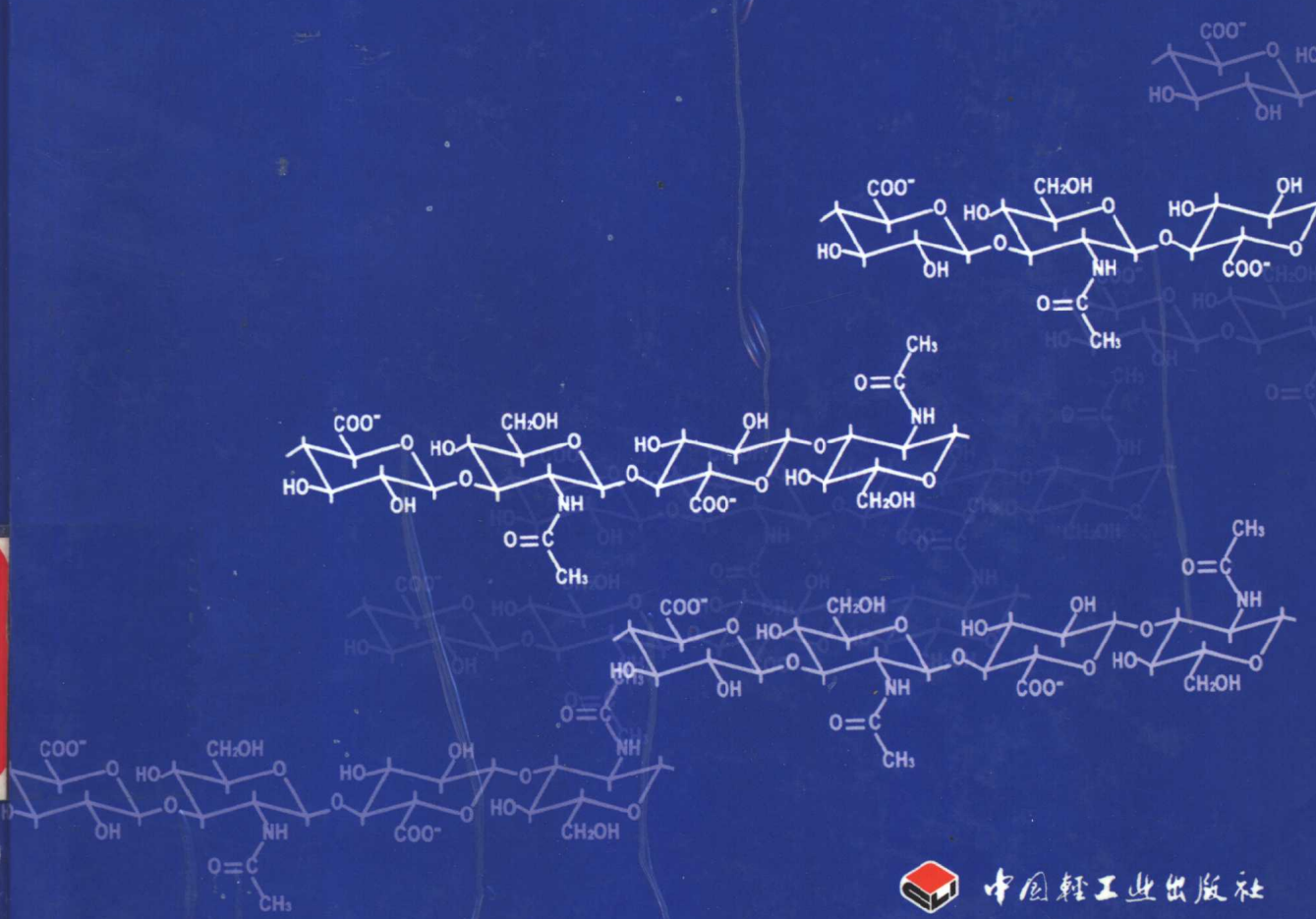


HA 透明质酸

HYALURONAN

凌沛学 主编 张天民 主审




中国轻工业出版社

透 明 质 酸

凌沛学 侯丽君 主编
凌沛学 侯丽君 郭学平
侯丽君 贺艳丽 张天民
贺艳丽 杨晓红 张天民
杨晓红 张天民 主审

编著

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

透明质酸/凌沛学主编. —北京: 中国轻工业出版社,
2000. 8

ISBN 7-5019-2902-5

I. 透… II. 凌… III. 透明质酸钠 IV. Q556

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 32737 号

责任编辑: 李 菁 责任终审: 唐是雯 封面设计: 赵小云
版式设计: 丁 夕 责任校对: 燕 杰 责任监印: 胡 兵

*

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

联系电话: 010-65241695

印 刷: 中国人民警官大学印刷厂

经 销: 各地新华书店

版 次: 2000 年 8 月第 1 版 2000 年 8 月第 1 次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 17.25

