



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101415432 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 26

(21) 申请号 200780012274. 0

(22) 申请日 2007. 04. 03

(30) 优先权数据

954/DEL/2006 2006. 04. 04 IN

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 10. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2007/000856 2007. 04. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02007/113646 EN 2007. 10. 11

(73) 专利权人 科学与工业研究委员会

地址 印度新德里

(72) 发明人 R · S · 桑万 N · D · 朝瑞希娅

L · N · 密斯瑞 P · 雷傲

G · C · 尤莉亚 N · S · 桑万

A · K · 思睿瓦斯塔瓦 K · A · 苏芮

G · N · 侑子 R · 图里

(74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司 11225

代理人 黄威

(51) Int. Cl.

A61K 36/896 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

A61K 125/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

Kaushik Nutan. Saponins of Chlorophytum species. 《Phytochemistry Reviews》. 2005, 第 4 卷 (第 2 — 3 期), 第 191 — 196 页.

审查员 赵保忠

权利要求书 2 页 说明书 11 页

(54) 发明名称

用作免疫调节剂的药物组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及 Chlorophytum (Safed Musli) 的免疫增强活性。由于 Chlorophytum (Safed Musli) 新颖的胶体形成水溶液萃取液或其部分或完全提纯的糖类 (多糖), 因此 Chlorophytum 或其水溶液萃取液或胶体或有用的糖类和安全健康改善物质可以单独使用, 或作为添加剂用于食物、食品中, 如功能性食物、饮食辅助剂和营养药。而且, 生物活性物质组合物含有新颖的糖类, 不限于从植物中发现的 Chlorophytum 或 Musli 葡甘露聚糖 (MGM)。因此, 植物、植物水溶液萃取液、部分提纯或完全提纯的糖类产品, 以及其相关的方法、性能、用途和应用形成本发明。本发明新颖的生物活性多糖 / 杂聚糖是哺乳动物生理学的生物调节剂, 能够增加正常个体、病体的免疫能力。这些可以口服的组合物可以改善预防或治疗和免疫相关的问题、风险、失常、不适和疾病及此生疾病中的应用。本发明可以将 Chlorophytum 作为 Indian Kon_jac。

1. 从 *Chlorophytum* sp 中分离生物活性多糖的方法,该方法包括如下步骤:
 - [a] 将 *Chlorophytum borivillianum* 组织或生物质放入水溶液介质中均质化或溶剂化,得到上清液;
 - [b] 将 4 个体积的乙醇加入到步骤 [a] 的上清液中,沉淀多糖;
 - [c] 在搅拌的情况下将步骤 [b] 中得到的沉淀的多糖溶解,接着过滤,得到滤液和残余物;
 - [d] 将步骤 [c] 中得到的残余物用水进行悬浮,得到水易萃取的水悬浮液多糖;
 - [e] 同时,用公知的脱蛋白试剂处理步骤 [c] 中得到的滤液,沉淀蛋白质,得到脱蛋白的上清液;
 - [f] 将步骤 [e] 中得到的上清液用乙醇沉淀,得到沉淀;
 - [g] 将步骤 [f] 中得到的沉淀用水溶解,得到水易萃取的水溶性多糖组分。
2. 根据权利要求 1 所述的分离生物活性多糖的方法,其中的萃取可以在高达萃取介质沸点温度的任何温度内进行。
3. 根据权利要求 1 所述的分离生物活性多糖的方法,其中乙醇沉淀的糖可以在正常或碱性水中进行再溶解和脱蛋白。
4. 根据权利要求 2 所述的分离生物活性多糖的方法,其中脱蛋白可以通过用 TCA、乙酸钠或其它常规的蛋白质沉淀剂进行沉淀。
5. 根据权利要求 2 所述的分离生物活性多糖的方法,其中脱蛋白的上清液可以直接用乙醇沉淀糖,或者在透析或其它的脱盐作用之后进行沉淀。
6. 根据权利要求 2 所述的分离生物活性多糖的方法,其中脱蛋白的多糖制剂用离子交换色谱和 / 或排阻色谱部分或全部提纯。
7. 根据权利要求 2 所述的分离生物活性多糖的方法,其中生物活性的多糖组分的产量有 8%w/w 的水易萃取的水溶性多糖和 15%w/w 的水易萃取的水悬浮液多糖。
8. 根据权利要求 1 得到的水易萃取的水溶性多糖或水易萃取的水悬浮液多糖的多糖组分,其用作为药品。
9. 根据权利要求 8 所述的多糖组分,其包括杂聚糖,所述杂聚糖含有葡萄糖和甘露糖作为组成单元的聚合物,其分子量大于 200,000 道尔顿。
10. 根据权利要求 8 所述的多糖组分,其中所述药品用于免疫调节。
11. 根据权利要求 8 所述的多糖组分,包括 45%(w/w) 的多糖、7-10%(w/w) 的蛋白质和 40-50%(w/w) 的其它组分。
12. 用于作为免疫调节剂的药物组合物,其单独或联合地包括根据权利要求 8 所述的多糖组分,可选择的含有药学上可接受的赋形剂。
13. 根据权利要求 12 所述的药物组合物,其中所述的使用的植物组织 / 生物质空中或块茎 / 指状物,或其混合物。
14. 根据权利要求 12 所述的药物组合物,其中所述的植物组织 / 生物质被萃取,或新鲜或干燥使用,其可以是天然的或剥皮的或任何合适的物理形式。
15. 根据权利要求 12 所述的药物组合物,其中所述的口服的剂量为 50-100mg/Kg 体重,持续 1-28 天。
16. 根据权利要求 12 所述的药物组合物,其中所述的用于诱导体液免疫性的 RBC 的量

