说 明 书

一种具有显著降血脂活性的龙须菜多糖及其制备方法与应用

技术领域

本发明属于龙须菜深加工领域，具体涉及一种具有显著降血脂活性的龙须菜多糖及其制备方法与应用。

背景技术

龙须菜(GracialriaLemaneofimrsi)属红藻门，江篱属(Gracaialri)植物，主要生产于我国广东、海南、山东等地，含有丰富的膳食纤维、维生素和微量元素，脂肪含量低，同时含有多糖、藻胆蛋白和不饱和脂肪酸等活性成分。龙须菜在中国东部地区有悠久的食用历史，传统中医认为龙须菜具有“利便、治瘿结热气”的功效，现代医学研究者则认为其具有助消化、解积腻、清肠胃、止血、降压的功效。

早期由于龙须菜产量稀少，因此国内对于龙须菜的研究报道主要集中在种植和加工方面，旨在提高其产量及繁殖率，而近年来关于龙须菜的研究重点逐渐由生产转移到了对其活性物质的提取及生理功能的研究方面，已见报道的有抗氧化活性、降血糖活性、免疫活性和抗肿瘤活性等。如朱益生公开了一种提高龙须菜萃取液的抗氧化成份的方法（专利申请号201010188414.3）；广东药科大学公开了一种龙须菜提取物及其制备方法和应用，该提取物对DPPH自由基、羟自由基、超氧离子自由基的清除率在90%以上(专利申请号201611024913.2)。国家海洋局第三海洋研究所公开了一种龙须菜琼胶寡糖及其制备方法，可应用于抗氧化、抗紫外线保健品和化妆品中（专利申请号201210347105.5）；华南理工大学公开了一种龙须菜多糖提取物及其制备方法与应用，所得多糖具有较好的抑制二肽基肽酶 IV 的活性，该多糖可应用于降血糖药物或保健品的研发中（专利申请号201410252784.7）；上海水产大学公开了一种龙须菜多糖的制备方法，所得多糖对小鼠淋巴细胞具有较高的增殖效果（专利申请号200710044610.1）；上海交通大学公开了一种龙须菜多糖的应用，该多糖可用于制备诱导细胞中的FADD和GADD基因的表达的抑制剂中的应用，在抗肿瘤药物或防癌保健品的制备中具有应用前景（专利申请号201610082951.7）。

发明内容

为了提高龙须菜的深加工技术，拓宽龙须菜的应用范围，本发明的首要目的在于提供一种龙须菜多糖。

本发明的另一目的在于提供上述龙须菜多糖的制备方法。

本发明的再一目的在于提供上述龙须菜多糖的应用。

本发明的目的通过下述技术方案实现。

一种具有显著降血脂活性的龙须菜多糖的制备方法，包含以下步骤：

（1）将龙须菜洗净、风干、粉碎过筛，得到龙须菜粉；

（2）向龙须菜粉中加入有机酸溶液，经过预均质处理后，结合动态高压微射流技术提取龙须菜粉，然后用碱中和，过滤，得到滤渣和提取液；

（3）将步骤（2）所述提取液进行超滤，舍弃透过液，收集截留液；

（4）用离子交换树脂分离所述截留液，取降血脂活性最高的组分进行真空浓缩，得浓缩液；

（5）将所述浓缩液与乙醇混合，静置，过滤得到多糖沉淀；

（6）将所述多糖沉淀进行干燥，得到所述龙须菜多糖。

优选的，步骤（1）所述粉碎过筛为粉碎后过 20~80 目筛。

优选的，步骤（2）所述有机酸溶液的 pH 值为 2.0~4.0。

优选的，步骤（2）所述有机酸溶液为柠檬酸溶液或苹果酸溶液。

优选的，步骤（2）所述有机酸溶液的质量为所述龙须菜粉质量的 20~40 倍。

优选的，步骤（2）所述预均质处理的参数为：20~50MPa，1~3 分钟，均质次数为 1~2 次；

优选的，步骤（2）所述动态高压微射流提取的控制条件为：微射流压力为 120~180MPa，提取温度为 75~100℃，提取时间为 80~160 分钟，提取次数为 1~2 次。