字 数: 404 千字 印数: 1—5000

书 号: ISBN 7-5019-2902-5/TQ·223 定价: 45.00 元

·如发现图书残缺请直接与我社发行部联系调换·

前 言

1934年, Meyer等自牛眼玻璃体内提取分离得到一种大分子多糖, 命名为 hyaluronic acid。根据全国科学技术名词审定委员会公布的《生物化学名词》, 将其译为“透明质酸”, 而《中国药典》和国家药品标准则将其称为“玻璃酸”。目前国内在多种领域中用“透明质酸”, 而在与药品有关的领域则用“玻璃酸”, 本书也按此惯例处理。

经过半个多世纪的研究, 人们对透明质酸的结构、理化性质和生理功能已有了明确的认识。其应用研究已开展了以下几个方面: 具有保湿功能, 广泛用于化妆品中, 口服美容保健食品也已上市; 作为粘弹性保护剂用于眼科手术和关节腔内注射治疗类风湿性关节炎和骨性关节炎等关节疾病; 作为媒介在滴眼液中广泛应用; 交联的透明质酸在术后粘连的预防和软组织修复等应用中获得成功; 透明质酸与其他药物反应形成的加合物对药物发挥控释作用, 可达到定向和定时释放的目的。近几年对透明质酸生理功能的认识有了重大的突破, 已形成了“有透明质酸合成缺陷人的生命不可能存活”的认识, 可见其对机体的重要性。

鉴于透明质酸的重要性以及目前国内尚无此方面的专著, 我们编著了本书。全书的中心内容包括透明质酸的结构和性质、生产工艺、分析检验、生理功能、代谢以及在化妆品、保健食品和医药方面的应用。编著的指导思想是准确、实用、新颖和全面。全书设计着重在循序渐进, 论述质精、面广, 注意系统性、逻辑性和相关性, 力求其叙述由浅入深、由易到难和深入浅出。本书的编著者自20世纪80年代初即开始进行透明质酸的研究和开发, 锲而不舍至今已逾20年之久, 编著者中包括了进行实验研究、批量生产、开发创新以及临床使用的专业人士, 做到了理论与实践相结合; 在全面参阅了所能收集到的最新文献的基础上, 再结合个人的实践经验进行选材, 同时融入编著者的见解, 使本书既有较高的学术水平, 又有较

大的实用价值。

全书所用名词基本以全国科学技术名词审定委员会公布的名词为基准,其他依据还包括《中国药典》和国家药品标准所用名词以及科学出版社有关词汇。书中凡成分的含量以%表示的,一般指质量分数,或按惯例。

本书可供从事药品、化妆品、保健品以及临床眼科、骨科、皮肤科等有关科研工作者及生产技术人员参考使用,为大专院校的有关专业师生也提供了有价值的资料。

本书在编著过程中,承山东省生物药物研究所、山东正大福瑞达制药有限公司、中国轻工业出版社的大力支持和帮助,在此一并表示诚挚的谢意。

本书在编著过程中查阅了大量资料,数易其稿,虽经编著者细心修改和校对,仍难免有不足之处,诚望各界读者不吝指正,提出宝贵意见。

凌沛学

(山东省生物药物研究所研究员, 山东医科大学教授)

二〇〇〇年五月一日

目 录

第一章 粘多糖类物质概述	(1)
一、粘多糖的化学组成.....	(1)
(一) 组成粘多糖的单糖	(1)
(二) 粘多糖的结构	(2)
二、粘多糖的提取与纯化方法.....	(4)
(一) 粘多糖在组织中的存在形式	(4)
(二) 粘多糖的提取	(4)
(三) 粘多糖的纯化	(5)
第二章 透明质酸的分布、结构、生物合成及理化性质	(9)
一、分布.....	(9)
二、结构	(11)
(一) 一级结构.....	(11)
(二) 二级结构 (螺旋结构)	(12)
(三) 三级结构 (网状结构)	(13)
三、生物合成	(15)
四、理化性质	(18)
(一) 流变学特性.....	(18)
(二) 依数性.....	(20)
(三) 降解反应.....	(21)
(四) 交联反应.....	(23)
(五) 酯化和成盐反应.....	(25)
第三章 透明质酸的生产工艺	(30)
一、以雄鸡冠为原料的生产工艺	(30)
(一) 工艺路线.....	(30)
(二) 工艺过程.....	(30)
(三) 工艺说明与讨论.....	(31)
二、以人脐带为原料的生产工艺	(32)
(一) 工艺路线.....	(32)
(二) 工艺过程.....	(32)
(三) 工艺说明与讨论.....	(33)
三、以动物眼玻璃体为原料的制备工艺	(33)