为 0.2ml 的 1×10^8 红细胞。

17. 根据权利要求 12 所述的药物组合物,其中啮齿动物单次服用高达 2000mg/Kg 体重的组合物是无毒的。

18. 根据权利要求 12 所述的药物组合物,其中体液免疫调节活性大于左咪唑。

19. 根据权利要求 12 所述的药物组合物,其中细胞介导免疫调节活性大于正常的动物和用环磷酰胺治疗的动物。

用作免疫调节剂的药物组合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用作免疫调节剂的药物组合物及其制备方法。具体来说,本发明直接涉及 Chlorophytum(Safed Musli) 作为潜在的免疫调节、健康改善、营养药植物的应用。特别的,本发明涉及分离免疫调节糖类 / 多糖、包括但不限于 Chlorophytum MusliGlucomannan(MGM) 的方法。本发明进一步涉及植物水溶液萃取液的提纯的组合物。此外,本发明直接涉及从 Safed Musli 得到的植物性药材物质,应用该植物的物理或化学形式进行免疫反应的增强,通过预防免疫抑制用于任何目的或以任何方式治疗和免疫相关的疾病和不适。

背景技术

[0002] 物种 Chlorophytum 属于百合科类。Chlorophytum 大约有 175 个地下茎植物的有效分类,这些植物主要分布在热带,世界其它地方培育了一些装饰性的花朵。该类植物的起源处和分布主要在热带和非洲、亚洲的亚热带,其中发现了 85% 的物种(参考:Bordia、A. Joshi 和 M. M. Simlot,1995, Safed Musli In Advances in Horticulture volumell(Medicinal and Aromatic Plants)Editors :K. L. Chadha and Rajendra Gupta, pp. 430-450, Malhotra Publishing House, New Delhi, India)。

[0003] Chlorophytum 的特性是其新鲜的根 / 根茎(簇生的根)和有吸引力的绿叶。叶子在底部基本是螺旋重叠成瓦状,在顶端水平分布。花通常是白色的,具有观赏的价值。该植物是雌雄同株或雌雄异株的药草、灌木或树,具有不同的生长习性,显示出 2 或 3 种不同类型的茎分支(参考:Bordia、A. Joshi 和 M. M. Simlot,1995, Safed Musli In Advances in Horticulture volumell(Medicinal and Aromatic Plants)Editors :K. L. Chadha and Rajendra Gupta, pp. 430-450, Malhotra Publishing House, New Delhi, India)。

[0004] 目前被认为是活性成分的 Chlorophytum 物种的典型植物化学物质的实例是低分子量的类萜类植物化学物质,如推定的类固醇 / 螺甾烷醇骨骼分子的葡糖苷 / 皂角苷,如龙舌蓝皂苷配基(参考:A. Joshi 和 M. M. Simlot,1995, Safed Musli In Advances in Horticulture volumell(Medicinal and Aromatic Plants)Editors :K. L. Chadha and Rajendra Gupta, pp. 430-450, Malhotra Publishing House, New Delhi, India ;S. Mimaki、T. Kanmoto、Y. Sashida、A. Nishino、Y. Satomi 和 H. Nishino, Steroidal saponins from the underground parts of Chlorophytum comosum and their inhibitory activity on tumor promoter-induced phospholipids metabolism of HeLa cells, Phytochemistry 41 : 1405-1410, 1996 ;X-C Li、D-Z Wang 和 C-R Yang, Steroidal saponins from Chlorophytum malayense, Phytochemistry, 12 : 3893-3898, 1990 ;S-X Qui, X-C Li, Y. Xiong, Y. Dong, H. Chai, N. R. Farnsworth, J. M. Pezzuto 和 H. H. S. Fong, Isolation and characterization of cytotoxic saponin chloromaloside A from Chlorophytum malayense, Planta Medica 66 : 587-590, 2000)。

[0005] 在这些物种中, Safed Musli、Chlorophytum arundinaceum 和 Chlorophytum

birivillianum 在印度草医学和民间医学中用作性虚弱的滋补品或壮阳药。不过,没有任何具体的工作对其医学意义的化学成分进行分析。不知道药草中的何种化学物质会影响精子的生成、遗精或慢性白带。甚至这些应用没有被科学证实。从 *Chlorophytum arundinaceum* 中分离出的皂角苷配基,如 *stigmasterol*、知母皂苷元、替告皂苷元、新吉托皂甙元和托克皂甘元的量较小,以干重计分别为 0.0012%、0.0003%、0.0003%、0.0003%、0.0005% (参考:M. Tandon 和 Y. N. Shukla, *Sapogenins from Asparagus adscendens and Chlorophytum arundinaceum* J. Indian Chemical Society 69:893, 1992)。同时,另外一些低分子量的化合物,如联苯木糖苷和二取代四氢呋喃,已经在物种的块茎中检测到 (参考:M. Tandon、Y. N. Shukla 和 R. S. Thakur, 4-hydroxy-8,11-oxidoheneicosanol and other constituents from *Chlorophytum arundinaceum* roots, *Phytochemistry* 31:2525-2526, 1992; M. Tandon 和 Y. N. Shukla, A bibenzyl xyloside from *Chlorophytum arundinaceum*, *Phytochemistry* 32:1624-1625, 1993)。

[0006] 在现有文献中,对 *Safed Musli* (*Chlorophytum borivillicum*) 的植物化学物质的研究没有可用的。只限于一些印度古代对块茎的皂角苷的非定量的总重的估计 (参考:PC Bordia、A. Joshi 和 M. M. Simlot, 1995, *Safed Musli* In *Advances in Horticulture* volume 11 (Medicinal and Aromatic Plants) Editors: K. L. Chadha and Rajendra Gupta, pp. 430-450, Malhotra Publishing House, New Delhi, India)。公共领域中并没有这些物种的块茎和活性成分、特别是药草中的多糖的体内或体外生物活性数据。

[0007] 现实急需治疗或遏制人体由于体弱或相关的疾病、感染引起的免疫反应缺失,以及它们的治疗剂。一些天然和合成的亲水性聚合物在几种药物应用中是有兴趣的。已经报道了 *Salvia officinalis* 中的粗多糖的促有丝分裂活性、促增殖活性和免疫调节活性 (参考:P. Capek 和 V. Hribalova, *Phytochemistry* 65:1983-1992, 2004)。关注的葡甘露聚糖、Konjac 葡甘露聚糖 (KGM) 是流行的。KGM 从 *Amorphophallus konjac* 的块茎中萃取出。KGM 对人类的健康有益,其能治疗一些疾病的活性已经有很好的报道 (W. Fang 和 P. Wu, *Variation of Konjac glucomannan, KGM from Amorphophallus konjac and its refined powder in China*, *Food Hydrocolloids* 18:167-170, 2004)。多糖在单节显性组合物中的比例和序列和植物中是独特的,这些对生物性能和物理性能 (如凝胶、胶体) 是重要的,并在食物、药物、化妆品和相关的生物医药行业有广泛的用途。药草对免疫反应缺失疾病或其它环境导致的局部或系统免疫性越来越有用,科学文献报道了含在这些植物中的化学物质、萃取液或部分或完全的提纯物质的效果。和 *Chlorophytum/safed Musli* 相关的性能已被本发明的权利要求书涵括。下述的实施例进一步解释这些问题。