优选的，步骤（3）所述超滤采用截留分子量 1kDa 的超滤膜。

优选的，，步骤（4）所述离子交换树脂的型号为 DEAE-fast flow 或 DEAE-52。

优选的，步骤（4）所述真空浓缩所得浓缩液为所述截留液体积的 1/10~1/5。

优选的，步骤（5）所述乙醇的用量占所述浓缩液与乙醇混合后总体积的 60%~90%，

优选的，步骤（5）所述静置是在 2~8℃下静置 8~14 小时。

优选的，步骤（6）所述干燥为真空冷冻干燥或喷雾干燥。

由以上所述的制备方法制得的一种龙须菜多糖，所述龙须菜多糖的分子量为 20~35 kDa，硫酸基含量达 20~28wt%。

以上所述的一种龙须菜多糖在制备降血脂药物或保健品中的应用。

相对于现有技术，本发明具有如下的优点及效果：

（1）本发明采用有机酸结合动态高压微射流技术提取龙须菜多糖，其提取率比传统水提

法提高3~5倍，可大幅缩短提取时间、降低能耗。

（2）本发明所得龙须菜多糖具有较好的降血脂功效。

附图说明

图 1 a~图 1e 分别为 NC、HF、HF+AT、HF+LGP、HF+HGP 组小鼠肝脏组织的油红 o 染色切片照片（200×）。

图 2 a~图 2e 分别为 NC、HF、HF+AT、HF+LGP、HF+HGP 组小鼠肝脏组织的 HE 染色切片照片（400×）。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

实施例1

一种龙须菜多糖提取物，其制备方法如下：

（1）龙须菜洗净、风干粉碎后过 20 目筛，取筛下粉末备用；

（2）取 50g 龙须菜粉置于容器中，与 pH 2.0 的柠檬酸按 1:30 的质量比混合均匀，30MPa 预均质 2 次，每次均质 2 分钟，均质后，结合动态高压微射流技术提取，微射流压力 125MPa，提取温度 90℃，提取时间 150 分钟，提取 2 次，用 NaOH 中和至 pH 值为中性，过滤得滤渣和提取液；

（3）将步骤（2）所得的提取液用截留分子量 1kDa 的膜进行超滤，舍弃透过液，收集截留液；

（5）用离子交换树脂 DEAE-Fast flow 型号分离截留液，取降血脂活性最高的组分，真空浓缩至截留液体积的 1/10，得浓缩液；

（6）在浓缩液中加入无水乙醇至乙醇终浓度为 85wt%，混合均匀后，在 6℃下静置 12 小时，过滤，除去上层清液部分，得多糖沉淀；

（7）将所得多糖沉淀冷冻干燥，得到所述龙须菜多糖，记为 1#提取物。

实施例2

一种龙须菜多糖提取物，其制备方法如下：

（1）龙须菜洗净、风干、粉碎后过 40 目筛，取筛下粉末备用；

（2）取 50g 龙须菜粉置于容器中，与 pH 3.5 的柠檬酸按 1:20 的质量比混合均匀，25MPa 预均质 3 次，每次均质 1 分钟，均质后，结合动态高压微射流技术提取，微射流压力 160MPa，提取温度 80℃，提取时间 100 分钟，提取 1 次，用 NaOH 中和至 pH 值为中性，过滤得滤渣和提取液；

（3）将步骤（2）所得的提取液用截留分子量 1kDa 的膜进行超滤，舍弃透过液，收集截留液；

（5）用离子交换树脂 DEAE-52 型号分离截留液，取降血脂活性最高的组分，真空浓缩至截留液体积的 1/8，得浓缩液；

（6）在浓缩液中加入无水乙醇至乙醇终浓度为 68wt%，混合均匀后，在 4℃下静置 10 小时，过滤，除去上层清液部分，得多糖沉淀；

（7）将所得多糖沉淀冷冻干燥，得到所述龙须菜多糖，记为2#提取物。

实施例3

一种龙须菜多糖提取物，其制备方法如下：

（1）龙须菜洗净、风干、粉碎后过 60 目筛，取筛下粉末备用；

（2）取 50g 龙须菜粉置于容器中，与 pH 3.0 的柠檬酸按 1:40 的质量比混合均匀，45MPa 预均质 1 次，每次均质 3 分钟，均质后，结合动态高压微射流技术提取，微射流压力 148MPa，提取温度 96℃，提取时间 130 分钟，提取 1 次，用 NaOH 中和至 pH 值为中性，过滤得滤渣和提取液；

