[19]中华人民共和国专利局　　[11]公告号 CN 1034313A

(12)发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89100264.2

[51] Int.Cl⁴
A61K 31/715

[43] 公开日 1989年8月2日

[22]申请日 89.1.13
[30]优先权 88.1.14 JP 144,872
[71]申请人 卡林顿实验室公司
地址 美国得克萨斯州
[72]发明人 比尔·H·麦卡纳利

[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司
代理人 王巍

A61K 35/78 C08B 37/00

说明书页数: 61 附图页数: 14

[54]发明名称 制备芦荟产品的方法

[57]摘要

本发明公开了从芦荟植物提取具有药物活性的多糖物质的方法。

本发明还公开了具有药物活性的多糖物质及其特性。

1.一种从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，此方法包括以下步骤：

a)制备含溶解成分的芦荟汁；

b)将所述芦荟汁的pH值调至3.00-3.50；

c)将水溶性低级脂族极性溶剂加到芦荟汁中，以析出活性化学物质，从而形成多相溶液；

d)从多相溶液中除去水溶性低级脂族极性溶剂和溶解成分，分离所析出的活性化学物质；以及

e)将析出的活性化学物质干燥。

2.按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中所述芦荟汁是通过以下步骤获得的，即：

a)用杀菌溶液洗涤芦荟叶，基本上除去所有的表面污物和细菌；

b)至少除去洗过的芦荟叶上的顶端部分；

c)从上述切割和洗涤过的芦荟叶中沥出富有蒽醌的汁，保藏，汇集；

d)去掉上述芦荟叶的外皮，得到基本上无蒽醌的凝胶带；以及

e)将所述的基本上无蒽醌的凝胶带研磨并均匀化，得到基本上无蒽醌、含溶解成分的芦荟汁。

3.按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中所述芦荟汁是通过以下步骤获得的，即：

a)用杀菌溶液洗涤芦荟叶，以基本上除去所有表面污物和细菌；

b)将洗过的芦荟叶挤碎；以及

c)用化学方法将已挤碎的芦荟叶渗析，以便从碎叶的剩余部分中除去分离出基本上无蒽醌的凝胶。

4.按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的

方法，其中所述芦荟汁是通过以下步骤获得的，即：

a)用杀菌溶液洗涤芦荟叶，基本上除去所有表面污物和细菌；

b)将所述的已洗过的芦荟叶挤碎；

c)将所述的芦荟叶研磨并均匀化，得到含溶解成分的芦荟汁。

5.按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中所述芦荟汁是通过以下步骤获得的，即：

a)用杀菌溶液洗涤芦荟汁，以基本上除去表面污物和细菌；

b)研磨所述经过洗涤的芦荟叶；

c)过滤所述经过研磨的芦荟叶，以除去纤维性物质；以及

d)将所述经过研磨的芦荟叶均匀化，得到富有蒽醌、含溶解物质的芦荟汁。

6.按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中所述芦荟汁是通过以下步骤获得的，即：

a)将芦荟植物叶压碎，以挤出含溶解成分的芦荟汁。

7.按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中所述芦荟汁是通过以下步骤获但的，即：

a)用杀菌溶液洗涤芦荟叶，以基本上除去所有表面污物和细菌；

b)从所述芦荟叶上除去外皮，得到芦荟凝胶带；以及

c)将所述芦荟凝胶带研磨并均匀化，得到含溶解成分的芦荟汁。

8.按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中对所述沉淀物辐射，从而将所述活性化学物质消毒和防腐保藏。

9.按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中将四体积的所述水溶性低级脂族极性溶剂加到一体积的芦荟汁中，以析出所述活性化学物质。

10. 按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质

的方法，其中所述水溶性低级脂族极性溶剂选自甲醇、乙醇和丙醇。

11．按权利要求10的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中所述水溶性低级脂族极性溶剂为乙醇。

12．按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中在除去所述水溶性低级脂族极性溶剂前，所述活性化学物质从水溶性低级脂族极性溶剂和芦荟汁中析出需4 小时。

13．按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，其中通过冰冻干燥法将所述析出的活性化学物质干燥。

14．按权利要求1 的从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的方法，该方法还包括以下步骤：

f)将析出的活性化学物质再溶解于磷酸盐缓冲液；

g)先后用非特异性蛋白酶及广延性透析法处理再溶解沉淀的活性化学物质，以及

h)将处理后不可过滤的产物冰冻干燥。

15．按权利要求1 的方法生产的产品。

16．按权利要求2 的方法生产的产品。

17．按权利要求3 的方法生产的产品。

18．按权利要求4 的方法生产的产品。

19．按权利要求5 的方法生产的产品。

20．按权利要求6 的方法生产的产品。

21．按权利要求7 的方法生产的产品。

22．按权利要求8 的方法生产的产品。

23．按权利要求9 的方法生产的产品。

24．按权利要求10的方法生产的产品。

25．按权利要求11的方法生产的产品。

26．按权利要求12的方法生产的产品。

27. 按权利要求13的方法生产的产品。

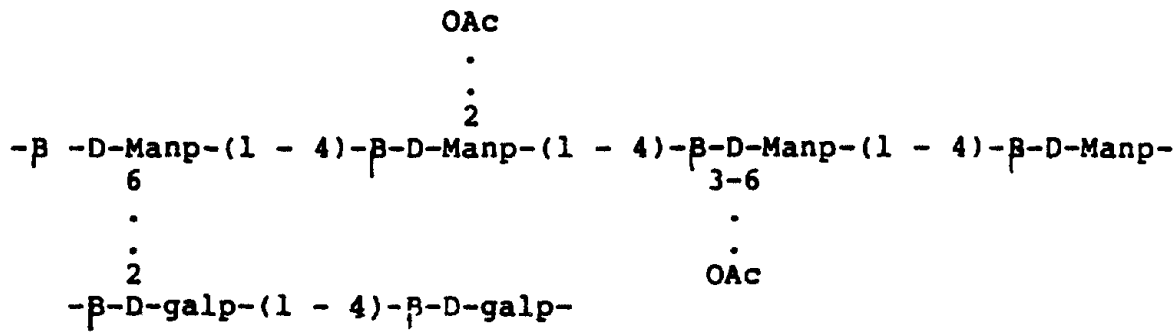
28. 按权利要求14的方法生产的产品。

29. 一种物质组合物包含：β(1→4)-D- 甘露糖基单元的线性聚合物，该聚合物基本上是不可降解的和冰冻干燥的聚合物，其中随机分布的乙酰基团通过氧原子同聚合物连接；D- 吡喃半乳糖通过 α(2-6) 键与聚合物连接，其比例为每七十单体单元中有一个D-吡喃半乳糖残基。

30. 按权利要求29的物质组合物，其中所述聚合物经 γ 射线或微波辐射。

31. 按权利要求29的物质组合物，其中乙酰化程度为每单体中有 0.8 个乙酰基团。

32. 活性物质组合物含有重复单体的基本上不可降解的冰冻干燥线性聚合物，所述重复单体包括：



其中乙酰化程度为每聚合物单体中有0.8 个乙酰基团；其中吡喃半乳糖单元与聚合物连接，其比例为一比七十单体单元；其中甘露糖与半乳糖的比例为20:1。

制备芦荟产品的方法

本申请是美国专利申请序列第869,261 号的接续部分，该申请的全部公开内容在此专门用作引用文献。所述美国专利申请序列第869,261号（现为美国专利第4,735,935 号），其相应的国际专利申请号为No.PCT/US86/01335（于1986年6 月20日提交）并于1987年1 月15日以国际公开号WO87/00052公开，在此也将其全部公开内容专门用作对照文献。所述美国专利申请序列第869,261 是1985年12月17日提交的美国专利申请序列第810,025 号（现已放弃）的接续部分；申请序列第810,025 号是1985年7 月12日提交的美国专利申请序列第754,859 号（现已放弃）的接续部分；所述申请第754,859 号是1985年6 月28日提交的美国专利申请序列750,321 号（现已放弃）的接续部分；所述申请序列750,321 号是1984年9 月12日提交的美国专利申请序列649,967 号（现已放弃）的接续部分；所述第649,967 号是1982年5 月7 日提交的美国专利申请序列375,720 号（现已放弃）的接续部分。所述申请序列869,261 号的题目是“芦荟属产物的制备方法、由此制得的产物及其组合物”。所述申请序列810,025 号的题目是“芦荟产品的制备方法以及由此制备的产物”。所述申请序列754,859 号、750,321 号。649,967 号和375,720号的题目是“芦荟产物的制备方法”。

本发明涉及对芦荟植物进行加工并除去所述植物的若干部分以将其加工成供局部和内服应用组合物的方法，和含有所述芦荟的组合物。

并非是普遍认为的仙人掌属植物，而是百合属植物。已知的芦荟属植物大约有360 种。见Harding,Aloes of the World:A Checklist，index and code,Excelsa 9:57-94(1979)。这些芦荟植物在热带干旱

地区生长良好，并广泛分布于地中海、中东。非洲、中国、日本、墨西哥和美国南方。可用作药用的少数几种重要的芦荟包括Aloe barbadensis Miller(翠叶芦荟)、A.arborescens 、A.plicatilis、A.vahombe 、A.saponaria 、A.africana、A.ferox 和Aloe perryi 。见Reynolds,Aloes of Tropical Africa and Madagasar,The Trustees, The Aloe Book Fund,Mbabane Swaziland 。然而，由于A. barbadensis Miller的广泛用途和所传的其十分有效的治愈效力，通常只将其视为“真正的芦荟”，尽管在日本传统上将A.arborescens Miller用作民间治疗药物，用以治疗从胃肠病到脚气的各种病症。

芦荟是一种多年生的植物，其饱满的绿叶呈玫瑰花形连接于茎杆。成熟植物的叶子可长达25英寸以上，沿其边缘有锯形的齿。

如图1 和图2 所示，横向切开叶子，显示出覆盖着厚厚角质层的表皮3 的外壁。表皮3 之下是叶肉，叶肉有别于绿色组织细胞和称作为薄壁组织的薄壁细胞。薄壁组织细胞含透明粘液质胶状物1 。具有内维管束鞘细胞的维管束2 包含具有轻泻剂性质的黄汁液，并夹在两种主要细胞之间。在叶子中心部分处多半可发现作为植物细胞代谢副产物而产生的草酸钙针状结晶体。

芦荟含有两种主要液体源，即：黄色乳汁(渗出液)和澄清凝胶(粘胶)。Aloe barbadensis Miller 叶的干燥渗出液称为芦荟素。其商品名为Curacao 芦荟，主要由芦荟素、芦荟一大黄素和酚组成。见Bruce,South African Medical Journal,41:984(1967)，Morrow 等，Arch. Dermatology,116:1064-1065(1980)，Salek 等,Corrsion Prevention & Control,9-10(1983)，Mapp等,Planta Medica,18:361-365(1970)，Ranwald,Arch.Pharmacology,315:477-478(1982)。另据报道，包括葸醌及其甙在内的若干酚盐具有药物活性。见Bruce,Excelsa 5:57-68(1975)，Suga等,Cosmetic and Toiletries,98:105-108(1983)。

从植物的绿色组织细胞得到的粘液质胶状物称为芦荟凝胶。一般情况下，蒽醌不会分解，并导致凝胶被污染，除非是加工技术不合理，才会使凝胶受到污染。

荟凝胶的含水量约为98.5%(重量)。全部固体的60% 以上是由原始碳水化合物的多糖组成的。固体的其余成分为有机酸的无机化合物，尤其是草酸钙。

人们早已将芦荟植物的整个叶子、渗出液和凝胶用来治疗各种病症，其作为治疗药物的应用可追溯到公元前400 年的埃及人时代。芦芸还用来涂尸防腐并保护涂尸者免受死因的影响。其他早期的文明人将芦芸用作清洗剂。以保护皮肤，减轻虫子叮咬的痛苦，治疗擦伤，加速伤口愈合，治疗脱发，以及用于治疗溃烂皮肤。它是许多民族的传统药物，例如作为驱虫剂、泻药、健胃剂，特别用于治疗麻风病、烧伤和过敏性病症。见Cole等,Archives of Dermatology and Syphilology,47:250 (1943)；Chopra 等,Clossary of Indian Medicinal Plants，科学和工业研究理事会，新德里；Ship,Journal of American Medical Association,238:1770-1772(1977)；Morton,Atlas of Medicinal Plants of Middle American Bahamas to Yucatan,Charles C.Thomas ED.78-80(1981)；diez-Martinez,La Zabila,Communcado No.46 Sobre Recursos Bioticos Potenciales del Pais,INIREB,Mexico (1981)；Dastur,Medicinal Plants of India and Pakistan；D.B.Taraporevala Sons & Co.,Private Ltd.,Bombay 16-17(1962)。

长期以来，芦荟享有具有“治疗”或“治愈”特性的盛誉。在过去几年里，为数众多的学术著作和论文论述了芦荟。许多研究机构(例如芦荟研究协会和公认的医学研究所),通过出版物和医生、兽医及其他科学家所记载的病例史，都为“芦荟现象”提供了证据。芦芸在皮肤病领域、尤其在治疗辐射引起的皮肤病症中起着十分重要的作用。见Mackee,

X-Rays and Radium in the Treatment of Disease of the Skin, 3rd Ed. Lea 和Febiger,Philadel-phia,319-320(1938)；Rovalti 等，Industrial Medicine and Surgery,28:364-368(1959)；Zawahry 等 Quo-tations From Medical Journals on Aloe Research ,Ed.Max B Skousen,Aloe Vera Research Institute,Cypress，Colifornia 18-23 (1977)；Cera 等., Journal of the American Animal Hospital Association, 18:633-638(1982) 。有关芦荟作为杀病毒剂、杀菌剂和杀真菌剂在治疗消化疾病中的应用，以及在妇科病症中的应用的报道极为广泛，并且由Grindlay和Reynolds对此作了充分的评述(Journal of Ethnopharmacology,16:117-151(1986)) 。

芦荟中存在的化学成分的价值由下述事实得到说明，即：在各国出版的药典上均记载了芦荟的化学成分，例如，见U.S.Pharmacopeia第20版修订本成份，国家药典第14版(United States Pharmacopeial Convention,Inc.,Rockville,Maryland,July 1,1980) 。然而，美国药典描述的是芦荟的黄汁药物部分而不是粘胶。新鲜的未经防腐处理凝胶的含水量约为98.5～99.2% 。脱水之后，剩余的全部固体占0.8 ～1.5%。固体的主要成分包括粘胶、糖、纤维、蛋白质、灰质、脂肪、芦荟素和树脂。见Robson等,Journal of Burn Care Rehabilitaion,3:157-163 (1982)。已有下述组合物的报道。所述组合物包括酶、有机酸、无机盐、氨基酸和生物碱。见Rowe等,Journal of the American Pharmaceutical Association,30:262-266(1941)；Roboz等,Journal of the American Chemical Society,70:3248-3249(1948)；Waller 等,Proceedings of Oklahoma Academy of Science,58:69-76(1978)。虽然加工芦荟叶的方式有别，但粘胶和糖始终是脱水凝胶的主要成分。所述糖包括半乳糖、葡萄糖、甘露糖、鼠李糖、木糖和糖醛酸。尽管已出现彼此相反的报道，但粘胶主要由甘露聚糖或葡甘露聚糖组成。见

Eberendu等,The Chemical Characterization of Carrisyn (in preparation)；Mandal等,Carbohydrate Research,87:249-256(1980b) Roboz 等,Journal of the American Chemical Society,70:3248-3249 (1948)；Gowda等，Carbohydrate Research,72:201-205(1979)；Segal 等,Lloydia,31:423(1968)。

目前，有关芦荟中活性物质特性的争论还未定局。因此，有必要明确地区分凝胶中的成分和渗出液中的成分。凝胶大部分主要是具有多糖性质的粘胶，及少量各种其他化合物。可以想象，在某些观察到的活性中，多糖基质和其他成分间存在某种增效剂作用。见Leung,Excelsa 8: 65-68(1978)；Henry,Cosmetic and Toiletries,94:42-50(1979)。例如，据几位研究工作者报道，治愈伤口的有效成分可能是愈伤酸(Freytag, Pharmazie, 9:705(1954)) 和某种多糖。见Kawashima 等，Chemical Abstracts,93:13075(1979)。Mackee(如前述) 特别指出，是凝胶而不是叶皮或渗出液在治疗辐射烧伤时起着有益的作用，他强调采用新鲜芦荟叶进行有效治疗的重要性。多糖随时间降解，为产生特殊的药理效应，要求一定的分子量可能是必要的见Goto等,Cann,63:371- 374 (1972)。

在有关多糖的文献中，有许多显示多糖的药理和生理活性(不借助其他成分的增效作用) 的实例。见Ohno等,Chem. Pharm.Bull.,33:2564 -2568(1985)；Leibovici 等,Chem.Biol.Interactions,60:191-200 (1986)；Ukai 等,Chem.Pharm.Bull.31:741-744(1983)；Leibovici 等, Anticancer Research,5:553-558(1985)。普通人群中的高脂血症，尤其是家族性血胆固醇过多症一般伴随发生冠心病和死亡。就膳食纤维摄取量较高的地区而言，动脉粥样硬化的病例似于较为罕见。见Trowell 等，编者,Refined Carbohydrate Foods and Disease,London, Academic Press,207(1975)。据报道，果胶和瓜耳胶可降低正常人和

高脂血症患者的胆固醇。见Kay 等,American Journal of Clinical Nutrition,30:171-175(1977)。洋槐属豆科树胶，即：一种由甘露糖和半乳糖组成的多糖，可减少正常人和家族性高胆固血症病人的脂蛋白胆固醇水平。见Zavoral 等,American Journal of Clinical Nutrition,38:285-294(1983)。将瓜耳胶添加到碳水化合物的膳食中，可抑制正常人和糖尿糖病人饭后血中葡萄糖上升。见Jenkins 等,Lancet,2:779-780(1977)。Kuhl等证实(Diabetes Care,6(2):152-154(1983))，瓜耳胶对依赖大量胰岛素的糖尿病人的血糖具有控制作用。

多糖的抗肿瘤活性已被广泛报道。由浅杯状香菇(Lentinus cyathiformis)制得的多糖可提高宿主对肿瘤的防御能力。见Rethy 等Annuals of Immunology Hungary,21:285-290(1981)。在几份报告中，均论述了由蘑菇、酵母或杆菌中提取的多糖对宿主的病毒和肿瘤能产生高度防御能力。见Chihara 等,Nature,222:687(1969)；Schwartzman，Proc.Soc.Exper.Biol.Med.,29:737(1932)；Rethy,X. International Congrees of Microbiology；Moscon,642(1966)。Suzuki等(Journalof Pharm.Dyn.,7:492-500(1984))还报道了从培养的真菌(Grifola frondosa)子实体中提取的多糖部分的抗肿瘤活性。多糖部分(GF01)表明：腹膜内(IP)、静脉内(IV)和肿瘤内(IT)给药时，具有同样高的抑制活性。然而，据报道，口服给药则无效果。GF-1还具有防止小鼠Meth A纤维内瘤和MM46癌的硬块形成的作用。香菇多糖(Lentinan)，一种类似于GF-1的6-支链- β-1-3连接的葡聚糖，对Meth A 纤维肉瘤无效。见Chihara,The antitutmor polysaccharide Lentinan:an overview；"Manipulation of Host Defense Mechanisms"，ed.Aoki等，Excerpta Medica, North Holland,1-16(1981)；Sasaki等，Carbohydrate Research,47:99-104(1976)。据报道，合成的支链多糖显示抗肿瘤的生物活性。见Matsuzaki 等,Makromol.Chem.,186:449

(1985)。Matsuzaki 等(Makromol .Chem.,187:325-331(1986))用象牙果甘露聚糖、 β-(1 →4)-D- 吡喃 甘露糖和 β-(1 →4)- 连接的葡甘露聚糖合成了支链多糖，它具有明显的活性。从Dictyophoria Indusiata Fisch 的子实体提取的直链 β-(1 →3)-D- 甘露聚糖部分乙酰化后具有抗肿瘤活性。见Hara等,Carbohydrate Reseach,143:111(1982),由于 β-(1 →3)- 葡聚糖型聚合物比 β-(1 →4)- 葡聚糖和半纤维素聚合物的抗肿瘤活性要高，看来，抗肿瘤活性取决于聚合物主链的种类及其聚合程度。见Matsuzaki 等,Makromol .Chem.,187:325-331(1986) 。在注射了 β-(1 →3)- 葡聚糖的羧甲基化衍生物后两小时，导致移植生长的内瘤180 肿瘤细胞的严重破坏。所述 β-(1 →3)- 葡聚糖是从细菌培养液中得到的。见Baba等,Journal of Immunopharmacology,8:569-572(1986)。同一作者观察到，由于注射所述物质引起多核白细胞的增长。另外,bestatin,一种具有调节免疫和抗肿瘤活性的已知二肽(Ishizuka等,Journal of Antibiotics,33:642-652(1980)),既不影响肿瘤细胞生长，也不影响多核白细胞。见Baba等报导(前述) 。

有关硫酸化多糖、硫酸化昆布糖和葡聚糖(Jolles 等,British Hournal of Cancer,17:109-115(1963)) 的抗肿瘤作用已有许多报导。所述硫酸化多糖包括肝素(Jolles 等,Acta Univ.Int Cancer,16:682-685 (1960);Suemasu等，Cann,61:125-130(1970))。Yamamoto等(Japan Journal of Experimental Medicine,54:143-151(1984))报道，通过进一步硫酸化后，能增强岩藻依聚糖的抗癌活性。该硫化产物对L-1210白血病具有活性作用。作者假定，抗肿瘤作用的机理可能部分是由于抑制了L-1210细胞的浸润性生长的结果。这种浸润性生长是由于肿瘤细胞和间皮细胞间的静电推斥产生的。见Yamamato等(前述) 。另据报道，具硫酸酯基团的多糖为人体T 细胞的促细胞分裂剂和鼠性多细胞株的B 细胞激活剂。见Sugawara等,Microbiological Immunology,28:831-839

(1984)。一般而言，带硫酸基团的大分子量的高聚多糖具有上述性质。见Dorries 等,European Journal of Immunolgy,4:(1974);Sugawara等Cell Immunology,74:162-171(1982)。

据报道，从酵母Saccharomyces cerbisiae 提取的葡聚糖是细胞和体液的免疫调节剂。见Wooles等,Science,142:1078-1080(1963)。多糖还刺激鼠性多能造血干细胞、粒细胞巨噬细胞的集群细胞及形成髓细胞和红细胞群的细胞。见Pospisil等,Experientia,38:1232-1234(1982);Burgalta等,Cancer Research，37:1739-1742(1977)。Maisin等(Radiation Research,105:276-281(1986) 还报导：静脉注射多糖，能保护鼠性性造血干细胞，抗X 射线辐射，从而降低受辐射鼠的死亡率。