(一) 工艺路线·····	(33)
(二) 工艺过程·····	(33)
(三) 工艺说明与讨论·····	(34)
四、细菌发酵法生产工艺·····	(34)
(一) 工艺路线·····	(34)
(二) 工艺过程·····	(34)
(三) 工艺说明与讨论·····	(35)
第四章 透明质酸的分析检验 ·····	(41)
一、透明质酸的含量和纯度测定·····	(41)
(一) 葡糖醛酸含量测定·····	(41)
(二) 氨基葡糖含量测定·····	(42)
二、相对分子质量测定·····	(42)
(一) 粘度法·····	(42)
(二) 分子排阻色谱法·····	(43)
(三) 分析超速离心法·····	(43)
三、杂质的含量测定·····	(44)
(一) 蛋白质含量测定·····	(44)
(二) 紫外光谱测定·····	(45)
(三) 干燥失重·····	(46)
(四) 重金属和砷的检测·····	(46)
四、微生物及内毒素检查·····	(46)
(一) 微生物检查法·····	(46)
(二) 细菌内毒素检查法·····	(48)
五、组织和体液中微量透明质酸的检测·····	(49)
(一) 高效液相色谱法·····	(49)
(二) 毛细管电泳法·····	(50)
(三) HA 结合蛋白法·····	(50)
第五章 透明质酸的生理功能 ·····	(53)
一、粘弹性与生理功能·····	(53)
(一) 多种基质的构成·····	(53)
(二) 保水作用、渗透压及溶胀压·····	(55)
(三) 分子排阻效应及对扩散速率的影响·····	(57)
(四) 润滑作用·····	(58)
(五) 对细胞的作用·····	(58)
二、HA 与 HA 结合蛋白的作用·····	(63)
(一) 基质内的 HA 粘附质·····	(63)
(二) 细胞膜上的 HA 粘附质 (受体)·····	(66)
(三) 分布及作用·····	(69)

三、HA 及受体对基质装配的作用	(73)
四、HA 在组织生成过程中的作用	(74)
(一) HA 对细胞的凝聚作用	(74)
(二) HA 在组织生成中的作用	(75)
五、HA 对血管生成的作用	(77)
(一) HA 对内皮细胞增殖的影响	(78)
(二) HA 对内皮细胞移动的影响	(79)
(三) HA 与内皮细胞单层的完整性	(79)
(四) HA 对内皮细胞的作用机理	(79)
六、HA 对肿瘤的作用	(80)
(一) 肿瘤周围基质 HA 的合成以及对肿瘤入侵的作用	(81)
(二) HA 在肿瘤诊断和预后判断方面的作用	(82)
七、HA 在创伤愈合、止血等方面的作用	(83)
第六章 透明质酸的代谢	(96)
一、HA 代谢研究方法的进展	(96)
(一) 采用标记的 HA 前体物质	(96)
(二) 采用未标记的 HA	(96)
(三) 采用标记的 HA	(97)
(四) 采用其他放射性元素标记的 HA	(97)
二、HA 的酶代谢机理	(97)
(一) 对 HA 产生降解作用的酶	(98)
(二) HA 的酶降解	(100)
三、HA 的清除途径	(102)
(一) HA 经分泌排泄	(104)
(二) HA 的局部清除	(104)
(三) HA 在淋巴体系的清除	(107)
(四) 血浆中 HA 的清除	(107)
(五) HA 在脑脊液中的清除	(109)
(六) 摄入和降解 HA 的细胞	(110)
四、病理状况下 HA 的清除	(110)
(一) 由合成增加导致的血浆 HA 浓度升高	(111)
(二) 由代谢障碍所致的血浆 HA 浓度升高	(113)
(三) 由间隙体液流量的增加导致的血浆 HA 浓度的升高	(113)
(四) 其他体液中 HA 浓度的变化	(114)
第七章 透明质酸在化妆品和保健食品中的应用	(121)
一、皮肤中的透明质酸	(121)
(一) 皮肤的解剖学结构	(121)
(二) 皮肤中 HA 的分布	(122)