[0008] 因此,本发明涉及 *Chlorophytum* (*Safed Musli*) 或其一种或多种多糖组分、混合物或从其中得到的物质在预防或治疗和免疫相关的问题、风险、失常、不适和疾病及此生疾病中的应用。

发明内容

[0009] 发明目的

[0010] 本发明的主要目的是提供一种从 *Chlorophytum* sp (*Safed musli*) 中分离出生物活性多糖的方法。

[0011] 本发明的另一目的是提供一种用作免疫调节剂的药物组合物,该组合物含有从植物 *Chlorophytum borivillianum* 的块茎/指状物(簇生的根)中得到的分离的多糖组分。

[0012] 本发明的另一目的是提供一种用作免疫调节剂的 *Chlorophytum* sp. (Safed musli),其中含有多达 45% (w/w) 的分离的多糖、7-10% (w/w) 的蛋白质和 40-50% (w/w) 的其它组分,如纤维、纤维素、胶质、半纤维素和游离糖。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种药物组合物,该药物组合物的体液免疫调节活性大于左咪唑,左咪唑是用于免疫调节活性测试系统的阳性对照。

[0014] 本发明的进一步目的是提供用作免疫调节剂的药草性的无毒药物组合物。

[0015] 本发明的另一目的是提供一种萃取 safed musli 中的多糖的水溶液和水悬浮液的简单易行的方法。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及 *Chlorophytum* 或其水溶液组分(水易萃取的水溶性多糖、水易萃取的水悬浮液多糖、葡甘露聚糖,等)的应用,或者从药草中收集到的对免疫增强和免疫调节性能有好处的、与多糖/MGM 相关的物质或这些物质的混合物。*Chlorophytum* 或其萃取物(水易萃取的水溶性多糖、水易萃取的水悬浮液多糖、葡甘露聚糖 MGM 多糖)的免疫增强性能包括在本发明的权利要求书中,包括但不限于用体内试验测定的水易萃取的水溶性多糖、水易萃取的水悬浮液多糖、葡甘露聚糖 MGM 多糖。

[0018] 而且,本发明涉及 *Chlorophytum* 或其水溶液组分、或从其中得到的物质或这些物质的混合物由于其新颖的多糖(水易萃取的水溶性多糖、水易萃取的水悬浮液多糖、葡甘露聚糖,等)在营养药、饮食辅助剂、可食用添加剂、用于增强免疫、抗血糖生成的药物组合物的生产中的应用,以及在预防或治疗免疫抑制(如辐射诱导的皮肤癌)引起的疾病中的应用。

[0019] 而且,本发明涉及 *Chlorophytum* 或其水溶液组分、或从其中得到的物质或这些物质的混合物在制备免疫增强和抗血糖生成的制剂、营养药、食物、功能性食物、饮食辅助剂和食物添加成分中的应用。

[0020] 相应的,本发明提供了从 *Chlorophytum* sp (Safed musli) 中分离生物活性多糖的方法,该方法包括如下步骤:

[0021] [a] 将 *Chlorophytum borivillianum* 组织或生物物质放入水溶液介质中均质化或溶剂化,得到上清液;

[0022] [b] 将 4 个体积的乙醇加入到步骤 [a] 的上清液中,沉淀多糖;

[0023] [c] 在搅拌的情况下将步骤 [b] 中得到的沉淀的多糖溶解,接着过滤,得到滤液和残余物;

[0024] [d] 将步骤 [c] 中得到的残余物用水进行悬浮,得到水易萃取的水悬浮液多糖 (Bio-RS1F);

[0025] [e] 同时,用公知的脱蛋白试剂处理步骤 [c] 中得到的滤液,沉淀蛋白质,得到脱蛋白的上清液;

[0026] [f] 将步骤 [e] 中得到的上清液用乙醇沉淀,得到沉淀;

[0027] [g] 将步骤 [f] 中得到的沉淀用水溶解,得到水易萃取的水溶性多糖组分 (Bio-RS1D)。

[0028] 本发明进一步提供用作免疫调节剂的药物组合物,该组合物单独含有从植物 *Chlorophytum borivillianum* 中得到的分离的多糖组分或其它药学上可接受的赋形剂的组合,该多糖组分含有水易萃取的水溶性多糖和水易萃取的水悬浮液多糖。

[0029] 本发明也提供一种用作免疫调节剂的植物 *Chlorophytum sp.* (*Safed musli*) 的应用,该免疫调节剂中含有多达 45% (w/w) 的分离的多糖、7-10% (w/w) 的蛋白质和 40-50% (w/w) 的其它组分,如纤维、纤维素、胶质、半纤维素和游离糖。在本发明的另一实施例中,萃取可以在高达萃取介质沸点温度的任何温度内进行。

[0030] 在另一实施例中,乙醇沉淀的糖可以在正常或碱性水中进行再溶解和脱蛋白。

[0031] 在另一实施例中,脱蛋白可以通过用 TCA、乙酸钠或其它常规的蛋白质沉淀剂进行沉淀。在另一实施例中,脱蛋白的上清液可以直接用乙醇沉淀糖,或者在透析或其它的脱盐作用之后进行沉淀。

[0032] 在另一实施例中,脱蛋白的多糖制剂可以用离子交换色谱和 / 或排阻色谱部分或全部提纯。

[0033] 在另一实施例中,生物活性的多糖组分的产量有 8% w/w 的水易萃取的水溶性多糖 (Bio-RS1D) 和 15% w/w 的水易萃取的水悬浮液多糖 (Bio-RS1F)。在另一实施例中,组分是从 *Chlorophytum*

