

中药多糖有效部位研究中相对分子质量及分布研究相关问题探讨^{*}

李计萍

(国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038)

摘要: 本文结合审评中发现的问题, 对相对分子质量及其分布测定在中药多糖有效部位研究中的重要作用及应关注的问题进行了分析, 建议采用 HPGPC 方法进行测定, 并与文献及其他方法进行比较研究, 相互印证结果。

关键词: 中药多糖; 有效部位; 相对分子质量; 相对分子质量分布

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)10-1768-04

Discussion on relative molecular mass and distribution study of polysaccharide in active fraction of traditional Chinese medicines^{*}

LI Ji-ping

(Center for Drug Evaluation, State Food and Drug Administration, Beijing 100038, China)

Abstract The object of this paper is to emphasize the importance of relative molecular mass and molecular mass distribution determination of polysaccharide in active fraction of traditional Chinese medicine on the basis of drug technical review experiences. Author briefly introduced the methods for relative molecular mass and molecular mass distribution determination, and suggested that the HPGPC method was used for the determination. Finally some considerations in the method selection and determination conditions were given.

Key words traditional Chinese medicine; active fraction; polysaccharide; relative molecular mass; molecular mass distribution

多糖 (polysaccharides) 分布广泛, 在高等植物、细菌、真菌、藻类及动物体内含量丰富。随着人们对多糖生物学功能认识的深入, 各种天然产物提取的生物活性多糖的研究再次成为人们关注的焦点, 目前已有 300 多种多糖类化合物从天然产物中被分离提取出来, 其中从中药中提取的水溶性多糖较多, 且生物活性各不相同。多糖的药理活性与其相对分子质量 (M_w) 及其分布密切相关^[1], 中国药典已将相对分子质量及其分布列入多糖药物的质量标准。但现阶段有关多糖的中药新药申报资料中对相对分子质量分布的研究资料较少, 没有对此项工作在多糖研究中的重要作用引起重视, 即使是进行了申报也仅仅按药典方法 (HPGPC) 测定一个相对分子质量范围, 而没有对测定方法、色谱柱、对照品的选择等进行研究, 没有针对有效性及临床研究结果说明确定的相对分子质量分布范围为临床有效范围等等。

下面结合审评中存在的问题及研究状况讨论如下。

1 相对分子质量及其分布在中药多糖有效部位研究中的重要作用

1.1 中药多糖研究中相对分子质量研究的复杂性

目前, 对多糖研究的层次与水平还远远落后于蛋白质和核酸, 主要反映在其结构与功能的关系上。这主要是由多糖结构的复杂性所决定的, 仅一级结构的确定就必须解决相对分子质量、单糖的摩尔比与糖基组成、构型、连结次序等问题, 使其检测难度增大^[2]。

多糖相对分子质量的测定是研究多糖性质的一项重要的工作。多糖的性质往往与相对分子质量大小有关。例如, 多糖溶液的粘度不但随浓度的增大而升高, 而且与相对分子质量大小有关。一般来说, 相对分子质量增大, 粘度增高。在生物医学研究中, 发现某些多糖由于相对分子质量大小方面的差异, 所

^{*} 国家科技支撑计划课题“中药研发与上市前技术评价标准的研究”支持项目 (2006BA121B10)

作者: Tel: (010) 68585566-424 E-mail: lij@cde.org.cn

产生的某些效应也有一定差异。有文献报道多糖的抑瘤活性与其相对分子质量有一定关系。相对分子质量越大,则分子体积越大,不利于多糖跨越多重细胞膜障碍进入生物体内发挥生物活性。如云芝菌丝体提取物抑瘤活性与相对分子质量大小有关,一般活性较强的多糖成分,相对分子质量在 $5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^5$ 之间。从细菌中分离的某种果聚多糖,相对分子质量达到 2.1×10^5 时,抑瘤活性最强。由此可见不同的多糖产生生物学活性有其最佳相对分子质量范围^[3]。

多糖的相对分子质量只代表相似链长的平均配布,因此,测定多糖相对分子质量是一个非常复杂的问题。多糖相对分子质量的测定没有一个绝对准确的方法,不同方法往往会得出不同的相对分子质量,且所测得相对分子质量只代表相似链长的平均配布而不是确切的相对分子质量^[4]。因此多糖研究中相对分子质量分布的研究有其必要性和复杂性。

