

天然多糖的研究概况

□ 陈 怡 (深圳市药品检验所)

摘要:近年来,多糖的研究引起了国内外许多学者极大的兴趣。多糖不但能治疗机体的免疫系统受到严重损伤的癌症,又能治疗多种免疫缺损疾病。多糖的免疫疗法已经给近代肿瘤、艾滋病及其它疾病的治疗开辟了新的方向。由于分子生物学和分析新技术的高速发展,多糖的分离和分析手段也取得了很大的进展。使得科学家更为直接有效地探索生命现象的无穷奥秘。目前,多糖研究的关键在于产品质量标准的制定,尤其是特异指标的制定,以及多糖作用机制的研究等方面。本文主要从分布、提取、分离、纯化、检测和结构鉴定等方面综述了天然多糖的研究情况。

关键词:天然多糖 多糖 分离 纯化

近 10 年来,随着天然药物化学、药理研究的不断深入及分析手段突飞猛进的发展,多糖的研究引起了国内外许多学者极大的兴趣。多糖作为药物始于 1943 年^[1],到 60 年代作为广谱免疫促进剂而引起了医药界的广泛关注^[2],而且越来越多的研究证明,多糖不但能治疗机体的免疫系统受到严重损伤的癌症,又能治疗多种免疫缺损疾病,如慢性病毒性肝炎和某些耐药细菌和病毒引起的慢性疾病,还能治疗诸如风湿病之类的自身免疫疾病,有的还能诱导干扰素的产生。而且,多糖作为药物,其细胞毒极小,在治疗肿瘤时,它不像一般化疗药物直接杀死生长着的肿瘤细胞,而是促进细胞和体液免疫反应,如激活补体、巨噬细胞、T-淋巴细胞、B-淋巴细胞或加强抗体生成等,以达到抑制和消灭肿瘤细胞的作用,对正常细胞影响很小^[3-5]。多糖在治疗肿瘤、代谢及感染性疾病等方面的应用仍在不断扩大。多糖的免疫疗法已经给近代肿瘤、艾滋病治疗及其它疾病的治疗开辟

了新的方向。注射多糖对蛋白质结构和细胞壁特性有决定性作用^[6,7]。另外,多糖在医药上又是一种良好的佐剂,在食品工业、发酵工业及石油工业上也有广泛的应用。

一、多糖的来源和分布

多糖来源广泛,大多数高等植物、微生物(细菌和真菌)、地衣海藻和动物体内均有丰富的多糖。如研究较早的从细菌中得到的荚膜多糖在医学上主要用于疫苗。1984 年苏联人报道了全合成多糖作为疫苗,开辟了人工合成多糖应用于医药领域的先例。我国天然多糖资源丰富,一些有生理活性的多糖及来源如表 1。

二、多糖的分离和纯化

多糖是极性极大的大分子化合物,提取时一般先将原料脱脂、脱色,然后用水、盐或稀碱水在不同温度下提取。提取物浓缩后加沉淀剂(乙醇、丙酮等)离心沉淀,沉淀部分可反复多次离心沉淀,以除去部分水溶性色素等杂质。

1、除蛋白

用水或稀碱提取的多糖常含有蛋白质。常用的除蛋白的方法有 Sevag 法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸法等。前两种多用于微生物多糖,后者多用于植物多糖的分离纯化。Sevag 法是经典的除多糖的方法,但复杂费时且样品损失较大。冯建林等比较了 Sevag 法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸法、硫酸铵法及

木瓜蛋白酶复合酶法除蛋白的效果,从蛋白残留量和多糖的得率两方面评价,认为三氯乙酸法最好,但三氯乙酸仍不能完全除去蛋白,建议三氯乙酸法和 Sevag 法结合使用^[8]。

2、脱色

多糖中常含有一些色素(游离色素或结合色素),根据其不同性质采取不同的方法。常用的脱色方法

有:离子交换法、氧化法、金属络合物法、吸附法(纤维素、硅藻土、高岭土、活性炭等)。DEAE-纤维素是目前最常用的脱色方法,通过离子交换柱不仅达到脱色的目的,而且可以分离^[9-11];H₂O₂是一种氧化脱色剂,浓度不宜过高且在低温下进行,否则引起多糖的降解^[12];对于同时含有游离蛋白质和色素的多糖,可通过生成金属络合物的方法,同时除去蛋白和色素,方法是加入费林试剂生成不溶性络合物,经分离后用阴离子交换树脂分解络合物;吸附脱色法也常用,如通过活性炭、高岭土、硅藻土柱达到纯化的目的^[13]。