Seljelid等(Experimental Cell Research,131:121(1981) 观察到，不溶的或形成胶状的聚糖可活化体外巨噬细胞，而相应的可溶聚糖则不能。他们假定，将聚糖提供给单核吞噬细胞的方式对活化起着决定性的作用。Bogwald 等(Scand、Journal of Immunology,20:355-360(1984)) 确认，聚糖对体外巨噬细胞具有刺激作用。这使作者坚信，聚糖分子的结构或空间排列程度决定着对体外巨噬细胞的作用。从Candicla albicans 中分离提纯的多糖通过人体外周血液淋巴细胞引起体外抗体反应。见Wirz等,Clinical Immunology and Immunopathology,33:199-209 (1984)。正常人与受candida 感染的病人间，血清中的抗念珠菌抗体有显著的差异。见Wirz等报导(前述)。

已观察到多糖和与肽连接的多糖的抗病毒活性。见Suzuki等，Journal Antibiotics,32:1336-1345(1979)。Suzuki等(见前述) 报道了从Lentinus edodes 的培养菌丝体中提取的肽甘露聚糖(KS-2)的抗病毒作用。无论是口服(OP)还是腹内(IP)给药均可使得血清干扰素滴定率峰值增加。该干扰素有保护小鼠免遭病毒感染的作用。它与右旋糖酐磷酸盐(OP-40) 和9-甲基链霉双二硫亚胺(9-MS)的不同之处在于：后两

者只有给小鼠静脉(IV)或腹内(IP)施药时才导致血清干扰素滴定率峰值增加。有关右旋糖酐磷酸盐(DP-40) 参见:Suzuki et al.,Proc.Soc Exp.Biol.Med.,149:1069-1075(1975);有关9-甲基链霉戊二酰亚胺参见:Saito et al.,Antimier.Agent & Chemotherapy, 10:14-19(1976)。

无论是口服证据还是有名望的科学杂志都广泛报道了芦荟凝胶的抗感染作用。Rubel (Cormetics and Toiletries,98:109-114(1983)) 详细讨论了芦荟胶抗感染作用的可能机制。Ukai et al., cJ. Pharmacology Dyn., 6:983-990(1983)) 报道了从几种真菌果实体提取的多糖的抗感染作用。该多糖对由角叉菜诱发的水肿呈显著的抑制作用。另外,其中一个多聚体,O- 乙酰化-D- 甘露聚糖(T-2-HN)对烫痛觉过敏所呈现的抑制作用比保泰松更强(见Ukai等前述) 。鉴于该多糖没有蛋白质和脂质这一事实,就更有力地证实;该抗感染作用只能是乙酰甘露聚糖引起的。其他学者还报道了复合多糖(Saeki et al.,Japan J. Pharmacolgy.,24:109-118(1974)),糖蛋白(Arita et al.,J. Pharmacology,24:861-869 (1974)),硫酸化多糖(Rocha et al., Biochemical Pharmacology,18:1285-1295(1969))的抗感染作用。

在很有名望的科学杂志上连续不断地涌现了许多有关多糖药理和生理作用的文献报道。因此,要说主要成份为多糖的芦荟粘胶握有芦荟医疗作用的秘密也是合理的。该多糖究竟是葡甘露聚糖,甘露聚糖,果胶还是某个其他组合物则由化学纯化步骤来决定。按本发明所述方法加工芦荟,则肯定将部分乙酰化的甘露糖作为具有药理作用的主要多糖而分离出来。Yagi et al.,(Planta Medica,31:17-20(1977))采用稍加改进的提取方法,从Aloe arborescens Miller var .natalensis 中分离到乙酰甘露聚糖(芦荟甘露聚糖) 。但是,Dvodova,(Khim.Prior.Soedin, 83:93833(1975)) 早期分离到的同一芦荟科的主要成份是果胶。

本发明涉及通过物理手段从整个芦荟叶提取芦荟植物中的活性化学

物质的方法。该化学物质基本上是不降解的，并可按规定的数量给药。

本发明还涉及由上述方法加工的芦荟植物中的活性化学性质。已发现，所述化学物质是基本上乙酰化的甘露糖单体的线性聚合物，该聚合物基本上是不降解的，并经过冷冻干燥。较理想的是，通过 β-(1 →4) 键连接的甘露糖单体。所述活性化学物质经分析化学技术测定、标定和表征。

本说明书中所用的术语“活性化学物质”指的是具有治疗则伤和其他作用的芦荟物质。术语“基本上不降解的”是指产物具有如下的性质，即：在两年内，该产物分子量的减少不到5%，并且在两年内保持其95%以上的生物活性。“基本上乙酰化的甘露糖单体”指的是部分或基本上完全乙酰化的甘露糖单体。

本发明的方法是：从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质，该方法本质上至少包括以下步骤：

(a) 用杀菌溶液洗涤芦荟叶，以基本上除去表面上的污物和细菌；

(b) 从所述洗涤过的叶上除去首端部分；

(c) 从经过切割和洗涤的芦荟叶沥出富有蒽醌的汁，保藏，汇集；

(d) 从所述叶上除去外皮，得到基本上无蒽醌的芦荟凝胶带；

(e) 将所述的基本上无蒽醌的芦荟凝胶带研磨并均匀化，得到含有溶解成份的无蒽醌的芦荟汁；

(f) 将水溶性低级脂族极性溶剂加到芦荟汁中，以沉淀出活性化学物质，从而形成多相溶液；

(g) 将水溶性低级脂族极性溶剂和溶解成分除去，分离出沉淀的活性化学物质，和

(h) 将活性化学物质沉淀干燥。

专业人员可以理解到，可采取任何可能的方式从芦荟叶获得含有溶解成分的芦荟汁，然后通过步骤(f) (g) 和(h) 处理该汁，提取活性

化学物质。

实际上，专业人员可理解到，可取代步骤(b)、(c)和(d),将洗过的芦荟叶挤碎，而代替(B),用化学手段渗析被挤碎的芦荟叶，而代替(C)以除去不需要的成份，即：蒽醌、矿物质和酸，以及叶皮，得到基本上无蒽醌的凝胶，然后可通过步骤(e)、(f)、(g)和(h)处理该凝胶，提取活性化学物质。

专业人员还可理解到，可取代步骤(b)、(c)、(d)和(e),代之以将洗过的芦荟叶挤碎，挤出含溶解成分的富有蒽醌的芦荟汁，然后通过步骤(f)、(g)和(h)处理芦荟汁，提取活性化学物质。由于蒽醌和无机离子是水溶性的存在于液体溶剂相中而不沉淀出来，因而通过上述方法可有效地将活性化学物质与蒽醌及无机离子分离。

专业人员还可理解到，可取代步骤(b)、(c)、(d)和(e),代之以研磨洗过的全芦荟叶，滤出纤维性物质，使余物均匀化，得到含溶解成分的富蒽醌的芦荟汁。然后可通过步骤(f)、(g)和(h)处理该芦荟汁，以提取活性化学物质。鉴于上述原因，通过所述方法，可有效地将活性化学物质同蒽醌及无机离子分离。

专业人员可理解到，从芦荟植物叶提取芦荟植物中的活性化学物质的补充方法包括以下步骤：

a)用杀菌溶液洗涤芦荟叶，以基本上除去表面上所有的污物和细菌；

b)从所述芦荟叶除去叶皮，得到芦荟凝胶条；

c)研磨所述芦荟凝胶条并使之均匀化，得到含溶解成分的芦荟汁；

d)将水溶性低级脂族极性溶剂加到芦荟汁中，沉淀出活性化学物质，从而形成多相溶液；

e)从多相溶液中除去水溶性低级脂族溶剂和溶解的成分，分离沉淀出的活性化学物质；

f)将沉淀的活性化学物质干燥。

如上所述，由于蒽醌和离子是溶于水的，并且存在于液体溶剂相中，因而通过上述方法可有效地将活性化学物质同蒽醌和无机离子分离。

本说明书中所说的除去“基本上全部表面污物和细菌”是指(1) 除去污物后，剩余污物应不到芦荟叶重量的0.1%以及(2) 杀死该表面细菌后，剩余的表面细菌的计数为每克芦荟叶不足100 个。

此外，本发明的优选方法可进一步包括超滤步骤，采用超滤法的目的在于调节芦荟汁或芦荟部分的浓度，或进一步降低蒽醌的含量至小于5 ppm,甚至小于0.1 ppm 。

上述这些步骤使得加工者能够采用大芦荟叶或小芦荟叶(甚至不到一周岁),因为成熟芦荟叶中所含的聚合物胶料可选用较小的未成熟的芦荟叶加工而得到。

本方法的优点之一在于：可加工处理已受到破坏的芦荟叶，即由于大风或不良的采集技术造成的先前被认为不可用的芦荟叶，并且可将不希望有的污物透析掉。

所述超滤(渗析) 步骤具体表现为，薄膜技术，即，根据切割下来的芦荟叶的具体情况，选择具有不同大小孔径的滤膜，以实现以下的任一组合：

(1) 小孔径滤膜(最好大约为100 道尔顿),它可从芦荟凝胶中分离出水和盐。

(2) 大孔径滤膜(最好大约为500 道尔顿),它可从芦荟凝胶中分离出酸。

(3) 孔径更大的滤膜(最好大约为2000道尔顿),它可从芦荟凝胶中分离出黄汁成分。

(4) 孔径还要大的滤膜(最好大约为10,000-100,000道尔顿),它可按分子量大小分类凝胶聚合物，并将他们分开。

较为可取的是采用Romicon 4-柱(Romicon Co.,100 Cummings Park,

Noburn,MA 01801,No.HF4 SSS型，薄膜型PM 50,薄膜Nos.H526.5-43-pm 50)作为超滤装置。

作为一个补充优选实施例，所述方法的洗涤步骤包括：用滚动型洗涤机洗涤所述的基本上无蒽醌的芦荟凝胶带，然后研磨。

在实施上述从芦荟凝胶提取活性物质的所有方法中，均发现有少量有机物和无机物与产品同时沉淀。大部分无机盐是草酸钙。为保证产品的稳定性和有益于健康，应消除存在的无机盐（例如草酸钙),或者至少将其含量减少到最低量。现在，令人惊奇地发现，加入有效量的无机酸，将凝胶的pH值调至大约3.0 至3.5,然后加入醇，可使产品中的草酸盐和其它无机盐的含量降低。因此，在实施上述所有方法时，即从芦荟植物叶中提取其活性化学物质时，最好将凝胶的pH值由3.0 调节到3.5,然后加入醇。

较为理想的是，在实施上述所有由芦荟植物叶提取其活性化学物质的方法时，将四体积的水溶性低级脂族极性溶剂加到一体积的芦荟汁中，以沉淀出活性化学物质。优选的水溶性低级脂族极性溶剂是甲醇、乙醇和丙醇。最佳的溶剂是乙醇。专业人员可以理解到，可用其他水溶性低级脂族极性溶剂代替所述优选溶剂，只要能将活性化学物质从中沉淀出即可。

在实施上述提取方法时，最好用四小时时间，使活性化学物质从水溶性低级脂族极性溶剂和芦荟汁的混合物中析出。经测定发现，用四小时时间使混合物沉淀，活性化学物质的收率最高，并且，在四小时后，析出的活性化学物开始降解。经测定还发现，在24小时的沉淀后，收集到大量活性化学物质。专业人员可以理解到，最佳的沉淀时间取决于周围温度和压力，以及水溶性低级脂质极性溶剂的性质。

另外，在实施上述提取方法时，最好采用冷冻干燥法而不用烘箱干燥法，将析出的活性化学物质干燥，因为加热可能会促进活性化学物质

水解或降解。

在实施上述提取方法时，通过水溶性低级脂族极性溶剂，还能沉淀出芦荟汁中的纤维性物质（纤维素），但随着溶剂的加入，它先沉淀，且其密度低于活性化学物质。在活性化学性质沉淀后，纤维性物质存在于溶剂表面，因而可相当方便地除去。专业人员可以理解到，可代之以过滤芦荟汁，以便在加入溶剂前，先除去纤维性物质。

更理想的是，在实施上述所有方法时，从田野里收集足够清洁的芦荟叶或整个植物，以省去洗涤步骤。

可通过γ或微波射线辐射经过干燥的沉淀活性成分，从而将所述活性化学物质消毒和防腐保藏。

因而，可以认为，本发明提供了生产芦荟产品的新颖改良法。

还可认为，本发明提供了加工芦荟植物叶的改良法，该方法可避免这类植物叶的具有特殊性能的部分的不理想的组合或混合。

另外，本发明提供了制备芦荟植物叶的各种提取物的改良法，该方法可使最终提取物中不需要成分的浓度减到最低。

另外还可认为，本发明提供了制备芦荟植物叶提取物的新颖改良法，该方法可使植物叶的特殊部分的特有成分的浓度最高，同时使植物叶的其它部分的特有成分的浓度减少到最低或消除。

此外，本发明提供了从芦荟植物叶制备提取物的新颖改良法。所述植物叶中黄汁浓度较低。

最后，本发明提供了从芦荟凝胶提取活性化学物质的方法。该化学物质可用作无毒的免疫刺激剂，下文将把该物质称为Carrisyn® 提取物或acemannan 。如上所述，acemannan是基本上乙酰化的甘露糖单体的基本不降解的冰冻干燥的线性聚合物。它可通过分析化学技术来标定和表征。

图1 和图2 是芦荟叶的切开部分。

图3 是实施本发明方法时采用的优选芦荟叶洗涤装置示意图.

图4 是用于切开和浸泡芦荟叶的优选装置示意图.

图5 是用于将芦荟部分切割成条及用于粗磨的优选装置示意图.

图6 是用于充分均匀化及过滤的优选装置示意图.

图7 是用于很好地分离加工的芦荟物质的优选透析设备示意图.

图8 所示的是在不同pH条件下Carrisyn® 提取物的两个样品的红外光谱图.

图9 是Carrisyn® 提取物的差示温谱图.

图10是被草酸钙污染的Carrisyn® 提取物的差示温谱图.

图11是Carrisyn® 提取物的特性示意图.

图12是水溶性多糖标准品的筛析色谱图.

图13是Carrisyn® 提取物的筛析色谱图.

图14是经非蛋白的酶处理的Carrisyn® 提取物的红外光谱图.

图15是经蛋白酶处理的Carrisyn® 提取物的红外光谱图.

图16是Carrisyn® 提取物的差示温谱图.

图17是葡萄糖、半乳糖、甘露糖和肌醇的标准品混合物的HPLC色谱图.

图18是Carrisyn® 提取物的HPLC色谱图.

图19是鼠李糖、岩藻糖、阿戊糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖和肌醇及其糖醇乙酸酯标准品混合物的气液色谱(GLC) 图.

图20是Carrisyn® 提取物的气液色谱图.

图21是以acemannan 为对照甘露糖/ 肌醇之比率的标准曲线.

图22是Carrisyn® 提取物的部分甲基化和部分乙酰基化的糖醇的总离子色谱图.

图23是Carrisyn® 提取物的部分乙酰化的糖醇的质谱图.

图24是部分甲基化的甘露糖醇乙酸酯的分子结构图.

图25是在质谱分析过程中甲基化的甘露糖醇乙酸酯的碎片离子图。

已发现并已得到公认，黄汁的各部分和内凝胶的各部分各具有其独特的特性，因此，从中得到的提取物的用途也有着潜在的区别。下面简要地列出它们的区别、某些特性以及潜在的用途。

部　分	附属部分	用　　途
黄汁	(1) 沉淀物	轻泻剂、抗真菌剂、抗生物剂、杀虫剂和防晒剂
	(2) 上层清液	保护粘膜作用，防晒
内凝胶基质	(1) 粘胶	渗透剂、降低变态反应的药物、增水剂
	(2) 凝胶带	防溃疡剂、细胞刺激增水剂、治创伤治疗剂
	(3) 间隙纤维	天然防腐剂、止血剂
	(4) 残余基质	细胞生长促进剂
外皮		杀虫剂、驱虫剂、纸浆纤维

根据上述公知的常识，并且为使最终提取物中所需成分的质量和浓度能满足使用的要求，本发明方法主要涉及将芦荟植物叶分成特殊部分和上述附属部分，然后将上述附属部分中的特殊成分分离。通过以下详细说明，可更容易地理解所述方法的具体细节和特征。本发明还涉及通过上述方法分离得到的特殊成分。

由本发明方法制备的产品最好取自野外生长的芦荟植物的成熟矮叶的外侧部分。一般来说植令为两年的植物是成熟的；然而，植令为四年或五年的植物的宽叶一般含大量所希望的提取物，并且较易处理。生长于Rio Grand Valley of Texas 植令为四年或五年的Aloe barbadensis Miller叶最为理想。这些芦荟叶一般重约为1磅-2磅。根据具体用途或所期望的具体产品的不同，可将芦荟叶从芦荟植物上切割下来后，立

即对叶子进行加工，或者，在加工前，于迁宜的条件下将其储藏一段时间。此外，芦荟叶各种成分的浓度受到叶子本身所经受的不同季节和环境的影响，所有这一切因素应根据植物提取物的特定用途来加以考虑。

应将靠近植物底部的芦荟叶摘下或切割下来，最好在加工前芦荟叶的任何部分未遭破裂或损坏。较理想的是，用不到6 英寸长的小刀（例如可折合的小刀），在紧挨着主基之上的底部位置切割芦荟叶，将叶子从主茎上削下来，以避免澄清的细胞凝胶渗漏，或避免凝胶被黄汁沾染。叶子的破裂或擦伤会导致叶中所含各部分和其中的各成分相互混和。

将叶子从植物上取下之后，一般用温和的手段擦洗，或用适宜的清洗剂溶液（例如由得克萨斯州达拉斯的York Chem Co. 销售的OLYMPIC POOL CHLOR 65®）喷淋，清洗叶子。在某些情况下，借助于软刷进行清洗。清洗之后，用清水充分冲洗叶子，除去残留的清洗剂。

用尖锐小刀仔细切割，除去叶子下端的白色或浅色的部分及其上端部分。可分别处理上述部分（实际上这两部分组成了叶子的两端），以便从中获得黄汁，进而制备具有上述黄汁特性成分的产品。

然后，将芦荟叶的剩余部分横切成短小碎片，最好为半英寸长，并将碎片呈垂直方向放入高渗、等渗或低渗的水溶液（最好是去离子水）中，使黄汁从碎片中排出来。另外，为收集黄汁，供具有上述特性的其他制剂用，可将碎片呈垂直方向置于干燥的收集容器，最好是具不锈钢丝网底的不锈钢容器，以便排流与叶子接触并透过叶子的水。

按此方式，将碎片排水大约二十至三十分种。该切开的碎片最终会封口而停止渗流。在静置适当的一段时间后，收集到的黄汁便分离成两部分，即沉淀物和上层清液。黄汁可用来制成良好的防晒剂涂于皮肤（无伤口的皮肤）上，并可给皮肤带来棕褐色，此外，该黄汁还用于制备轻泻剂。

在完成了将黄汁从切开的芦荟叶碎片中提取出来的步骤后，利用合

适的设备，例如金属丝切片刀或削皮刀，削去芦荟叶碎片的外皮和外皮下层。可将芦荟叶碎片冷冻，以利于该去皮步骤的进行。削皮之后，剩余部分为内凝胶基质部分（凝胶带），检查该部分，并用手工检去粘着的皮或污染的部分，以消除其中残余的黄汁。用中度水流喷洗，最好是去离子水（且无酒精），或者将凝胶基质部分浸在流动的清水中，除去黄汁残余物。

然后可将所得凝胶条（内凝胶基质）沥水大约一小时。在沥水过程中，通常在凝胶基质的外表面上形成粘液层，该粘液层通过重力可收集到，或者借助于如离心之类的手段促进收集。收集积到的粘液即是以上所述的粘胶部分。

然后可将条形的凝胶基质的剩余部分碾碎、切碎或混合，以破碎其中的间质纤维；或者将凝胶基质带挤压通过金属丝网或滤网，使其成液体。然后将所得液体均匀化。另外，可将凝胶基质带冷冻和融化，然后混合，得到含有纤维的液态物质（该物质构成了以上所述的凝胶带）。然后过滤该液体物质，得到间质纤维部分，滤过的是上述的残余基质部分。

由此得到的均化提取物的pH值约为4 或5，较为理想的是4 。

上述方法中的所有步骤均在室温下进行。

图3 至图7 更为详细地提示了本发明方法的优选实施例。具体地说，图3 显示了用于洗涤芦荟叶的装置。采用芦荟叶洗涤设备A(Texas Harlington，Thompson Manufacturing Company 出品)，将植物叶预先浸泡于大桶4 。然后用人工将整个叶子 a放在传送带8 上，通过传送带8 将叶子移至两个刷子9a和9b下面。通过链条7 和滑轮6 驱动传送带8 。其中链条7 是通过马达的另一端旋转的；滑轮6 从储槽5 伸出，储槽5 同样是由Thompson制造公司提供的。在刷洗芦荟叶时，当芦荟叶通过第一个刷子9b后，在传送带8 末端10检查之。即：由传送带8 的末端处肉

眼检查叶子，确定其是否足够清洁。若叶子的清洁度不够，则将其置于槽12作进一步洗涤；若叶子的清洁度够，则将其放在向上移动、具有间隔13的传送带B 上，经13可用喷淋装置11喷出的自来水进一一步洗涤芦荟叶。所述传送带B 是Texas 州Seagoville的Dallas Mill Wright Co. 提供的。清洗喷淋装置11是由Texas 州Seagoville的Key Plumbing提供的。不锈钢槽12是由316 号不锈钢制成的，并且由Texas 州Dallas的National Sheet Metal公司定制。

洗涤之后，如图4 所示，切割和浸泡芦荟叶。在向上移动通过传送带B 的间隔13之后，经过清洗的芦荟叶原料落在浅盘14上。浅盘14上设置有供除去废料用的孔15。浅盘14是316 不锈钢制成的切割和浸泡装置C 的一部分（由Texax 州Dallas的National Sheet Metal Company提供）。所述设备是定制的。在浅盘14上，经手工切下芦荟叶的两端，将切下的尖端和粗端经过孔15置于废物贮器中（图中未显示）。然后，将经过切割的叶子 β堆在若干不锈钢蓝16的任何一个中。所述不锈钢蓝有不锈钢制成的金属丝网底。所述蓝16置于不锈钢轨道内，形成梯形漏斗17的尖端部分，由此黄汁从芦荟叶底部经蓝沥出，滴入漏斗17的底部部分。每隔一定时间取去黄计，冷冻保藏。沥出黄汁的步骤约需30分钟。