（3）将步骤（2）所得的提取液用截留分子量 1kDa 的膜进行超滤，舍弃透过液，收集截留液；

（5）用离子交换树脂 DEAE-Fast flow 型号分离截留液，取降血脂活性最高的组分，真空浓缩至截留液体积的 1/5，得浓缩液；

（6）在浓缩液中加入无水乙醇至乙醇终浓度为 75wt%，混合均匀后，在 2℃下静置 8 小时，过滤，除去上层清液部分，得多糖沉淀；

（7）将所得多糖沉淀冷冻干燥，得到所述龙须菜多糖，记为3#提取物。

对比例1 传统水提法制备龙须菜多糖提取物

一种龙须菜多糖提取物，采用传统水提法进行制备，其制备方法如下：

（1）龙须菜洗净、风干、粉碎后过 40 目筛，取筛下粉末备用；

（2）取龙须菜粉于容器中煮沸 120 分钟后，过滤得滤渣和提取液；

（3）将步骤（2）所得的最终提取液用截留分子量 1kDa 的膜进行超滤，舍弃透过液，收集截留液；

（4）用离子交换树脂 DEAE-Fast flow 型号分离截留液，取降血脂活性最高的组分，真空浓缩至截留液体积的 1/8，得浓缩液；

（5）在浓缩液中加入无水乙醇至乙醇终浓度为 80wt%，混合均匀后，在 0~4℃下静置 12

小时，过滤，除去上层清液部分，得多糖沉淀；

（6）将所得多糖沉淀冷冻干燥，得到龙须菜多糖，记为 4#提取物。

实验例 1 测定多糖提取率

测定实施例及对比例中各龙须菜多糖的多糖提取率。

采用苯酚-硫酸法测定 1#~4#提取物中的多糖含量，计算多糖提取率，公式为：多糖提取率(%) = (提取液中多糖含量(g)/原料重量(g))×100。

各龙须菜多糖提取物测定计算结果如表 1 所示：

表 1

提取物	1#提取物	2#提取物	3#提取物	4#提取物
多糖提取率（%）	23.65±0.27	19.80±0.62	20.31±0.80	5.46±0.52

注：表内数据为平均值±标准偏差（n=3）

从表 1 中数据可知，本发明所述方法的龙须菜多糖提取率明显高于传统水提法的多糖提取率。

实验例2 龙须菜多糖的降血脂实验

本实验利用高胆固醇高脂饲料饲养雄性昆明小鼠造成高血脂模型，从而评价按前述方法制备得到的龙须菜多糖的降血脂作用。

1. 实验材料

1.1 药物及试剂：高胆固醇高脂饲料（蔗糖 20%、猪油 15%，胆固醇 1.2%，胆酸钠 0.2% 、酪蛋白 10%、磷酸氢钙 0.6%、石粉 0.4%、预混料 0.4%，基础饲料 52.2% ；总能量 4.4kcal/g；由广东省医学动物中心提供），小鼠灌胃针管，一次性无菌注射器，离心管，无菌生理盐水，阿托伐他汀钙片（辉瑞制药有限公司，产品批号：S90890），甘油三酯测试盒（南京建成生物科技有限公司，生产批号：20180420），总胆固醇测试盒（南京建成生物科技有限公司，生产批号：20180420），低密度脂蛋白测试盒（南京建成生物科技有限公司，生产批号：20180426），高密度脂蛋白测试盒（南京建成生物科技有限公司，生产批号：20180426），游离脂肪酸测试盒（南京建成生物科技有限公司，生产批号：20180420）龙须菜多糖（GLP）由本实验室按前述制备方法自制。

1.2 实验主要仪器：低速离心机，酶标仪，移液枪。

1.3 实验动物：昆明种小鼠，雄性，体重 22~24g，购于广东省医学动物中心。

2. 供试液样品

实施例 1 中制备的龙须菜多糖。

3. 各供试样品液的配制：

3.1 他汀药液的配制：取 7 片阿托伐他汀钙片（含阿托伐他汀 140mg），以 350mL 无菌生理盐水混悬，配制成浓度为 0.4mg/mL（以阿托伐他汀含量计）的药液样品。