3、多糖的分级

采用一般方法提取的多糖,通常是多糖的混合物,即是多分散性的。其不均一性表现在化学组成、聚合度、分子形状等的不同,分级的方法可以达到纯化的目的。可按分子大小和形状分级(如分级沉淀、超滤、分子筛、层析等),也可按分子所带基团的性质分级(如按电荷性质分级的电泳、离子交换层析等)。

(1) 分级沉淀。

利用不同分子的分子大小和溶解度不同而分离,常用的有2种类型:①有机溶剂沉淀法^[14]。②季铵盐、硫酸铵等法。另外,Ba(OH)₂、Ca(OH)₂等常用于酸性多糖的分级。

(2) 柱层析法。

柱层析法较常用,可分两类:①只有分子筛作用的一般凝胶柱层析,如 Sephadex、Saphrose、Biogel 等^[15]。②离子交换层析,这种分级不仅按电荷性质不同,同时也有分

表 1 一些天然多糖的来源及活性

类别	多糖名称	来源	生物活性
植物多糖	人参多糖	Panax ginseng	抗肿瘤、抗病毒、补体活化、抗辐射、刺激巨噬细胞吞噬作用、诱导细胞因子、抗炎、增加自然杀伤细胞的活性等
	黄芪多糖	Astragalus mongholicus	
	魔芋多糖	Amorphophallus konjac	
	当归多糖	Angelica acutiloba	
	红花多糖	Carthamus tinctorius	
	箬竹多糖	Sesa albomarginata	
	枸杞多糖	Lycium barbarum	
	蔗渣多糖	Saccharum sinense	
	茶叶多糖	Tea sinensis	
	汉防己多糖	Stephania tetrandra	
	女贞子多糖	Ligustrum lucidum	
	刺五加多糖	Acanthopanax senticosus	
动物来源	壳多糖	虾、蟹的外壳,乌贼骨,昆虫翅膀	降胆固醇,降血脂
	透明质酸		眼科手术
	硫酸软骨素	动物的结缔组织、体液中	
	硫酸角质素		
	肝素	动物肝脏、脾、肺、肌肉中	抗凝血
海藻地衣	褐藻多糖	Sargassum fusiforme	抗病毒,抗肿瘤
	海藻多糖	Dumantiaceae	抗炎
	地衣多糖	Cetraria islandica	免疫调节
	螺旋藻多糖	Spirulina maxima	
微生物来源	猪苓多糖	Polyporus umbellatus	抗病毒、抗肿瘤、补体活化、抗辐射、刺激巨噬细胞吞噬作用、抗炎、增加自然杀伤细胞的活性等
	虫草多糖	Cordyceps sinensis	
	亮菌多糖	Armillariella tabescens	
	香菇多糖	Lentinus elodes	
	银耳多糖	Tremella fuciformis	
	竹黄多糖	Shiraia bambusicola	
	槐耳多糖	Trametes robinioiphila	
	灵芝多糖	Ganoderma lucidum	
	木耳多糖	Auricularia auricula	
	云芝多糖	Corilus versicolor	
	茯苓多糖	Poria cocos	
裂褶多糖	Schizophyllum commune		

子筛的作用,如带负电荷的多糖可在阴离子型 DEAE-纤维素柱或 DEAE-Sephadex 柱上达到分级,酸性多糖可在阳离子型的羧甲基 (CM-Sephadex) 或黄乙基 (SE-Sephadex) 等凝胶柱上分离。这种离子交换树脂常用水、不同浓度和种类的缓冲溶液或酸碱液洗脱以得分级。检测手段国内仍沿用经典的苯酚-硫酸法,国外用 LKB 柱层析系统,用比旋度、视差折光及紫外检测器,各组分的峰位自动记录,分离效果好且方便^[16]。

