



· 制剂与炮制 ·

# 鱼腥草抗补体活性多糖的制备工艺研究

张娟娟, 卢燕\*, 陈道峰\*

(复旦大学药学院生药学教研室, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:建立鱼腥草中抗补体活性多糖的整套制备工艺。方法:以多糖得率和经典抗补体活性为综合指标,利用正交试验确定鱼腥草活性多糖的最佳提取工艺和最佳醇沉条件;以蛋白清除率和多糖保留率为综合指标,进行三氯乙酸除蛋白工艺优化;以色素去除率和多糖损失率为综合指标,利用正交试验优化最佳脱色工艺。结果:最佳制备工艺为于 50 倍水、90 ℃下煎煮 3 次、每次 2 h;将提取液浓缩至相当于每毫升 0.12 g 生药,加入 4 倍体积的 90% 乙醇,静置 24 h;离心去上清液,沉淀依次用无水乙醇、丙醇、无水乙醚洗涤,再用水复溶,于复溶液中加入三氯乙酸至终浓度为 20% 除蛋白;于 50 ℃,pH 3.0,3% 活性炭下吸附 50 min 脱色。采用该工艺制备三批鱼腥草抗补体活性多糖,多糖得率平均为 4.03% (RSD 0.96%),糖质量分数平均为 80.97% (RSD 1.5%),蛋白质量分数平均为 2.02% (RSD 2.3%),补体抑制活性的  $CH_{50}$  平均为  $0.079 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (RSD 3.6%)。结论:本实验系统建立的工艺稳定可靠,所得多糖的糖含量高、活性强,适合鱼腥草抗补体活性多糖的大量制备。

**[关键词]** 鱼腥草;多糖;抗补体;提取;醇沉;除蛋白;脱色

补体系统是人体重要的免疫防御系统之一,但其过度激活会引起人体免疫系统的过度反应,造成人体自身正常组织的损伤,参与急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、老年性痴呆等多种重大疾病的病理过程<sup>[1-2]</sup>,目前临床上对补体系统过度激活相关疾病尚无理想的治疗药物。自然界中广泛存在具有抗补体作用的活性物质,包括多糖、黄酮、甾体、三萜、生物碱、蛋白质等多种类型<sup>[3-5]</sup>,从天然产物中寻找开发高效低毒的新型补体抑制剂越来越受到国内外学者的关注。鱼腥草为三白草科 Saururaceae 蕺菜属植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草或干燥地上部分,具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋的功效,临床上用于肺炎、上呼吸道感染、流感、肝炎等病的治疗<sup>[6]</sup>。作者在对中药抗补体活性成分的研究中发现,鱼腥草粗多糖具有强的抗补体活性,且无抗凝血副作用,并对实验动物的急性肺损伤和发热症状都有明显的防治

作用,是一种很有开发价值的天然补体抑制剂。文献[7]中曾以多糖含量和多糖得率为指标对鱼腥草多糖的水提工艺进行了研究,本实验首次系统研究了包括提取、醇沉、除蛋白和脱色的鱼腥草多糖整套制备工艺,首次引入补体抑制活性指标优化提取和醇沉工艺,为其在治疗补体过度激活相关疾病方面的应用及新药开发奠定基础。

## 1 材料

单糖对照品半乳糖单糖(中国食品药品检定研究院,批号 100226-200404);三氯乙酸(国药集团化学试剂有限公司,批号 T20090720);牛血清白蛋白(上海爱紫特生物科技有限公司,批号 100125);木瓜蛋白酶(上海源聚生物科技有限公司,批号 110617);考马斯亮蓝 G-250(Fluka 产品分装,批号 070325);透析袋(Merck,分子截留量 5 000~8 000,3 000~5 000)。硫酸、苯酚、盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、三氯乙酸均为分析纯,活性炭为市售(药用级),水为三蒸水。鱼腥草药材购自上海养和堂药业连锁经营有限公司,经复旦大学药学院生药学教研室卢燕副教授鉴定为蕺菜 *H. cordata* 的干燥地上部分。

电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];TDL-4 型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Well scan MK3 型酶标仪(Thermo Labsystems 公

**[稿件编号]** 20120224003

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30801508,30925042);上海市科委(10XD1405900,08DZ1971202);国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09301001-003)

