

## · 天然药物化学 ·

## 香菇多糖的研究

龚俊涛 王宗成 董可因 林明爱

(南京军区福州总医院 福州 350001)

**摘要** 香菇多糖系从福建产香菇(Lentinus)的子实体中提取,经 DEAE 纤维柱层析和分级沉淀法等纯化后得到的葡聚糖,其分子量为 10-70 万。经甲醇解气相分析,高碘酸氧化,Smith 降解、甲基化、气相色谱、气-质谱分析,证明多分枝结构为  $\beta(1\rightarrow6)$  分支链的以  $\beta(1\rightarrow3)$  为主链的葡聚糖,已制备成香菇多糖注射液,对慢性病毒性肝炎,肿瘤有较好的治疗作用<sup>[1-3]</sup>。

**关键词** 香菇;香菇多糖;葡聚糖

## The study of lentinan

Gong Yuntong, Wang Zongchen, Dong Keyin, Ling Minai

(Fuzhou Military General Hospital, Fuzhou 350001)

**ABSTRACT** Lentinan is the dextran which is extracted from the seed of lentinus edodes (Berk) sing produced in Fujian province by DEAE cellulose chromatography and graded precipitation. Its molecular weight is  $10-70 \times 10^4$  dalton. With methanol decomposition, periodic acid oxidation, Smithdegradation, methylation, gas chromatography and gaschromatography-mass spectrometer analysis, it was confirmed that the poly-branched structure is dextran with  $\beta(1\rightarrow3)$  branched chain and  $\beta(1\rightarrow3)$  main chain, Lentinan injection has been prepared. It has effect for the treatment of chronic virus hepatitis and tumor.

**KEY WORDS** lentinus, lentinan, dextran

自 60 年代以来,国内、外大量资料报道了从动、植物中提取多糖数种<sup>[4]</sup>,其中日、美、俄等国对多糖研究报道较多,尤其是日本,制成了静脉注射用香菇多糖,用于肿瘤的治疗取得一定效果。80 年代以来,国内对多糖也进行了大量研究,如从动植物中提取了人参多糖<sup>[5]</sup>、竹黄多糖<sup>[6]</sup>、银耳多糖、黄芪多糖<sup>[7]</sup>、猪苓多糖、玉足海参多糖<sup>[8]</sup>等。不过供临床应用的是从香菇菌丝体提取的香菇菌多糖片。伞菌科真菌香菇是一种食用和药用真菌,其药用历史已有几千年,自古以来就做为健脾益气、扶正祛邪、疏风行血瘀、调和阴阳的良药。我们从 77 年 6 月开始对香菇多糖进行了

结构分析、稳定性及临床应用等研究,并制备成香菇多糖注射液,属国内首家研制生产的国家级新药。

## 一、香菇多糖的提取和精制

香菇加水煮沸 3 次(3h、2h、1h),过滤、浓缩、除蛋白,离子交换或透析除杂质,加 3 倍量乙醇沉淀,用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,真空干燥,得到微黄白色粉末。将粉末溶于水,经 DEAE 纤维柱层析和分级沉淀法分离、浓缩,加乙醇沉淀,再用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤后放入盛有五氧化二磷的真空干燥器中干燥,得白色粉末。

## 二、鉴别与含量测定

采用水解后碘量法与比色法测定,含量在 96% 以上。

**鉴别** 取本品 0.05g,用乙醇洗涤数次,不溶物加蒸馏水 20ml,加热溶解,加稀硫酸 1ml,置水浴上加热 15min,放冷,加氢氧化钠试液至中性,加入硷性酒石酸铜试液数 ml,置水浴上加热数分钟,即发生红色沉淀。

**含量测定** 取本品约 0.1g,精密称定,置碘量瓶中,加蒸馏水 20ml,加热使溶解,加稀硫酸 25ml,加热回流 4h,放冷,加酚酞指示液 1-2 滴,加氢氧化钠试液显中性,精密加入碘液(0.1mol/L)25ml,摇匀,逐滴加入氢氧化钠试液 4ml,边加边剧烈振摇,密塞,暗处放置 10 分钟,加稀硫酸 4ml,立即用硫代硫酸钠标准液(0.1mol/L)滴定,至近终点时,加淀粉指示液 2ml,继续滴定至兰色消失,并将滴定结果用空白试验校正即得。每 1ml 的碘液(0.1mol/L)相当于 9.008mg 的  $C_6H_{12}O_6$ 。

### 三、香菇多糖的结构分析

本品经甲醇解后气相色谱分析,其组成

成分为单一葡萄糖。

本品经高碘酸氧化,消耗  $IO_4^-$  为 0.89mol/mol 己糖基,释放甲酸为 0.44mol/mol 己糖基, $IO_4^-$  消耗为甲酸的释放的 2 倍,表明分子中仅存在 1→,1→6 可氧化糖基,分子中可氧化糖基占 44.4%,不可氧化糖基占 55.6%。