(3) 透析、超滤及超速离心。

选用不同规格的超滤膜和透析袋进行超滤和透析,以及一定条件下的超速离心操作,可按分子大小差异把多糖样品分级。超滤和透析更常用于除去小分子物质。

(4) 区带电泳。

区带电泳主要按多糖的电荷性质不同分级,常用的有聚丙烯酰胺凝胶电泳、醋酸纤维素薄膜电泳^[17]。

三、纯度检查和分子量测定

经过分级纯化的多糖,在测定结构前须检查其纯度及测定分子量。

1、纯度检查

目前,检查纯度最常用的方法主要有:①用 GC、HPLC 测定组成多糖的单糖的摩尔比是否恒定,用不同的柱型测定结果更为可靠。②电泳只出现一条带,如可用聚丙烯酰胺凝胶电泳、醋酸纤维素薄膜电泳及玻璃纤维纸电泳。对于中性多糖可采用高压电泳,以硼酸盐为缓

冲液,可增大其迁移速度。③凝胶柱层析图呈现对称的单峰。若有“拖尾”现象,说明其均一性不够好。④纸层析法呈单一集中斑点。

2、分子量测定

多糖的分子量测定过去用超速离心沉降法、光散射法、渗透压法、粘度法等^[18],这些方法操作复杂且误差较大,现在少用。较常用的方法有凝胶过滤法和高效凝胶液相色谱法^[19]。此两种方法须先用已知分子量的标准多糖对照测定样品的分子量^[20]。

四、结构测定

多糖的生物大分子结构比蛋白质更为复杂,这不仅因为组成多糖的单糖品种繁多(目前已知的单糖有 200 多种),而且即使只有一种单糖组成的多糖其连接方式的不同以及可能有的支链(蛋白质支链较少)造成多糖的结构测定非常困难。多糖的结构测定方法较多,主要可分为两大类,即化学分析法和物理分析法。

1. 化学分析法

(1) 酸水解:阐明结构的第一步就是要鉴别多糖的单糖组分,酸水解是常用的方法,可根据需要选择适当的条件(酸的种类、浓度、温度及水解时间等)。现在酸水解方法可达到完全自动化^[21]。

(2) 甲基化:甲基化法虽然不能解决多糖中单糖的连接顺序,但它对于阐明单糖的连接方式(键型)、重复结构中某种单糖的数目、末端糖的性质以及分支点的位置等非常有用。全甲基化的多糖一般先经

90% 的甲酸水解,然后用 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸或三氟乙酸水解,水解时要注意防止发生去甲基化和降解反应。水解条件文献已有报道^[22]。水解后的甲基化单糖混合物可用层析法分离或制备成挥发性衍生物通过 GC 分析。Bjorhdal 报道了几种甲基化单糖的醋酸酯在 GC 上的滞留时间^[23]。若用 GC-MS 对结构解析更为方便^[24]。

(3) 过碘酸及其盐的氧化:多糖因其有邻二醇、邻三醇结构,而易被过碘酸盐氧化开环。通过测定过碘酸盐的消耗、甲酸的生成和剩余糖的比就可确定多糖中各种单糖的键型及其比例^[25-26]。

(4) Smith 降解:利用稀酸在室温下对多元醇进行部分酸水解,结果得到各种赤藓醇糖甙或丙三醇糖甙,研究这些单糖甙、二糖甙或寡糖甙的结构有利于阐明多糖中单糖的部分连接顺序和键型。

(5) 碱降解:碱降解发生在单糖的羟基或羧基连接的酯上,多糖还原端的单糖被逐个剥落,用之可分析多糖的键型。

(6) 酶水解:是多糖控制降解的另一种方法,它主要是根据特定的酶才能降解特定结构的多糖的特性,以阐明多糖的部分结构。

(7) 免疫化学技术:多糖是许多微生物免疫特异性的决定因子,根据多糖抗原与蛋白质抗体的多反应基的特异性,可以肯定,一定结构的多糖才能与一定类型抗体的蛋白质作用,如果能制备对抗未知多糖的抗体,那么这种抗体可用来阐明未知多糖的相似结构。