完成这一步后，用手工方式将仍留在蓝16中的切开芦荟叶 β移至紧靠梯形漏斗17的水槽18。水以逆流方向由进水管19(19 距梯形漏斗17最远）进入水槽18，接着通过紧靠梯形漏斗17的出水管20排出。朝着背离梯形漏斗17的方向，用手移动装有芦荟叶的钢蓝，使其慢慢通过水槽，钢蓝停留在水槽18中洗涤约一小时。

洗涤之后，将蓝放在托盘21上进行干燥，时间仅持续几分钟。此外，图4 中与蓝有关的整个装置（包括金属丝网、黄计浸沥和自动洗涤设备）是由316 不锈钢制成的，该不锈钢由Texas 州达拉斯的National Sheet Metal 公司定制。

洗涤之后，如图5 所示，将堆在托盘21上的蓝16内的切开芦荟叶 β 移至供进一步切割成小条的区域。从小条上除去叶皮22，留下的基本上只是清洁的原料。将削下的皮22废弃。然后将小条上置于输送盆23，将其送至粗研磨装置D 。所述输送盆23是由Texas 州Dallas的National Sheet Metal Company 生产的316 号不锈钢制成的。所述研磨装置的型号为No.5150-N-Sink-erator(Watson Food Service Industries,Inc., Dallas,Texas)。经研磨装置D 粗磨之后，由研磨装置送出的经加工的原料r'流至容量为100 加仑的可移动的槽E,该槽包括由316 号不锈钢制成的直立的独立壳体(由Perma-San 生产，通过Texas 州Dallas的Van Tone公司分销)。采用Perma-San 搅拌器(型号为No.AAPHZ，同样通过Texas 州Dallas的Van Tone公司分销),于槽E 中搅拌经过粗磨的小条r'。

经过初步均化后，将来自槽E 的原料引至分离工段供进一步均化和(任意的) 过滤。图6 中，来自槽E 的原料被泵过泵26进入精细均化器F 。泵26系Texas 州Dallas的Crepaco 公司提供的离心泵，型号为No.4V-81,由不锈钢制成，并且泵26由Ohio州Cleveland 的Reliance Electric公司出产的Reliance马达(型号为B76Q2139M-VF) 驱动；所述均化器F 系Texas 州Dallas的Crepaco 公司出产，其型号为No.3DD13。原料经充分均化之后，将其送至容量为1000加仑、由不锈钢制成的直立型独立壳体混合槽G(制造商为Perma-San,通过Texas 州Dallas的Van Tone公司分销)。采用Perma-San 搅拌器26a(Perma-San,型号为AAPH2,经Texas 州Dallas的Van Tone公司分销),搅拌该充分研磨的小条△。将槽G 中的原料△送至泵27A 。27A 与过滤器27B 形成一个单元，以便通过废料排管28除去浆液。泵27A 和过滤器27B 构成Lomart硅藻土过滤器(型号为No.99-2138，由Texas 州Dallas的Allen Recreation公司分销) 的一部分。然后，过滤的原料被泵入槽H,槽H 类似槽E,具有盖25。

图7 中，通过混合器29搅拌滤过的细磨小条△，并被泵30将其泵入

透析器。混合器29是Perma-San 搅拌器（型号为AAPH2），经Texas 州Dallas的Van Tone公司分销。泵30是优等不锈钢型SCS45 工序泵（Superior Stainless 公司，Delavan，Wisconsin）。与工序泵30御接的是由4450rpm 的Baldor马达组成的3 马力的马达30a 。所述Baldor马达由Baldor Electric 公司生产（地址:Ft .Smith Arkansas，产品目录编号为No .CM3559T）。过泵30的原料通过透析装置J（由Massachusetts 州Woburn的Romicon 公司制造的Romicon 型HF4SSS超滤系统），装置J 具有4 个过滤器31（图中未显示），每个滤器设置在过滤器外壳32内。原料垂直流至一定位置，在此部分原料通过分离管34进入分离排出管35。其余未分离的原料通过循环回流管33返回到透析装置中，或者，通过分离回流管36返回槽Ⅰ。

根据所期望的芦荟部分及最终产品的具体要求，可在加工后通过分离排出管35或在槽Ⅰ中获得所期望的原料。例如，若要除去过量的水和无机物，则可采用孔径小的超滤器，以除去水和无机物，并通过管35排出；而所期望的芦荟部分则返回槽Ⅰ。仅仅使槽Ⅰ中的芦荟液循环通过透析装置，重复上述过程多次，直至除去所期望量的盐和水为止。这一过程可包含一个以上的透析步骤。例如，如前所述，可在第一个透析步骤中除去盐、低分子量的酸和不需要的葸醌。不需要的原料可通过分离排出管35排出；而需要的部分回到槽Ⅰ。采用（购自Romicon 公司的）孔径为10,000道尔顿的超滤器实施上述步骤。接着，用50,000道尔顿的超滤器（同样购自Romicon 公司）取代10,000道尔顿的超滤器，重复透析过程。该透析过程将凝胶基质聚合物分离成两部分，第一部分包括10000 至50000 道尔顿的凝胶基质聚合物，该部分通过分离排出管35排出；第二部分包括大于50,000道尔顿的凝胶基质聚合物，该部分返回槽Ⅰ。根据要从原料液中除去盐和水的量，上述过程可持续若干分钟至若干小时。

图7 中，分离回流管36由聚乙烯管（食品级）制成，由Texas 州Dallas的Texas Rubber Supply Company 提供。分离排出管35是由Texas 州Dallas的Van Tone公司分销的316 号不锈钢管。

然后处理残余的基质附属部分，以分离、析出并纯化其中的活性化学物质acemannan 。为从残余基质附属部分分离acemnnan，将过量水溶性低级脂族极性溶剂加到该残余基质附属部分中。Acemannan 开始从该混合物中沉淀。使溶液放置足够的时间，以便使尽可能多的活性成分从溶液中析出，但沉淀时间不能长至acemannan 开始降解。沉淀后，将上层清液倒去，或通过虹析管抽出但不要抽出沉淀物。然后将沉淀物和剩余溶液置于适宜的离心机中，收集沉淀物。离心后，将上层清液轻轻倒出和弃之。任意地，用新鲜的水溶性低级脂族极性溶剂洗涤沉淀物，再离心，并将上层清液再废弃。然后将得到的沉淀物冰冻干燥，使之干燥过夜。所得产物为基本上不降解的冻干acemannan 。可以将所得产物研磨成粉末。较理想的是，先将适宜的酸加到芦荟凝胶中，然后加入低级脂族极性溶剂。加入酸是为了溶解芦荟凝胶中所含的草酸钙，以便于除去之。最好加入足够的量酸，以溶解草酸钙杂质，同时又不使acemannan 聚合物链降解。

一个分离和析出acemannan 的可供选择的方法包括以下步骤。

从靠近植物底部的位置摘取或切割野外生长的成熟芦荟植物叶，最好在加工前使叶子的任何部分不受到破损或损坏。最好在紧挨着主茎的植物底部切割叶子，并将其从主茎上削下，以避免透明的细胞凝胶的渗漏，或被黄汁污染。

在将叶子从植物上割下之后，将叶子的粗端和尖端部分切去，并去皮得到上述的条状物。

然后将所得带（内部凝胶基质）碾碎、切碎或混合，以破坏其中的间质纤维，或者可使该内部凝胶基质通过金属丝网或滤网，使其液化。

然后将液化的内部凝胶基质均匀化。所得的均匀化提取物的pH值大约为4 或5,较理想的是约为4 。然后过滤该均匀化的提取物，以除去间质纤维。处理该经过均匀化和过滤的提取物(按类似于上述处理残余基质附属部分的方式进行处理),以分离和析出acemannan 。

用于分离和析出acemannan 的补充及优选方法包括以下步骤。

从靠近植物底部的位置摘取或切割野外生长的成熟芦荟植物叶，最好在加工前使植物叶的任何部分不受到破损或损坏。最好在紧挨着主茎的植株底部位置切割植物叶，将其从主茎上削下，以避免透明的细胞凝胶的渗漏，或受黄汁的污染。

然后，可通过适宜的装置，例如由Texas 州Harlingen 的Thempson制造公司生产的“Thompson芦荟挤压机”，将植物叶压碎，挤出芦荟汁。接着可按类似于上述处理残余基质附属部分的方式，处理所挤出的芦荟汁，以分离和析出acemannan 。

上述方法的所有步骤均在室温下进行，只是冰冻干燥步骤最好在约-50℃下进行。

在阅读了上述一般描述之后，本领域的专业人员显然可以对所公开的方法和本发明的组合物作出各种改良，以及其提出各种替代物，变换物和等同物。以下实施例仅用于说明、而不是限制所附权利要求书的范围。所述权利要求书复盖了所有过类变更、等同或变换物。

实施例1

分离和析出acemannan 的方法

A.准备工作:

1.用50% 的异丙醇(IPA) 溶液清洗预先已经洗过的桶、混合器和设备，用去离子的热水冲洗，以除去IPA 。

2.用5%含氯的游泳池消毒液“HTH ”清除泵和与之御接的皮带管中的污物，然后用水洗涤。

3.用50% 的异丙醇溶液清洗泵和与之御接的皮带管。用去离子热水洗涤泵和与之御接的皮带管，直至除尽异丙醇为止。

4.用50% 异丙醇溶液清洗均化器和与之御接的皮带管以及泵。用去离子热水洗涤均化器和与之御接的皮带管，直至除尽异丙醇为止。

将取自Rio Grande流域的barbadensis Miller芦荟叶于收集后八小时内用40至45°F 的冷藏车运输，并在40至45°F 的冷藏条件下保藏至进行提取处理为止，以减少降解。

将二十至六十磅储藏的叶子在室温下置于含次氯酸钙水溶液的预洗池中，基本上除去叶子表面的污物和杀死叶子表面上的细菌。将大约0.125 克98% 的次氯酸钙加到一升的水中，制成含50ppm 游离氯的次氯酸钙水溶液。将芦荟叶在预洗池中浸泡约五分钟。

接着，将基本上无污物和细菌的芦荟叶置于Texas 州Harlingen 的Thompson制造公司生产的“Thompson芦荟洗涤器”的卧式传送带上。“Thompson芦荟洗涤器”用室温水洗涤芦荟叶，除去芦荟表面的污物和次氯酸钙水溶液。此外，有必要的话，用肉眼检查叶子，并人工擦洗之，以去除叶上残留的所有表面污物。然后用室温水漂洗该芦荟叶。

从叶上切去尖端和粗端部分，将叶子置于不锈钢蓝式容器中，这些容器一起设置在一漏斗形的不锈钢收集器的顶部上，每一容器均具有网底。使黄汁从芦荟叶中渗出约30分钟。该黄汁通过不锈钢蓝的网底，被漏斗形的收集器收集。

将盛有芦荟叶的不锈钢蓝从收集器上移出，并浸入第二个不锈钢容器中，冲洗约三十分钟至一小时。所述第二个不锈钢容器中含有水平流动的室温冲洗水。在冲洗时，逆着水流方向，用于将钢蓝慢慢地从容器的一端移向另一端。这样，可进一步使黄汁从芦荟叶中排出。然后将芦荟叶浸泡30分钟，

从水中取出芦荟叶，用小刀或金属丝干酪切片刀除去芦荟叶的皮，

得到芦荟凝胶小条。用肉眼检查此芦荟凝胶小条，将已被特有的黄色污染的芦荟凝胶小条或小条污染部分废弃。根据芦荟叶的大小和具体状况的不同，未受污染的芦荟凝胶小条的总量为起始芦荟叶量的20% ～60% 。

将未受污染的芦荟凝胶小条放入一个能处理有750 个座位的餐厅的废料的不锈钢处理装置中，将凝胶小条粗磨成粘稠的粒度均匀的，但能自由流动（ 粗均化）的液体。所述不锈钢装置是由WI,Racine 的Emerson Electric Co.的N-sink-erator 部门制造的，型号为:No. SS-150-13,系列号为No.115132 。

然后将粗磨的芦荟凝胶小条粘稠液转到一个100 加仑的不锈钢储槽。该储槽是由Michgan 州Belding 的加工设备公司制造的，型号为No. 100 加仑OVC,系列号为No.40865-3。

将粗磨的芦荟凝胶小条溶液由储槽抽至均化器。该均化器是由Illinois州chicago 的Crepaco Food Equipment and Refrigeration，Inc.制造的，系列号为No.04-03。该均化器在乳制品加工中一般用于均化牛奶。在大约1500psi 压力下，将粗磨的芦荟凝胶小条溶液充分地均化。

将充分均化的芦荟凝胶带溶液从均化器抽至不锈钢储槽。该储槽是由Michigan州Belding 的加工设备公司制造的，型号为No.1000 加仑OVC,系列号为40866-2 。经过均化的芦荟凝胶带溶液的总量为起始芦荟叶量的20% 至60% 。如需要时，可用超滤法透析该均化产物。

接着，将该充分均化的芦荟凝胶条溶液过滤（ 用型号为DE-48 的Leslie's硅藻土滤器),除去间质纤维。将间质纤维本身代替硅藻土用作过滤介质，该纤维由尼龙网布过滤支座支撑。用几分钟时间将凝胶液泵过过滤器，然后打开出口门，这样便有足量的纤维堆积而构成过滤介质。

然后，将二十加仑经过过滤的芦荟凝胶带溶液泵入100 加仑的槽中，并且将80加仑190 号标准的未变性乙醇（ 乙醇,190 proof,U.S.P.

punctilious,54 gal.Batch I.D.#CT185J04，通过美国工业化学品公司获得，该公司地址是:P.O.Box218,Tuscola,Illinois 61953）加到芦荟凝胶带溶液中。用Perma-San 螺旋浆搅拌器（型号为#AAPGF-4A,由Michigan州Belding 的加工设备公司制造),将溶液搅拌20至30分钟。

此后，立即将醇-凝胶溶液移至若干直径为10½"、高为8"的11夸脱的18-8不锈钢锅中(Bloomfield Industries Inc.,Chicago,Illinois制造，可通过Watson Food Service Equipment and Supplies获得，其地址是3712 Hagger Way,Dallas,Texas）。

接着，使醇-凝胶溶液沉淀约四小时。

倒去澄清的上清液，或用虹吸管仔细吸出，不要影响沉淀物。将沉淀物和剩余溶液移至四个1 品脱的不锈钢离心桶，每个离心桶中约含500g沉淀物和剩余溶液。此后，将桶以2000×g 的转速离心约10分钟。采用IEC Centra-7离心机(International Equipment Co.制造，其地址为:300 2nd Avenue,Needham Heights,Massachusetts 02194,可以通过American Scientific Products获得，其地址为:Box,1048,Grand Prairie,Texas 75050)。

离心后，将上清液倒出并废弃。然后用新鲜的190 号标准的未变性乙醇洗涤沉淀，再以2000×g 的转速离心约10分钟。离心后，再将上清液废弃。

将沉淀移至若干600ml 的VIRTIS冷冻干燥缸中，并于液氮中回荡至冷冻。然后将该冷冻干燥缸与冷冻干燥装置连接。所述冷冻干燥装置包括:Welch Duo-密封真空泵（型号No.1402,可以Sargeant-Welch获得，该公司的地址为:P.O.Box35445,Dallas,Texas 75235)；Virtis浸液蛇管冷却器（型号为No.6205-4350冷却器，干丙酮浴中）和Virtis 18 port真空歧式歧管（型号No.6211-0350）。所有Virtis设备均可从American Scientific Products 公司(P.O.Box 1048,Grand Prairie,Texas

75050)获得。用维持在 -50℃的丙酮充满冷冻干燥的鼓，将样品冷冻干燥过夜，然后将其放在Mettler AE 163天平上称量。冷冻留下的样品便是基本上不降解的冻干Carrisyn® 提取物。从20加仑芦荟凝胶得到的产量约为145 ～155g Carrisyn® 提取物。

实施例2

分离和析出acemannan 的方法

将取自Rio Grand 流域的barbadensis Miller芦荟叶于采集后八小时内用40至45°F 的冷藏车运输并在40至45°F 的冷藏条件下保藏至进行提取处理为止，以减少降解。

除去叶上首尾部分。然后用锋利小刀或金属丝干酪切片刀除去叶的外皮，得到芦荟凝胶带。

然后将芦荟凝胶带置于可处理具750 座位的餐厅的废料的不锈钢处理装置中，该装置将小带粗磨成粒度均匀、粘稠的、但可自由流动的（初步均化的）液体。该不锈钢处理装置是由WI州Racine的Emerson Electric公司的N-sink-erator 部门制造的，型号为No.SS-150-13，系列编号为No.115132 。

经过粗磨的芦荟凝胶液被转到100 加仑的不锈钢储槽。该储槽是由MI州Belding 的加工设备公司制造的，其型号为No.100加仑OVC,系列编号为No.40865-3。

将粗磨的芦荟凝胶带溶液由储槽抽到均化器。该均化器是由Illinois州芝加哥市的Crepaco Food Equipment and Refrigeration, Inc.制造的，系列号为No.04-03。该均化器乳制品加工中用于均化牛奶。在1500 psi的压力，将粗磨的芦荟凝胶溶液充分均化。

将充分均化的芦荟凝胶溶液由均化器抽到不锈钢储槽中。该储槽是由MI州Belding 的加工设备公司制造的，型号为1000加仑OVC,系列号为No.40866-2。经过均化的芦荟凝胶溶液的总量为原料芦荟叶量的20% 至

60% 。根据需要，可用超滤法透析该均化产品。

用Leslie硅藻土过滤器（型号:DE-48),将均化的凝胶液过滤，除去间质纤维。将间质纤维本身代替硅藻土用作过滤介质，用尼龙布支撑住纤维。用几分钟时间将凝胶液泵过过滤器，然后打开出口门，以便有足量的纤维聚积形成过滤介质。

然后，将二十加仑凝胶液泵入100 加仑的槽中，并将80加仑190 号标准未变性乙醇(Ethyl Alcohol,190 proof,U.S.P.,punctilious, 54gal.Batch I.D.#CT185J04,通过美国工业化学品公司获得，该公司的地址是:P.O.Box218,Tuscola,Illinois 61953）加到芦荟凝胶溶液中。用Perma-San 螺旋式搅拌器（型号为#AAPGF-4A,由MI州Belding 的加工设备公司制造）将溶液搅拌20至30分钟。

立即将醇- 凝胶溶液送至若干直径为10$\frac{1}{2}$" 、高为8"、由18-8不锈钢制成的11夸脱的锅里。所述的锅是由Illunois 州芝加哥市的Bloomfield工业公司生产的，可通过Watson Food Service Equipment and Supplies获得，其地址是:3712 Hagger Way,Dallas,Texas)。

然后，将所述的醇- 凝胶溶液沉淀大约四小时。

接着，倒出或用虹吸管抽出澄清的上清液。细心操作，不要影响下面的沉淀物。然后，将沉淀物和剩余溶液移至四个1 品脱的不锈钢离心桶里，每桶里移入500g沉淀物和剩余溶液。接着，用IE(Centra-7 离心设备，以2000×g 的转速将桶离心大约10分钟。所述离心设备是由International Equipment Co. 制造的，其地址是:300 2nd Avenue, Needham Heights,Massachusetts 02194,该设备可通过American Scientific Products购得，其地址是:P.O.Box1048,Grand Prairie, Texas 75050 。

离心后，倒出上清液并弃之。然后，用新鲜的190 号标准、未变性乙醇洗涤沉淀，并以2000g 的转速，再次离心大约10分钟。离心后，将

上清液废弃。

将沉淀移至若干600ml VIRTIS冻干缸中，在液氮中回荡，直至冻结。然后将冷冻的缸与冰冻干燥装置连接。该冰冻干燥装置包括:Welch Duo-密封真空泵(型号为No.1402,可以Sargeant-Welch获得，其地址是:P.O.Box 35445,Dallas,Texas 75235)、Virtis浸液蛇管冷却器(型号为No.6205-4350，于丙酮浴中的冷却器)和Virtis 18 Port真空鼓式岐管(型号为No.6211-0350)。所有Virtis设备均可通过American Scientific Products购得，其地址是:P.O.Box 1048,Grand Prairie, Texas 75050。对该冰冻干燥的缸充以 -50℃的丙酮。

使样品干燥过夜，并在Mettler AE163 秤上称重。干燥后留下的样品便是基本上不降解的冻干的Carrisyn® 提取液。从20加仑芦荟凝胶中获得的Carrisyn® 提取液大约为145-155 克。

实施例3

标准实验室规模的分离和提纯Carrisyn® 提取物的方法

用水洗涤大约50磅barbadensis Miller芦荟叶，并刷去污物、干燥胶乳和其它污染物。然后除去芦荟叶的外表皮，将全部小条置于大烧杯(在冰上)中。

将芦荟小条装入 1.5升批量的Waring搅拌器中。于室温下将小条高速搅拌两次，每次两分钟。然后将搅拌混合的小条于 4℃下冷却，以便在搅拌时产生的泡沫消失。

然后，将混合的芦荟汁滤过四层棉布(Cleveland棉)，以除去纤维素性的浆体。然后使滤液通过六层棉布，收集到大约 4升的芦荟汁。

接着，将芦荟汁置于五加仑的大不锈钢容器内。将16升的冷冻乙醇(Fisher乙醇试剂级，目录编号No.A995)加到过滤的芦荟汁中。缓慢地加入乙醇，同时搅拌芦荟汁。形成絮凝状的沉淀物，将该混合物搅拌15至30分钟，并于室温下使之沉淀大约两小时。

倒掉上清液，将沉淀置于小混合器中（该混合器中加有一升的去离子水）。以低速将混合物搅拌几分钟，以洗涤沉淀，然后将该混合物置于八升的nalgene 容器中。向该混合物中再加入四升乙醇，并将该混合物搅拌30分。将形成的沉淀物静置约两小时。

然后倒掉大部分的上清液，于室温下，以2000×g 的转速将沉淀物离心20分钟，以便使沉淀物成团，有利于出上清液。

将沉淀团置于冰冻干燥烧瓶中，用Virtis冷冻干燥装置冷冻干燥过夜。

冻干的粉末重10.9g 。百分收率为0.273%或2.73×10^{-3}g/ml 。

实施例4

降低芦荟提取物-Acemannan中草酸钙污染物的方法

在用醇从芦荟凝胶中提取acemannan 的过程中，可发现少量有机物和无机物与产品一同沉淀。大部分无机盐及提取acemannan 的芦荟凝胶醇提物中出现的主要污染物是草酸钙。通过光学显微技术红外显微技术和热重量分析法，可证实草酸钙的存在。虽然各批中草酸钙的数量可能不等，但已观察到，草酸钙占全部提取物重量的30% 。实施例4 中所述方法的目的在于降低acemannan 中的草酸盐含量。草酸钙极难溶解于水和醇。通过用醇处理芦荟凝胶，将Carrisyn® 提取物沉淀物中的草酸钙浓缩。草酸盐的浓度可通过下述方法测定：其一，Carrisyn® 提取物在1600-1587cm 处的强烈红外吸收，（草酸盐的羰基的不对称振动）；其二，采用热重量分析法测得的Carrisyn® 提取物的高灰分含量。由于Carrisyn® 提取物中的活性物质是acemannan ，因此，为保证产品质量的稳定性及健康起见，应消除诸如草酸钙之类的无机盐，或至少使其含量达到最低。