[0034] *borivillianum* 分离的。在另一实施例中,植物组织 / 生物质优选为空中的或块茎 / 指状物 (簇生的根) 或其混合物。

[0035] 在另一实施例中,用于萃取或使用的植物组织 / 生物质为新鲜的或干燥的,可以说是任何天然或剥皮的物理形式。

[0036] 在另一实施例中,组合物的剂量为每天口服 50-100mg/Kg 体重,持续 1-28 天。在另一实施例中,用于诱导体液免疫性的 RBC 的量为 0.2ml 的 1×10^8 红细胞。

[0037] 在另一实施例中,在啮齿动物试验中,单次服用高达 2000mg/Kg 体重的组合物是无毒的。

[0038] 在另一实施例中,组合物的体液免疫调节活性大于左咪唑,左咪唑是用于免疫调节活性测试系统的阳性对照。

[0039] 在另一实施例中,组合物的细胞介导免疫调节活性大于正常的动物和用环磷酰胺治疗的动物;在延迟型过敏反应的测试系统中用对照组,以检测细胞介导免疫调节活性。

[0040] 在本发明的另一实施例中,本发明的萃取方法可以用水溶液溶剂进行,包括其它的盐或溶剂也是可以接受的,只要不危害聚糖的萃取,聚糖包括但不限于水易萃取的水溶性多糖、水易萃取的水悬浮液多糖、杂聚糖如 MGM。

[0041] 本发明进一步涉及预防或治疗疾病或健康风险的方法,其中给哺乳动物施用一种或多种 *Chlorophytum* 或其水溶液组分或其中的物质 (水易萃取的水溶性多糖、水易萃取的水悬浮液多糖、葡甘露聚糖多糖等) 或这些物质的混合物。在本发明优选的实施例中,药草的水溶液萃取液或组分选自聚糖、特别是 (水易萃取的水溶性多糖、水易萃取的水悬浮液多糖、*Chlorophytum/Musli* 葡甘露聚糖多糖 (MGM) 等)。

[0042] 在本发明优选的实施例中, *Musli glucomannanpolysaccharides* (MGM) 部分含有该药草所有的植物性药材部分。

[0043] 根据本发明的应用,在聚糖的优选实施例中,水溶液萃取液包括任意温度有水萃

取得到的多糖混合物,或者在缺乏其它溶质或稀释剂下萃取得到的多糖混合物。

[0044] 在另一优选的实施例中,萃取就是溶解物质或物质的混合物,从而以其优选的溶剂化方法根据细胞定位和物化性能从组织基质中恢复这些物质,包括在水中加入添加剂帮助萃取。在另一特别优选的实施例中,醇和 / 或其混合物可以用于萃取、提纯或沉淀这些物质或其混合物。

[0045] 聚合 / 低聚合糖化合物是类似的,不限于已证实存在植物中的水易萃取的水溶性多糖、水易萃取的水悬浮液多糖、MGM,本领域普通技术人员可以用实施例和权利要求书中的方法或其它化学和生物领域公知和应用的方法进行分离和提纯。例如,柱层析法(离子交换、排阻色谱)、选择性沉淀、脱蛋白、冻干、透析等用于从植物中部分或全部获得纯的化合物。

[0046] 在本发明另一优选的实施例中,可以通过体内或体外的方法测试 / 监测免疫调节活性,该方法包括实例和实践中其它相关材料中提供的方法。

[0047] 在本发明另一优选的实施例中,免疫调节的优点涉及细胞和体液。

[0048] 在本发明优选的另一实施例中,免疫调节优点包括初级、次级、直接或间接的。

[0049] 在另一优选的实施例中,药草或其纯的或不纯的多糖物质的健康改善潜力包括本发明中提到的物质的性能。已经观察到 Chlorophytum 水溶液萃取液能增强免疫反应和免疫调节活性。因此,从植物或其部位得到的水溶液萃取液可以用于为正常人或患者获得免疫健康的好处。有利的,这些水溶液萃取液是可以安全用于预防、治疗或支持或加强免疫系统和反应的营养药。除了增强免疫外,本发明的水溶液萃取液优选从已长时间安全施用的植物中分离。在优选的实施例中,水溶液萃取液从 Chlorophytum 中分离。

[0050] 在本发明另一优选的实施例中,应用包括口服、局部施用或实践中在食物、健康、生物医药和化妆品中的其它方式。

具体实施方式

[0051] 植物材料:Chlorophytum borivilliamum 植物在 Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow (India) 的试验农场按照标准农艺实践培育。在农作物成熟时,挖出块茎(簇生的根),去掉表皮,在阴凉处完成干燥,使用前储藏在阴凉干燥的地方。

[0052] 多糖的分离:干燥的块茎进行很好的研磨,用 20 个体积 (20ml/ 克干重) 的水在室温下持续搅拌 12 小时,并过滤。保存滤液,残余物用 20 个体积的水再萃取,如上过滤。合并两滤液,加入醇至 80% 的饱和度,物质完全混合,并在室温下静置 6 小时。还原沉淀的多糖。多糖在水中溶解,并过滤。滤液由天然多糖的水易萃取的水溶性多糖组分 (Pro-Bio-RS1D) 组成,同时过滤后的残余物在水中悬浮,得到天然多糖的水易萃取的水悬浮液多糖组分 (Bio-RS1F)。易溶于水的前者进一步用 6% (最终的浓度) 的三氯乙酸处理提纯,沉淀通过离心法分离除去。离心后的清液(上清液)用醇沉淀,还原水易萃取的水溶性多糖 (Bio-RS1D)。

[0053] 多糖的表征:水易萃取的水溶性多糖组分 (Bio-RS-1D) 通过分子筛排阻色谱法处理,通过丙烯葡聚糖凝胶 (Sephacryl) HR-200 柱。为此,试样量 (0.5ml) 的多糖附载在 Sephacryl HR-200 (空隙体积 17.5ml) 的分子量校对柱 (38.5×1.4cm) 上,该柱用蒸馏水洗

堤,收集组分 (2.0ml)。加入醇,使每个组分的试样量 (300 微升) 的醇饱和度达到 80%,收集沉淀,进行重量分析,在 300 微升的水中再溶解,进行糖的蒽酮测试。多糖的洗堤体积估测其分子量超过 200,000 道尔顿。