2. 物理分析法

(1) IR: IR 在多糖结构分析上主要是确定吡喃糖的甙键构型, 以及常规观察其他官能团。一般主要观察 $730 \sim 960\text{cm}^{-1}$ 的范围, 如对于 α -吡喃糖, $\delta\text{C}_1-\text{H}$ 在 845cm^{-1} , 而 β -吡喃糖, $\delta\text{C}_1-\text{H}$ 在 890cm^{-1} 。

(2) MS, GC-MS: GC 分析多糖虽受样品挥发性和热稳定性的限制, 但 GC-MS 是多糖结构分析不可缺少的工具, 特别是对水解单糖、甲基化单糖及甲基化寡聚糖的分析^[27], 而且能鉴别出糖的异构体。

MS 在糖链结构分析中的作用, 由于其方法快速灵敏、样品用量极少而得到越来越广泛的应用^[28, 34]。不但在鉴定各种甲基衍生物的碎片, 确定各种单糖残基的连接位置时必不可少, 而且, 近年来由于 FAB-MS, ESI-MS 和 MALDI-MS (基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱) 的出现, 利用质谱还可以测定糖链的分子量及糖链的一级结构^[35]。Hanesson 发表了某些挥发性糖衍生物的标准质谱图^[29]。近年来, Vernon 等人研究了 ESI-MS 与 CID (collision-induced dissociation) 相结合研究多糖的分子量、序列、链连接及分支的方法^[30]。

(3) NMR: 用 NMR 技术研究糖链结构的一个特点是不破坏样品, 对糖链的结构特征通过化学位移、偶合常数、积分面积、NOE 及弛豫时间等参数表达。早期 NMR 主要用于解决多糖结构中甙键的构型, 以及重复结构中单糖的数目, 近年来, NMR 技术突飞猛进的发展为生物大分子的结构研究创造了良好的

条件。Sugigama 等详细研究了 D-glu 及有关寡糖的 NMR^[31, 32], Pawan 等人综述了一维、二维 NMR 在分析糖的构型、相互连接的位置及顺序等方面的应用^[33]。Hord 等人利用 NMR 技术成功地分析了 T-H (Human Tomn Horsfall) 糖蛋白中 150 个 N-糖链中的 30 个糖链的结构^[36]。此外, 2D-NMR 和 NOE 技术的应用使 NMR 在糖链结构测定中能得到越来越多的结构信息^[37]。

由于分子生物学和分析新技术的高速发展, 多糖的分离和结构测定方法也取得了很大的进展。糖化学家们可以利用化学、物理和生物学手段对多糖分子结构与功能进行研究, 而高新技术的发展与联用使分析手段更加快速、高效和灵敏, 如 Parekh 等人已经成功地在 pmol 水平上确定了从正常人的血液单核细胞中提得仅 20ug 白介素-6 样品上的寡糖序列^[38]。相信随着糖类分子生物学的不断发展和分析新技术科学的进步, 对分子水平的超微量的多糖分子也能进行分离和结构测定^[39]。因而将大大推动分子生物学的发展, 使得科学家更为直接有效地探索生命现象的无穷奥秘。

参考文献

- 1 Shear MJ, et al. Nat Cancer Inst, 1943, 4: 81
- 2 Whistler RL, et al. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1976, 32: 235J
- 3 Makoto YY, et al. Int J Immunopharmacol, 1984, 6: 493
- 4 Suzuki I, et al. Immunomodulation by Microbiol Products and related Synthetic Compounds, Excerpta Medica. Amsterdam, 1981, 347
- 5 Zaporozhets TS, et al. Antibiot Med-Biotechnol, 1985, 30: 43
- 6 Hamuro J, et al. Nature, 1973, 40: 245
- 7 Vliegthart JFG, et al. Abstract of the 12th International Carbohydrates Symposium. Netherlands, 1984, 566
- 8 冯建林, 等. 中国第五届海洋药物学术研讨会, 1998, 10: 149
- 9 方积年, 等. 生物化学与生物物理学报, 1980, 12(4): 365
- 10 石钺, 等. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(4): 327
- 11 方积年, 等. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(3): 222
- 12 郑海龙, 等. 中国第五届海洋药物学术研讨会, 1998, 10: 98
- 13 方晓明, 等. 时珍国药研究, 1996, 6(4): 16
- 14 夏尔宁, 等. 生物化学与生物物理学报, 1988, 20(6): 614
- 15 吴梧桐, 等. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16(4): 393
- 16 魏远安, 等. 药学报, 1989, 24(7): 532.
- 17 台桂花, 等. 生物化学与生物物理学报, 1988, 20(2): 119
- 18 方积年. 药学通报, 1984, 10: 46.
- 19 方积年. 药学报, 1986, 21(12): 944
- 20 Alsop PM, et al. J Chromatogr, 1982, 246: 27
- 21 Kennedy JF, et al. Carbohydr Res, 1977, 54: 13
- 22 Bouveng HO, et al. Adv Carbohydr Chem, 1960, 15: 53
- 23 Bjorhdal H, et al. Acta Chem Scand, 1967, 21: 1801
- 24 Lonngreen J, et al. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1974, 29: 41
- 25 Massashi T, et al. Chem Pharm Bull, 1976, 24: 2744
- 26 Massashi T, et al. Chem Pharm Bull, 1972, 20: 2491
- 27 Aspinall IJ, et al. Org Chem, 1976, 265 (1): 202
- 28 Chizhor OS, et al. Carbohydr Res, 1967,