分离草酸盐和其它无机盐的一个方法是薄膜透析法。然而，这种方法具有许多缺点和不利之处。由于粗制的Carrisyn® 提取物必须于醇中

被再水合、再提取，并且必须再冻干，因此所述方法非常耗时。最重要的是，在透析步骤中，除非对产品进行防腐处理，不然，微生物降解和破坏会使Carrisyn®提取物失去活性。

一般情况下，用稀无机酸处理时，羧酸盐可转化成其相应的酸。按以下反应机理，用盐酸处理草酸钙，可产生草酸和钙盐。所述反应为：

$$CaC_2O_4 + 2H^+ + Cl^- \rightarrow C_2H_2O_4 + Ca^{++} + 2Cl^-$$

（草酸钙）　　（草酸）

草酸在水及醇中是高度可溶的，因此它首先被溶入水/醇混合物。其结果是：Carrisyn®提取物中草酸盐和其它无机盐的含量非常之低。

为说明本实施例，制备大约2 升芦荟凝胶液。方法是：将芦荟凝胶液先在500psig 压力下均化，再用新的游泳池用过滤器过滤而得。搅拌后，记下凝胶液的初始pH值。将已知重量的凝胶液试样置于若干600ml的烧杯中，用适宜的酸，这里采用稀无机酸（最好是6N的盐酸），或者用浓氢氧化钠溶液，适当的地调整pH值。试样的具体数据如下：

试样	0	1	2	3	4	5	6	7	8
重量（凝胶）	100.	100.	99.3	100.	100.	99.7	100.	99.9	99.5
pH	4.56	4.07	2.45	3.35	5.09	10.6	6.16	7.0	8.58

将各试样的pH值调整后，尽快加入四(4)体积的SDA-3A乙醇，使凝胶处在规定pH状态的时间最短。将混合物搅拌不到 2分钟后，使各混合物静置大约3-4 小时。然后，将各提取物离心、冰冻干燥和称量，以确定在不同pH条件下的收率。

将适当量的提取物混合于溴化钾中制得小片，由此测得九种固体Carrisyn®提取物试样的红外光谱。采用IBM FT-IR 光谱仪，在4000至400cm⁻¹（波数）范围内对每一小片进行扫描，定性地比较不同pH条件下的Carrisyn®提取物试样的光谱。

热重量分析法：

Carrisyn® 提取物的热重量损失即为其本身的特征常数之一。将10毫克试样，于热分析仪中，以20℃/ 分钟的速率，由25℃加热至 780℃。操作过程中充入氮气，直至温度达到 600℃为止。接着在氧化环境下加热至 780℃，然后使各试样在此温度下维持 2分钟。通过差示热分析图上的重量丢失，测得水份含量、碳水化合物、可氧化的碳骨架、草酸盐和灰份的含量。

结果和讨论：

用酸处理Carrisyn® 提取物最重要的因素是该方法对它的物理化学性质是否有害影响。必须选择适宜的酸：(i) 能够在适易体积中达到适宜的pH范围(大约为3.0 至3 5)，(ii)不会有害地同有益成分(acemannan) 、溶剂混合物(乙醇) 和存储容器及设备发生反应,(iii)此外，所选择的酸的浓度不会使acemannan 链降解。虽然不含氧的无机酸最适于用来酯化，并使降解程度最低，但若干稀无机酸和高浓度的有机酸也是适宜的。采用不产生副作用适宜的酸(例如6N的盐酸) ，在低的pH条件下，Carrisyn® 提取物的质量似乎得到明显的改善。例如，用酸处理后，同样浓度(W/V) 的Carrisyn® 提取物产生更粘稠的重新水合溶液。粘性溶液意味着良好的产品。用筛析色谱法分离溶液后表明，具有与未经处理的Carrisyn® 提取物相同的色谱分布型。因此，在所采用的条件下，未观察到降解现象。

以下结果表明，经过酸处理后，以凝胶的单位体积中总的固体表示的Carrisyn® 提取物的收率下降。

试样	# 0	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	4.56	4.07	2.45	3.35	5.09	10.56	6.16	7.0	8.68
收率%	0.26	0.22	0.12	0.14	0.27	0.23	0.25	0.26	0.24

然而，其后对产品所作的红外光谱分析和热重量分析表明，高收率显然与草酸盐和灰分含量有关。

广泛采用红外光谱法可同时从定性和定量地表征Carrisyn®提取物。图8 显示，在低的pH值下，位于约1740cm^{-1} 处的乙酰基的吸收值的增加，以及Carrisyn®提取物的草酸盐峰值在约1590cm^{-1} 处的下降，表明了草酸含量下降。

热重量分析给出了与温度有关的特征的重量丢失分布图。一般情况下，在差示热分析图上，纯的Carrisyn®提取物产生三个主要的峰，即：(a) 水分峰30-100℃，(b) 碳水化合物峰(acemannan) 200-400 ℃，和(c) 可氧化的碳架峰 600-630℃(见图9)。另一方面，被草酸钙污染的Carrisyn®提取物另外具有两个峰，即位于 456-500℃和 650-720℃之间，这与高灰分含量有关(见图10) 。

表1A-E给出了各种pH条件下的Carrisyn® 提取物的热重量分析数据。

表　1B

pH4.56对CARRISYN® 提取物的热重量分析

试 样 ID	WT (mg)	% H_2O	% 残余物	% 碳水化合物	草酸盐 425 540 C	草酸盐 631 750 C
70302	9.7220	6.9122	17.3940	49.9485	10.3680	12.14
70307	8.8020	6.6803	18.0750	51.1364	9.7364	11.64
70311	10.1150	6.7721	18.9030	51.3980	8.6604	11.36
70312	9.1790	6.6347	18.4330	52.4889	8.7700	10.89
70313	8.9810	5.2667	18.5390	53.0124	8.9522	10.85
70314	9.4530	4.7287	18.5130	52.0994	9.4785	12.19

70316	9.6000	5.4271	17.7810	52.5517	9.1771	12.19
70320	9.9120	5.6094	17.0600	54.7322	8.6259	10.62
平均值 (X)	9.4705	6.0039	18.0873	52.1709	9.2211	11.49
STD DEV	0.4570	0.8391	0.6325	1.4205	0.6087	0.65
N - 8						

表 1B

pH3.60时的CARRISYN® 提取物的热重量分析

试 样 ID	WT (mg)	% H_2O	% 残余物	% 碳水化合物	草酸盐 425 540 C	631 750 C
70315	9.2100	6.9164	7.7959	72.4104	4.6243	4.082
70321	10.7180	6.5777	9.0035	70.1716	6.4751	4.879
70323	9.3070	6.0277	7.9295	73.5680	5.1467	3.900
70324	9.0919	5.2690	6.9739	74.6780	5.0820	3.707
70326	9.6950	7.0397	10.1080	70.0355	6.4879	5.796
70327	9.1490	5.7493	9.5639	69.4942	6.6455	5.224
70328	9.4680	5.5450	8.3333	68.8317	9.5902	4.393
70329	9.3140	6.4204	8.6859	71.3503	5.5937	4.402
平均值 (X)	9.4940	6.1939	8.5491	71.3503	6.3307	4.548
STD DEV	0.5303	0.6478	1.0118	2.0730	1.4527	0.708
N - 8						

表 IC

pH3.20时的CARRISYN®提取物的热重量分析

试样 ID	WT (mg)	% H_2O	% 残余物	% 碳水化合物	草酸盐 425 540 C	草酸盐 631 750 C
70330	9.3260	3.5814	6.2621	77.1819	5.7152	3.506
70331	9.8330	4.6273	4.5764	80.7280	4.9425	1.871
70334	10.8360	6.1831	5.0388	77.6395	4.8819	2.685
70401	8.1040	7.8196	4.8618	80.3070	4.9975	2.023
70402	9.0650	4.0927	4.6222	79.4380	6.8285	1.522
70403	9.9490	4.2014	4,3220	80.1990	4.7945	2.472
70405	8.8930	6.0497	4.8353	79.1636	4.4305	2.069
70406	9.8350	4.3213	4.0874	80.9156	4.7788	1.9420
70419	9.0080	5.3619	2.1758	81.8822	4.7069	1.7651
70423	9.8510	6.6998	3.9285	79.8803	4.7102	20.5.6
70426	9.7880	5.5885	4.1479	78.8307	3.9947	1.2873
70427	10.1010	6.7815	3.2670	79.5866	4.5144	2.0190
70428	10.7790	3.6181	2.6069	80.1190	4.4717	2.7368
70431	9.9030	5.9881	4.1099	78.4407	4.5542	2.3831
70433	8.3980	6.2277	3.5127	79.5073	4.5844	2.2982
70434	9.7360	7.1385	4.6188	77.1878	4.5604	2.5781
70440	10.0850	5.3148	3.1730	81.4331	4.4522	1.9534
70442	9.9470	6.2933	3.3779	81.0805	4.4234	1.2567
70504	9.9740	6.2933	4.7925	77.1410	4.7323	2.8173
70505	9.1440	5.9165	3.6308	80.5337	4.4182	1.4545
70506	10.2590	5.5659	3.4214	78.8573	5.9460	1.9300

70514	10.2060	7.7406	5.5164	74.4461	5.2714	4.0956
平均值	9.6827	5.7172	3.8581	79.2956	4.8504	2.2145
(X) STD DEV	0.6851	1.2332	1.3386	1.7546	9.6198	0.

6731N - 22

表 1D

搅拌20分钟后的循环CARRISYN®提取物的热重量分析

试 样 ID	WT (mg)	% H_2O	% 残余物	% 碳水化合物	草酸盐 425 540 C	631 750 C
70515	9.8270	6.9401	9.4739	68.5359	6.0141	6.4109
70518	9.9530	5.5059	5.3753	76.3485	5.0638	2.9941
70519	10.4880	3.4134	8.1998	68.3159	5.9497	6.4836
70523	9.5570	3.2855	6.8013	66.6212	5.9642	7.3663
70526	9.8250	5.8321	8.1629	74.7279	5.5714	3.1959
平均值 (X)	9.9300	4.9954	7.6026	70.9099	5.5714	5.2902
STD DEV	0.3437	1.5944	1.5611	4.3276	0.5990	2.0401

N - 5

搅拌40分钟后的循环CARRISYN®提取物的热重量分析

试 样 ID	WT (mg)	% H_2O	% 残余物	% 碳水化合物	草酸盐 425 540 C	631 750 C
70528	9.6900	5.7069	6.1197	77.7195	4.7678	2.633
70529	9.2960	7.0998	4.9699	75.8714	4.5611	3.001
70535	9.7970	6.5428	4.3483	79.3609	4.2462	1.194
平均值 (X)	9.5943	6.4498	5.1460	77.6506	4.5250	2.182
STD DEV	0.2638	0.7011	0.8987	1.7457	0.2627	0.922
N - 3						

上述表格中的数据表明：

1.从pH值超过4.56的起始凝胶制得的Carrisyn®提取物的总的碳水化合物和残余物（灰系）的平均含量分别为52.2% 和18.1% 。

2.将起始凝胶的pH值由大约为4.56调至3.60后，碳水化合物和灰分含量分别为71.4% 和8.55% 。这比所测定的对照值36.8% 和52.8% 有了提高。

3.然而，当pH为3.20时，碳水化合物平均含量跃至79.3%,而灰分含量降至3.86%,这意味着碳水化合物增加约51.2%,灰分含量降低78.7% 。

4.原始数据表明，具有高碳水化合物含量和低灰分值的Carrisyn®提取物显示出更好的抗病毒活性，因此，最好在pH3.00～3.50下进行加工处理。

pH值对Carrisyn®提取物的影响（热重分析法）

pH	2.45	3.35	4.07	4.56	5.09	6.16	7.00	8.68
水份	5.6762	6.2433	6.9750	8.4035	8.5905	8.8431	8.9819	9.7702
acemannan	73.925	69.930	46.929	38.651	37.649	36.796	35.593	36.316
碳骨架	17.812	15.455	12.840	12.846	12.969	12.508	11.485	10.769
草酸钙	0.4990	4.3160	9.7965	10.670	10.251	10.347	11.725	10.148
灰份	1.9644	3.9494	13.811	15.999	16.847	17.908	17.192	17.198
收率%	0.12	0.14	0.22	0.26	0.27	0.25	0.26	0.24

Carrisyn®提取物（全部固体）收率、草酸钙、灰份含量和水份似乎随pH值增加至4-5 内而增加。但acemannan 和相应的碳骨架pH值的减少而增加。因此，若必须减少灰份和草酸钙含量，那末，最好不要使pH超过4 。对收率超过0.2%的Carrisyn®提取物必须作草酸钙污染程度的分析。

用适宜的酸（例如：稀的无机酸，最好是盐酸）处理芦荟凝胶，将凝胶的pH值调至3.0 至3.5,接着用乙醇提取，使草酸盐量显著下降。通过这一步骤，可使草酸钙和灰分含量降低80% 以上。上述处理还可将活性Carrisyn® 提取物浓缩，而不使聚合物降解，正如物化分析方法所显示的那样。

按实施例1 所述的方法，但在乙醇沉淀前，先酸化至pH3.6 ，制备两批Carrisyn®提取物。在Lot #70315中，将浓硝酸(61ml)加到20加仑的均化芦荟凝胶中。Lot #70321中，将浓盐酸(171ml) 加到45加仑的均化芦荟凝胶中。收率分别为55.6g(0.07%)和186.6g(0.11%) 。经IR TGA所作的化学分析显示，这两批提取物具有相同的质量，并且草酸钙含量均减少，结果见表1B。

对专业人员来说，显而易见的是，可单独将硝酸用来酸化，也可采用盐酸或其他任何适宜的酸进行酸化。

Carrisyn®提取物的表征

采用药物筛选技术，现已发现，从芦荟凝胶中提取的多糖是芦荟凝胶中的活性化学物质。下文将该多糖称之为acemannan 。Acemannan 是基本上乙酰化的甘露糖单体的有规线性聚合物。其它成份，例如蛋白质、有机酸、蒽醌、维生素和氨基酸的含量不到Carrisyn 提取物的百分之一。现已发现，芦荟凝胶中Carrisyn®提取物的浓度大约为芦荟凝胶汁的0.05-0.3%(重量) 。芦荟叶中Carrisyn®提取物的收率和浓度取决于叶子的成熟程度。

有关acemannan 是芦荟中的活性化学物质的论据可根括如下:

1.acemannan 的剂量应与具有等量acemannan 的芦荟汁是相同的。

2.Acemannan 在防护溃疡的模型中是有效的，所述模型包括各种给药途径，即: 静脉内、腹膜内和口服给药。

3.在两个药理模型中，Acemman 所起的药效均为100%。

4.化学物质，即从完全不同的来源- Konjac植物获得的与acemannan 相似的葡甘露糖也有部分药理反应。

在实验室组织培养研究中，Carrisyn®提取物已显示能将成纤维细胞的复制在48小时内增加至300%，该成纤维细胞在治疗烧伤，溃疡和皮肤及胃肠道内壁的其他创伤中起重要作用。

Carrisyn®提取物还显示出能在成纤维细胞核中加快DNA 的合成的作用。DNA 合成的加快又加快了代谢活动和细胞复制的速度，这些是治愈过程中的基本步骤。

在对照研究中，Carrisyn®提取物显示出能提高动物治愈率的作用。

在动物实验中，Carrisyn®提取物还显示出有效的治胃溃疡的作用。对生长期为三年以上的实验大白鼠(其胃的反应与人类胃相似) 进行试验。结果发现，Carrisyn®提取物相当于或优于现有的用于治疗胃溃疡的药物。大多数这类产品有抑制胃中盐酸的作用。Carrisyn 提取物的

机理则不同，它不改变消化酸的自然分泌。

如上所述，通过加入水溶性低级脂族极性溶剂（最好是乙醇），可使Carrisyn®提取物从液化的芦荟凝胶中沉淀出来。然后，通过冰冻干燥法可制得Carrisyn®提取物粉末，并且，任意地，采用研究装置，例如Moulinex咖啡研磨机（可通过Texas 州Dallas的Dillard's 购得），可将冻干的产物磨成粉末。Carrisyn®提取物粉是高度静电的，并且根据蒽醌沾染物的氧化态的不同，为灰白色至粉红色- 略带紫色的非晶形粉末。Carrisyn®提取物是稳定的，通过冰冻干燥除去引起水解的水，变成基本上不降解的物质。含有一定量的Carrisyn®提取物的干芦荟凝胶冷冻两年仍保其效力。可以相信，冷冻保存干燥的Carrisyn®提取物，其效力可稳定达十年之久。

已发现，加热和时间是生产粉末状Carrisyn®提取物过程中的重要因素。加热有助于Carrisyn®提取物的水解或降解，在一定的温度下，对Carrisyn®提取物进行热处理的时间越长，其降解就越显著。因此，当期望得到高分子量的Carrisyn®提取物粉末时，最好采用能够最快地从整个芦荟叶提取Carrisyn®提取物的方法；当期望得到低分子量的Carrisyn®提取物粉末时，最好采用能够最慢地从整个芦荟叶提取Carrisyn®提取物提取Carrisyn®提取物的方法。

将重量/ 体积浓度为0.2-1%的Carrisyn®提取物提取物再水合，便重新形成了类似于新鲜芦荟凝胶的粘性“凝胶”。再水合后所再现的类似凝胶的粘度意味着Carrisyn®提取物具有高分子量多糖的性质。一般来说，随着多糖的降解或水解，其粘度也随之降低。因此，经再水合的Carrisyn®提取物的粘度标志着质量的好坏，可将其作为质量保证的一个参数。

按本发明的方法生产的Carrisyn®提取物可被表征为基本上上乙酰化的甘露糖单体的基本上不可降解的冻干线性聚合物。所述甘露糖单体

最好通过 β(1→4)键相互连接。

专业人员阅读了上述总的说明后，显然能够对本发明公开的成分以及替换改进物、变换物和等同物作出各种改进。为进一步表征鉴定Carrisyn® 提取物，提供了以下实施例（例5-8）。以下实施例仅用来说明而不是限定权利要求书的范围。权利要求书覆盖了任何这类改进物、等同物或变换物。

实施例5

Carrisyn® 提取物的分离、提纯和表征

A.Carrisyn® 提取物的分离

将芦荟叶洗涤、切开并切成条。保留清洁的内凝胶部分，将绿皮和胶乳物质废弃。将切成条过的物质均化，用Finisher型75过滤装置(FMC, Chicago, IL)粗略地过滤，以除去大部分浆状物。用稀盐酸将澄清的粘稠的凝胶酸化至pH约为3.20，以便将钙和镁的草酸盐和乳酸盐溶解，它们通常是以相应的水可溶的酸而被溶解。然后，在环境温度下，用四体积95% 的乙醇，将经酸处理的凝胶提取4-5 小时。除去漂浮的纤维，然后用虹吸管将醇/ 水混合物抽上来，同时通过离心法收集固体沉淀物。在处理过程中，大部分醇/ 水可溶的物质（例如有机酸、低聚糖、单糖、蒽醌和无机盐）被除去。然后，用新鲜的醇洗涤固体，离心，冻干，将其研磨成非晶形的白色粉末。

B.纯化

这时，Carrisyn® 提取物中一般含蛋白质、单糖、低聚糖和无机盐。这些沾染物不会改变产品生物活性，因此就没有必要对制成的疏松原料进一步纯化。然而，作为表征鉴定Carrisyn® 提取物的一个步骤，另需要补充纯化步骤。将粗提物粉末再溶解于磷酸盐缓冲液，用非特异性蛋白酶(Sigma Lot #5147) 处理之，接着进行彻底透析，可除上述杂物。将未过滤的产品（主要是乙酰化的聚甘露糖）冻干，采用若干分析手段，

包括红外光谱、热解重量分析、HPLC、GLC 和GC/MS 等，进行表征鉴定，如图11所示。

最好采用HPLC和GC法来标定芦荟凝胶产品。用气液色谱法(GLC) 分离芦荟凝胶提取物中的甘露糖，并将其定量。为防止含有甘露糖的产品的峰值增高(因为甘露糖干扰分析，使产品中的芦荟凝胶含量偏高)，可以增加一个透析步骤(分子量范围在12,000-14,000 之间)。此外，通过高的半乳糖或葡萄糖与甘露糖的比率，可检测到带有刺槐豆胶、瓜耳树胶或葡甘露糖的产品的峰值增高。

C.分子量测定

介绍:

Acemannan (AM)是植物提取多糖是多分散的，即其分子量的大小不等。

目的:

研究目的在于通过筛析色谱法测定acemannan 的分子量分布。

化学试剂:

0.05% 的叠氮化钠。

标准:

0.2% (W/V)的标准Pull lan 853K 、100K和12.1K 道尔顿，溶于0.05% 叠氮化钠中。(Shodex P-82，Showa Denko, K.K.)