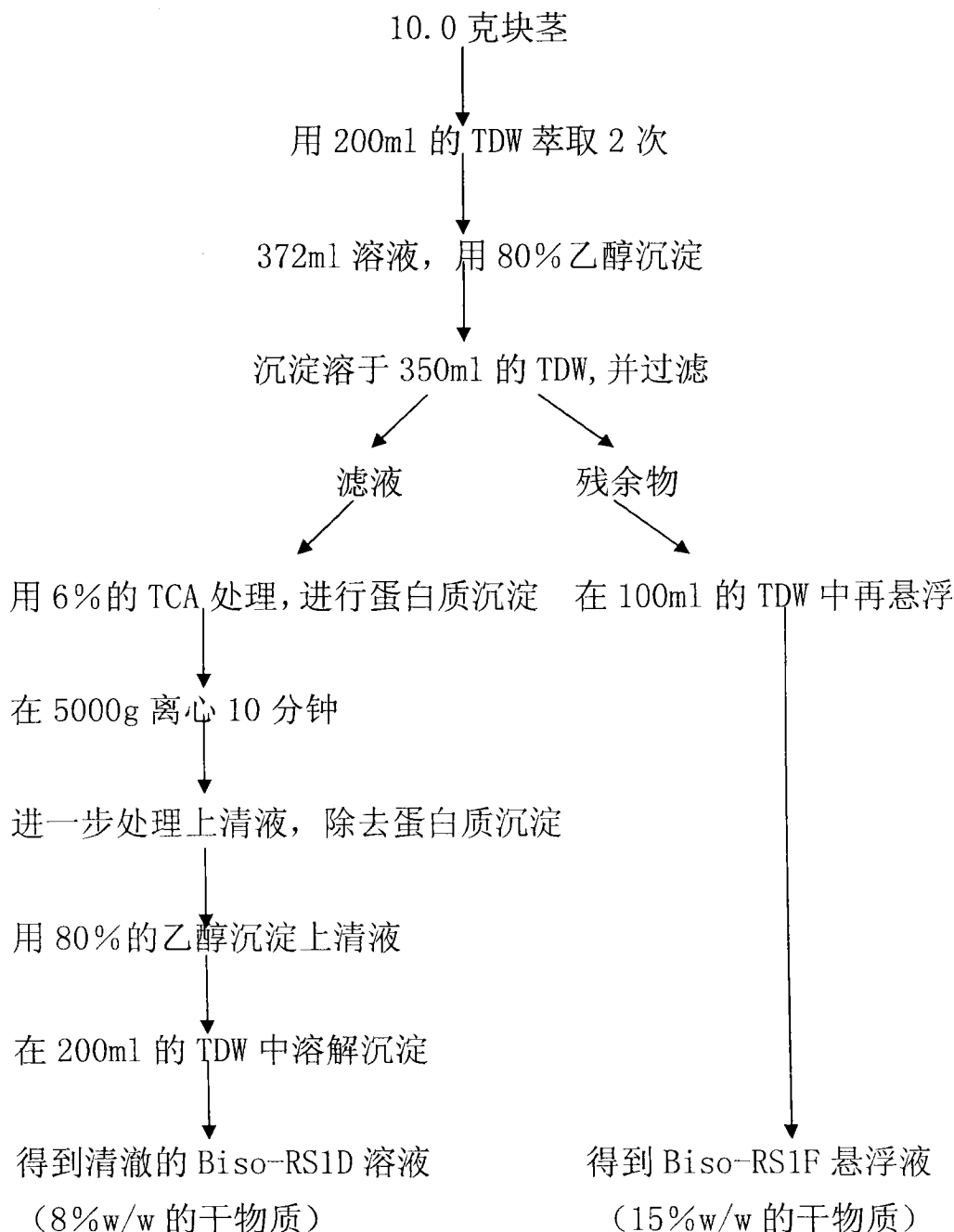
[0054] 根据单糖重复单元的性能,通过组成分析鉴别多糖的特性。为此,用 TFA (三氟乙酸) 对多糖进行水解,用薄层色谱 (TLC) 分析水解和未水解的多糖。为此,在封闭的玻璃管中,多糖的溶液用 2M 的 TFA 水解,进行 5 小时的开水浴。水解后,加入碳酸氢钠中和混合物,直至停止冒泡。所述的或合适稀释 (多达 10 次) 的 $2\mu\text{l}$ 中和溶液和标准单糖 (1.0mg/ml, $2\mu\text{l}$) 一起在预涂 TLC 板 (没有荧光指示剂的 E. Merck-kiesel) 上进行 TLC。TLC 所用的溶剂系统为乙酸乙酯:异丙醇:水:吡啶 = 26:14:8:2 (v/v)。通过喷洒喷显剂检测糖,喷显剂在乙醇中含有二苯基胺 (2% w/v)、苯胺 (2% v/v)、磷酸 (10% v/v)。该板在 110°C 时加热 10 分钟,真正的标准样品水解产物的斑点就显现出来并对比。从多糖和标准单糖中得到的水解产品的迁移对比分析表明水解产品为葡萄糖和甘露糖,因此鉴别出该多糖为葡甘露聚糖。由于从不同组织得到的多糖在大小和聚合的程度/范围不同,通常每种植物的特点也不同。因此,Safed Musli 葡甘露聚糖认定为 Musli 葡甘露聚糖 (MGM)。多糖的分离也可以从热水萃取开始,或者之前先用氯仿-甲醇 (1:1) 对组织进行脱脂。

[0055] Musli 多糖生物活性的测定:根据正常鼠 (*Mus musculus*) 的体内免疫调节 (体液和细胞介导的) 活性对多糖的生物活性进行测定。对于体液免疫调节活性,将正常的健康远交系鼠保持在标准的环境 ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 昼夜 12 小时循环,喂食小球,浸湿的孟加拉绿豆) 中,每组中的 5 个动物用作试验。将测试的化合物喂食这些动物,剂量为 100mg/Kg 体重,时间为 1-28 天。将新近收集和清洗的野兔的 RBC 作为抗原,该抗原在第 7 天用于使动物免疫,接着在第 14 天喂食加强剂量。21 天后从眼窝丛收集血液,进行红血球凝集素滴定度的测定。血凝反应在 96 孔“U”底部微量滴定板中用两倍稀释血清进行。显示可见的凝集的最高稀释作为抗体滴定度。