对中药传统炮制的不同看法

目前有关医学部门与专家提出,应该对传统的药材炮制方法进行系统的研究。运用植化分析、仪器测试、药理功效和临床验证的方法,对饮片进行研究分析,弄清炮制原理,研究炮制前后药物有效成份和对疗效变化的影响,以及是否符合科学卫生的要求。然后从理论上加以论证、整理、提高、总结,改进不科学、不卫生的炮制方法及落后工艺,并制定现代科学炮制的质量标准,以便炮制出符合卫生与具有一定药性的中药饮片。

一、炒焦、炒炭法是否卫生

中药炮制中的炒焦法,是将药物置于炒锅内,用火加热翻炒至药面焦黄,或焦褐色,并透出焦香药气取出放凉。炒炭法则更进一步,将饮片翻炒至焦黑、内部呈焦黄色或焦褐色,目的是改变生药的偏性和药用功效。但是现代科学证实,焦糊的植物或动物药材所产生的氢氧化物是对人体产生危害的物质,如其中丙烯醛是一种能加速人体衰老、可致人脑晕、耳鸣及精神疲乏的物质。特别是动物类材料,高温可使其高分子蛋白裂变成低分子氨基酸,这些氨基酸再经组合,便能生成R-氨基衍生物,这种致癌物质的强烈程度甚至超过黄曲霉素。因此,应该从科学卫生的角度,对原生药材的炒焦、炒炭及煨制等炮制方法,进行研究和论证。

二、有害物熏漂法是否可取

1、硫磺熏制药材。将容易虫蛀的药材浸油后,用硫磺进行熏制,以达到软化、变白和防虫的目的,然而硫

磺熏制后的中药,肯定会含有硫磺化合物,对人体是有危害的。2、明矾漂制药材。明矾又叫白矾,味酸、性寒。主要成份为硫酸铝钾,有杀虫防腐功效,常被用来漂制半夏、白附子、天南星等药材。经漂制后,这些药材含有相当的铝元素。近年来流行病学实验显示,铝是老年性痴呆症的主要致病因素之一,因此被认为对神经细胞有毒害作用,减少对铝元素的摄入,对保护人们的心身健康是有利的,因而,防止中药的“铝中毒”应该引起重视。3、用灶心土或焦黄土炮制药材。灶心土久经柴草熏烧,主要成份为硅酸盐、钙盐及多种碱性氧化物等一些有害物质。这些土炮制中药的过程中,焦糊物质及一些重金属也随之“入侵”药材的表皮,使之含有有害物质。

三、变异中药处理后应用是否可靠

变异中药是指已虫蛀、发霉、变色、泛糖、走油的中药材。目前对这类中药的处理方法,通常是筛、检、烘、晒等方法。严重的则用硫磺或三氯硝基甲烷(氯化苦)和磷化氢气体熏蒸杀虫。霉变则以水洗、烘烤和暴晒。变色用白酒淋洒或硫磺熏使其变白。泛糖走油的只能想法控制不使其继续恶化,有专家认为,变异药材处理后使用,可能不会有原有的药用价值,只能以劣药对待。人们都知道生虫、霉变后的食品不能食用,难道变异中药处理后就能当作正品用作治病救人的药物了吗?

