服用 20ml，D 组每天服用 30ml，E 组每天服用 40ml，F 组每天服用 50ml，服用本品的时间为 17 天（第 4~20 天）；第 18~20 天测试 9 次 100 米成绩，方法如前，计时装置和场地未变，平均成绩如下表 7 服用后的数据。

表 7：两次测试 100 米成绩的平均值

人员	剂量 (ml)		A (0ml)		B (10ml)		C (20ml)		D (30ml)		E (40ml)		F (50ml)	
	计时 (s)		服用前	服用后	服用前	服用后	服用前	服用后	服用前	服用后	服用前	服用后	服用前	服用后
1			12.53	12.51	12.33	12.27	13.10	12.98	12.45	12.31	12.13	11.97	12.61	12.45
2			12.36	12.37	12.64	12.55	12.63	12.54	12.24	12.10	12.35	12.19	12.35	12.18
3			12.51	12.51	11.95	11.88	12.53	12.44	12.55	12.40	12.42	12.26	12.39	12.22
4			11.86	11.83	11.87	11.78	12.67	12.59	12.36	12.20	12.61	12.44	11.97	11.81
5			12.65	12.63	12.36	12.31	12.15	12.04	12.85	12.70	12.58	12.44	11.55	11.38

下表 8 的数据显示，服用本品后明显增加了运动员的运动成绩，服用 30ml 以上的量虽然成绩仍然有所提高，但是提高的很少，成本却增加较大。因此，一般情况下的最佳服用量定为 30ml/天，视体重变化可适量增减。本实施例只进行了 100 米的测试，运动员服用本品后无任何不良反应出现。

表 8：两次测试的平均值的差值及差值的平均值

	A	B	C	D	E	F
1	-0.02	-0.06	-0.12	-0.14	-0.16	-0.16
2	+0.01	-0.09	-0.09	-0.14	-0.16	-0.17
3	0	-0.07	-0.09	-0.15	-0.16	-0.17
4	-0.03	-0.09	-0.08	-0.16	-0.17	-0.16
5	-0.02	-0.05	-0.11	-0.15	-0.14	-0.17
平均值	-0.012	-0.072	-0.098	-0.148	-0.158	-0.166

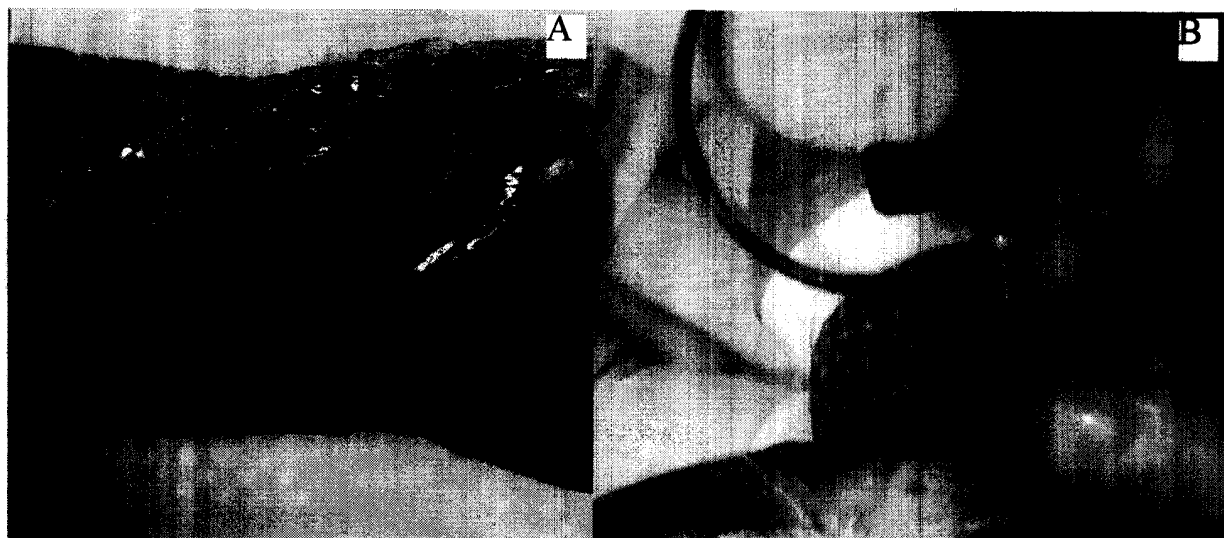


图 1