测试仪器:

高效液相色谱议，型号590 (Waters Associates，Milford, MA)

差示折光检测仪，型号1770 (生物拉德)

积分仪SP 4290(光谱物理)

试样制备:

称取20mg Carrisyn® 提取物置于带有特氟隆衬盖的玻璃阀中(105×25mm) 中。

加入10ml 0.05%的叠氮化钠，(4小时) 置于Junior(次) 轨道摇动器(Lab-Line Instruments, Mel Rose Park, IL) 中振摇 4小时，使其溶解。

用 1.2 μm 的隔膜(Acrodisc®, Gelman Sciences) 滤过。保留滤液，供HPLC仪分析。

高效液相色谱(HPLC)条件

柱：Spherogel TKS 5000 PWHR (Beckman Instruments)

检测器：差示折光检测器(生物拉德)

流动相：0.05% 的叠氮化钠

流速：40℃，1mL/分钟

注射体积：50 μL

结果：

Acemannan 是多分散性的多糖，其至少73% 的聚合物大于10.000道尔顿，正如通过筛析色谱法(SEC) 的以支链(pullulan)多糖为标准所检测到的那样。图12表示已知分子量的支链(pullulan)标准的SEC色谱，分别为853K、100K和12.1K 道尔顿。图13显示一Carrisyn®提取物相应的色谱图。该色谱图突出了三个标有A.B.C 的主峰。峰A 表示acemannan 大于100,000 道尔顿的部分，峰B 为大于10,000道尔顿、小于100,000 道尔顿的部分。峰C 表示低分子量成分。峰A 和峰B 的叠加构成活性部分。

D.红外光谱分析

介绍：

acemannan (即Carrisyn®提取物的活性产物) 的官能团在红外特征频率处有吸收。因此，红外光谱法是表征鉴定该物质的重要方法。

目的：

实验研究的目的在于通过红外光谱法进一步表征鉴定Carrisyn®提

取物。

化学试剂：

红外级的溴化钾(KBr)粉(Mallinckrodt Inc.,Paris,Kentucky)。

测试仪器：

联有IBM9000 计算机和打印机/ 绘图机的IBM 傅里叶变换红外(Ft-Ir)光谱仪，型号#32 。

试样制备：

采用Wiley 磨机(Thomas Scientific Co.)和孔径小于60目的网筛，将Carrisyn®提取物磨成细粉。

将5mg 磨细的试样同495mg 干溴化钾混合成总量为500mg 的混合物。用玛瑙研钵和研杵，手工将混合物再磨成均匀的混合物。

采用液压千斤顶(Walker®)，以40,000psi 的压力，将试样(80-100mg)压成透明小片。

在4000cm^{-1}至400cm^{-1} 范围内，对小片进行扫描。以4cm^{-1} 的分辨率进行多次扫描(扫描30次),以改善信噪比。

结果：

图14中所示的光谱分析图突出了以下特征吸收峰频率(cm):

波值(cm^{-1})	测　　定
1066.8	(吡喃糖环结结的)C-O伸展振动
3422.1	O-H 伸展振动
1250.0	C-O-C 伸展振动(乙酰基团)
1740.0	C-O 伸展振动(乙酰基)
1377.3	C-H 弯曲振动
1649.3	C-O 伸展振动(酰胺Ⅰ)
530.5	面内弯曲等振动
599.9	面内弯曲等振动

2928.3	C-H 伸展振动
1541.3	N-H 形变振动（酰胺Ⅱ）
806.3	……
897.0	在环中C_1上的直立H
773.6	环呼吸

值得注意的是，由于O-H 的伸展振动，Carrisyn® 提取物的光谱在3422cm^{-1} 附近显示出强烈的吸收。羰基和乙酰基的C-O-C 伸展振动吸收峰分别位于1740和1250cm^{-1} 附近。C-O-C 结构的强吸收带表明是与单聚元相接的O-乙酰基团。酰胺的羰基在约1649cm^{-1} 处的伸展振动吸收峰（酰胺Ⅰ峰）与样品中水的吸收峰重叠，约1541cm^{-1} 处的H-N 变形振动吸收峰（酰胺Ⅱ峰）是蛋白质/ 蛋白多糖不纯物的吸收所致。

在960-730cm^{-1} 处的吸收带与acemanan提取物的立体化学构型有关。例如，844cm^{-1} 附近的吸收带是平伏键的C -H吸收峰，而897cm^{-1} 则是直立键的C -H吸收峰，上述事实证明acemannan 提取物是B 型连接。环振动峰(955cm^{-1} 肩峰）和773cm^{-1} 处的环呼吸峰表明D-甘露糖具有 β- 配糖键。

下面的表3 表明按吸收度强弱排列的吸收峰频率。

表 3

非蛋白酶处理CARRISYN提取物的IR吸收频率

峰编号	峰	起始峰	结束峰	吸收度
1	1066.8	1201.8	1049.4	.546
2	3422.1	3433.7	3410.6	.474
3	1250.0	1348.4	1201.8	.439
4	1740.0	1821.0	1699.5	.433
5	1377.3	1410.1	1350.3	.343
6	1649.3	1697.6	1585.7	.325

7	530.5	582.6	493.8	.313
8	599.9	634.7	586.4	.282
9	2928.3	2995.8	2899.4	.242
10	1541.3	1581.8	1527.8	.226
11	806.3	835.3	789.0	.224
12	897.0	920.2	843.0	.210
13	773.6	787.1	750.4	.207

E.经蛋白酶处理的Carrisyn®提取物的红外光谱

正如酰胺Ⅰ峰和酰胺Ⅱ峰所证实，Carrisyn® 提取物的红外光谱提供了蛋白质或蛋白多糖不纯物存在的证据。用能水解蛋白质或蛋白多糖非特异性蛋白酶处理样品，然后通析。纯化的样品中使不含上述不纯物。

蛋白酶处理过的样品的IR吸收光谱见图15。当将其与未经蛋白酶处理的Carrisyn 提取物的IR吸收光谱(图14)进行分析比较，便可发现有不同之处。例如，图14中位于1649和$1541cm^{-1}$处的酰胺Ⅰ和Ⅱ峰，在经蛋白酶处理过的样品的IR吸收光谱中使消失了。此外，位于约1639,7 cm处的水吸收峰也明显地消失了。按照吸收度的大小排列的经蛋白酶处理的Carrisyn提取物的吸收峰频率列于表4

表 4

蛋白酶处理的Carrisyn提取物的IR吸收峰频率

峰 号	峰	起始峰	结束峰	吸收度
1	1064.8	1093.8	1049.4	.969
2	1032.0	1045.5	970.3	.966
3	3422.1	3435.6	3404.8	.814
4	1248.1	1348.4	1201.8	.729
5	1740.0	1838.4	1695.6	.679
6	1377.3	1406.3	1350.3	.593

7	530.5	545.9	493.8	.575
8	598.0	677.1	586.4	.532
9	1639.7	1695.6	1554.8	.491
10	2928.3	2990.0	2903.2	.428
11	897.0	918.2	887.4	.409
12	806.3	835.3	790.9	.409
13	771.6	789.0	748.5	.387

所映峰强度的吸收度是不能与未经蛋白酶处理的Carrisyn® 提取物的IR吸收光谱(图14) 比较的，因为它是定量的，在制作样品片时的浓度不一致。

仅根据红外光谱,Carrisyn® 提取物是一种主要由 β- 连接的D-甘露糖含O-乙酰基侧链的多糖。N-乙酰基的存在可能是由于蛋白质/ 蛋白多糖杂质存在所致。

F.Carrisyn® 提取物的热解重量分析(TGA)

介绍:

热解重量分析(TGA) 是研究聚合物的重要分析方法。由于温度变化造成的聚合物分解时损失的质量是该聚合物的特征。此外,TGA法有助于测定粉状物质的水份(H_2O) 和灰份含量。

目的:

本试验研究的目的在于采用TGA 来进一步表征鉴定Carrisyn 提取物。

化学试剂:

无化学试剂。

测试仪器:

1.Mettler 热分析仪:TA3500 系列，它带有一台TC10A 评价和控制计算机以及一台具有M3-03 微量天平的TG50炉。

2.打印机/ 绘图机型号MP3(Print Swiss Matrix)。

3.用于临档存储的IBC PC机。

试样制备和分析:

- 用精确度在± 1 μg 以内的微量天平对含10mg试样的70ml铝坩埚进行称量。

- 以20℃/ 分钟的程序升温速率，在TG50炉内，将坩埚及其内含物加热。该加热速率是标准的，适合于对物料进行分析。

- 先在氮气环境中，从25℃加热至 600℃，然后在空气(氧化剂)下，从 601℃加热至 780℃。

达到最终温度后，保温 2分钟(选择 780℃是因为有机物和无机物在此温度之前便分解。

- Carrisyn® 提取物的分解分布型是具有特性的。图16描绘了Carrisyn® 提取物的分解分布型的实时曲线和相应的一次导数曲线。acemannan(Carrisyn® 提取物的活性物质)分解类型不同于其他多糖的分解类型。例如，在相同操作条件下，使acemannan 产生主要分解的温度不同于使纤维素、葡聚糖或麦胶产生分解的温度。与acemannan 的重量损失有关的温度在 200℃至 630℃之间。大部分Carrisyn® 提取物分解发生在 200℃至 540℃和 600℃至 630℃之间。借助于这两个温度范围可测定acemannan 部分，而灰份和水份一起占大约10%(重量)。表5表示采用TGA 法对Carrisyn® 提取物作平行测定分析。

表 5

Carrisyn® 提取物的TGA 分析

试样	重量(mg)	H_2O %	灰分* %	AM %	CuO %
1	9.4390	7.3631	3.8034	82.2119	2.5532
2	9.5860	7.3649	4.0163	81.8381	2.7540
3	9.5210	7.4992	4.2012	81.7568	2.9514
4	9.4530	7.7118	4.1786	81.2010	2.9620
5	9.4090	7.7691	3.8793	81.6072	2.9546
6	9.5960	6.8674	3.9912	82.0969	3.1576
7	9.5740	7.6209	4.1904	81.6856	2.8605
8	9.5730	7.3436	4.2411	81.0719	3.3218
9	9.5550	7.9435	4.1130	80.9652	3.2444
10	9.5220	7.7715	4.3373	80.8023	3.1611
Ave.** (X)	9.5128	7.5255	4.0952	81.5238	2.9920
Std Dev.	0.0626	0.3087	0.1688	0.4864	0.2353

* 灰份中含有Cu(1.51)、Si(0.1)、Na(0.55)、Mg(0.37)、Fe(0.02)和Al(0.00)等的氧化物。

**平均值不会达到100%，因为不超过基峰2%的峰未计算在内。

该分析方法是定性以及半定量的。例如，可按下式确定acemannan的百分比：

$$1.\text{AM的百分比}(\%) = \frac{\text{mg}(200\text{-}630℃) \times 100}{\text{mg}(\text{试样})}$$

或

$$2.\text{AM的百分比}(\%) = \frac{\text{mg}(200\text{-}630℃)\ \text{试样} \times 100}{\text{mg}(200\text{-}630℃)\ \text{参考标准}}$$

水份和灰份含量是粉状药物的重要参数。采用热解重量法，可方便地确定这些参数。

G.通过酸水解和高效液相色谱(HPLC) 测定Carrisyn® 提取物中的糖成分

介绍：

通过酸或酶催化水解，将多糖水解成其成分单体。选择2M的三氟乙酸(TFA) 进行水解，因为TFA 的酸性强到足以将配糖键水解，而又不象硫酸，它是较温和的不致破坏单体糖。

目的：

目的在于确定Carrisyn® 提取物的acemannan 部分的单体糖成分。

1.含0.5mg/ml肌醇的2M TFA作为内标。

2.异丙醇

测试仪器：

1.备有自动取样器HP79842A和自动注射器HP79841A的Hewlett Packard HPLC，型号为1084B 。

2.生物拉德差示折光检测仪，型号1770。

试样制备：

- 将2.0mg Carrisyn® 提取物放在称量纸上精确称量，并定量地将其移至带有特氟降衬盖的(13 ×100mm)可任意处理的培养管中。
- 加入一毫升含0.5mg/ml肌醇的2M TFA，作为内标。
- 将培养管放于热设备(Hycel热设备) 中在 120℃放置大约1 小时。
- 用干燥空气将水解产物混合物吹干。
- 将1ml 异丙醇中的固体再分散，用干燥空气蒸干。
- 将固体重新溶于1ml 的去离子水中，以备注射入HPLC柱中。

HPLC条件：

柱：Aminex 碳水化合物HPX-87P(Bio-rad Labs.,Richmond,CA)

流动相：80 ℃的去离子水

流速：0.6ml/ 分钟

炉温：40 ℃

记录纸速：0.2cm/ 分钟

检测器：折光指数(生物拉德#1770)

Atln：2

结果：

图17表示标准混合物的色谱图。所述标准混合物包括作为内标的葡萄糖、半乳糖、甘露糖(各为1mg/ml) 和肌醇(0.5mg/ml)。图18表示相同条件下的Carrisyn®提取物的色谱图。值得注意的是，甘露糖是聚合物的主要成分，这表明多糖基本上由甘露糖单元组成的。

H.Carrisyn®提取物的气液色谱分离和定量

介绍：

Carrisyn®提取物的多糖主要呈中性。通过气液色谱(GLC),中性多糖以其糖醇乙酸酯得到更好的分析。

目的：

研究的目的在于：通过对糖单体以其糖醇乙酸酯的形式分离和定量，进一步表征鉴定Carrisyn®提取物。通过一步骤，用毛细管柱分离糖醇乙酸酯，并用火焰电离法检测。

化学试剂：

1.含0.2mg/ml肌醇的2MTFA 作内标。

2.异丙醇

3.含10mg/ml 氰化硼钠($NaB^{\circ}H_4$)或硼氢化钠($NaBH_4$) 的1M NH_4OH。

4.冰醋酸

5.甲醇

6.吡啶

7.乙酸酐

8.甲苯和二氯甲烷

9.气相色谱(G.C.)级丙酮

测试仪器:

1.气相色谱Vista 6000(Varian Instrument Group,Palo Alto,CA)

2.积分仪SP 4290(Spectra-Physics,San Jose,CA)

试样制备:

- 将2mg 试样精确称重，移入带有特氟隆衬盖的培养管(13 ×100 mm) 中。

水解:

- 加入 500 μl 三氟乙酸TFA(2M，含200mg/ml的肌醇),于 120℃ (用Hycel 热设备) 加热大约一小时。

- 在气流下除去TFA(用40℃的水浴),用异丙醇洗涤残余物，以除去余酸。

还原:

- 将残余物溶解于1M的NH_4OH (300ml，含10mg/ml 的氰化硼钠 NaB^2H_4),于室温下放置一小时。

- 用冰酯酸(滴几滴直至不起泡为止) 除去过量的还原剂，用空气吹干溶剂，用含有10% 乙酸的甲醇(3×300 μl)洗涤残余物，最后用甲醇(3×300 μl)洗涤。

乙酰化:

- 将200 μl 吡啶和200 μl 乙酸酐加到脱干的残余物中，于120 ℃下加热20分钟。

- 将500 μl 甲苯加到冷却的上述溶液中，室气下除去溶剂，将残

余物溶解于水，用二氯甲烷提取。

将有机相移至清洁的试管中，空气下除去有机溶剂，将残余物溶解于丙酮(100 μl)，然后进行气液色谱分析。

气液色谱条件(GLC)

柱:SP 2330,15M或30M,0.25mm I.D.,0.25 μm 液相厚度(Supelco，Inc.)

载气: 氦

炉温:235℃(等温)

注射温度:250℃

注射体积:0.5-1 μl(分流)

结果:

图19表示标准混合物的GLC 色谱图。所述标准混合物包括以糖醇乙酸酯形式存在的鼠李糖、岩藻糖、阿戊糖、水糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖和肌醇。图20显示了Carrisyn®提取物的色谱，图中的主峰对应于甘露糖；还存在微量的半乳糖、葡萄糖、阿戊糖、木糖和岩藻糖。这些是来自细胞壁的污染物。最后一个峰是作为内标的糖醇乙酸酯。

由于甘露糖醇乙酸酯是水解和乙酸化物料中的主要糖峰，因此Carrisyn®提取物基本上是多甘露糖型的多糖。

借助于肌醇作内标，可对甘露糖醇峰进行定量。图21表示根据甘露糖/ 肌醇的面积比率与acemannan 的重量关系绘制的标准曲线。利用该标准曲线，可计算出Carrisyn®提取物试样中acemannan 的量。

I .Carrisyn® 提取物的气相色谱/ 质谱和配糖键分析

介绍:

通过测定糖单元相互之间连接的方式，表征鉴定多糖。多糖的化学、物理和生物活性取决于已糖相互之间连接的五个可能位置。

目的:

本研究的目的在于确定Carrisyn®提取物多糖的糖单元连接的方式。

化学试剂：

1.无水二甲亚砜(DMSO)

2.二甲基亚磺酰钠阴离子(2M)

3.甲基碘

4.2M的TFA

5.异丙醇

6.含50% 甲醇、10 mg/ml (NaB^2H_4)的NH_4OH

7.冰醋酸

8.含10% 乙酸的甲醇

9.乙酸酐

10. 硼氢化钠

11. 二氯甲烷

12. GC级丙酮

测试仪器：

气相色谱/ 质谱仪MSD(HP5970)。

GLC/MS和配糖键分析

Carrisyn®提取物的全面表征鉴定包括聚合物的键分析。采用Harvil等所述的方法(Plant Physiology,62:418-422(1978)，这里专门作为引用文献),将Carrisyn®提取物过甲基化，水解成单体，并转化成甲基化的醛醇乙酸酯。用Hewlett-Packard GC/MC 系统的Supelco SP 330毛细管柱(3.0 m×0.25 mm)对挥发性衍生物进行分析。通过电子碰撞(EI)法，使单体的甲基化醛醇乙酸酯的裂解。图22是作为部分甲基化和部分乙酰化糖醇衍生的Carrisyn®提取物的总离子色谱(TIC) 图。图3是部分乙酰化的甘露糖醇的质谱图。

完整的操作步骤如下：

(1) 将试样(1 mg)置于带有特氟隆衬盖的试管中，并在50℃的真空炉中将其干燥。

(2) 将无水DMSO(250 μl)) 加到试样中，搅拌(用特氟隆搅拌棒) 试样，直至其溶解(可借助于声处理技术) 。用氩(或氮) 清洗试管。

(3) 将250 μl 二甲基亚磺酰钠阴离子(2M)加到多糖液(在DMSO中) ,至少将其搅拌4 小时(应在氩气环境进行反应) 。最好让试样在阴离子溶液中过夜。

(4) 将阴离子溶液于冰中冷却，缓慢地加入甲基碘200 μl ,将溶液搅拌约1 小时。

(5) 将大约2.5 ml水加到溶液中，用氩除去多余的甲基碘。

(6) 将混合物移至透析管 ,13.3 ×2.1 cm(直径)(分子量范围12,000-14,000 ,Spectrum Medical ,Inc .Los Angeles ,CA)。

(7) 在(50 ℃) 气流下，将未透析部分浓缩。

(8) 将250 μl 2M 的TFA 加到干燥的残余物中，于120 ℃下加热1 小时。

(9) 在空气下除去TFA ,用异丙醇(2×250 μl)洗涤残余物。

(10)将残余物溶解于含有10 mg/mL NaB^2H_4 的50% 甲醇氨水溶液中，在室温下静置1 小时。

(11)用冰酯酸(几滴) 除去过量的氧化剂，浓缩至干燥，用含有10% 乙酸的甲醇(3×250 μl)洗残余物。

(12)将乙酸酐(100 μl)加到干燥的残余物中，于120 ℃下加热3小时。冷却将水(约1.5 mL) 加到试样中，然后加入碳酸氢钠，直至起泡为止。

(13)将有机相浓缩至干，将残余物溶解于100 μL 丙酮中，然后进行气相液相色谱(GLC) 和质谱(MS)分析。GLC 条件：

柱:SP 2330熔融硅柱(30 m ×0.25 mm)

温度: 于170 ℃保持3 分钟，接着以4 ℃/ 分钟

升至240 ℃，在此温度下保持10分钟。

检测器: 火焰温度检测器(FTD)

GLC/MC条件:

柱:SP 2330(30 m ×0.25 mm)

温度: 在80℃下维持2 分钟，以30℃/ 分钟升至170 ℃，然后以4 ℃/ 分钟升至240 ℃，在此温度下保持10分钟

MS: Hewlett Packard MSD

通过甲基化分析测定试样的主要配糖键

在本方法中，将多糖的液离羟基转化成甲醚(步骤4)。将甲基化的多糖水解成单糖成分(步骤8)，转化成甲基化的醛醇(步骤9)，并乙酰化(步骤10) 。通过GLC/MS(步骤13),分析这些挥发性的衍生物，根据碎片可确定醛醇上O-甲基和O-乙酰基的位置。

说明

现研究1 和4 位连接的糖基(甘露糖基) 残基(即:(1 →4)连接的甘露聚糖) 。在2 位、3 位和6 位的羟基是游离的，可将其转化成甲醚。水解和还原之后,1位、4 位和5 位的羟基即被暴露，可将其乙酰化，得到衍生物:1,4,5- 三-0- 乙酰基-2,3,-6-三-0- 甲基己糖醇(图24) 。当用质谱技术检查时，由于邻近0-甲基间的裂解或0-甲基和0-乙酰基间的裂解，产生了主要的碎片离子。因乙酸、甲醇等的丢失而产生次要的碎片离子(图25) 。图22和23分别显示了Carrisyn® 提取物的总离子色谱和作为部分乙酰化的甘露糖醇的4 位连接的甘露糖醇的4 位连接的甘露聚糖的质谱。

根据Carrisyn® 提取物的总离子色谱图和键分析，可以推断，Carrisyn® 提取物主要是甘露糖的(1→4)位连接的线性聚合物。

实施例6

现对一名具有“多年”溃疡性结肠炎病史的32岁病人进行试验。在发作期间，她用40 mg 强的松、3 克Asulfidine、50 mg 6-巯基嘌呤和甲硝哒唑无任何作用。她继续感到腹部疼痛，每天有4-8 次肠道出血(bloody bowel movements)。她被认为是患了营养过度症。内窥镜检查所见表明，她患有严重升结肠溃疡，并且还患有轻度的肝旁横结肠溃疡。给病人服用50 mg Carrisyn® 提取物，每日四次，此外，辅以其他药物，让其回家。一周后，症状基本上已消失。病人只感到轻微的腹部疼痛，内窥镜可见已治愈的和轻度充血的粘膜。病人逐渐停用其他药物，临床症状继续改善。此时，病人仅服用Carrisyn® 提取物。体格检查和临床症状检查完全正常。

观察到另外五例溃疡性结肠炎和节段性回肠炎患者具有类似的临床反应。其中一名患者的Carrisyn® 提取物胶囊服完了四周后，轻度的症状开始出现(大便增加，轻度腹部不适),于是她继续服药，三天后，症状完全消失。

实施例7

若干受滋病患者接受了无毒性或无副作用的高剂量(Carrisyn® 提取物的长期治疗。在这些临床症状减轻和消除及感污机会减少的爱滋病患者中，观察到T-4 和T-8 淋巴细胞比率上升，和T-4 绝对计数增加。。这意味着Carrisyn® 提取物对病人具有抗病毒或调节免疫的作用。

已观察到对这类病人的淋巴细胞的刺激作用，这意味着Carrisyn®提取物可能与免疫调节有关。

实施例8

醇的浓度对Carrisyn® 提取物收率的影响

步骤:

将Hilltop 叶(15.9 磅) 洗涤，切成小条，用Waring 捣碎器研磨，滤过八层的棉布。接着，将凝胶液移至四个11夸脱的不锈钢锅中，分别加入体积比为二比一、三比一、四比一和五比一的冷却的USP 级乙醇。具体数据汇总如下：