**[通信作者]** \* 卢燕,博士,副教授,Tel:(021)51980157,E-mail:luyan@fudan.edu.cn;\* 陈道峰,教授,博士生导师,Tel:(021)51980135,E-mail:dfchen@shmu.edu.cn



司,芬兰);EYELA-OSB-2100 型旋转蒸发仪(东京理化 EYELA 公司);精达水浴恒温振荡器;德国 Martin Christ RLPHR 1-2 LD 型冷冻干燥器;UV759S 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 考察指标的测定** 抗补体活性测定:采用细胞溶血法<sup>[4]</sup>测定 50% 溶血所需最小供试品浓度,即 CH<sub>50</sub>。糖含量测定:苯酚-硫酸法<sup>[8]</sup>。蛋白含量测定:考马斯亮蓝法<sup>[9]</sup>。脱色率的计算:采用文献<sup>[10]</sup>方法,450 nm 下测定多糖溶液脱色前后的吸光度,计算脱色率。

**2.2 提取工艺** 取鱼腥草粗粉 2 g,精密称定,选择提取时间(A)、温度(B)、次数(C)、料液比(D)作考察因素,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计表进行水提工艺的条件优化,因素水平表见表 1。提取液浓缩离心后,上清液经 4 倍体积 90% 醇沉 24 h,过滤,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,得鱼腥草粗多糖。以多糖得率和抗补体活性为综合考察指标来评价各因素、水平对水提工艺的影响。

表 1 水提正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of the extracting experiments

水平	A 时间 /h	B 温度 /℃	C 次数	D 加水量 /倍
1	2.0	80	1	30
2	2.5	90	2	40
3	3.0	100	3	50

**2.3 醇沉工艺** 选择提取液质量浓度(g·mL<sup>-1</sup>, A)、醇沉浓度(B)、醇沉时间(C)、加醇量(体积倍数,D)作为考察的 4 因素,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计表进行醇沉工艺的条件优化,因素水平表见表 2。所得沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,得鱼腥草粗多糖。以多糖得率和抗补体活性为综合考察指标来评价各因素、水平对醇沉工艺的影响。

**2.4 除蛋白工艺** 多糖溶液在 4℃ 下加入一定浓度的三氯乙酸溶液,在 4℃ 下放置 2 h,用 10% NaOH 溶液中和后除去沉淀,即得脱蛋白的多糖溶液。实验共考察了 3%,5%,8%,13%,20%,30% 的三氯乙酸,以糖保留率和蛋白清除率为综合指标来评价除蛋白效果。

表 2 醇沉正交试验因素水平

Table 2 Factors and levels of the alcohol precipitate designing experiments

水平	A 提取液质量浓度 /g·mL <sup>-1</sup>	B 醇浓度 /%	C 醇沉时间 /h	D 加醇量 /倍
1	0.08	70	8	2
2	0.10	80	12	3
3	0.12	90	24	4

注:提取液质量浓度以药材质量计。

**2.5 脱色工艺** 以温度(A)、pH(B)、吸附时间(C)、活性炭用量(D)为考察因素,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计表进行脱色工艺的条件优化,因素水平表见表 3。以多糖损失率和色素去除率为综合指标来评价脱色效果。

表 3 活性炭脱色的正交试验因素水平

Table 3 Factors and levels of the decolorating experiments

水平	A 温度 /℃	B pH	C 吸附时间 /min	D 活性炭用量 /%
1	20	3.0	30	1
2	35	3.5	40	2
3	50	4.0	50	3

## 3 结果与结论

**3.1 提取工艺** 水提工艺正交试验结果见表 4,方差分析见表 5。

表 4 水提 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果

Table 4 Results of the orthogonal experiments on water extraction

No.	多糖得率/%	CH <sub>50</sub> /g·L <sup>-1</sup>	综合指标
1	3.93	0.087	0.951
2	8.29	0.067	4.376
3	11.07	0.071	5.199
4	5.18	0.070	2.849
5	8.62	0.096	2.155
6	4.77	0.079	1.948
7	5.18	0.060	3.662
8	4.29	0.048	4.270
9	5.68	0.078	2.405

方差分析显示,D 因素差异显著(P < 0.05);从表 4 可以看出,多糖得率最高的工艺为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,而所得多糖抗补体活性最强的工艺则为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,为了兼顾多糖得率与活性,本实验按照正交试验中