(三) 皮肤中 HA 的生理功能	(122)
二、HA 与化妆品	(123)
(一) HA 在化妆品中的作用	(123)
(二) 化妆品用 HA 的来源	(125)
(三) 化妆品用固体 HA	(125)
(四) 化妆品用液体 HA	(126)
(五) 添加 HA 的化妆品的种类及配方	(126)
三、HA 保健食品	(133)
第八章 透明质酸在关节疾病中的应用	(137)
一、HA 在关节中的分布	(137)
二、HA 在关节中的生理功能	(139)
(一) 润滑及缓冲应力	(139)
(二) 充当填充剂和扩散屏障	(139)
(三) 清道夫功能	(140)
(四) 对细胞功能的调节作用	(140)
三、HA 治疗关节疾病的药效学研究及机理探讨	(140)
(一) HA 对关节软骨及糖胺聚糖的作用	(141)
(二) HA 对关节疼痛的缓解作用	(142)
(三) HA 对炎症的作用	(143)
四、HA 治疗关节疾病的临床研究	(144)
(一) 对 OA 的临床研究	(144)
(二) 对 RA 的临床研究	(148)
(三) 毒副作用及安全性	(148)
(四) 当前市场上 HA 及 hylan 的品种	(149)
(五) HA 在关节中的代谢	(150)
第九章 透明质酸在眼科中的应用	(160)
一、HA 在眼内的分布及生理功能	(160)
二、HA 在眼科手术中的应用	(162)
(一) 作为眼科手术粘弹剂基础的 HA 理化性质	(162)
(二) HA 应用于眼科手术的药效学及临床研究	(164)
(三) 不同品牌的 HA 制剂	(169)
(四) 药代动力学研究	(170)
(五) 不良反应	(171)
三、HA 在治疗干眼症方面的应用	(173)
(一) 干眼症的发病机理及临床表现	(173)
(二) HA 治疗干眼症的临床应用	(173)
四、HA 在眼用制剂中的应用	(176)
第十章 透明质酸在给药体系中的应用	(185)

一、HA 的改构研究进展	(186)
(一) 碳二亚胺对羧基的修饰	(187)
(二) 酰肼对羧基的修饰	(188)
(三) 对羟基的修饰	(192)
(四) HA 衍生物的生物相容性	(194)
(五) HA 及 HA 衍生物的应用	(194)
二、HA 及 HA 衍生物在眼用制剂上的应用	(202)
(一) HA 提高眼用制剂生物利用度的机理探讨	(202)
(二) 含 HA 的眼用制剂	(209)
第十一章 透明质酸预防术后粘连和对软组织的修复作用	(216)
一、HA 和 hylan 对粘连的预防作用	(216)
(一) 粘连形成机理	(216)
(二) HA 和 hylan 用于预防粘连的机理	(217)
(三) 预防粘连形成的 HA 制剂	(220)
二、HA 及 HA 衍生物对软组织的修复作用	(222)
(一) 促伤口愈合作用	(222)
(二) 在软组织填充方面的应用	(228)
第十二章 医用透明质酸的研究进展	(236)
一、HA 的结构及理化性质的研究	(236)
(一) HA 结构的研究	(236)
(二) HA 理化性质的研究	(237)
二、HA 的合成和代谢	(237)
(一) HA 的合成	(237)
(二) HA 的代谢	(238)
三、HA 的生理功能	(240)
(一) 构成多种基质	(240)
(二) 保水、润滑、渗透压调节及分子排阻效应	(240)
(三) 对细胞的作用	(241)
(四) 与蛋白质的结合及其作用	(243)
四、HA 在关节中的生理功能及临床应用	(246)
(一) HA 在关节中的生理功能	(246)
(二) HA 对关节疾病的治疗机理	(247)
(三) HA 对关节疾病的临床研究	(248)
(四) HA 在关节中的代谢	(249)
五、HA 在眼科方面的应用	(250)
(一) HA 在眼内的分布和生理功能	(250)
(二) HA 作为粘弹剂在眼科手术中的应用	(251)
(三) HA 粘弹剂在眼内的药动学研究	(252)

(四) HA 在眼用制剂中的应用	(252)
六、HA 的结构修饰和应用	(254)
(一) 对羧基的修饰	(254)
(二) 对羟基的修饰	(255)
(三) HA 衍生物的应用	(255)
七、展望	(257)
(一) HA 微量检测技术的普及和临床应用	(257)
(二) 加强 HA 给药体系的应用	(257)
(三) 拓展 HA 的应用领域	(258)

第一章 粘多糖类物质概述

粘多糖(mucopolysacchride)是广泛存在于动物体内的一类多糖,因该类物质的水溶液具有较高的粘度而得此名。动物体内的多糖除了作为能量代谢的糖原外,基本上都属于粘多糖类。1938年 Meyer 提出把动物来源的含有氨基己糖的多糖统称为粘多糖,现又称为糖胺聚糖(glycosaminoglycan)。研究发现粘多糖分子中除氨基己糖外多含有糖醛酸和硫酸化的糖残基,因此也称为酸性粘多糖。粘多糖可根据所含单糖的种类及比例,*N*-乙酰基、*N*-硫酸基及 *O*-硫酸基等的多少,*O*-硫酸基等的位置,糖苷键的类型和相对分子质量进行分类,主要有肝素、类肝素、低分子肝素、透明质酸(HA)、软骨素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素(dermatan sulfate)、硫酸角质素(keratan sulfate)、甲壳素等。硫酸基的位置和数量与粘多糖的生理功能密切相关,如肝素和类肝素的抗凝活性和调血脂作用,与硫酸化程度关系很大。近年来,随着生物化学、生化分离技术、生理学和药理学的发展,逐步对粘多糖的结构、理化性质、生理活性、药理作用有了新的认识,人们普遍认为粘多糖是一类具有发展前途的生物活性物质,在医药、保健食品和保健护肤品中有着广泛的用途。