[0056] 通过延迟型过敏性模型 (DTH) 的正常鼠 (*Rattus norvegicus*) 的细胞介导活性:将正常的健康远交系 Sprague Dawley 鼠保持在标准的环境 ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 昼夜 12 小时循环,喂食小球,浸湿的孟加拉绿豆) 中,每组中的 5 个动物用作试验。将测试的化合物喂食这些动物,剂量为 50-100mg/Kg 体重,时间为 15 天。动物开始用清洗过的 RBC 作为抗原 (0.2ml , 含有 1×10^8 皮下细胞),药物治疗 5 天后,在第 12 天喂食加强剂量,皮下的抗原数量相同。在最近抗原剂量 48 小时后,在后爪趾面对动物进行相同抗原的免疫性试验。24 小时后,读取器官血量变化。

[0057] 进行毒物学反应评价 (单剂量反应),其中正常健康鼠 (*Mus musculus*) 喂食口服单剂量 2000mg/Kg 体重,观察任何不正常的症状。对于这个剂量,动物是正常的,没有显示任何有毒的证据,表明单剂量 2000mg/Kg 体重是安全的。对于毒物学反应评价 (重复剂量反应),正常健康鼠 (*Mus musculus*) 喂食重复口服剂量 100mg/Kg 体重,持续 28 天,观察任何不正常症状。对于这个剂量,所有的动物是正常的,没有显示任何有毒的证据,表明重复口服剂量 100mg/Kg 体重是安全的。

[0058]



[0059] 上述流程图是从 Chlorophytum 块茎中分离生物活性多糖的过程。两种形式的多糖, Bio-RS1D 和 Bio-RS1F 分别代表的是水易萃取水溶性形式和水易萃取水悬浮液形式。TDW:蒸馏三次的水;TCA:三氯乙酸。

[0060] 根据本发明,术语“Chlorophytum 糖类物质”指的是整个植物的各个部分,覆盖了聚物质,包括低聚多糖。这些物质可以单独使用或和别的物质联合使用,不同 Chlorophytum 物种的相同或类似成分可以单独或联合使用。Chlorophytum 或本发明权利要求书中涵括的物质使用时可以预处理或不进行预处理。

[0061] 可以从 Chlorophytum 的任何部位得到的“物质或物质的混合物”可以包含在药草中使用,或以纯的或不纯的形式使用。这些活性试剂可以单独使用,或和活性试剂或活性试剂的混合物联合使用。活性物质的混合物可以从相同的 Chlorophytum 植物部分得到,或者从相同物质的不同部位或不同物种中得到。

[0062] 根据本发明,“物质或物质的混合物”由相同或不同的化学物质多糖组成。这些化学物质可以是天然的形式,即没有被获取方法改性,或被获取方法改性。在本文中,衍生物指的是可以从所述化合物得到的所有化合物,其可以通过化学改性、联接等获得。例如,这些衍生物可以通过取代、加成、酯化、皂化、缩合反应等形成。

[0063] 在本发明的含义中,“预防”指的是 Chlorophytum 或从其中得到的物质或物质混合物广泛用于免疫反应设备没有临床诊断失常的预防、或预防由于生理异常或免疫系统功能、暴露于环境的风险、感染或疾病导致的免疫缺失的恶化,以及治疗这些情况。以 Chlorophytum 或权利要求中涵括的该物质为基础的制剂或产品可选择的以具体或合并形式 / 方式 / 方法 / 载体介导的 / 浓度药学上可接受的或生理相容的形式使用。

[0064] 实例

[0065] 下述给出的实例对本发明进行说明,因此不应解释为对本发明范围的限制。

[0066] 术语和定义:

[0067] 为了便于理解本发明,本发明中使用的术语和缩写定义如下:

[0068] “提纯的”意指部分提纯的和 / 或完全提纯的。因此,“提纯的”物质可以是部分提纯的或完全提纯的。

[0069] “萃取液”意指天然萃取液、提纯的萃取液和萃取液纯化得到的提纯的组合物。

[0070] “免疫调节活性”意指物质改变受体免疫状态的能力。

[0071] “滴定度”意指血清最大稀释度,该血清含有诱导的抗体,该抗体显示了和 RBC 的血凝反应。

[0072] “连续稀释”意指通过 1、2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048 等因子与血清稀释相连的微板形式稀释。

[0073] “血凝反应”意指在 U- 底部微量滴定板中锯齿状或钮扣状的、可见的凝集。

[0074] “抗原”意指在老鼠中用于诱导免疫的兔的 RBC。

[0075] “血清”意指凝结的血液的上清液。

[0076] “植物或部分”意指植物的整体或任一部分,如空中的部分、种子、叶子、茎干或根或花或任意部分的组合。

[0077] 实例 1

[0078] 25 克干燥的块茎研碎成粉末。然后将该粉末用 20 个体积的氯仿:甲醇 = 1:1(v/v) 脱脂。脱脂的残余物进一步用 500ml 的热水 (100°C) 萃取 3 小时,然后过滤 / 沉淀,收集滤液或上清液。在上清液中加入 4 个体积的乙醇,沉淀多糖。将沉淀的多糖制剂过滤 / 离心出来,然后搅拌溶于 200ml 的水 (富含水溶性多糖的萃取液)。该溶液用液氮快速冷冻,然后在 4-10°C 慢慢解冻过夜。形成的沉淀在 4-10°C 以 5000rpm 离心收集 10 分钟。沉淀冷冻干燥,得到蓬松的物质或薄片 (9.583 克)。多糖组分占块茎干重的 38.3%。最后得到的物质或制剂是冻干的天然多糖薄片 (指定为 Bio-RS1 的来源)。