表 5 水提正交方差分析

Table 5 Variance analysis for water extraction

因素	组间平方和 SS	方差 MS	F	P
A	2.697	1.348	12.841	0.05 ~ 0.1
B	1.898	0.949	9.038	0.05 ~ 0.1
C	2.530	1.265	12.046	0.05 ~ 0.1
D	7.978	3.989	37.991	<0.05

注:  $f=2, F_{0.01}(1,2)=99, F_{0.05}(1,2)=19, F_{0.1}(1,2)=9$  (表 7, 10 同)。

Z 分综合评价法<sup>[11]</sup>计算综合指标(为避免结果出现负值,将计算结果均加上 3)进行工艺评价,优选的最佳提取工艺为  $A_1B_2C_3D_3$ ,即煎煮 2 h,温度 90 °C,煎煮 3 次,加水倍数为 50。

**3.2 醇沉工艺** 正交试验结果见表 6,方差分析见表 7。

表 6 醇沉  $L_9(3^4)$  正交试验结果

Table 6 Results of the orthogonal experiments on alcohol precipitation

No.	多糖得率/%	$CH_{50}/g \cdot L^{-1}$	综合指标
1	2.63	0.295	1.000
2	4.33	0.154	3.513
3	10.17	0.068	7.144
4	4.67	0.066	4.767
5	6.27	0.058	5.567
6	6.77	0.055	5.823
7	5.08	0.073	4.859
8	6.89	0.064	5.762
9	8.56	0.058	6.567

表 7 醇沉正交方差分析

Table 7 Variance analysis for alcohol precipitation

因素	组间平方和 SS	方差 MS	F	P
A	5.765	2.883	24.022	<0.05
B	13.237	6.618	55.154	<0.05
C	4.153	2.077	17.305	0.05 ~ 0.1
D	3.761	1.880	15.669	0.05 ~ 0.1

方差分析显示,A,B 因素差异显著( $P < 0.05$ );从表 6 可以看出,多糖得率最高的工艺为  $A_3B_3C_3D_3$ ,而所得多糖抗补体活性最强的工艺则为  $A_2B_3C_3D_3$ ,为了兼顾多糖得率与活性,按照 Z 分综合评价法<sup>[11]</sup>计算多糖得率和抗补体活性综合指标,最佳醇沉工艺为  $A_3B_3C_3D_3$ ,即提取液浓缩至相当于每毫升 0.12 g 生药,加入 4 倍体积的 90% 乙醇,静置 24 h。

**3.3 除蛋白工艺** 不同浓度的三氯乙酸对鱼腥草多糖中蛋白的清除效果见表 8。

表 8 不同浓度的三氯乙酸对鱼腥草多糖中蛋白的清除效果

Table 8 Results of the deproteinizing experiments using different concentration of trichloroacetic acid %

三氯乙酸浓度/%	多糖保留率	蛋白去除率
3	92.93	45.66
5	74.30	47.31
8	70.91	55.43
13	60.24	62.19
20	55.73	70.68
30	54.45	71.78

结果显示,当三氯乙酸浓度达到 20% 后,蛋白去除率和多糖损失率变化均不大,且此时蛋白去除率达到 70.68%。故本实验选择终浓度为 20% 的三氯乙酸来清除鱼腥草多糖中的蛋白。

**3.4 脱色工艺** 正交试验结果见表 9,方差分析见表 10。

表 9 活性炭脱色  $L_9(3^4)$  试验结果

Table 9 Results of the orthogonal experiments on decoloration

No.	多糖损失率/%	色素去除率/%	综合指标
1	17.18	40.99	0.59
2	32.49	57.59	0.60
3	2.56	59.73	3.62
4	24.29	70.55	2.52
5	6.13	40.08	1.56
6	21.53	55.75	1.48
7	4.37	57.39	3.25
8	6.13	68.00	4.01
9	20.50	41.98	0.37

表 10 活性炭脱色方差分析

Table 10 Variance analysis for decoloration

因素	组间平方和 SS	方差 MS	F	P
A	1.409	0.705	7.416	
B	0.147	0.074	0.776	
C	4.063	2.031	21.382	<0.05
D	9.958	4.979	52.412	<0.05