比率(乙醇：芦荟凝胶)	凝胶量	乙醇量
2:1	500 ml	1000 ml
3:1	500 ml	1500 ml
4:1	1670 ml	6680 ml
5:1	500 ml	2500 ml

使沉积物静置四小时，然后细心地倒出醇- 凝胶上溶液，将其储贮于另一容器中。采用IEC Centra-7离心设备，将沉淀物以2800 rpm 离心10分钟，用醇洗涤，然后在相同条件下再次离心。将沉淀物移至600 ml的瓶中，液氮下冷冻，并冰冻干燥过夜。

以2:1 的比例(体积),另外将醇加到上清液中，使之在室温下沉淀过夜。同样，在室温下，保留上清液，并放置过夜。

次日，除了因以2:1 的比例另外加入醇而沉淀出来的沉淀物外，如前所述，从上清液中的沉淀物也应收集。在此情况下，当沉淀物被移至冰冻干燥瓶时，加入大约5-10 ml 水。

经过开始的四小时醇沉淀，结果归纳如下：

(乙醇：芦荟凝胶) 比	收率(g)	(g.Carrisyn® 提取物/g. 凝胶) 收率%
2:1	0.0518	0.10
3:1	0.3847	0.077
4:1	1.945	0.116
5:1	0.6675	0.134

另外加入乙醇后，该2:1(体积）的上清液又沉淀出178 mg Carrisyn® 提取物。仅仅放置过液,3:1和4:1 的上清液中又分别沉淀出89 mg 和105 mg沉淀物。第一次分离后，醇量为5:1 的上清液中仅沉淀出微量的沉淀物，因而不再收集。

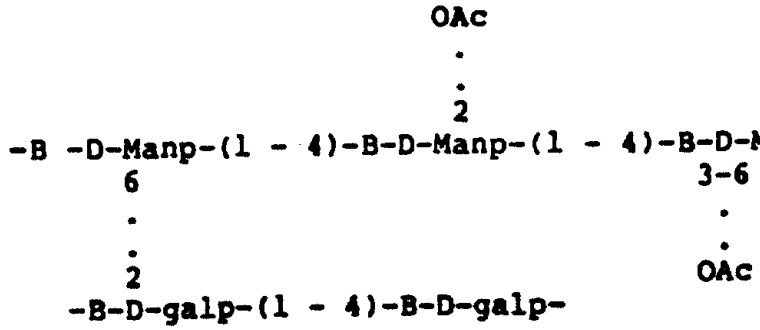
对于从2:1(3:1)比例的上清液中沉淀出来的第二批沉淀物，冰冻干燥前，用5-10 ml 水洗净离心桶。这样，产生了低密度的白色松散性的Carrisyn® 提取物，它与其它试样制得的密度较大的灰色Carrisyn® 提取物试样有极大的差别。

总结

Carrisyn® 提取物是一种取自芦荟粘胶的纯化的白色非晶形粉末。

该聚合物基本上是由线性的 β(1→4)-D- 甘露糖基单元组成的。它是一种长链聚合物，该聚合物中任意地分布着通过氧原子而与其连接的乙酰基团。采用alkaline hydroxamate法(Hestrin,S.:J.Biol.Chem., 180:240(1949),这里专门用作引用文献),测得乙酰化程度大约为0.8 个乙酰基团/ 单体。中性糖键分析表明,(多半）通过 α(2-6) 键而与链相接的是D-吡喃半乳糖残基，比例大约为每七十个糖中含一个D-吡喃半乳糖残基。甘露糖与半乳糖之比为20:1，这表明，半乳糖单元间主要也是通过 β(1→4)配糖键，相互连接的。

采用现代的多糖表征鉴定技术得到的化学结构式如下:



Carrisyn® 提取物是多分散的，其中至少70% 的分子的分子量大于

10,000道尔顿。

物化性质：

(a) 溶解性

Carrisyn®提取物是一种白色至灰白色非晶形粉末，它能缓慢地溶解于水，形成具有高度粘性的胶体溶液(0.4%/v)。剧烈摇振数小时之后，可得到1%(w/v) 粘稠的凝胶。Carrisyn®提取物尤其不溶于包括丙二醇在内的普通有机溶剂。然而,Carrisyn® 提取物溶解于20% 水和80% 丙二醇中，形成长时期保持稳定的均匀粘稠凝胶液。

(b)pH:

Carrisyn®提取物的0.2%(w/v) 水的溶液的pH大约为6.31±0.33。

(c) 旋光性：

将0.2%(w/v) 的Carrisyn®提取物水溶液通过0.45 μm 膜滤器(Uniflo®,Schleicher & Scheull Inc.,Keene,Nh),测得的旋光度如下：

$[\alpha]_{589}^{20}$ = -20 （表示 β- 键）。

将去离子水作空白。

(d) 碱处理：

对Carrisyn® 进行碱处理，产生脱乙酰作用，便破坏了其形成粘胶体的能力，这表明对Carrisyn® 进行O-乙酰化会影响其粘性。经过脱乙酰作用的产品不溶解于水，这显然是由于强列氢键链合增加的缘故。

(e) 红外光谱鉴定：

采用红外光谱法鉴定Carrisyn® 中的官能团（见图14和15）。在1740 cm^{-1} 和1250 cm^{-1} 附近的IR强收谱带表示乙酰化。位于约3422cm^{-1}、1066 cm^{-1} 、1639 cm^{-1} 、897 cm^{-1}、806 cm^{-1} 和773 cm^{-1} 附近的其它吸收峰是 β- 甘露糖基键的多糖的特征吸收峰。弱的酰胺I 峰和酰胺II峰分别位于约1649 cm^{-1} 和1541 cm^{-1} 处（见图14),这是蛋白质杂

质的吸收峰。当Carrisyn®提取物用蛋白酶处理后再通析，上述两个酰胺峰便消失（图15）。

（f）分子量分布：

Carrisyn是多分散的，其至少73% 的分子其分子量大于10,000道尔顿（如筛析色谱法所测定的）。高压液相色谱分析（图13）显示了标有A、B、C 的三组分。峰A 代表分子量大于100,000 道尔顿的Carrisyn®提取物，峰B 代表大于10,000道尔顿、但小于100,000 道尔顿的Carrisyn 提取物。峰C 代表CARRISYN®的分子量组成。峰B 和峰C 的面积随着Carrisyn提取物的分解而增加，而Carrisyn®提取物的分解导致峰A 面积的减小。

根据以上对本发明及实施例的充分描述，专业人员显然能够理解到：可用未列举的化合物和步骤代替所列举的优选化合物和方法步骤，不提及这类未列举的化合物和方法步骤并不意味它们不包括在本发明范围内，而仅仅为了满足描述简洁准确的要求才省略之。