3.2 低剂量龙须菜多糖药液的配制：精密称取 3.57g 龙须菜多糖。以 350mL 无菌生理盐水溶解，配制成多糖含量为 6.0mg/mL 的药液样品。

3.3 高剂量龙须菜多糖药液的配制：精密称取 13.37g 龙须菜多糖。以 350mL 无菌生理盐水溶解，配制成多糖含量为 22.5mg/mL 的药液样品。

4. 实验方法

4.1 造模阶段：昆明种小鼠 102 只，22-24g，雄性，随机分成两组，一组 24 只，为正常对照组，以普通饲料喂养；另一组 78 只，为高血脂模型组（以下简称模型组），以高胆固醇高脂饲料喂养，自由饮水摄食，饲养 6 周后，每组各随机选取 6 只小鼠，禁食不禁水 8h 后，采用摘眼球采血法，离心分离血清，按照试剂盒说明书操作，分别测定总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白（LDL-C）、高密度脂蛋白（HDL-C）、游离脂肪酸（FFA）的含量，根据上述指标判断造模是否成功。

4.2 实验阶段：造模成功后，将模型组随机分为 4 组，每组 18 只，分别为：模型对照组（HF）、阿托伐他汀干预组（HF+AT）、低剂量龙须菜多糖干预组（HF+LGP）、高剂量龙须菜多糖干预组（HF+HGP）。灌胃给药。正常对照组（NC）和模型对照组每日按 0.1mL/10g 灌胃无菌生理盐水，给药组每日灌胃给予 0.1mL/10g 体积的相应药物。共给药 42 天。分别在给药 14，28 和 42 天后，每组随机选取 6 只小鼠禁食不禁水 8h 后，采用摘眼球采血法采血，脱颈椎处死小鼠后，取附睾周脂肪称重，取肝脏作组织切片病理学分析；采血 2h 内离心分离血清按照测试盒说明书操作，分别测定 TC、TG、LDL-C、HDL-C、FFA 的含量。

4.3 数据处理与分析方法：以下实验数据均以“平均值±标准差”（$\bar{x} \pm SD$）来表示。采用 SPSS19.0 进行 one-way ANOVA 进行单因素方差分析和差异显著性分析，方差之间无/有显著差异时以 LSD/Dunnett's T3 方法进行分析。

5. 实验结果

5.1 经测定，用于本实验例中的龙须菜多糖提取率为 23.65±0.27wt%，经苯酚硫酸法检测得到多糖纯度为 59.01±0.91wt%，经 BCA 试剂盒检测得到蛋白质含量仅为 1.57±0.37wt%，硫酸基含量为 22.85±0.70wt%，分子量为 31.45±5.21kDa。

5.2 龙须菜多糖对小鼠血清总胆固醇（TC）含量的影响（mmol/L）、甘油三酯（TG）含

量的影响（mmol/L）、低密度脂蛋白（LDL-C）含量的影响（mmol/L）、高密度脂蛋白（HDL-C）含量的影响（mmol/L）、游离脂肪酸（FFA）含量的影响（mmol/L）、动脉粥样硬化指数（AI）的影响（mmol/L）、附睾周脂重指数的影响（$\times 10^{-2}$g/g）（$\bar{x} \pm SD$）见表 2~表 8。

表 2

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	4.09±0.81	5.05±0.50	4.30±0.85	3.85±0.50
HF	5.99±0.58^{*a}	5.96±0.46^{*a}	6.52±1.06^{*a}	6.46±1.64^{*a}
HF+AT	6.16±0.67^{*a}	6.33±0.68^{*a}	5.45±0.96^{ab}	5.53±0.32^{*ab}
HF+LGP	6.10±0.71^{*a}	5.88±1.09^{a}	5.267±0.68^{b}	4.85±0.71^{b}
HF+HGP	6.02±0.54^{*a}	6.17±0.91^{a}	5.43±1.045^{*ab}	4.89±0.72^{b}

注：$^{*}p<0.05$，高脂组与正常对照组比较；$^{**}p<0.01$，高脂组与正常对照组比较；不同字母表示高脂小鼠各组之间存在显著性差异（$p<0.05$）。下同。

表 3

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	0.83±0.18	0.80±0.12	0.62±0.16	0.62±0.13
HF	1.37±0.21^{**a}	0.77±0.11^{a}	0.84±0.17^{*a}	0.83±0.17^{a}
HF+AT	1.33±0.28^{**a}	1.00±0.39^{a}	0.64±0.16^{b}	0.61±0.08^{a}
HF+LGP	1.35±0.20^{**a}	0.72±0.20^{a}	0.57±0.09^{b}	0.35±0.04^{*b}
HF+HGP	1.18±0.28^{*a}	0.74±0.18^{a}	0.64±0.14^{b}	0.45±0.04^{c}