注:  $f=2$ 。

方差分析显示,C,D 因素差异显著( $P < 0.05$ );按照正交试验中 Z 分综合评价法<sup>[11]</sup>计算综合指标,



综合评价鱼腥草活性炭脱色过程各因素对糖损失率和色素去除率的影响,优化的脱色工艺为 $A_3B_1C_3D_3$ ,即 50 °C, pH 3.0, 加入 3% 的活性炭吸附 50 min。

由于正交设计表中并无此条件,因此对其进行验证,结果脱色率达到了 60.12%,同时多糖损失率为 9.79%,说明此脱色工艺可行。

**3.5 总多糖的制备及验证试验** 根据以上结果确定鱼腥草抗补体活性总多糖的制备工艺:药材粉碎,95%乙醇渗漉后晾干,加 50 倍的水,90 °C 煎煮 3 次,每次 2 h。提取液浓缩至相当于每毫升 0.12 g 生药,加入 4 倍体积的 90%乙醇,静置 24 h。离心去上清液,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,再以水复溶;复溶液加入三氯乙酸至 20% (体积分数),于 4 °C 下静置 2 h,10% NaOH 调 pH 至 7,离心,取上清。所得上清液用 0.1 mol · L<sup>-1</sup>的盐酸调 pH 至 3.0,于 50 °C 下,加入 3% 的活性炭吸附 50 min,离心,取上清液,浓缩,透析,冻干。按该工艺平行试验 3 次,试验结果见表 11,证明该工艺稳定。

表 11 总多糖制备工艺验证

Table 11 Confirmatory tests of the preparation procedures of crude polysaccharide preparation

药材质量 /g	多糖质量 /g	多糖得率 /%	糖含量 /%	蛋白含量 /%	CH <sub>50</sub> /g · L <sup>-1</sup>
2.016 8	0.080 3	3.98	79.33	2.04	0.076
2.007 5	0.081 7	4.07	81.56	1.96	0.079
1.990 7	0.080 6	4.05	82.03	2.07	0.083

#### 4 讨论

本实验系统研究了鱼腥草多糖的提取、醇沉、除蛋白及脱色整套制备工艺,而且在提取、除蛋白和脱色工艺研究中,都是通过预实验从多种常用方法中筛选出既符合鱼腥草多糖特点又适合工业化生产的方法,进而通过正交或单因素实验优化最佳工艺。如提取预实验发现,文献中水提、酸提、碱提和酶提 4 种方法<sup>[7,12-14]</sup>对鱼腥草多糖的提取效果都较好,多糖得率分别为 8.38%, 8.07%, 7.81%, 5.82%; CH<sub>50</sub>分别为 0.078, 0.098, 0.075, 0.066 g · L<sup>-1</sup>,但酸法、碱法、酶法在操作上比较繁琐,不适于工业化生产,且采用酸碱提取时 pH 控制不当有可能破坏多糖结构,因此确定采用水提工艺提取。Sevage 法、三氯乙酸法、盐酸法和木瓜蛋白酶法 4 种常用除蛋

白方法<sup>[15-16]</sup>中,Sevage 法使用氯仿和正丁醇有毒溶剂,易造成多糖活性降低和溶剂残留,木瓜蛋白酶操作繁琐,盐酸法对鱼腥草多糖中蛋白的清除率低于 30%,而三氯乙酸法的蛋白去除率超过 70%,故本实验确定采用三氯乙酸法除蛋白。同样,比较了双氧水、大孔树脂 D101 和活性炭 3 种脱色方法<sup>[10,17-18]</sup>对鱼腥草粗多糖的脱色效果,发现双氧水脱色虽然效果较好,但是直接氧化提取液中的色素,并未脱去,且有可能破坏多糖的结构;大孔树脂 D101 脱色效果很差,且操作较繁琐;活性炭对鱼腥草多糖的脱色率达到 60% 以上,且原料易得、操作简单、价格低廉,故确定用活性炭脱色。

本实验首次将抗补体活性作为指标之一优化鱼腥草多糖的水提和醇沉工艺条件,以综合指标优选的工艺既保证了较高的多糖提取得率,又确保了所制备的鱼腥草多糖具有较强的抗补体活性,可以较好保证产品质量及疗效的稳定性。

鱼腥草是传统的清热解毒中药,又是国家卫生部正式确定的“药食两用”的品种之一。采用本实验优选工艺制备的鱼腥草多糖的糖含量高、抗补体活性强、蛋白及色素杂质少,可作为一种新的天然抗补体抑制剂,为鱼腥草在治疗补体过度激活相关重大疾病方面的应用与开发奠定了基础,对鱼腥草资源的充分利用具有重要意义。