(文摘)

- | | | |
|---|--|---|
| 4: 273 | 33 Pawan K, et al. <i>Phytochemistry</i> , 1992, 1 | 37 Bhattacharyya SN, et al. <i>Arch Biochem</i> |
| 29 Hanesson S, et al. <i>Methods Biochem</i> | (10): 3307 | <i>Biophys</i> , 1982, 231: 1285J |
| <i>Anal</i> , 1971, 19: 105 | 34 Egge H, et al. <i>Mass Spectrom Rev</i> , 1987, | 38 Parekh RB, et al. <i>Eur J Biochem</i> , 1992, |
| 30 Vernon N, et al. <i>Anal Chem</i> , 1995; 1: 772 | 6: 331 | 203: 135 |
| 31 Sugiyama H, et al. <i>Tetrahedron Lett</i> , | 35 Dell A, et al. <i>Methods Enzymol</i> , 1990, | 39 Hofstadler SA, et al. <i>Anal Chem</i> , 1995, |
| 1973, 36: 397 | 193: 647 | 67: 1477 |
| 32 Sugiyama H, et al. <i>Carbohydr Res</i> , 1974, | 36 Hard K, et al. <i>Eur J Biochem</i> , 1992, | |
| 33: 105 | 209: 895 | |

(责任编辑:张志华)

not in contradict with our socialism market economy, on the contrary it can demonstrate the importance of the management function of the government. In the systems engineering of the modernization of Traditional Chinese medicine, our country has drawn up the goals and countermeasures. It is proved very effective that local governments and departments coordinate their actions and make their specific "Top Designs". That makes the Traditional Chinese Medicine industry a new increasing spot of economy and pushes the development of pharmaceutical industry to the mainstay industry of our country.

Keywords: modernization of Traditional Chinese Medicine industry government Pop Design

Countermeasure to Reinforce the Supervision and Management of Technical Market of New Drugs in China by Law

Guo Ru Xing (Shanxi Provincial Institute For Drug Control, Taiyuan)

Ren Jing (Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan)

The paper analysed the present situation of technical market of new drugs and put forward some proposals concerning supervision and management of this market by law.

Key words: technical market, supervision and management, by law

Exploring the Method to Modernize Traditional Chinese Medicine

Chen Chong (Shaanxi Zhong Guan Botanical Development Ltd)

By applying the current results obtained from Traditional Chinese Medicine (TCM) research, one can expect to take a short cut in the development of TCM modernization. In order to be understood by more people in the world, the relationship between the "nature, taste and action" of TCM, and the pharmacology of western medicine, has been elucidated with mathematical method, such as group theory and set theory, in this paper. First, the active constituents have been extracted, then the prescription preparations have been made up by these extractions according to the traditional Chinese prescription. As a result, the components of the TCM were able to be measured, controlled and understood.

Key words: group, theory, active constituents Atherosclerosis

Pharmaceutical Enterprises Should Enhance Product Innovation Guided by Market

Chen Guang (Nan Jing of Traditional Chinese Medicine)

Product is the essence of the existence and development of an enterprise. The ability of products innovation is an important component of the kernel competitive ability of the enterprise. Under the present situation, pharmaceutical enterprises should take more efforts to improve their ability of product innovation, hence make significant contribution for the development to national pharmaceutical industry.

Key words: product creation, pharmaceutical enterprises, competitive advantage, market

Survey of the research on Natural Polysacchides

Chen Yi

The research of polysacchides has aroused great interest during recent years. polysacchides is not only used in the treatment of cancer but also of immunodeficiency disorders. Polysacchides as immunomodulation agents are being investigated for potential uses in neoplasm and AIDS et al. With the rapid evolution and adoption of molecular biology and new analytical techniques, the methods of isolating and analyzing polysacchides develop greatly too. So far establishing product - quality - standard is the key point of Polysacchides research, especially for the characteristic index and the action mechanism of Polysacchides. This paper reviewed the research on natural Polysacchides from its distribution, extraction, isolation, purification, examination, identification and so on.

Key words: natural Polysacchides, research advance