表 4

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	0.45±0.09	0.39±0.14	0.37±0.11	0.33±0.07
HF	0.91±0.36^{**a}	1.12±0.28^{**a}	0.66±0.20^{a}	0.64±0.24^{a}
HF+AT	1.25±0.12^{**ab}	0.71±0.12^{*b}	0.53±0.07^{a}	0.61±0.26^{a}
HF+LGP	1.37±0.20^{**a}	0.86±0.14^{**ab}	0.58±0.11^{a}	0.38±0.06^{a}
HF+HGP	1.10±0.17^{**b}	0.97±0.34^{**ab}	0.75±0.26^{a}	0.29±0.06^{a}

表 5

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	2.90±0.83	3.36±0.77	3.81±0.51	3.90±0.52
HF	1.41±0.63^{**a}	2.88±0.31^{ab}	2.84±0.60^{*a}	2.90±0.47^{*a}
HF+AT	1.60±0.34^{*a}	3.53±0.41^{a}	2.71±0.51^{**a}	3.70±0.86^{b}
HF+LGP	1.64±0.31^{**a}	3.11±0.47^{ab}	2.91±0.73^{*a}	3.87±0.64^{b}
HF+HGP	1.63±0.44^{*a}	2.99±0.48^{ab}	2.90±0.50^{*a}	3.25±0.56^{ab}

表 6

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	1.31±0.31	1.52±0.25	1.11±0.15	1.13±0.23
HF	1.73±0.33^{a}	1.90±0.43^{*a}	1.56±0.19^{*a}	1.41±0.20^{*a}
HF+AT	1.94±0.55^{*a}	1.12±0.16^{*b}	1.27±0.24^{b}	1.28±0.26^{ad}
HF+LGP	1.95±0.59^{*a}	1.30±0.11^{bc}	1.37±0.20^{*ab}	0.78±0.09^{**b}
HF+HGP	1.81±0.09^{*a}	1.55±0.20^{c}	1.24±0.32^{b}	1.32±0.26^{a}

表 7

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	0.15±0.05	0.14±0.08	0.10±0.03	0.09±0.02
HF	0.84±0.56^{**a}	0.42±0.15^{**a}	0.24±0.05^{**a}	0.20±0.07^{*a}
HF+AT	0.82±0.13^{**a}	0.22±0.05^{b}	0.19±0.01^{*a}	0.17±0.07^{*a}
HF+LGP	0.87±0.13^{**a}	0.26±0.04^{ab}	0.21±0.08^{**a}	0.11±0.04^{b}
HF+HGP	0.71±0.34^{**a}	0.38±0.08^{**a}	0.26±0.06^{**a}	0.09±0.02^{b}

注：AI=LDL-C/HDL-C

表 8

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	1.15±0.36	1.08±0.30	0.92±0.52	1.21±0.46
HF	1.76±0.34^{**a}	2.10±0.61^{**a}	2.46±0.68^{**a}	2.40±0.63^{*a}
HF+AT	1.81±0.21^{**a}	2.10±0.11^{**a}	1.97±0.51^{**ac}	1.68±0.54^{b}
HF+LGP	1.78±0.38^{**a}	1.78±0.83^{*a}	1.68±0.26^{*bc}	1.28±0.16^{b}