1.2 相对分子质量分布在中药多糖研究中的重要性

现阶段申报的多糖制品多为未经分离、精制、筛选等优化工艺而制成的粗多糖制剂,不利于发挥多糖的最佳功效。粗多糖组成成分复杂,除主要含有多糖的不同组分外,还含有蛋白质、生物碱及其他水溶性成分等,有些多糖与色素、蛋白质结合,影响多糖的构象变化,相应多糖的活性会受一定的影响。此外,不同来源的多糖作用不一,配伍后同样存在协同作用。所以,多糖的不同提取纯化工艺影响着多糖的构成基础,从而对多糖的活性有一定程度的影响。姜素琴^[5]等研究证明不同批号的云芝多糖其相对分子质量及其分布有明显的差异,因此控制其相对分子质量显得非常必要。

文献报道有近 300 种中药中均含有多糖,有的已进行了相关的结构确证、药理活性等较深入的研究,结果表明不同植物中多糖活性各不相同,单糖组成及比例和空间构象各不相同,相对分子质量分布也不尽相同,因此,将相对分子质量分布测定作为工艺研究中重要指标之一,并结合药效筛选,以找到真正有效的相对分子质量段的活性多糖并加以控制是必要的。杨晓彤^[6]等比较了不同提取方法提取云芝多糖,虽然多糖总含量没有显著差异,但单糖组成及构型不同,其相对分子质量分布不同,抑瘤活性亦不同,通过研究找出了最佳活性相对分子质量范围。

2 相对分子质量及其分布测定方法研究现状

多糖的相对分子质量测定方法常有渗透压法,蒸汽压渗透计法,端基法,粘度法,光散射法,超过滤法,沉淀法,凝胶电泳法,凝胶色谱法,超离心分析法等。这些方法各有局限性,有的方法误差大,现已不经常使用。骆传环^[7]采用蒸汽压渗透计法(VPO)和超离心扫描法(UCS)对柴胡多糖进行数均相对分子质量(M_N)和重均相对分子质量(M_W)测定,并计算其分散度 D 。结果:蒸汽压法测得柴胡多糖的 M_N 为 8033,超离心法测得 M_W 为 8990, M_N 除以 M_W 得到的分散度 D 为 0.89 尚接近于 1,说明该多糖相对分子质量分布范围较窄,因此计算出的平均相对分子质量数据应有意义。蒸汽压法的数据取决于高分子物质自身的相对分子质量分布以及和标准品相对分子质量数值之间的差距。本实验因样品纯度较高,有明确的相对分子质量范围,故测出数据较为可靠。超离心法是精确度较高的测定方法,且不必使用标准品,但是仪器昂贵,操作复杂,花费时间长,不易普及推广。两法比较,蒸汽压法具有操作简便、成本低的优点,在样品相对分子质量分布较窄、有标准品的条件下,宜采用蒸汽压法。

近年来已有人将凝胶渗透色谱法(GPC)、高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)、小角激光散射法等用于多糖相对分子质量的测定。在实际应用中凝胶渗透色谱法(GPC)可和小角度激光散射仪(LALLS)联机、高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)与多角激光光散射仪联机,不需对照品作对照即可测定,是目前测定多糖相对分子质量及分布较理想的方法之一^[8~14]。

多糖相对分子质量的测定没有一个绝对准确的方法,不同方法往往会得出不同的相对分子质量。因此中国药典 2005 年版二部附录对多糖相对分子质量的测定方法做出了统一规定^[15],即采用 HPGPC 方法。尽管由于标准多糖和样品多糖结构上的差异,凝胶柱对多糖可能产生的吸附作用,多糖在柱上的扩散、浓度、粘度和测试温度的影响都可能引起误差,但采用 HPGPC 能同时测定相对分子质量和相对分子质量分布,HPGPC 还具有操作简单、快速、灵敏、重复性好和样品用量少等特点。

多糖相对分子质量分布 HPGPC 法测定,结果用 M_N (数均相对分子质量)、 M_R (重均相对分子质量)、 M_P (峰值相对分子质量)以及分散度 $D(M_N/M_R)$ 来综合评价多糖的相对分子质量,更加全面而准确地反应了多糖作为一个多聚物所具有的性质。用凝胶

色谱图表征多糖相对分子质量分布较为直观,若在图上出现附加的小峰,则说明样品中含有杂质等,可以更广泛的应用到多糖研究中。

3 采用 HPGPC法测定时应关注的问题

3.1 标准品选择对多糖相对分子质量测定的影响

为了考察选择不同结构类型标准品对相对分子质量测定结果的影响,吕志华^[16]等分别采用葡聚糖和低分子肝素作标准品,测定了海洋硫酸多糖(CCS)的相对分子质量及其分布,并对测定结果进行了比较。研究表明以不同标准品来测定海洋硫酸多糖的相对分子质量及分布宽度时,结果差异很大。这是由于 CCS为低分子海洋硫酸多糖,其分子本身带有电荷,在结构上与肝素极其类似,而葡聚糖为电中性物质,结构上与 CCS相差较大,为了给出真实的相对分子质量,应选择与被测样品相同的标准品或结构相似或性质相近的标准品为好,否则误差较大。