[0079] 实例 2

[0080] 25 克干燥的块茎研碎成粉末,然后将该粉末用 20 个体积的热水在 100°C 萃取 3 小时。过滤得到的溶液,收集滤液,残余物如上再次萃取。合并滤液 (950ml),减压下浓缩至 400ml。保存 50ml 的浓缩液,在 350ml 的浓缩液中加入四个体积的乙醇进行乙醇沉淀。过滤该物质,通过过滤收集沉淀。在 50°C 将沉淀溶于 200ml 的水中,溶液用液氮快速冷冻,并慢

慢在 4-10℃解冻。过滤出得到的沉淀,并在 100ml 的水中溶解(天然多糖的溶液或胶体形式)。稀释溶液 4 次,得到浓度为 1mg/ml 的水萃取多糖的制剂。该制剂指定为 Bio-RS1B,并进行免疫调节活性(实例 7)。

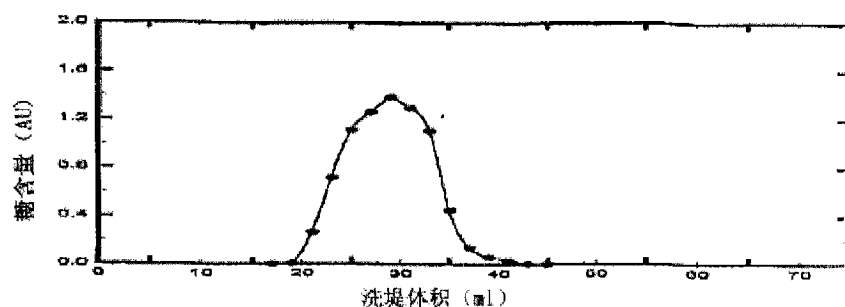
[0081] 实例 3

[0082] 10 克干燥的块茎研碎成粉末,然后将该粉末用 20 个体积的水在室温下萃取 2 次,并同时搅拌。通过过滤得到 372ml 的溶液,然后用 80% 的乙醇沉淀。由此得到的沉淀溶于 350ml 的水中,然后过滤。滤液含有全部的天然多糖中的水易萃取可溶性多糖组分,该组分作为 Pro-Bio-RS1D 保留。过滤的残余物在 100ml 的水中悬浮。悬浮液称之为天然多糖中的水易萃取水悬浮液多糖(15mg/ml),然后标记为 Bio-RS1F,并进行免疫调节活性测试(实例 6)。滤液(Pro-Bio-RS1D)用 6% TCA(最终浓度)处理,沉淀出蛋白质。离心除去蛋白质沉淀(5000g,10 分钟),上清液(350ml)用乙醇沉淀,从而还原多糖(部分提纯的水易萃取水溶性组分)。过滤收集沉淀,并溶于 200ml 的水。该清澈的脱蛋白多糖溶液(浓度为 Bio-RS1D)指定为 Bio-RS1D,并用于评价免疫调节活性。该沉淀也进行化学组分分析(如实例 5),并进一步通过胶体过滤色谱(如实例 4)提纯。

[0083] 实例 4

[0084] 随后用醇和冷冻-解冻的方法和脱蛋白进行选择沉淀部分纯化多糖,可溶性多糖的 Chlorophytum/Musli 葡甘露聚糖(MGM)组分通过分子筛排阻色谱法处理,通过丙烯葡聚糖凝胶(Sephacryl)HR-200 柱。为此,0.5ml 试样量的可溶性多糖附载在 SephacrylHR-200(空隙体积 17.5ml)38.5×1.4cm 的柱上,该柱用三次蒸馏水洗提,收集组分 2.0ml。加入醇,使每个组分的试样量(300 微升)的醇饱和度达到 80%,收集沉淀,在 300 微升的水中再溶解,并进行糖测定(蒽酮方法)。糖的单峰从图 1 所示的用色层法分离的制剂中洗提。提纯的多糖通过水解用 TFA 进行组分分析,接着进行实例 6 所示的薄层色谱法(TLC)。

[0085]



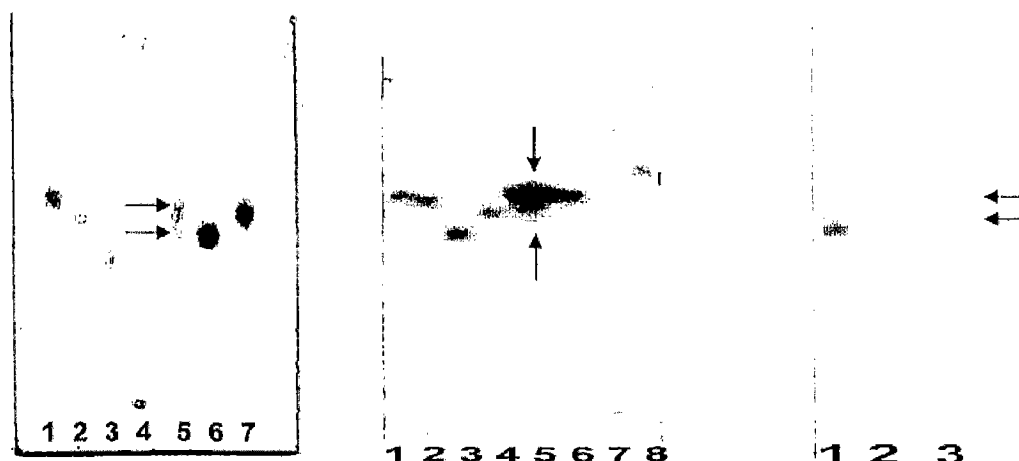
[0086] 图 1: Chlorophytum borivillianum(Safed musli) 的水易萃取水溶性多糖制剂通过 Sephacryl HR-200 柱的分子排阻色谱。

[0087] 实例 5

[0088] 取 Bio-RS1D 清澈溶液的试样量(1.0ml),在封闭的玻璃管中,用 2M 的 TFA 对其水解,进行 5 小时的开水浴。加入碳酸氢钠中和混合物,直至停止冒泡。所述的或合适稀释(多达 10 次)的 2 μl 中和溶液和标准单糖(1.0mg/ml,2 μl)一起在预涂 TLC 板(没有荧光指示剂的 E. Merck-kieselgel)上进行 TLC。TLC 所用的溶剂系统为乙酸乙酯:异丙醇:水:吡啶=26:14:8:2(v/v)。通过喷洒喷显剂检测糖,喷显剂在乙醇中含有二苯基胺(2% w/v)、苯胺(2% v/v)、磷酸(10% v/v)。该板在 110℃时加热 10 分钟,真正的标准样品水解产物