HF+HGP	1.74±0.31^{**a}	1.67±0.63^{a}	1.60±0.56^{*bc}	1.56±0.20^{b}

图 1 a~图 1e 分别为 NC、HF、HF+AT、HF+LGP、HF+HGP 组小鼠肝脏组织的油红 o 染色切片照片（200×）。

图 2 a~图 2e 分别为 NC、HF、HF+AT、HF+LGP、HF+HGP 组小鼠肝脏组织的 HE 染色切片照片（400×）。

6. 分析与讨论

从 0d 结果来看，模型与空白组相比，TC 的浓度有显著性升高（$p<0.05$），而 TG、LDL-C 的浓度均有极显著性升高（$p<0.01$），HDL-C 浓度分别有显著性降低（$p<0.05$）和极显著性降低（$p<0.01$），该结果表明实验动物造模成功。在干预 42d 后 TC 浓度变化方面，与模型组相比，龙须菜多糖低、高剂量组，具有显著性差异（$p<0.05$），阿托伐他汀组虽有降低，但无显著性差异（$p>0.05$）。在干预 42d 后 TG 浓度变化方面，与模型组相比，龙须菜多糖低、高剂量组，具有显著性差异（$p<0.05$）。在干预 14d 后 LDL-C 浓度变化方面，与模型组相比，他汀组具有显著性降低作用（$p<0.05$），而龙须菜多糖低、高剂量组不具有显著性降低作用（$p>0.05$），随着干预时间增加直至 42d，高脂小鼠的 LDL-C 浓度均有下降趋势，但各组之间无显著性差异（$p>0.05$）。在干预 42d 后 HDL-C 浓度变化方面，与模型组相比，阿托伐他汀组和龙须菜低剂量组，具有显著性升高作用（$p<0.05$），龙须菜高剂量组不具有显著性升高作用（$p>0.05$）。在干预 42d 后 FFA 浓度变化方面，与模型组相比，龙须菜多糖低剂量组具有显著性降低性作用（$p<0.05$），阿托伐他汀组和龙须菜高剂量组不具有显著性降低作用（$p>0.05$）。在干预 42d 后血清动脉粥样硬化指数（AI=LDL-C/HDL-C）变化方面，与模型组相比，龙须菜低、高剂量组具有显著性降低作用（$p<0.05$），阿托伐他汀组不具有显著性降低作用（$p>0.05$）。在干预 42d 后附睾周脂重指数（附睾周脂肪重量/体重，$\times 10^{-2}$g/g）变化方面，与模型组相比，阿托伐他汀组、龙须菜低、高剂量组均具有显著性降低作用（$p<0.05$）。

从图 1 a~e 的各组小鼠肝脏组织油红 o 染色切片结果可见：NC 组呈正常肝形态，仅有少量肝细胞含细点状橘染脂滴；HF 组呈弥漫性滴状深橘红色，坏死区小片状深橘红色，提示大量肝细胞内含大脂滴且坏死处脂滴融合；HF+AT 组呈弥漫点状、小滴状粉染，与模型组相比脂滴有所减小，但数量减少不明显；HF+LGP 组呈灶性浅橘色，提示含脂滴的肝细胞数量及脂滴大小较模型组明显减少，减脂效果显著；HF+HGP 组呈巢片性点状橘色，脂滴较模型组减少、减小，减脂效果明显。

从图 2 a~e 的各组小鼠肝脏组织 HE 染色切片结果可见：NC 组肝细胞排列规则，无脂肪变性，无炎症坏死情况；HF 组肝细胞排列紊乱，胞质内可见数量不等，大小不一的脂肪空泡

（箭头标注 1），有重度脂肪变性情况出现，有重度肝细胞水样变性情况（箭头标注 2），同时有炎性细胞灶性浸润（箭头标注 3），提示模型组肝脏有大量脂肪积累，同时有中度炎症坏死情况；HF+AT 组肝细胞排列稍有规则，有脂肪空泡（箭头标注 1）、肝细胞水样变性（箭头标注 2）和少量炎症细胞分布（箭头标注 3），提示他汀干预组有中度脂肪变性情况，同时有轻度炎症情况出现；HF+LGP 组肝细胞排列规则，未见脂肪空泡，但有多处局灶性炎性细胞浸润，提示低剂量龙须菜多糖干预后脂肪积累情况有明显好转，但炎症有加重，可能处于机体修复后期；HF+HGP 组肝细胞排列规则，有少量脂肪空泡（箭头标注 1），脂肪空泡体积较模型组的明显减小，有轻度脂肪变性情况，未见炎症出现，提示 HF+HGP 组肝脏脂肪积累情况较模型组有明显好转。

以上实验结果表明，低剂量（多糖含量为 6.0mg/mL）的龙须菜多糖对高血脂小鼠的 TC、TG、FFA 和 AI 指数均有明显降低作用，并对 HDL-C 有显著性升高作用；高剂量（多糖含量为 22.5mg/mL）的龙须菜多糖对高血脂小鼠的 TC、TG 和 AI 指数均有显著降低作用。综上，龙须菜多糖具有显著的降血脂功能，并能有效降低患动脉粥样硬化的风险。

实验例3 龙须菜多糖与阿托伐他汀致肝损伤毒副作用比较

1. 实验材料

1.1 药品试剂：阿托伐他汀钙片（辉瑞制药有限公司，产品批号：S90890），谷丙转氨酶（GPT）试剂盒（南京建成生物科技有限公司，生产批号：20180420），谷草转氨酶（GOT）试剂盒（南京建成生物科技有限公司，生产批号：20180420），龙须菜多糖（GLP）由本实验室自制。