HPGPC 法测定聚合物相对分子质量时,色谱柱的淋出体积真正反映的是试样的流体力学体积,因而只能用于测定与标准品相同的试样,不同类型的高分子当相对分子质量相同时它们的流体力学体积并不相同。因此在采用 HPGPC 法测定多糖相对分子质量分布时,应首先通过研究搞清所要测定的多糖的结构类型,再选择与其结构性质的标准品进行测定,否则,当使用不恰当标准品时测定结果有较大差异。在采用不同质标准品时,其测定结果只具有相对意义而不能代表样品的真实结果。

3.2 色谱柱的选择

选择适合不同相对分子质量范围的色谱柱,多糖的淋出体积不同,因此测得的相对分子质量也不同。袁振林^[17]等在研究枸杞多糖的相对分子质量分布时,比较了不同相对分子质量范围的色谱柱对测定结果的影响。如枸杞多糖的测定,选择相对分子质量范围 10~100000 万的色谱柱测定结果为 7000 左右,选择 10~30000 万的柱子,测定结果为 21500 左右,同样样品在 LC-MS 上测定结果为 22700 左右,国内文献报道为大于 20000,结果表明:应结合文献报道及其他方法测定结果相互证明来选择确定色谱柱类型。戴敬等^[18]在测定四维灵芝液中多糖组分的相对分子质量分布时比较不同规格色谱柱子对其中两多糖组分的保留作用,结果发现将两型号柱子串联使用,虽分离效果好,但柱压太高、分析时间长,不宜采用。同时考察了流动相、流速、进样量对测定分离效果的影响。因此,在选择色

谱柱时应综合考虑相对分子质量范围、保留率等的影响。

3.3 相对分子质量分布范围的确定

由于相对分子质量的分布范围与有效性关系密切,因此,相对分子质量范围的确定应通过药效筛选及临床试验有效性进行确定。袁振林^[17]等研究表明,不同相对分子质量分布的枸杞多糖在临床上观察发现,只有相对分子质量在 20000 左右的枸杞多糖对 S-180 肿瘤和 Lewis 肺癌有较好的疗效,因此确定在生产中只有提取在 20000 范围的多糖才具有一定的临床效果,并以此作为制定提取工艺的依据。

4 讨论

4.1 不同的多糖产生生物学活性有其最佳相对分子质量范围。因此多糖研究中对相对分子质量及其分布的研究是非常重要和必要的。

4.2 多糖的相对分子质量测定方法,应结合不同品种的特点,选择合适的方法进行测定。

4.3 应采用不同测定方法进行相互验证或与文献进行对照,以说明所用方法测得的相对分子质量是否接近真实值。

4.4 HPGPC 能同时测定相对分子质量和相对分子质量分布,并具有操作简单、快速、灵敏、重复性好和样品用量少等特点,因此可作为多糖相对分子质量和分布的首选方法。

4.5 采用 HPGPC 法测定多糖相对分子质量分布时应首先通过研究搞清所要测定的多糖的结构类型,再选择与其结构性质的标准品进行测定。

4.6 采用 HPGPC 法测定多糖相对分子质量分布时还应综合考虑相对分子质量范围、保留率等选择适宜相对分子质量范围的色谱柱、适宜的检测器进行测定,同时应考察流动相、流速、进样量等对测定分离效果的影响。

4.7 由于相对分子质量的分布范围直接与有效性关系密切,因此,相对分子质量范围的确定应通过药效筛选及临床试验有效性进行确定。并可以此作为提取工艺筛选的依据。

参考文献

- 1 FANG Yi-wei(方一苇). Fundamental study of pharmaceutical active polysaccharides(具有药理活性多糖的研究现状). *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1994, 22(9): 955
- 2 SUN Yu-shu(孙玉书), BILi-fu(毕力夫), SU Xi-lan(苏秀兰). General research situation of polysaccharides and polysaccharides medicine(多糖及多糖类药物研究概况). *Acta Acad Med Nei Mongol* (内蒙古医学院学报), 2006, 28(1): 75