本品经 Smith 降解后产物完全水解,经气相色谱分析,其中甘油与葡萄糖之比为 1.0 : 1.25,表明其中除 1→,1→6 糖基外,尚有 1→3 等不氧化的葡萄糖基,其比例与高碘酸氧化结果一致。Smith 降解产物部分水解后经气相色谱分析(GC)透析袋内仅为葡萄糖,袋外仅为甘油,表明香菇多糖中 1→3 等连接的糖基为分子核心或主链,而 1→,1→6 等连接的糖基处于分子外围或支链。

本品经 HaKormori 法 3 次甲基化后,用红外光谱检查无  $OH^-$  吸收峰,产物水解、还原、乙酰化用气相色谱与质谱联用分析(GC-MS),根据仪器数据库检索及文献值参考,确定产物及其比例等如下表:

表 1 香菇多糖甲基化产物 GC-MS 分析结果

甲基化单糖名称	主要质谱碎片	摩尔比	键型
2,3,4,6-四甲基葡萄糖	43,45,71,87,101, 129,145,161,205	1.0	1→
2,4,6,-三甲基葡萄糖	43,45,87,101,117, 129,161	4.01	1→3
2,3,4,-三甲基葡萄糖	43,87,99,101,117, 129,161,189	3.02	1→6
2,4-二甲基葡萄糖	43,87,117,129,189	1.01	1→3,6

以上各分析结果一致表明香菇多糖分子的基本结构以 1→3 葡萄糖基构成主链,在 0-6 位上有分支。

香菇多糖经红外光谱及核磁共振谱分析:

本品的红外光谱除糖类特征共同吸收外,890cm 吸收峰表明为  $\beta$ -糖苷键多糖<sup>[9][10]</sup>。

本品的<sup>13</sup>C-核磁共振(NMR)谱分析除糖基内部各碳峰外,异头碳主要为

103.85PPM( $\beta$ 1 $\rightarrow$ ),连接碳为 86.72PPM[ $\rightarrow$ 3( $\beta$ )],69.965PPM[ $\rightarrow$ 6( $\beta$ )],表明香菇多糖中主要糖苷键均为 $\beta$ -型,且为1 $\rightarrow$ 3(103.85-86.73PPM)1 $\rightarrow$ 6(103.85-69.965PPM)两种型式,与以上各项分析结果基本一致。

经查阅国内、外有关杂志和资料综合分析,以及上述试验和仪器检测数据,择其中主要部份香菇多糖作结构分析,结果是以 $\beta$ (1-3)连接的葡萄糖基为主链,在6位上有(1-6)连接的葡萄糖基分支。<sup>[11-15]</sup>

#### 四、药效与毒理学

##### (一) 药理

##### 1. 一般药理

香菇多糖注射液以4mg、8mg、16mg/kg分别给狗肌肉和静脉注射,观察结果,对狗的心血管系统、消化系统、神经系统均无明显影响。

##### 2. 保肝降酶作用

香菇多糖注射液对ICR小鼠CCl<sub>4</sub>引起的急性和亚急性实验性肝损伤而出现ALT显著增加,都具有明显的降低作用。

香菇多糖100mg/kg及200mg/kgip三个月后,可使大鼠四乙酯慢性肝损伤所引起ALT升高明显降低,并能使白蛋白增多, $\gamma$ 球蛋白减少,白蛋白、球蛋白比值增高。且与病理形态学上可控制肝细胞变性、坏死的发展,加速组织的修复及减轻纤维组织增生和假小叶形成,表明香菇多糖对慢性肝损伤具有一定的治疗效果。

##### 3. 免疫作用

对小鼠免疫功能的实验证明,本品可明显地提高巨噬细胞吞噬功能,可促进T淋巴细胞E玫瑰花形成及转化。且对小鼠免疫器官(胸腺、脾)重量观察,以及白细胞粘附抑制试验与T、B淋巴细胞电泳等变化,结果表明本品对体内具有双向免疫调节作用。说明香菇多糖注射液是良好的免疫增强剂。

##### 4. 抗癌作用

对小鼠移植瘤B<sub>22</sub>、Hep等瘤株的观察,

实验结果表明,香菇多糖注射液给药组具有较好的抑制肿瘤作用,且体重明显的较对照组增加,可强壮身体。

#### (二) 毒理

##### 1. 急性毒性试验

本品给小鼠静脉注射时LD<sub>50</sub>为1500mg/kg。小鼠肌肉注射增至最大剂量2250mg/kg,无法测出LD<sub>50</sub>。

##### 2. 长期毒性试验

香菇多糖注射液对狗和wistar大鼠长期毒性试验,以香菇多糖注射液人用剂量的50和100倍分别给于狗和大鼠,肌肉注射,每天1次,连续6个月。狗为低、高剂量,大鼠为低、中、高剂量。动物外观、体重,肝、肾功能,血常规,病理检查,电镜观察等均无明显影响。甚至狗和大鼠用药分别增至人用剂量的400倍时,也无明显影响。试验表明香菇多糖注射液长期应用,在临床治疗剂量范围内应用是相当安全的。