一、粘多糖的化学组成^[1~4]

(一) 组成粘多糖的单糖

组成粘多糖的单糖一般都是己糖和己糖的衍生物,主要有氨基葡萄糖(葡糖胺, glucosamine)、氨基半乳糖、葡糖醛酸(glucuronic acid)、艾杜糖醛酸(iduronic acid)、半乳糖、甘露糖、岩藻糖(fucose)和木糖等,以及这些单糖的乙酰基和单硫酸基或多硫酸基衍生物。其结构式如图 1-1 所示。

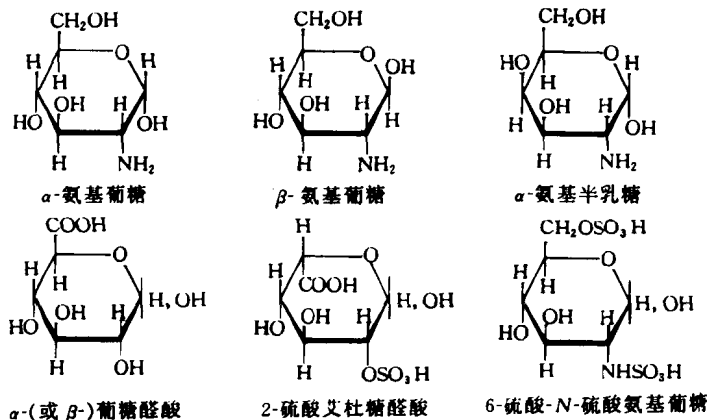


图 1-1 组成粘多糖的几种单糖的 Haworth 结构式

(二) 粘多糖的结构

粘多糖基本上由特定的重复双糖单位构成, 其中最具代表性的是 HA, 它的双糖单位是 (1→4) -O-β-D-葡萄糖醛酸- (1→3) -N-乙酰氨基葡萄糖。甲壳素的结构最简单, 由一种单糖 N-乙酰氨基葡萄糖组成。肝素的结构较复杂, 有五糖和双糖重复单位 (见图 1-5)。以下介绍几种常见的粘多糖及其结构。

1. 甲壳素 (chitin)

甲壳素又名甲壳质、壳多糖、几丁质, 广泛存在于节肢动物 (如虾、蟹) 的外壳、昆虫的体表层以及真菌的细胞壁中, 地球上每年的生物合成量大约有十亿吨, 仅次于纤维素, 在多糖类位居第二。甲壳素是由 N-乙酰氨基葡萄糖通过 β- (1→4) 糖苷键连接而成的直链高分子多糖, 平均相对分子质量 (relative molecular mass, Mr) 一般在 10⁶ 左右。壳聚糖 (chitosan) 为甲壳素的脱乙酰衍生物, 又名脱乙酰甲壳素或脱乙酰壳多糖, 与甲壳素相比, 它的特点是可溶于水, 又称为可溶性甲壳素。其结构如图 1-2 所示。

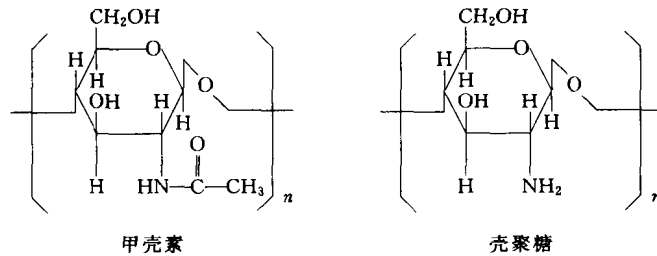


图 1-2 甲壳素和壳聚糖的结构

2. 透明质酸 (hyaluronic acid, HA)

HA 又名玻璃酸, 广泛存在于动物组织细胞间质中。商品 HA 一般为其钠盐, 即透明质酸钠 (sodium hyaluronate)。HA 是由葡萄糖醛酸-N-乙酰氨基葡萄糖为双糖单位组成的直链高分子多糖, 平均 Mr 为 10⁵~10⁷, 分子中两种单糖的摩尔比为 1:1。其结构如图 1-3 所示。

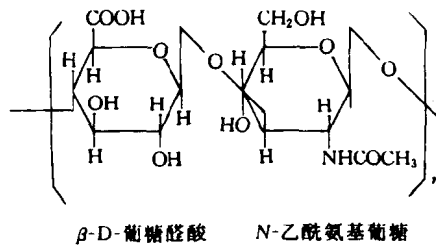


图 1-3 HA 的结构

3. 硫酸软骨素 (chondroitin sulfate)