1.2 实验仪器：低速离心机，酶标仪，移液枪，

1.3 实验动物：昆明种小鼠，雄性，体重 22~24g，购于广东省医学动物中心。

2. 实验样品的制备

实施例 1 中制备的龙须菜多糖。

3. 实验样品的配制

3.1 阳性对照药阿托伐他汀药液的配制：取 7 片阿托伐他汀钙片（含阿托伐他汀 140mg），以 350mL 无菌生理盐水混悬，配制成浓度为 0.4mg/mL（以阿托伐他汀含量计）的药液样品。

3.2 低剂量龙须菜多糖药液的配制：精密称取 3.57g 龙须菜多糖。以 350mL 无菌生理盐水溶解，配制成多糖含量为 6.0mg/mL 的药液样品。

3.3 高剂量龙须菜多糖药液的配制：精密称取 13.37g 龙须菜多糖。以 350mL 无菌生理盐

水溶解，配制成多糖含量为 22.5mg/mL 的药液样品。

4. 实验方法

4.1 造模阶段：昆明种小鼠 102 只，22-24g，雄性，随机分成两组，一组 24 只，为正常对照组，以普通饲料喂养；另一组 78 只，为高血脂模型组（以下简称模型组），以高胆固醇高脂饲料喂养，自由饮水摄食，饲养 6 周后，每组各随机选取 6 只小鼠，禁食不禁水 8h 后，采用摘眼球采血法，离心分离血清，按照总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、游离脂肪酸（FFA）试剂盒说明书操作，分别测定 TC、TG、LDL-C、HDL-C、FFA 的含量，根据上述指标判断造模是否成功。

4.2 实验阶段：造模成功后，将模型组随机分为 4 组，每组 18 只，分别为：模型对照组（HF）、他汀对照组（HF+AT）、低剂量龙须菜多糖组（HF+LGP）、高剂量龙须菜多糖组（HF+HGP）。灌胃给药。正常对照组（NC）和模型对照组每日按 0.1mL/10g 灌胃无菌生理盐水，给药组每日灌胃给予 0.1mL/10g 体积的相应药物。共给药 42 天。分别在给药 14，28 和 42 天后，每组随机选取 6 只小鼠禁食不禁水 8h 后，采用摘眼球采血法，离心分离血清，按照谷丙转氨酶（GPT）、谷草转氨酶（GOT）试剂盒说明书操作，分别测定 GPT、GOT 的活力。

4.3 数据处理与分析方法：以下实验数据均以“平均值±标准差”（$\bar{x} \pm SD$）来表示。采用 SPSS19.0 进行 one-way ANOVA 进行单因素方差分析和差异显著性分析，方差之间无/有显著差异时以 LSD/Dunnett's T3 方法进行分析。

5. 实验结果

5.1 经测定，用于本实验例中的龙须菜多糖提取率为 23.65±0.27wt%，经苯酚硫酸法检测得到多糖纯度为 59.01±0.91wt%，经 BCA 试剂盒检测得到蛋白质含量仅为 1.57±0.37wt%，硫酸基含量为 22.85±0.70wt%，分子量为 31.45±5.21kDa。

5.2 根据实验例 2 的实验结果，模型与空白组相比，TC 的浓度有显著性升高（$p<0.05$），而 TG、LDL-C 的浓度均有极显著性升高（$p<0.01$），HDL-C 浓度分别有显著性降低（$p<0.05$）和极显著性降低（$p<0.01$），该结果表明实验动物造模成功。

5.3 龙须菜多糖对小鼠血清谷丙转氨酶（GPT）含量的影响（U/L）（$\bar{x} \pm SD$）、龙须菜多糖对小鼠血清谷草转氨酶（GOT）含量的影响（U/L）（$\bar{x} \pm SD$）见表 9、表 10。

表 9

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	15.39±3.68	19.03±7.00	15.65±5.40	10.99±3.45
HF	26.25±4.00^{**a}	42.55±11.24^{**a}	31.38±7.16^{**a}	24.57±5.30^{**a}
HF+AT	25.35±1.73^{**a}	36.32±3.81^{**ac}	27.17±6.89^{**a}	20.86±5.62^{**ab}
HF+LGP	25.00±1.98^{**a}	26.66±4.16^{be}	25. 11±4.59^{*a}	18.25±2.22^{**b}
HF+HGP	23.25±1.98^{**a}	19.86±6.52^{de}	20.59±4.63^{b}	18.82±4.24^{**b}