- 3 GAO Xiao- rong(高小荣), LIU Pei- xun(刘培勋). Progress of polysaccharide structure- activity relationship study(多糖构效关系研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 229
- 4 YE Zhen- nan(叶振南), SHAO Jia- ping(邵家坪), LU Hui- wen(陆惠文). Study on extraction, separation and structure of polysaccharides(粗多糖的提取、分离及结构研究). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2000, 14(5): 329
- 5 JIANG Su- qin(姜素琴), JIANG Xiong- ping(姜雄平). Determination of molecular weight and its distribution of Coriolis versicolor polysaccharides(高效凝胶色谱法测定云芝多糖的相对分子质量及其分布). *Jiangsu Pharm Clin Res* (江苏药学与临床研究), 2002, 10(2): 17
- 6 YANG Xiao- tong(杨晓彤), MI Ke(糜可), FENG Hui- qing(冯慧琴), *et al*. Comparison of polysaccharopeptides from different strains of coriolis versicolor and with different extractive methods(不同云芝菌株及提取工艺所得结合蛋白多糖的分析比较). *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2000, 31(12): 545
- 7 LUO Chuan- huan(骆传环). Molecular weight measurement of lupuleum polysaccharide(柴胡多糖的相对分子质量测定). *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 1997, 28(6): 267
- 8 FENG Ju- qiang(封聚强), ZHAO Jun(赵俊). Advancement on molecular weight and constitution of polysaccharide of traditional Chinese drug(中药多糖的相对分子质量及结构研究进展). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19(3): 624
- 9 WANG Sai- zhen(王赛贞), LIN Shu- qian(林树钱), LIN Zhi- bin(林志彬), *et al*. Determination of molecular weight and molecular weight distribution of polysaccharide peptides in Sun recomel (CGLE) by HPGPC(高效凝胶渗透色谱法测定双林固本散中多糖肽的相对分子质量及其分布). *Straits Pharm J* (海峡药学), 2006, 18(5): 57
- 10 GUO Hui(郭辉), ZHANG Hong- xu(张红旭), WANG Hui(王慧), *et al*. Determination of molecular weight of polysaccharides of Acanthopanax ginseng by HPGPC(用高效凝胶色谱法测定红毛五加多糖组分的相对分子质量). *China Pharm* (中国药师), 2005, 8(7): 551
- 11 YI Jian- ping(易剑平), YE Xiao(叶晓), ZHONG Ru- gang(钟儒刚). Determination of relative molecular weights of polysaccharides in fruit of lycium barbarum by HPGPC(高效凝胶渗透色谱法测定枸杞多糖的相对分子质量). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(2): 214
- 12 CHEN Yun- yun(陈芸芸), WANG Wei(王伟), DING Yi(丁怡), *et al*. Determination of polysaccharide in Taizishenyue capsule by size- exclusion high- performance liquid chromatography(SEC-HPLC)测定太子神悦胶囊中多糖相对分子质量分布及含量). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2005, 40(7): 540
- 13 ZHOU Ru- zhen(周如真), ZHANG Xi- jian(张修健). Application of low angle laser light scattering photometer in polysaccharides data determination(小角激光光散射仪及其在多糖类高分子药物参数测定中的应用). *Foreign Med Sci Sec Pharm* (国外医学药学分册), 1994, 21(3): 164
- 14 LI Jing(李京), FAN Hui- hong(范慧红). Determination of molecular weight and molecular weight distribution of low molecular weight heparin by high performance size exclusion chromatography with multiangle laser light scatter(高效体积排阻色谱与多角激光光散射仪联用测定低分子肝素相对分子质量及其相对分子质量分布). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2009, 44(2): 140
- 15 ChP(中国药典). 2005 Vol III (二部): Appendix(附录) VH
- 16 LÜ Zhi- hua(吕志华), YU Guang- li(于广利), ZHAO Xia(赵峡). The influence of standards on HPGPC determining the molecular weight of a polysaccharide(不同标准品对 HPGPC 法测定多糖相对分子质量的影响). *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2002, 11(3): 220
- 17 YUAN Zhen- lin(袁振林). Lycium barbarum polysaccharides' production technique and determination of polysaccharides content along with molecular weight distribution(枸杞多糖的提取及含量测定分布的测定). *Guangdong Chem Ind* (广东化工), 2003, (3): 43
- 18 DAI Jing(戴敬), LU Jing(鲁静), LIU Wen- ying(刘文英), *et al*. HPGPC determination of the relative molecular weights of the components of polysaccharide in Sivei Lingzhi mixture(高效凝胶色谱法测定四维灵芝液中多糖组分的相对分子质量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23(3): 204

(本文于 2009年 1月 22日收到)