的斑点就显现出来并对比。

[0089]



[0090] 图2:Chlorophytum多糖的对比分析。左板:1- 树胶醛糖,2- 果糖,3- 半乳糖,4- 未水解的水易萃取水溶性多糖 (Pro-Bio-RS1D),5- 水解的 Pro-Bio-RS1D,6- 葡萄糖,7- 甘露糖;中板:1- 树胶醛糖,2- 果糖,3- 半乳糖,4- 葡萄糖,5- 水解的提纯的 Bio-RS1D (MGM),6- 甘露糖,7- 鼠李糖,8- 木糖;右板:1- 葡萄糖,2- 甘露糖,3- 胶体过滤用色层法分离的 Bio-RS-1D (MGM)。

[0091] 因此,两种单节显性单糖(箭头所示)、葡萄糖和甘露糖组成Chlorophytum/Safed Musli 的生物活性聚合杂聚糖 MGM。生物活性多糖物质是植物中的一种主要细胞组分,例如(没有限制)含有38%(总的)和8%的MGM,其中的组分分析方法为TLC,乙酸乙酯:异丙醇:水:吡啶=26:14:8:2(v/v)。

[0092] 实例6

[0093] 正常鼠(Mus musculus)的体内免疫刺激物(体液)活性:将正常的健康远交系鼠保持在标准的环境($22 \pm 3^\circ\text{C}$,昼夜12小时循环,喂食小球,浸湿的孟加拉绿豆)中,每组中的5个动物用作试验。将测试的化合物喂食这些动物,剂量为100mg/Kg体重,时间为1-28天。将新近收集和清洗的野兔的RBC作为抗原,该抗原在第7天用于使动物免疫,接着在第14天喂食加强剂量。21天后从眼窝丛收集血液,进行红血球凝集素(HA)滴定度的测定。血凝反应在96孔“U”底部微量滴定板中用两倍稀释血清进行。显示可见的凝集的最高稀释作为抗体滴定度。结果如下表所示(表1)。

[0094] 表1:治疗动物的红血球凝集素滴定度

[0095]

动物编号	正常对照	左咪唑对照	Bio RS-1F	Bio RS-1D
1	256	4096	64	64
2	128	1024	8092	16384
3	32	2048	16384	32768
4	64	32	1024	64
5	4	32	64	64
平均值	96.8	1446.4	5146.6	9868.8

[0096] 数据表明:Chlorophytum块茎(指状物/簇生的根)的多糖具有体液免疫性刺激活性,平均值分别是阳性对照(左咪唑)和中间值的3.55倍和8倍;同样的,多糖的chlorophytum/Musli 葡甘露聚糖(MGM)组分具有重要的体液免疫性刺激活性,平均值分别

是阳性对照（左咪唑）和中间值的 6.8 倍和 16 倍。

[0097] 实例 7

[0098] 通过延迟型过敏性模型 (DTH) 的正常鼠 (*Rattus norvegicus*) 的免疫刺激物活性 (细胞介导): 将正常的健康远交系 SpragueDawley 鼠保持在标准的环境 ($22 \pm 3^\circ\text{C}$, 昼夜 12 小时循环, 喂食小球, 浸湿的孟加拉绿豆) 中, 每组中的 5 个动物用作试验。将测试的化合物喂食这些动物, 剂量为 50-100mg/Kg 体重, 时间为 15 天。动物开始用清洗过的 RBC 作为抗原 (0.2ml, 含有 1×10^8 皮下细胞), 药物治疗 5 天后, 在第 12 天喂食加强剂量, 皮下的抗原数量相同。在最近抗原剂量 48 小时后, 在后爪趾面对动物进行相同抗原的免疫性试验。24 小时后, 读取器官血量变化。结果如下表所示。

[0099] 表 2: 被治疗的动物的平均延迟型过敏性反应 (爪中发炎年龄%)

[0100]

RS Bio-1B	正常	(-ve) 对照
24.47	7.79	3.92

[0101] 数据 (表 2) 表明: Chlorophytum 块茎的不同沉淀提纯的多糖具有重要的细胞免疫反应增强能力 (24.47%, 对比阳性对照的 7.79% 和阴性对照的 3.92%)。

[0102] 实例 8

[0103] 毒物学反应评价 (单剂量反应): 正常健康鼠 (*Mus musculus*) 喂食口服单剂量 2000mg/Kg 体重, 观察任何不正常的症状。对于这个剂量, 动物是正常的, 没有显示任何有毒的证据, 表明单剂量 2000mg/Kg 体重是安全的。

[0104] 实例 10

[0105] 毒物学反应评价 (重复剂量反应): 正常健康鼠 (*Mus musculus*) 喂食重复口服剂量 100mg/Kg 体重, 持续 28 天, 观察任何不正常症状。对于这个剂量, 所有的动物是正常的, 没有显示任何有毒的证据, 表明重复口服剂量 100mg/Kg 体重是安全的。

[0106] 优点:

[0107] 本发明的优点如下所示:

[0108] 1、本发明提供了植物 Chlorophytum (Safed Musli) 新颖和重要的治疗 / 健康益处应用, 该应用不同于其它难以说明的物质 (如壮阳药)。

[0109] 2、本发明的生物活性非营养多糖表明同种植物 / 植物部分具有多种用途, 如减肥用的功能性食物、低糖食物, 同时具有增强抗疾病恶化 / 耐受的免疫性的优点。

[0110] 3、本发明提供了 Chlorophytum 作为可替代食物、营养药和医药目的中的 Konjac。

[0111] 4、本发明提供了该植物在食物、烹调、饭店中作为有价值的添加成分的多种用途。

[0112] 5、本发明可以用于食物、快餐、巧克力、汤、果酱、冰淇淋、凝胶等中的稠化剂或其它的低卡路里的添加剂, 同时有益健康, 并避免多的卡路里。

[0113] 6、含有天然或富含多糖的药物组合物可以作为免疫增强 / 疾病耐受性的安全草药。