$^{*}p<0.05$，高脂组与正常对照组比较；$^{**}p<0.01$，高脂组与正常对照组比较；不同字母表示高脂小鼠各组之间存在显著性差异（$p<0.05$）。下同。

表 10

组别	时间			
	0d	14d	28d	42d
NC	30.21±5.75	21.57±4.05	21.81±8.27	15.33±4.26
HF	42.79±6.98^{**a}	28.89±3.05^{a}	27.42±4.20^{a}	20.76±1.48^{**a}
HF+AT	34.84±8.29^{a}	25.12±4.27^{a}	19.49±3.11^{ab}	16.50±1.45^{b}
HF+LGP	36.70±6.20^{a}	22.43±2.95^{a}	18.76±2.46^{ab}	11.48±1.36^{**c}
HF+HGP	34.88±6.38^{a}	27.06±5.37^{a}	17.42±3.58^{b}	17.41±2.34^{b}

6. 分析与讨论

在干预 42d 后 GPT 活力变化方面，与正常组相比，高脂小鼠组均具有极显著性升高（$p<0.01$）；与模型对照组相比，龙须菜多糖低、高剂量组均有显著性降低（$p<0.05$），但与阿托伐他汀组相比，龙须菜多糖各组均无显著性差异（$p>0.05$）。在干预 42d 后 GOT 活力变化方面，与正常组相比，模型对照组有极显著性升高（$p<0.01$）；与模型对照组相比，阿托伐他汀组、龙须菜多糖低、高剂量组均具有显著性降低作用（$p<0.05$）；与阿托伐他汀组相比，龙须菜多糖低剂量组具有显著降低作用（$p<0.05$）。

以上结果表明，龙须菜多糖与阿托伐他汀在致肝损伤毒副作用方面存在差异，低剂量（多糖含量为 6.0mg/mL）的龙须菜多糖比阿托伐他汀更安全。

上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1．一种具有显著降血脂活性的龙须菜多糖的制备方法，其特征在于，包含以下步骤：

（1）将龙须菜洗净、风干、粉碎过筛，得到龙须菜粉；

（2）向龙须菜粉中加入有机酸溶液，经过预均质处理后，结合动态高压微射流技术提取龙须菜粉，然后用碱中和，过滤，得到滤渣和提取液；

（3）将步骤（2）所述提取液进行超滤，舍弃透过液，收集截留液；

（4）用离子交换树脂分离所述截留液，取降血脂活性最高的组分进行真空浓缩，得浓缩液；

（5）将所述浓缩液与乙醇混合，静置，过滤得到多糖沉淀；

（6）将所述多糖沉淀进行干燥，得到所述龙须菜多糖。

2．根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤（1）所述粉碎过筛为粉碎后过 20~80 目筛。

3．根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤（2）所述有机酸溶液的 pH 值为 2.0~4.0；所述有机酸溶液为柠檬酸溶液或苹果酸溶液；所述有机酸溶液的质量为所述龙须菜粉质量的 20~40 倍。

4．根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤（2）所述预均质处理的参数为：20~50MPa，1~3 分钟，均质次数为 1~2 次；

所述动态高压微射流提取的控制条件为：微射流压力为 120~180MPa，提取温度为 75~100℃，提取时间为 80~160 分钟，提取次数为 1~2 次。

5．根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤（3）所述超滤采用截留分子量 1kDa 的超滤膜。

6．根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤（4）所述离子交换树脂的型号为 DEAE-fast flow 或 DEAE-52；所述真空浓缩所得浓缩液为所述截留液体积的 1/10~1/5。

7．根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤（5）所述乙醇的用量占所述浓缩液与乙醇混合后总体积的 60%~90%；所述静置是在 2~8℃下静置 8~14 小时。

8．根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤（6）所述干燥为真空冷冻干燥或喷雾干燥。

9．由权利要求 1-8 任一项所述的制备方法制得的一种龙须菜多糖，其特征在于，所述龙须菜多糖的分子量为 20~35 kDa，硫酸基含量达 20~28wt%。

10．权利要求 9 所述的一种龙须菜多糖在制备降血脂药物或保健品中的应用。