此类物质广泛存在于人和动物的软骨组织中。与 HA 相似, 硫酸软骨素也是由双糖单位组成的聚合物, 一般含有 50~70 个双糖单位, Mr 在 10 000~50 000 之间。根据双

糖单位的不同分为 A、B、C、D、E、F 等种类。其中硫酸软骨素 B 是主要存在于皮肤等组织的粘多糖，又称硫酸皮肤素，其组成中的糖醛酸与其他硫酸软骨素的葡糖醛酸不同，而是艾杜糖醛酸，硫酸软骨素 B 实际上是习惯的误称。硫酸软骨素 A、C 和硫酸皮肤素的结构如图 1-4 所示。

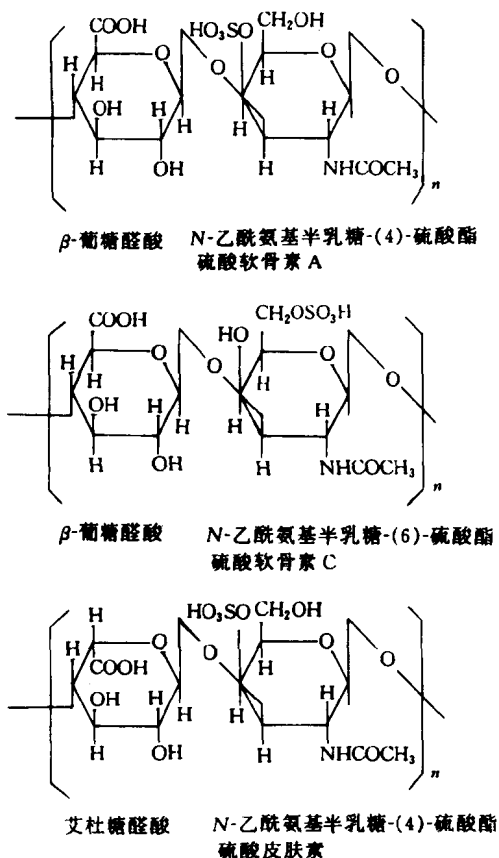


图 1-4 硫酸软骨素 A、C 和硫酸皮肤素的结构

4. 肝素 (heparin)

肝素的结构比较复杂，是由多种结构相似的硫酸化粘多糖组成的非均一体系。广泛存在于哺乳动物的各种组织中，如肠、肺、肝、心、胰、胎盘、血液等。商品肝素主要为猪肠粘膜肝素和牛肺肝素，平均 M_r 为 12 000~15 000，主要有钠盐和钙盐两种形式。1916 年，Mclean 在研究凝血问题时从肝脏中发现了这种物质，并命名为“肝素”。不同来源和不同工艺制得的肝素在结构上有一定差异，这导致肝素的生物活性和结构的多样性，一般认为猪肠粘膜肝素的抗凝活性高于牛肺肝素。肝素的基本骨架也是由糖醛酸和氨基葡糖双糖单位组成，不过其糖醛酸有艾杜糖醛酸和葡糖醛酸两种，且各单糖残基的硫酸化和乙酰化情况变化较多，有 *N*-硫酸基、*N*-乙酰基和不同位置的 *O*-硫酸基（酯）。主要由两种结构单位组成，结构单位 I 为五糖序列，结构单位 II 为三硫酸双糖单位，如图

1-5 所示。其中 R 为乙酰基或硫酸基，虚线框部分为结构中不规律之处。

笼统地说，商品肝素为未分级肝素， M_r 分布范围 3 000~30 000，含有低 M_r 和高 M_r 部分。一般认为， M_r 低于 8 000 的部分称为低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH)。低分子肝素从未分级肝素中分离，也可用化学降解或酶解的方法制得。与普通商品肝素相比，低分子肝素具有高抗血栓活性和低抗凝活性，并有口服吸收性和透皮吸收性。

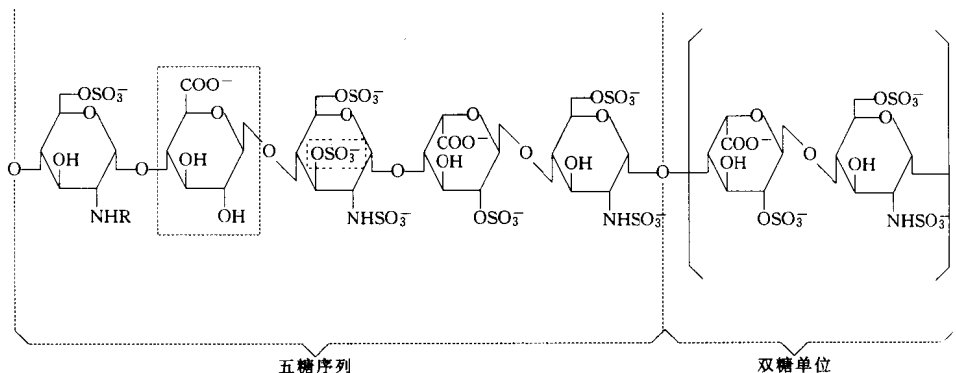


图 1-5 肝素的结构

二、粘多糖的提取与纯化方法^[1,5,6]