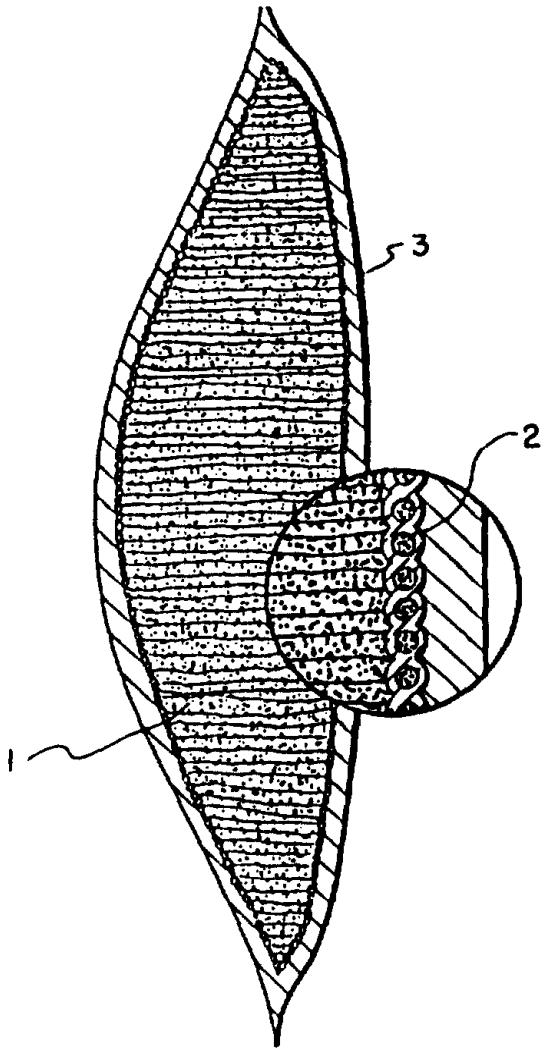


图　1

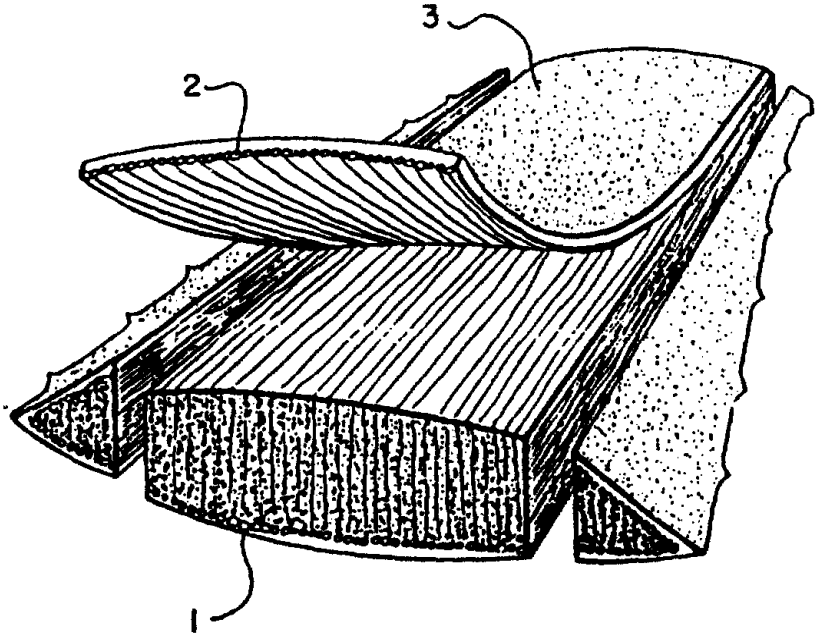


图　2

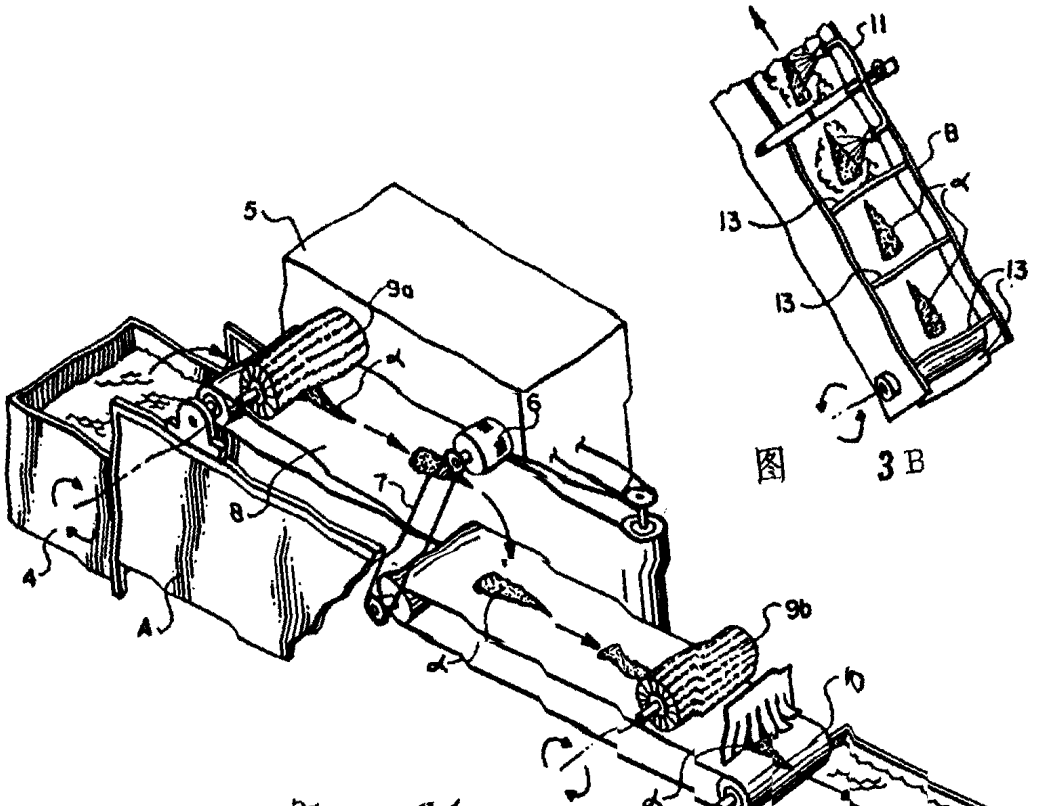


图 3B

图 3A

芦荟叶洗涤装置

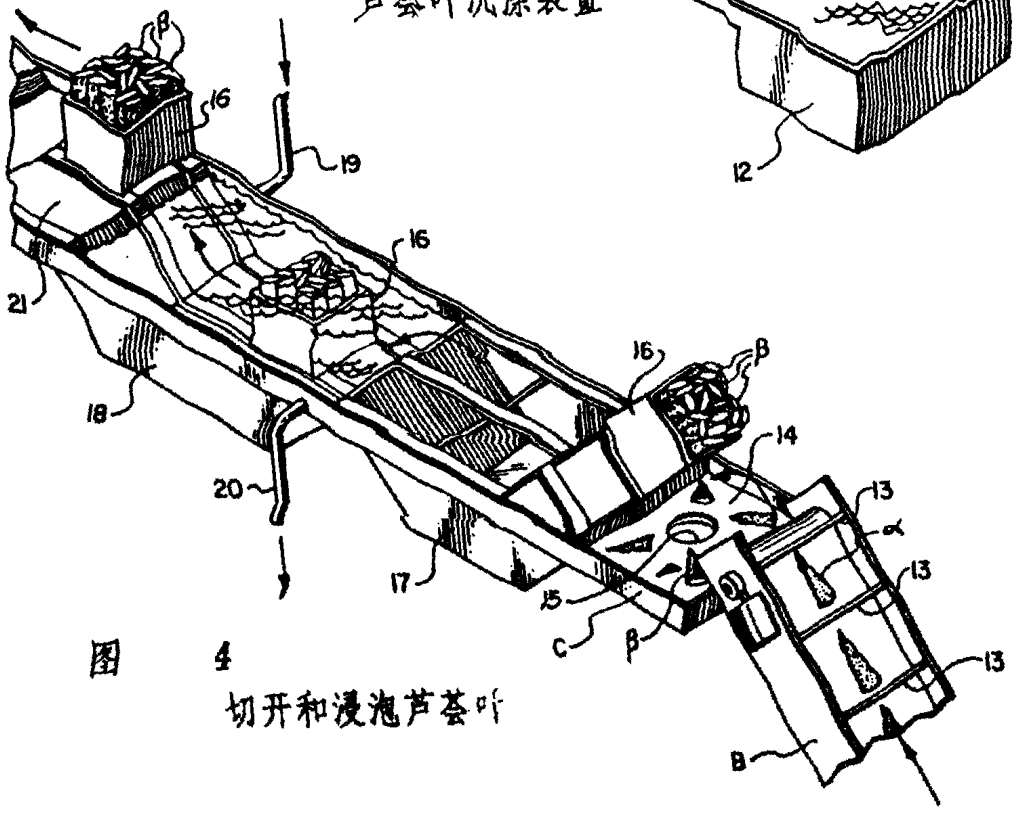


图 4

切开和浸泡芦荟叶

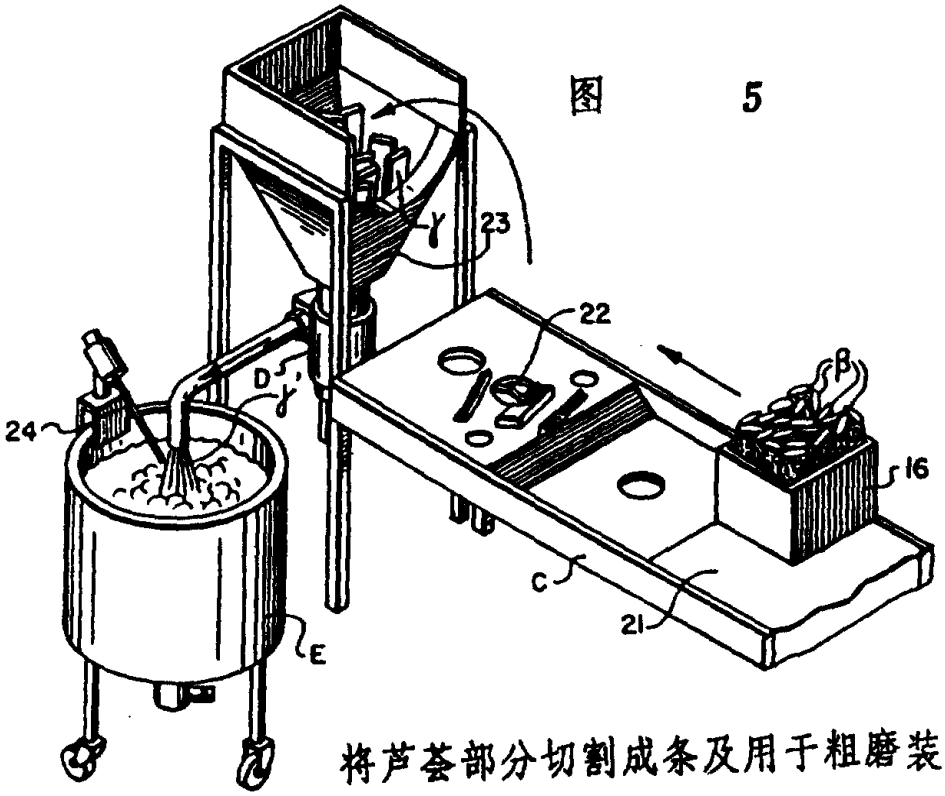


图 5 将芦荟部分切割成条及用于粗磨装置

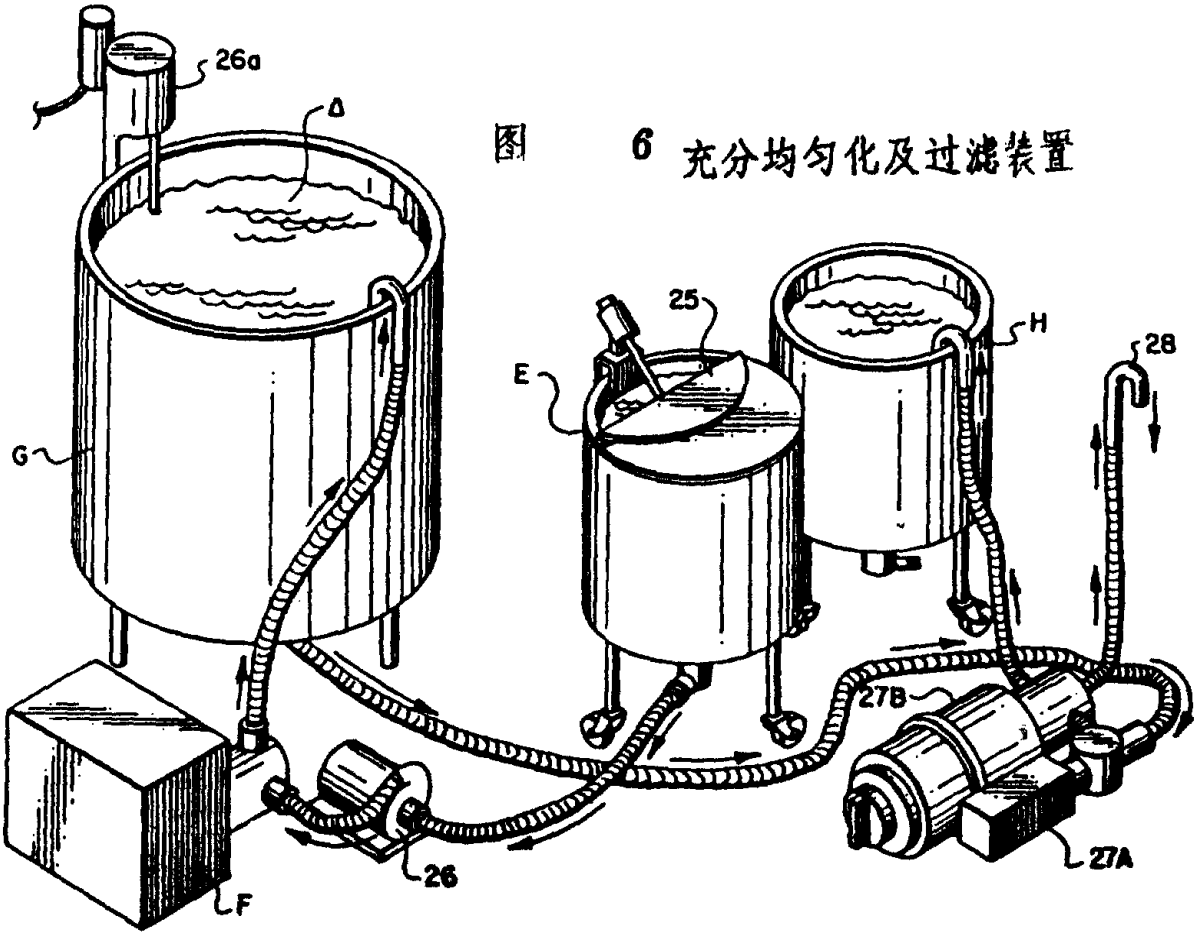


图 6 充分均匀化及过滤装置

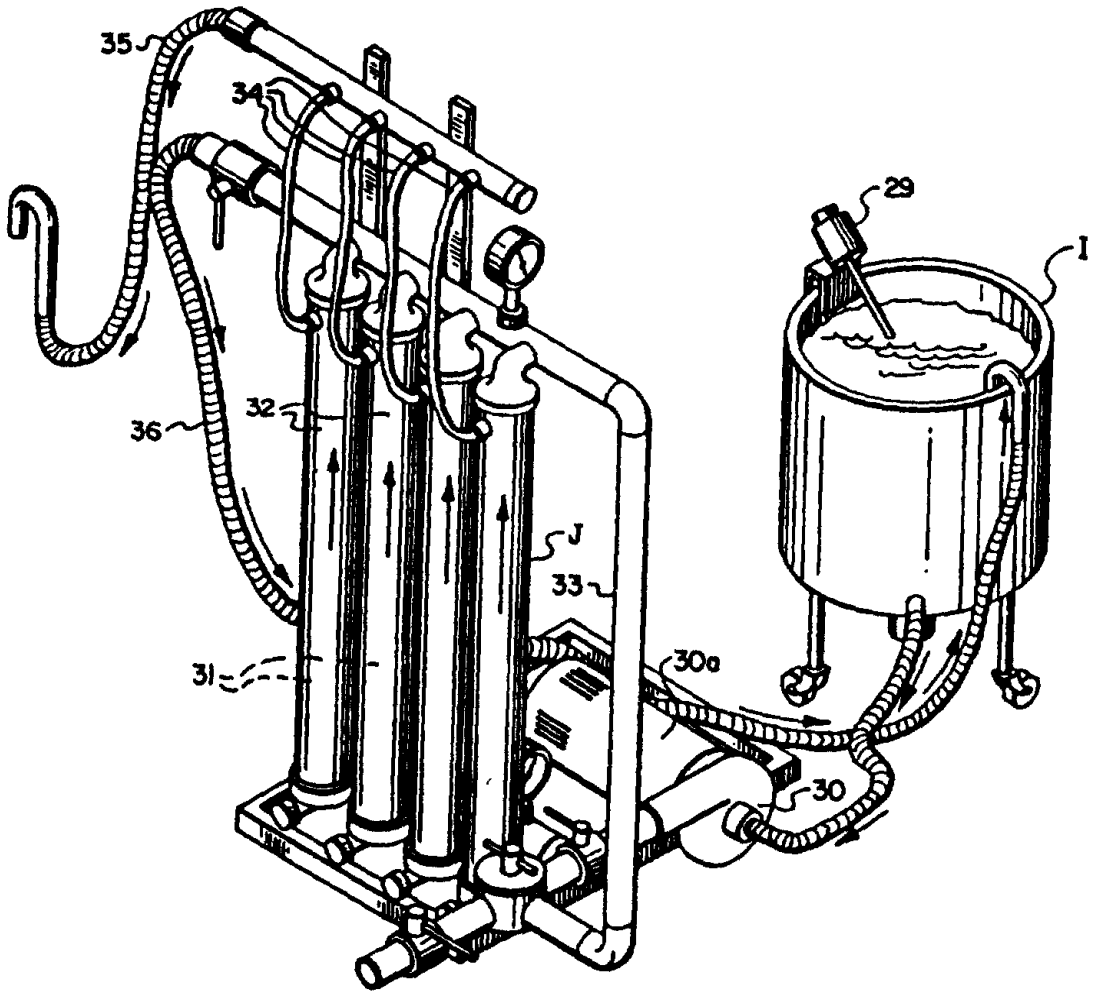
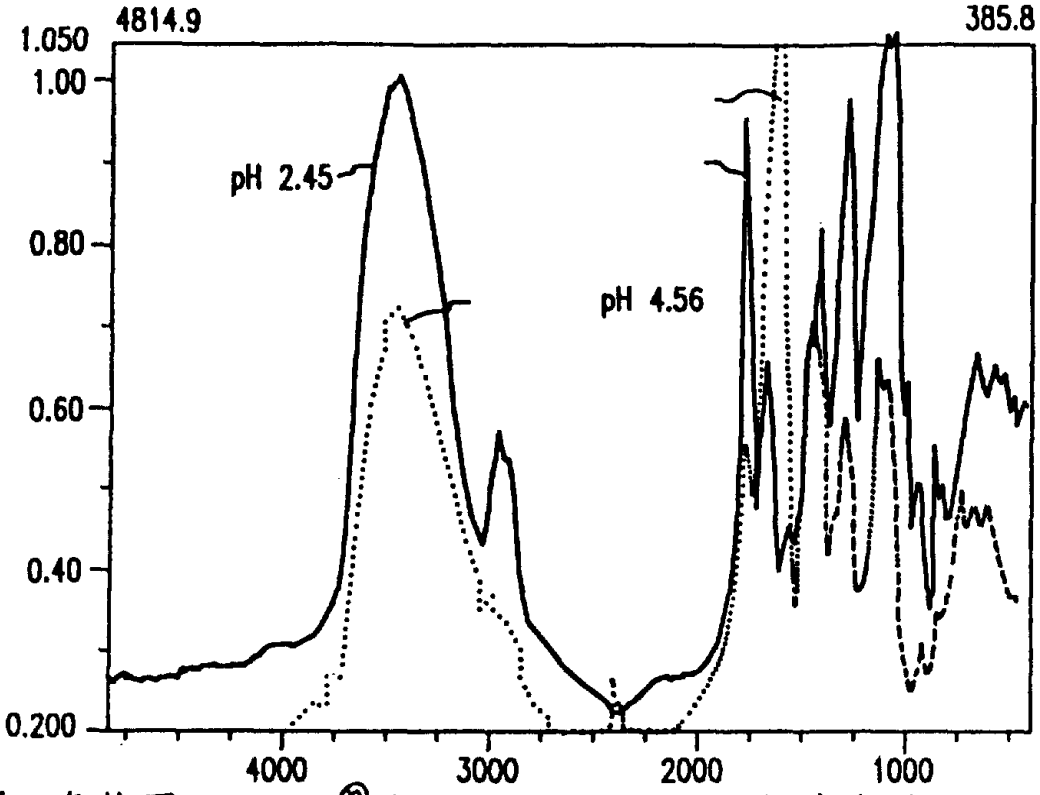