#### [参考文献]

- [1] 刘永铭, 严祥, 刘艳英. 补体与动脉粥样化[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(9): 866.
- [2] 王秀良, 唐芳, 李慧敏. 器官移植常用免疫抑制剂的不良反应[J]. 中国药业, 2002, 11(6): 43.
- [3] 徐晗, 章蕴毅, 张建文, 等. 天然产物中的抗补体活性成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(5): 321.
- [4] Xu Han, Zhang YunYi, Zhang JianWei, et al. Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii*[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7:175.
- [5] Pieroni A, Heimler D, Pieters L, et al. In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europea* L.) leaves[J]. Pharmazie, 1996, 51(10): 765.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2010: 208.
- [7] 孟江, 周毅生, 廖华为, 等. 正交试验法优化鱼腥草多糖水煎煮提取工艺[J]. 世界中西医杂志, 2007, 2(6): 341.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994:11.
- [9] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1):115.



- [10] 孟江, 周毅生, 廖华卫. 鱼腥草多糖活性炭脱色工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 112.
- [11] 赵应征, 鲁翠涛, 梅兴国. 常用多指标综合评价法在优选实验中的应用[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(7): 624.
- [12] 嵇文亚, 孟江, 徐玉茵, 等. 酸法提取鱼腥草多糖工艺研究[J]. 河南中医学院学报, 2008(3): 22.
- [13] 杨云, 刘福勤, 冯卫生, 等. 碱法提取大枣渣多糖及活性炭脱色的工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(7): 30.
- [14] 杨学敏, 陈仪男, 李志明, 等. 超声波萃取和酶解法提取大杯蕈多糖的比较[J]. 莆田学院学报, 2011, 18(2): 28.
- [15] 黄纯, 马驰, 宋慧智, 等. 亮菌多糖中提取中脱蛋白和脱色方法的比较[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(1): 45.
- [16] 董英, 张艳芳, 孙艳辉. 水飞蓟粗多糖脱蛋白方法的比较[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 82.
- [17] 龚桂珍, 张学俊. 杜仲叶多糖脱色的研究[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(3): 42.
- [18] 王维香, 王晓君, 黄潇, 等. 川芎多糖脱色方法比较[J]. 离子交换与吸附, 2010, 26(1): 74.

## Preparation procedures of anti-complementary polysaccharides from *Houttuynia cordata*

ZHANG Juanjuan, LU Yan\*, CHEN Daofeng\*

(Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To establish and optimize the preparation procedures of the anti-complementary polysaccharides from *Houttuynia cordata*. **Method:** Based on the yield and anti-complementary activity *in vitro*, the conditions of extraction and alcohol precipitating process were optimized by orthogonal tests. The optimal condition of deproteinization was determined according to the results of protein removed and polysaccharide maintained. The best decoloring method was also optimized by orthogonal experimental design. **Result:** The optimized preparation procedures were given as follows: extract the coarse powder 3 times with 50 times volume of water at 90 °C for 2 hours every time, combine the extracts and concentrate appropriately, equivalent to 0.12 g of *H. cordata* per milliliter. Add 4 times volume of 90% ethanol to the extract, allow to stand for 24 hours to precipitate totally, filter and the precipitate was successfully washed with anhydrous alcohol, acetone and anhydrous ether. Resolve the residue with water, add trichloroacetic acid (TCA) to a concentration of 20% to remove protein. Decoloration was at a concentration of 3% with activated carbon at pH 3.0, 50 °C for 50 min. The above procedures above were tested 3 times, resulting in the average yield of polysaccharides at 4.03% (RSD 0.96%), the average concentrations of polysaccharides and protein at 80.97% (RSD 1.5%) and 2.02% (RSD 2.3%), and average  $CH_{50}$  at 0.079 g · L<sup>-1</sup> (RSD 3.6%). **Conclusion:** The established and optimized procedures are repeatable and reliable to prepare the anti-complementary polysaccharides with high quality and activity from *H. cordata*.

[Key words] *Houttuynia cordata*; polysaccharide; anti-complementary; extraction; ethanol precipitation; deproteinization; decoloration

doi:10.4268/cjcm20121408

[责任编辑 马超一]