大部分粘多糖是从动物组织中提取的，需要有特定的动物组织或器官为原料，如从猪小肠（或肠粘膜）提取肝素，从雄鸡冠或人脐带提取 HA，从猪、牛软骨提取硫酸软骨素，从虾、蟹壳提取甲壳素等。因此粘多糖基本上属于资源性产品，产量受到限制。目前 HA 和甲壳素可用微生物发酵法生产，使生产成本下降，产量不受动物资源限制，而其他粘多糖仍需从动物组织中提取。

（一）粘多糖在组织中的存在形式

在组织中粘多糖几乎毫无例外地以共价键与蛋白质相结合。这些蛋白聚糖 (proteoglycan) 中，已确定存在以下三种类型的糖-蛋白连接方式：1) 木糖和丝氨酸间的 O-糖苷键；2) N-乙酰氨基半乳糖和丝氨酸或苏氨酸羟基间的 O-糖苷键；3) N-乙酰氨基葡萄糖和天冬酰胺的酰胺基之间的 N-氨基糖残基的键。

第一类连接类型存在于硫酸软骨素、硫酸皮肤素、肝素和硫酸乙酰肝素 (heparitin sulfate, 一种肝素) 中，第二种类型存在于骨骼硫酸角质素 (硫酸角质素 II)，第三种存在于角膜硫酸角质素 (硫酸角质素 I)。

（二）粘多糖的提取

根据粘多糖在组织中的存在形式，用水或盐溶液进行提取时，需用酶降解蛋白质部分或（和）用碱使多糖与蛋白质间的键断裂开以促进粘多糖在提取时的溶解。碱性提取的优点是可避免粘多糖的硫酸基团水解而破坏，并可简化提取过程，即在碱性提取的

同时用蛋白水解酶处理组织。提取液中存在的蛋白质可用普通蛋白质沉淀剂如硫酸铝等使之沉淀,也可用其他方法使变性沉淀,如适当调 pH 和加热等,有时也可直接用三氯乙酸、酚或醋酸等。

1. 非降解法

非降解法是指用水或盐溶液从动物组织中提取粘多糖的方法。此法适用于与组织结构联接不牢固的粘多糖或其蛋白复合物的提取,如从玻璃体、脐带、关节滑液中提取玻璃酸。用本法提取的粘多糖仍结合有蛋白质,需用酶解等方法去除。

2. 碱处理法

用碱处理的方法可以从组织中对粘多糖进行较完全的提取。例如,已经成功地用此法从软骨中提取硫酸软骨素:用 0.5mol/L 碱溶液进行提取后,提取液用酸中和,所含蛋白质采用调 pH 值、加热和用白陶土等吸附剂除去,而硫酸软骨素则可用乙醇沉淀法回收。此法的缺点是,粘多糖分子有从断裂的一端被碱进一步降解的可能。所以如果希望药物成分在特定的范围内保持分子完整,则不宜用此法,尽可能地使用稀碱并避免高温。为了避免在碱处理时可能发生的一些糖苷键的断裂,用碱提取可以在硼氢化物存在下进行,硼氢化物可使木糖残基还原为木糖醇,因而能成功地阻止进一步降解。

3. 酶处理法

用蛋白酶消化,是常用的使组织释出粘多糖的方法之一。通常选用专一性低的蛋白酶,以进行广泛的蛋白质水解。常用的有胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、链霉菌蛋白酶,糜蛋白酶等。从组织中释出粘多糖,有时选用含有多种酶类的混合物更具优越性。如用胰酶或胰脏浆,它们含有胰蛋白酶、糜蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等多种酶类,不仅具有水解蛋白质的广谱性,而且还可水解脂肪使提取易于操作,同时水解糖原等以减轻对粘多糖的污染。

消化过程中,通常希望蛋白质能达到完全水解,以至只有一个氨基酸残基保留在粘多糖分子上,但实际上是很难实现的。如用木瓜蛋白酶对软骨进行彻底水解所得硫酸软骨素产品中的残存肽,平均由 5 个氨基酸组成。与此类似,用链霉菌蛋白酶消化所得产品中,也含有若干个氨基酸组成的肽。当用来消化 M_r 较小的产品时,链霉菌蛋白酶在断裂糖-蛋白质键附近的肽键方面,较木瓜蛋白酶有效。

(三) 粘多糖的纯化

一般组织中存在多种粘多糖,因而需要对粘多糖混合物进行分级分离。对粘多糖进行分级分离的方法有多种,其中利用粘多糖在乙醇中的溶解度不同进行分离是最为常用的简单有效的方法。另外,根据粘多糖阴离子电荷密度的不同,可利用季铵盐络合物的生成、离子交换层析和电泳进行分级分离。根据 M_r 大小的不同,用凝胶层析及超滤等技术进行分级分离也是工业生产常用的方法。