图　　7　透析设备



在不同pH条件下Carrisyn® 提取物的两个样品的红外光谱图

图 8

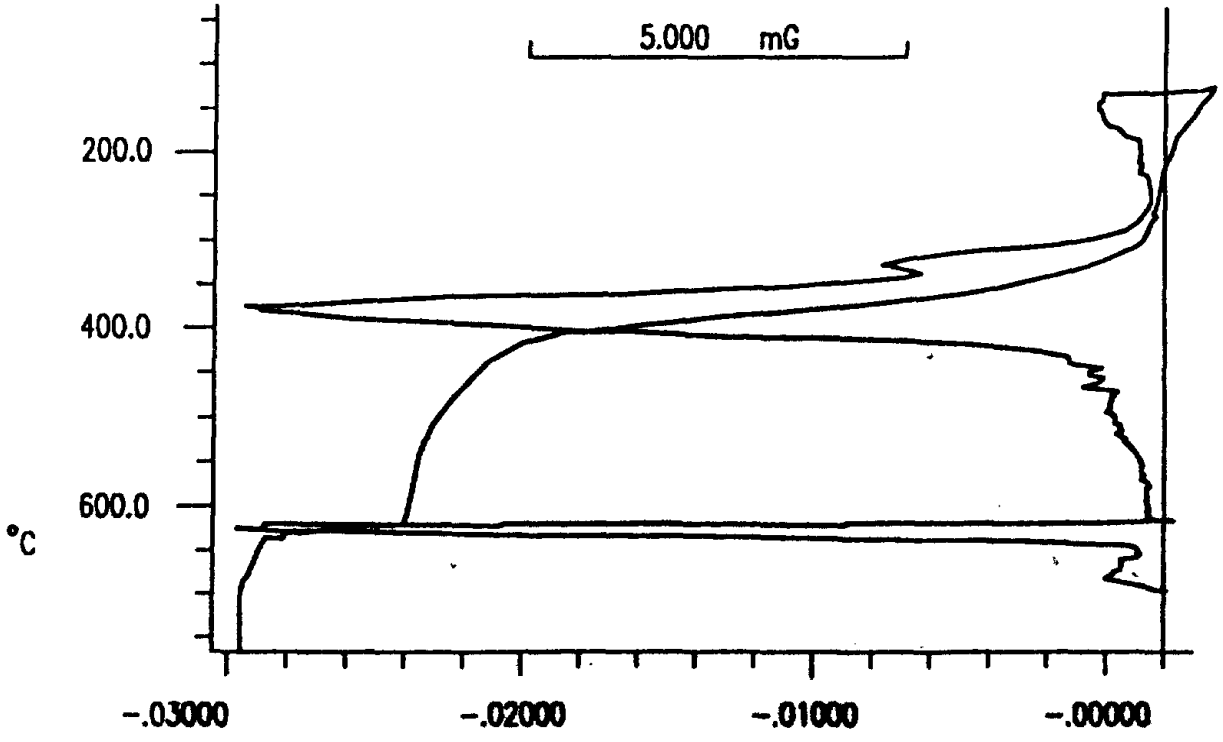


图 9 Carrisyn® 提取物的差示温谱图

被草酸钙污染的Carrisyn® 提取物的差示温谱图

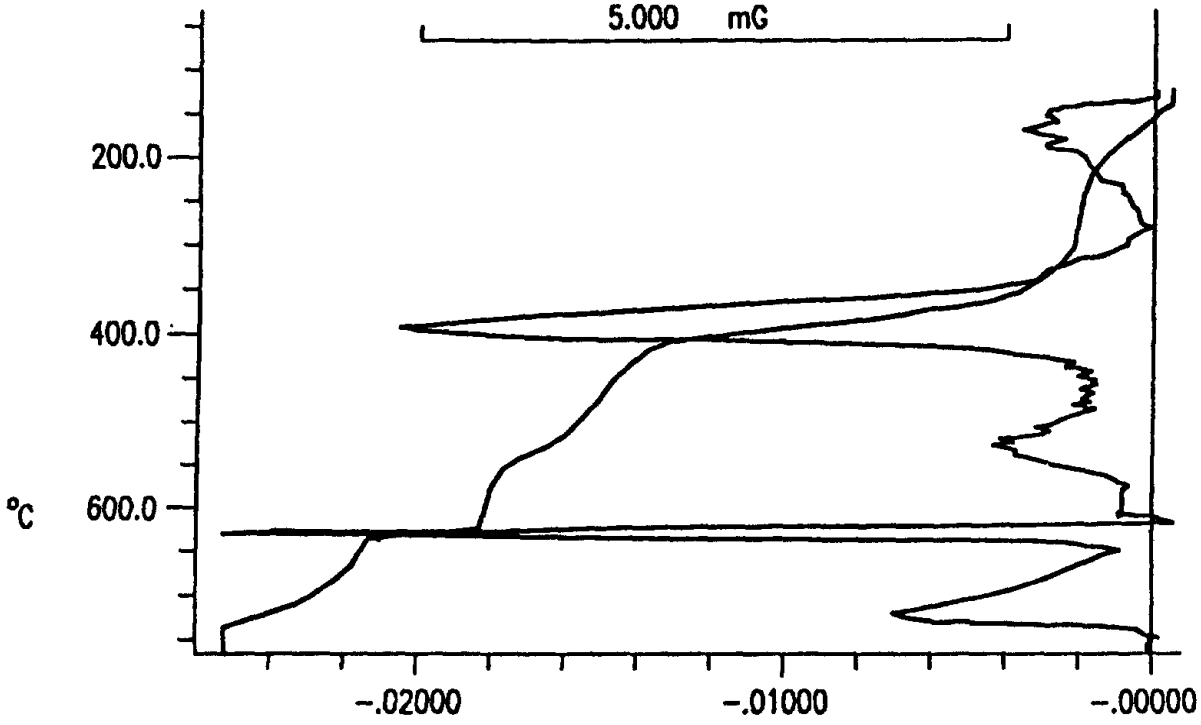


图 10

Carrisyn® 提取物的特性示意图

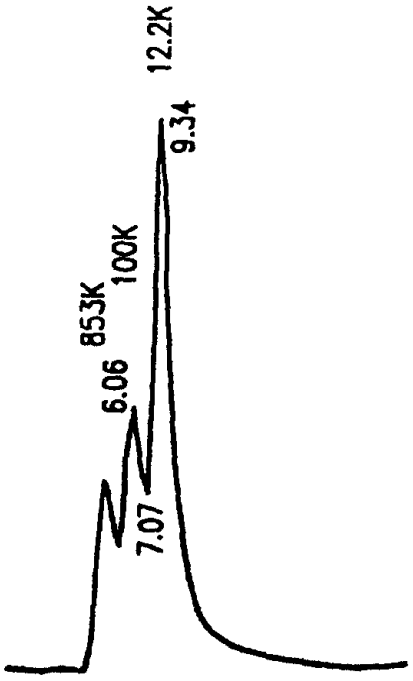


图 11

水溶性多糖标准品的筛析色谱图

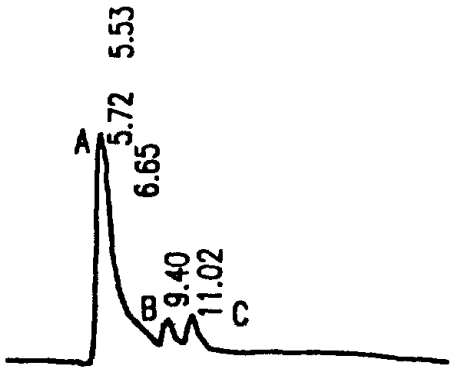


图 12

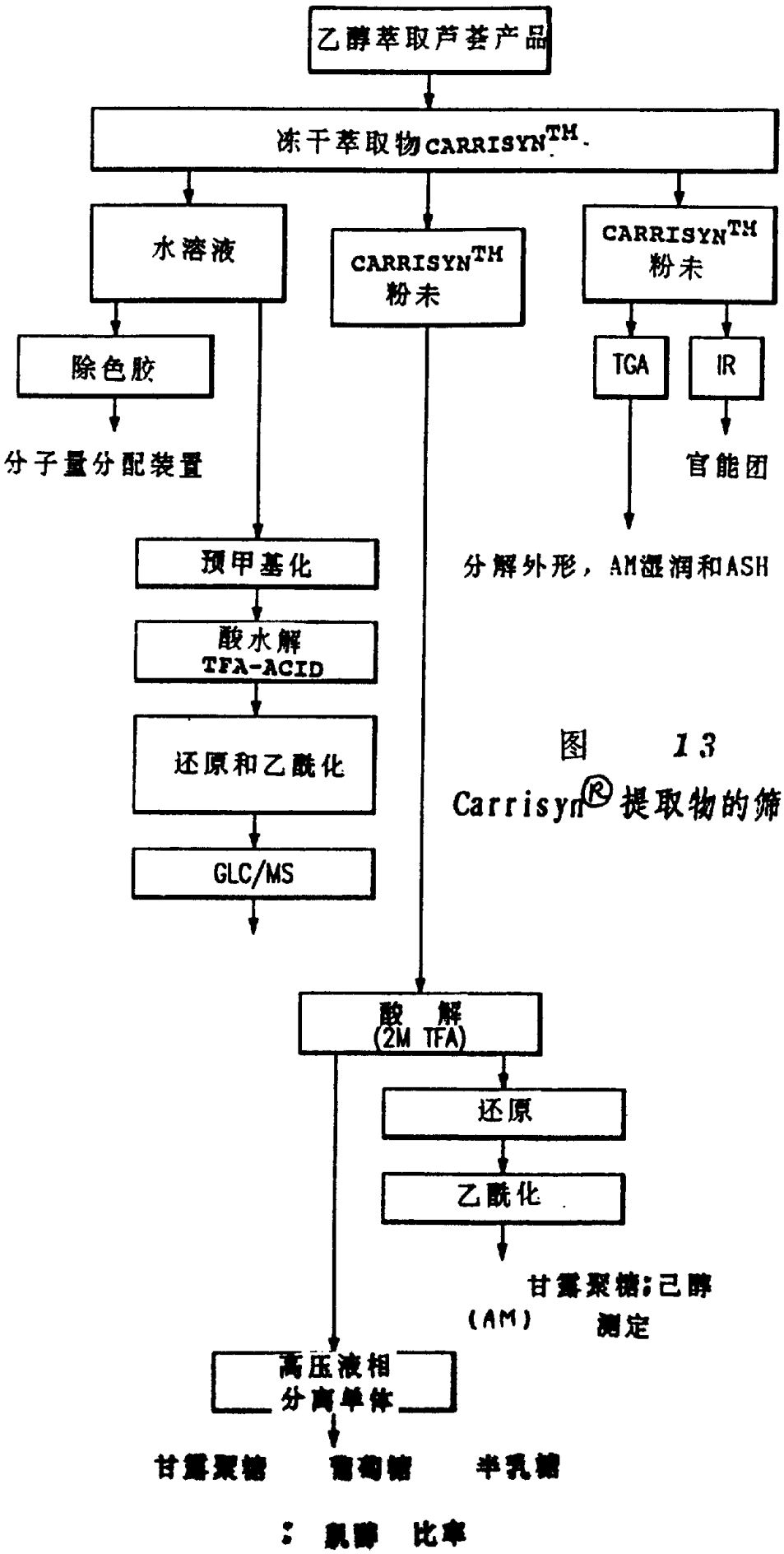


图 13

Carrisyn® 提取物的筛析色谱图

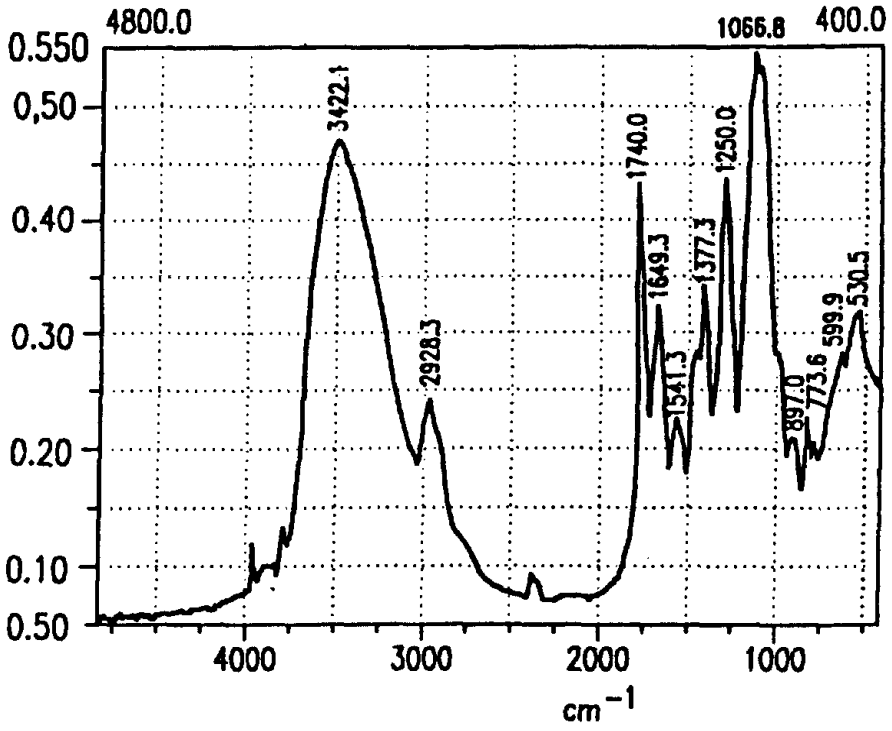


图 14

经非蛋白的酶处理的Carrisyn® 提取物的红外光谱图

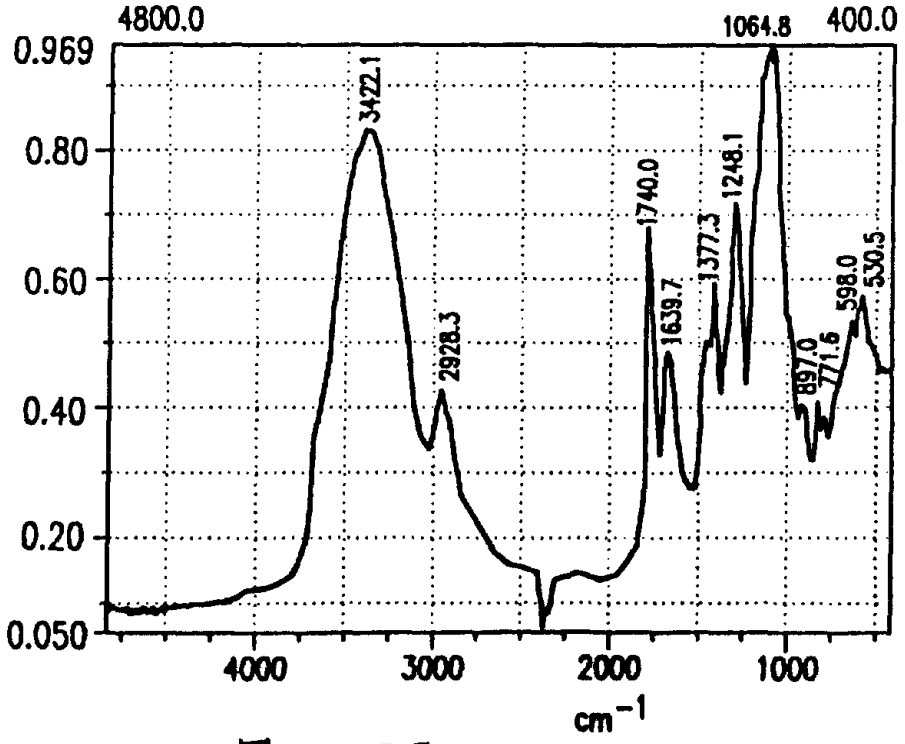


图 15

经蛋白酶处理的Carrisyn® 提取物的红外光谱图

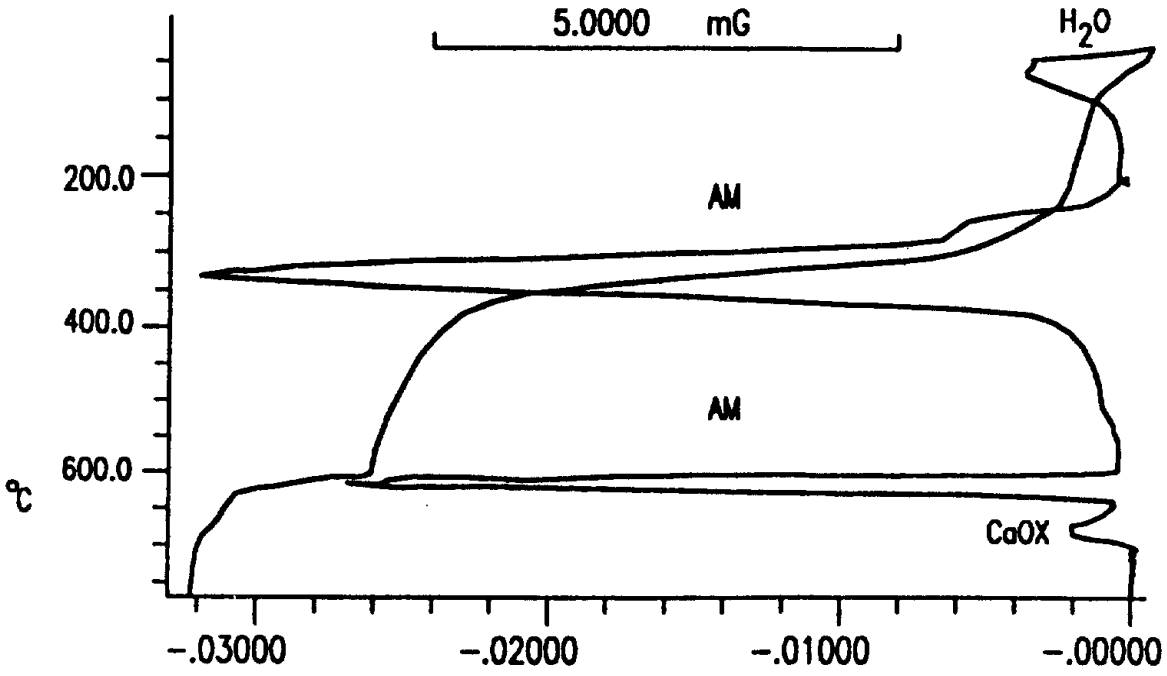


图 16

Carrisyn® 提取物的差示温谱图

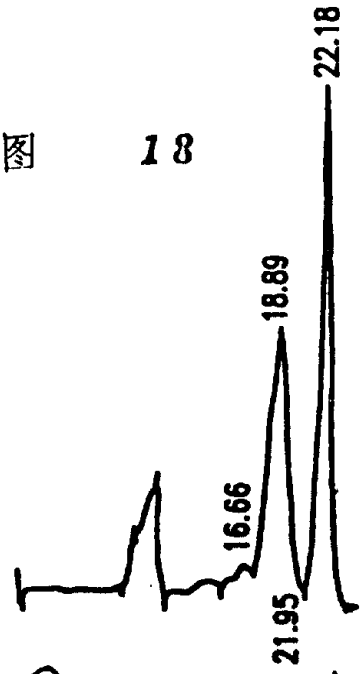


图 18

Carrisyn® 提取物的HPLC色谱图

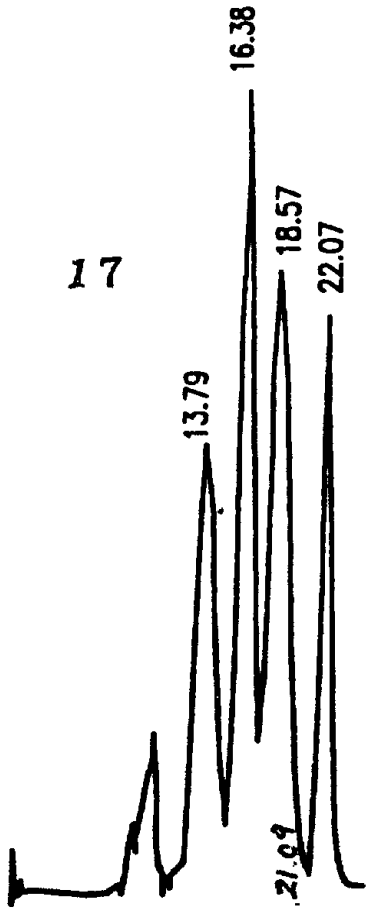


图 17

葡萄糖、半乳糖、甘露糖和肌醇的标准品混合物的HPLC色谱图

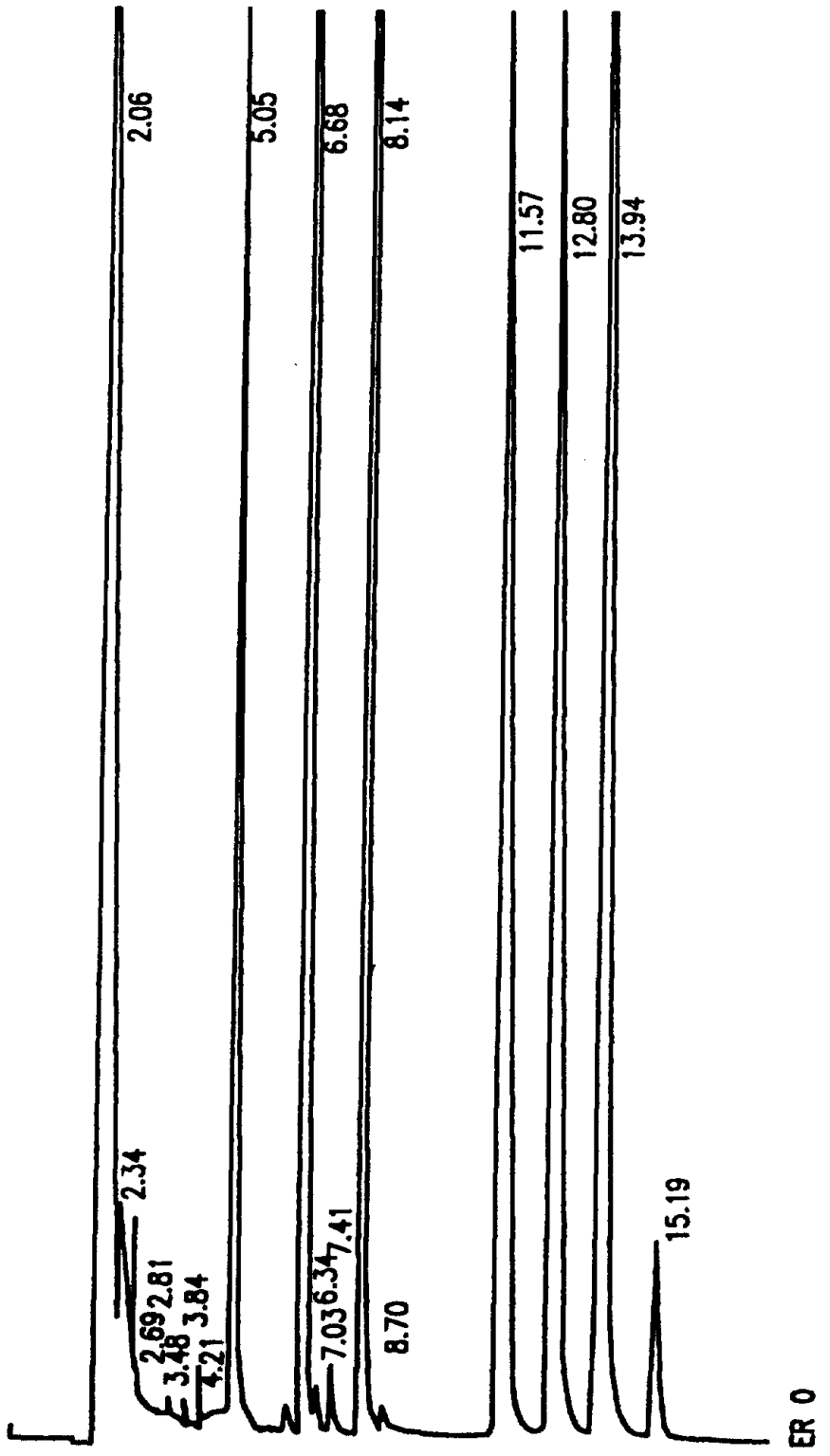
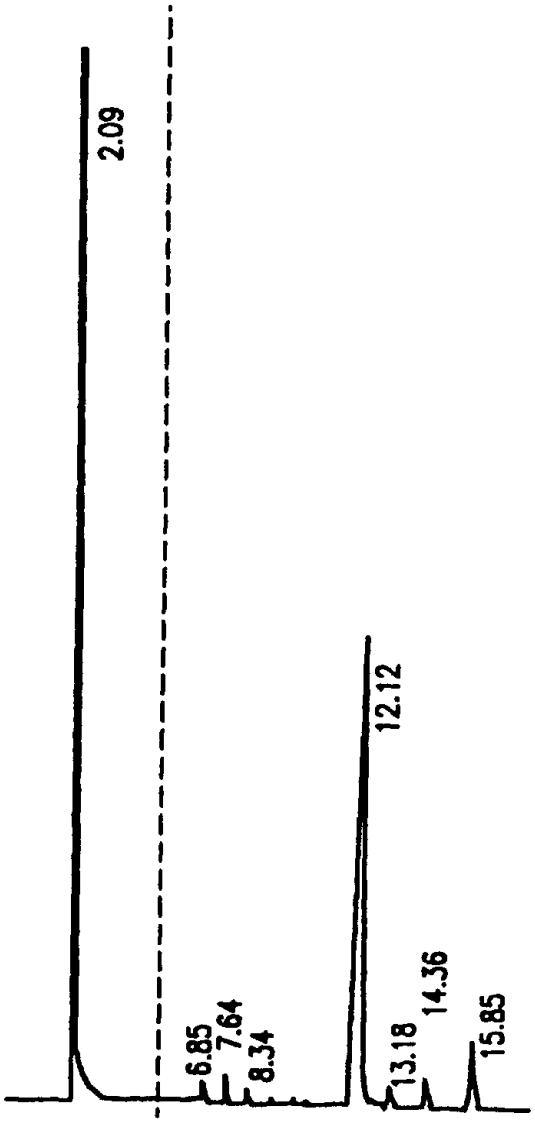


图　19

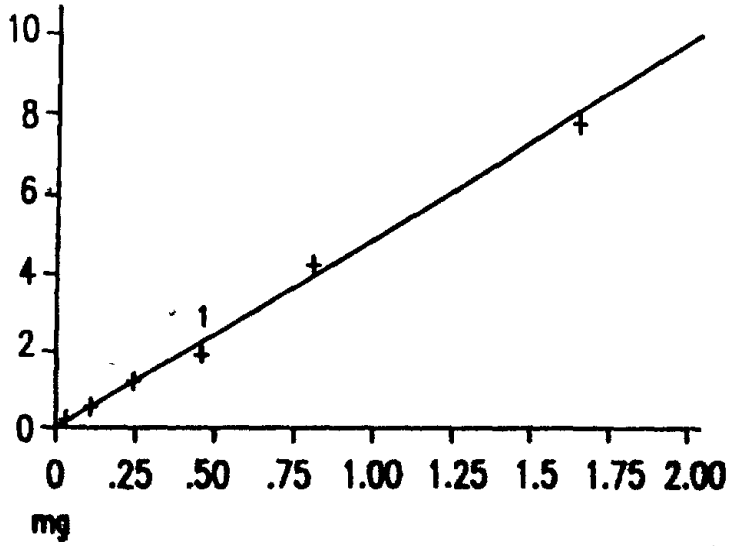
鼠李糖、岩藻糖、阿戊糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖和肌醇及其糖醇乙酸酯标准品混合物的气液色谱(GLC)图

图 20

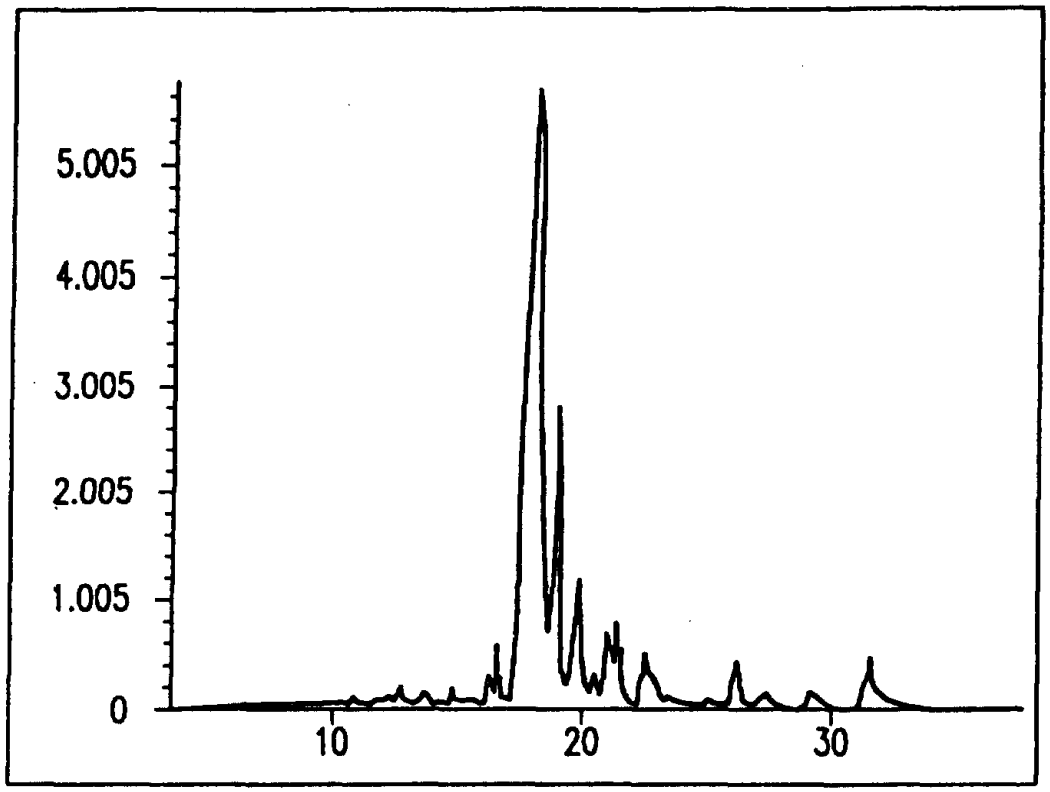


Carrisyn® 提取物的气液色谱图

图 21



以acemannan 为对照甘露糖/ 肌醇之比率的标准曲线



Carrisyn® 提取物的部分甲基化和部分乙酰基化的糖醇的总离子色谱图

图 22

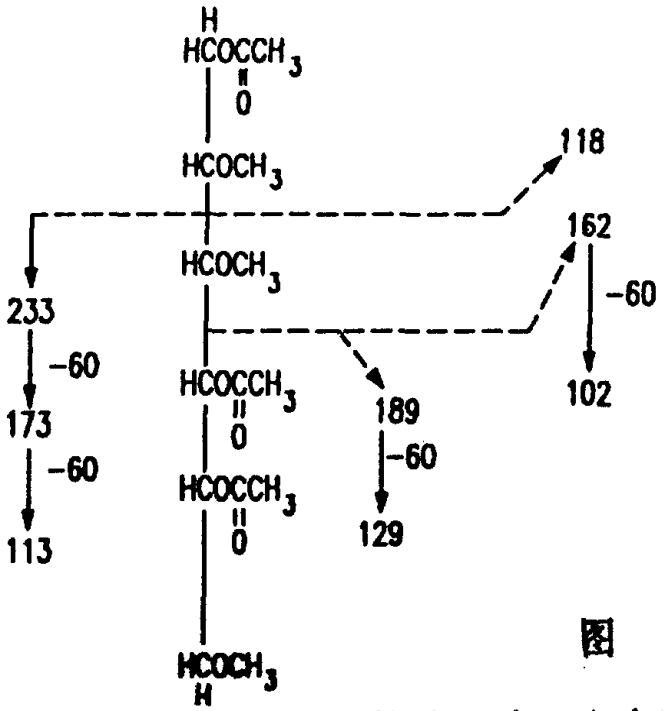
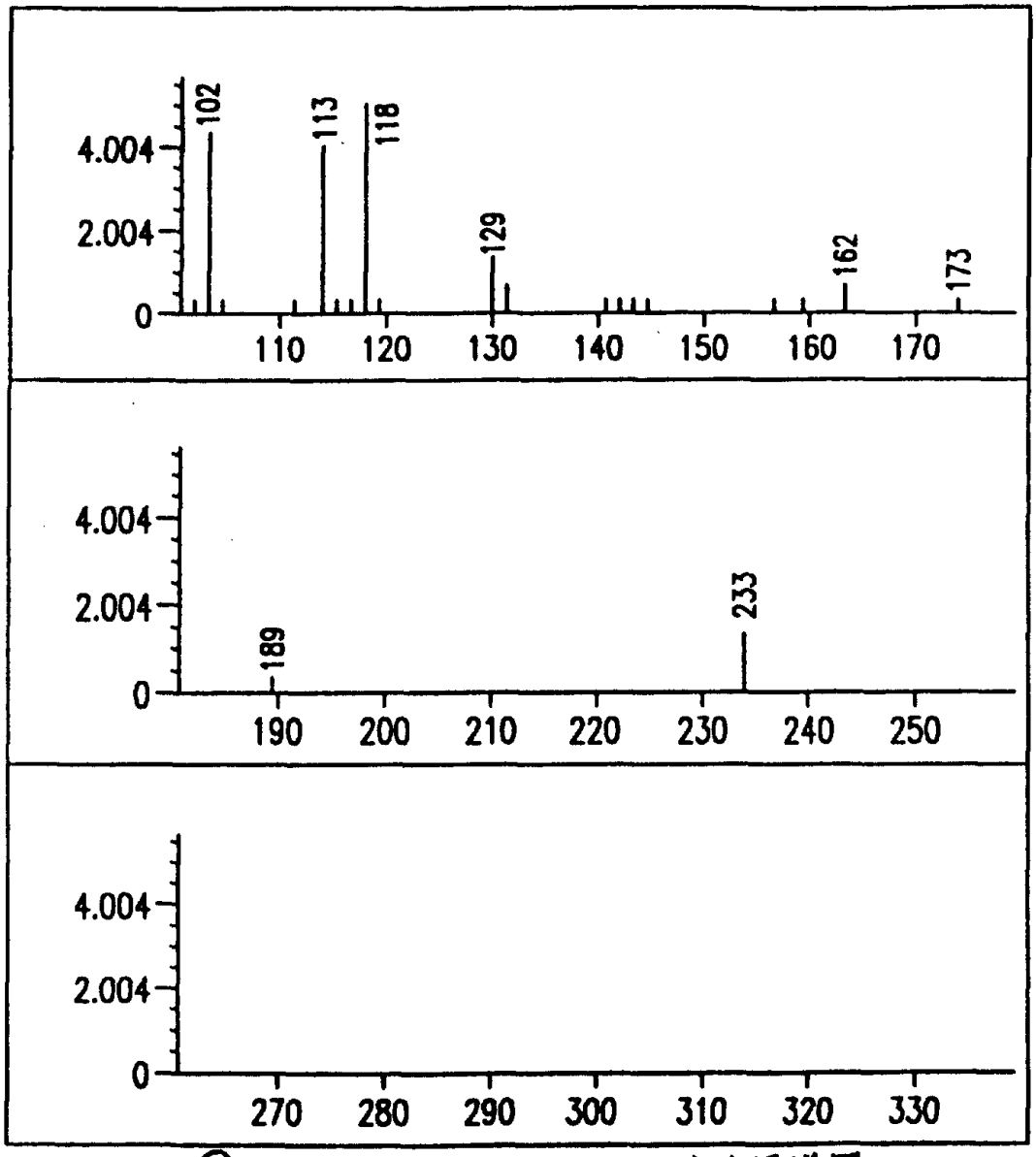


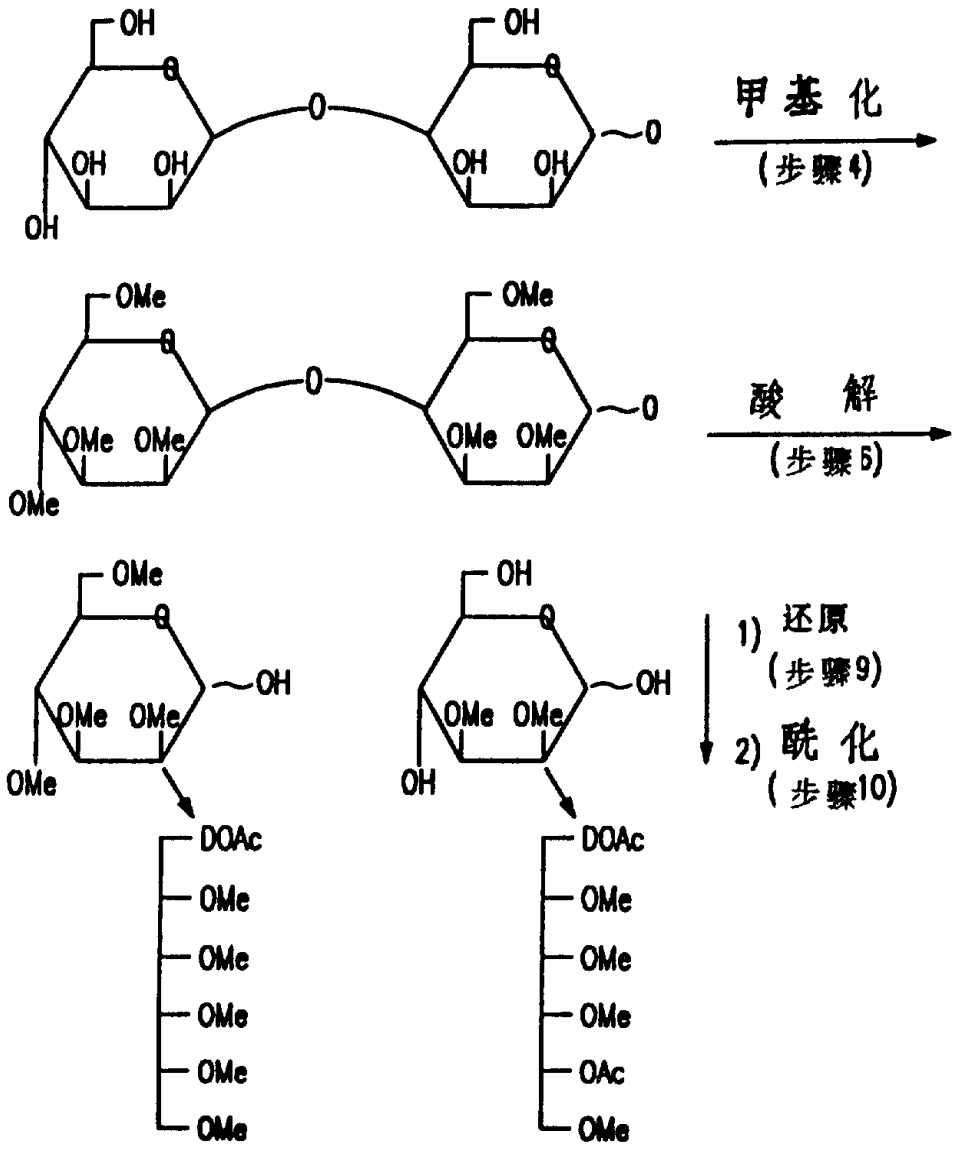
图 25

在质谱分析过程中甲基化的甘露糖醇乙酸酯的碎片离子图



Carrisyn® 提取物的部分乙酰化的糖醇的质谱图

图 23



部分甲基化的甘露糖醇乙酸酯的分子结构图

图 24