#### 五、临床作用

经福州、上海、南京、北京等地十几所医院对慢性病毒性肝炎、食管癌、贲门癌及胃癌等疾病进行了临床试验,经过严格的临床双盲对照治疗和实验室检查,证明对慢性病毒性肝炎能明显地改善临床症状,降酶作用好,HBsAg转阴率高。本品见效快、疗效短、效果好,无明显毒副作用,是安全可靠的药物。本品与化疗作用治疗胃癌等肿瘤,可起到增效作用,以延长生命、缓解症状。

##### 治疗结果:

(1)治疗慢性病毒性肝炎,总有效率为84.3%。

(2)治疗食管癌、贲门癌及胃癌(大部分为中、晚期肿瘤,病变部分缓解和稳定者)总有效率为74.6%。

本文得到东北师范大学生物系的大力支持和帮助,仅表示衷心感谢。

##### 参考文献

[1]方积年. 多糖研究的现状. 药理学报, 1986; 21(12):

946

- [2] Franz G. 药用多糖的应用现状和展望. 国外医学(药学分册), 1990; 17(6): 326
- [3] Goro Chihara, Junji Hamuro, Yukiko Y Maeda, etc. *Cancer Research* 30, 2776, November 1970
- [4] 章美华, 肖培根. 药用真菌中生物活性多糖研究进展. 中草药 1992; 23(2): 95
- [5] 刘春兰, 张翼仲, 等. 人参果中水溶性多糖的研究. 药学学报, 1988; 23(11): 863
- [6] 方积年, 等. 竹黄多糖的研究. 生物化学与生物物理学报, 1980; 12(4): 366
- [7] 黄乔书, 等. 黄芪多糖的研究. 药学学报, 1982; 17(3): 200
- [8] 樊绘曾, 等. 玉足海参酸性多糖的研究. 药学学报, 1983; 18(3): 203
- [9] 方积年. 多糖体的结构分析. 国外医学(药学分册), 1981; 4: 227
- [10] 李润秋, 张翼仲. 针裂蹄多糖的研究. 药学学报, 1983; 18(6): 430
- [11] Tognmi M, et al. *chem. pharm Bull* 1982; 30: 1134
- [12] Naohito Ohno, Iwao Suzuki and Toshiro Yadoma. *Chem Pharm Bull*, 264, Vol 34(1986)
- [13] 白日霞, 张翼仲, 等. 碱提水溶液安络小皮伞多糖的研究- $\beta$ 与 $\beta$ 的分离纯化及结构分析. 真菌学报, 1990; 9(2): 163
- [14] 方积年. CNMR 多糖结构分析的应用. 国外药学(抗菌素分册), 1982; 2: 109
- [15] Breitmai-erE, et al. *CNMR spectroscopy*, 1978, 247

## 荣舒康胶囊的质量标准研究

李医明 洪永福 张 峰 郭学敏 朱玉军

(第二军医大学药学院 上海 200433)

**摘要** 采用薄层层析法对荣舒康胶囊中苏木、川芎、赤芍、丹参等成分进行定性鉴别, 薄层扫描法测定其中原儿茶酸的含量。

**关键词** 荣舒康胶囊; 薄层鉴别; 薄层色谱扫描法

荣舒康胶囊是治疗颅脑损伤后遗症的医院制剂, 由苏木、丹参等 11 味中药组成。具有活血化瘀、开窍通络之效。为了控制本品质量提高疗效, 采用 TLC 法对苏木、川芎、赤芍、丹参等进行定性鉴别并用薄层扫描法测定该品中有效成分原儿茶酸的含量, 为该制剂建立一个较完善的质量控制标准。

### 一、实验部分

#### (一) 仪器与药品

日本岛津 CS-930 型薄层扫描仪, 青岛海洋化工厂生产硅胶 G、硅胶 GF<sub>254</sub>, 美国 DRUMMOND 厂定量毛细吸管。荣舒康胶囊由长海医院制剂室生产, 对照药材市售, 质量均符合中国药典 90 版规定。阿魏酸: 本院药分教研室提供; 丹参素: 上海医科大学药系植化教研室提供; 原儿茶酸: 南通制药厂提供; 丹参酮 I<sub>A</sub>: 上海医药工业研究院提供。所

用试剂均为分析纯。

#### (二) 定性鉴别

##### 1 苏木的鉴别

取荣舒康粉末 4g, 加适量水溶解, 加乙醇调至含醇量 70%, 温浸 1h, 不时振摇, 取上清液, 挥尽乙醇, 用乙酸乙酯 20ml 萃取 2 次, 合并萃取液, 加无水硫酸钠脱水, 过滤后, 滤液浓缩至 1ml, 作为试液。另取苏木粉末 1g, 加甲醇适量浸泡 1h, 过滤, 滤液浓缩至 1ml, 作为对照品溶液。展开剂: 氯仿-甲醇 (5:1)。显色剂: 取出放置或烘烤, 可见紫红斑点。

##### 2 川芎的鉴别

供试液制法同上。取川芎细粉 2g, 加适量水煎煮 2 次, 水煎液按同样方法制成每 1ml 中含药材 2g 的对照液。展开剂: 石油醚-氯仿-甲醇 (10:3:2)。在 UV254nm 下观察荧光<sup>[1]</sup>。