用乙醇沉淀等方法从提取液中获得的粘多糖,仍含有低 M_r 的消化产物和残存的蛋白质,应予以去除。去掉残存蛋白质的方法有等电点沉淀法、加热变性法、蛋白质沉淀剂法等,也可两种或两种以上的方法结合使用,如调 pH 值与加热相结合等。对于结合于粘多糖分子上未完全水解的蛋白质,可选用较高纯度的蛋白酶进行水解,最好选用与提

取时使用种类不同的酶。去掉粘多糖中小分子物质最常用的方法是透析法和超滤法。特别是后一种方法,适合于大规模生产。用乙醇或季铵盐沉淀粘多糖,使小 M_r 的消化产物存留于上清液中,也是在各种规模的生产中最为常用的有效方法。下面所述的各种粘多糖分级分离方法均可用于小分子消化产物的去除。

有色物质是常见于一些粘多糖产品中的另一类杂质,常用的去除方法是氧化法,也可用还原法。常用的氧化剂为过氧化氢和高锰酸钾,用这些强氧化剂可使粘多糖末端的醛基氧化成羧基,如果这种变化对某种粘多糖的生物活性有较大影响,应慎重或避免使用。曾用过的还原剂有亚硫酸氢钠等。在偏酸性和加热的条件下使用活性炭也可脱去粘多糖中的大部分有色物质,但在此条件下可引起脱硫酸基和降解反应,对于肝素类的粘多糖应谨慎使用。应用超滤技术也可除去部分小分子的有色物质。

1. 乙醇沉淀

(1) 一般说明 用乙醇沉淀是一种从溶液中定量回收粘多糖的简单方法,由于不同性质或不同 M_r 的粘多糖沉淀所需乙醇浓度不同,它同样也可用于样品中不同粘多糖组分的分级分离。

进行乙醇沉淀时,一般使粘多糖的浓度为 1%~2%,肝素溶液的浓度通常为 10%~15%,浓度过低,所需乙醇的量就偏大。如果使用充分过量的乙醇,粘多糖浓度小至 0.1% 也可基本得到完全的沉淀。HA 的乙醇沉淀就属于这种情况,因其溶液的粘度较大,一般采用 0.1%~0.3% 的浓度进行纯化和乙醇沉淀。浓度过高,沉淀趋向于呈糖浆状而难以操作。另外,在过高的粘多糖浓度下,分级分离难以完全。

为了使粘多糖完全沉淀,需要有足够浓度的盐,即应有足够的离子强度。当一种无盐或少盐的粘多糖水溶液与乙醇混合时,溶液可保持完全澄清而无沉淀生成。当粘多糖溶液中含有过高浓度的盐时,乙醇沉淀时可因其溶解度的降低而析出。盐的浓度一般在 1%~5%。常用的盐有氯化钠和醋酸钠。醋酸钠的优点是:与其他盐相比,它在乙醇中有高的溶解度,在使用过量乙醇时,也不至于沉淀,而氯化钠则有沉淀的可能。

如果粘多糖溶液的浓度适当,且有足够的盐存在,则 4~5 倍体积的乙醇可以使组织中的粘多糖完全沉淀。但是,从蛋白酶水解液沉淀粘多糖,乙醇用量以不超过 2 倍体积为宜,可避免非所需的消化产物一并沉淀。对于已经纯化的粘多糖,可根据需要确定乙醇的浓度,以达到分级分离的目的。

(2) 在溶液中分级分离 用乙醇进行分级分离是分离粘多糖混合物的经典方法,并且目前仍然在大规模生产中使用。此方法既可用于不同性质的粘多糖的分级分离,又可用于同一种类的粘多糖不同 M_r 组分的分级分离。例如,用 1.25 倍乙醇沉淀软骨消化液可得较纯的硫酸软骨素,而硫酸角质素和另外某些硫酸软骨素则保留于乙醇上清液中。如果有多种粘多糖存在,有时先将混合物用季铵盐或离子交换剂分离出粘多糖混合物,再用乙醇进行分级分离,效果更好。尤其在分离性质相似的粘多糖时,例如硫酸软骨素 A、B 和 C,在使用其他方法难以使之较完全分离时,可使用乙醇分级分离来解决。

在两价金属离子如钙、钡或锌存在时,用乙醇分级分离更为有效。其方法是在搅拌下,缓慢加乙醇至 1%~2% 的粘多糖溶液(含有 5% 醋酸钙和 0.5mol/L 醋酸)中。混合物在 4℃ 过夜,离心收集沉淀。对清液则以较高浓度乙醇进行再沉淀,即达到分级分离的