

夏枯草抗疱疹病毒多糖的提取及纯化工艺研究

孔思远^{1,2} 吴蓉^{1,2} 蔡双璠^{1,2} 谭红胜^{1,2}

(1 上海中医药大学,上海,201203; 2 中药创新药物研发上海高校工程研究中心,上海,201203)

摘要 目的:优化夏枯草抗疱疹病毒多糖的提取及纯化工艺,为新药研究提供科学依据。方法:以多糖含量和浸膏得率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法对夏枯草多糖提取过程中的提取次数,加水倍量及提取时间 3 个因素进行优化研究;以多糖含量及体外抗单纯性疱疹病毒 I 型(HSV-1)活性为考察指标,对超滤和醇沉两种纯化技术进行比较。结果:最优水提工艺为第 1 次加水 14 倍,第 2、3 次加水 12 倍,提取 3 次,每次提取时间 1.5 h;采用超滤和醇沉两种技术分别纯化所得多糖。通过 MTT 法测得醇沉多糖和超滤多糖抑制 HSV-1 的 IC_{50} 分别为 $(93.99 \pm 13.12) \mu\text{g/mL}$ 和 $(51.35 \pm 15.30) \mu\text{g/mL}$,结果表明超滤技术制备的多糖提取物抗单纯性疱疹病毒活性显著高于醇沉技术。结论:采用超滤技术制备的夏枯草多糖具有较高的含量及抗单纯性疱疹病毒活性,可作为夏枯草多糖开发新药的纯化工艺。

关键词 夏枯草;抗疱疹病毒;多糖;提取;纯化;醇沉;超滤

Extraction and Purification of Anti-HSV Polysaccharides from *Prunella Vulgaris*

Kong Siyuan^{1,2}, Wu Rong^{1,2}, Cai Shuangfan^{1,2}, Tan Hongsheng^{1,2}

(1 School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2 Engineering Research Center of Shanghai Colleges for TCM New Drug Discovery, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: The aim of this study is to optimize the extraction and purification process for anti-HSV polysaccharides from *Prunella Vulgaris*. **Methods:** The extraction method was modified by an orthogonal array experiment on three variable parameters: extraction time, solvent volume and extraction times. The content of polysaccharides and extraction yield were used as index. The effects of ultrafiltration technology and alcohol precipitation were compared in the purity of polysaccharide and anti-HSV activity. **Results:** The optimized extraction parameters are three extractions, 1.5 hour extraction time, 14 times of water for the first extraction and 12 times of water for the second and third extraction. The polysaccharide obtained from ultrafiltration technology and alcohol precipitation showed anti-HSV-1 activity in MTT assay, with IC_{50} values of $(93.99 \pm 13.12) \mu\text{g/mL}$ and $(51.35 \pm 15.30) \mu\text{g/mL}$, respectively. The results suggested that the two purification processes have significantly different degrees of polysaccharide purity. The anti-HSV activity of polysaccharide from ultrafiltration technology was significantly higher than that of alcohol precipitation. **Conclusion:** The polysaccharides from *Prunella Vulgaris* obtained using ultrafiltration technology have higher anti-HSV activity than that isolated by alcohol precipitation.

Key Words *Prunella Vulgaris* L.; Anti-HSV; Polysaccharides; Extraction; Purification; Alcohol precipitation; Ultrafiltration

中图分类号:R285.0 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.07.002

夏枯草为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗,因“夏至后即枯”而得名。具有清肝泄火,明目,散结消肿等功效。用于治疗目赤肿痛,目珠夜痛,头痛眩晕,瘰癧,癭瘤,乳瘤,乳癖,乳房胀痛等,民间饮用的历史已有 1000 多年。现代药理及化学成分研究证明,夏枯草主要含有三萜、黄酮、苯丙素、甾体、有机酸、挥发油及多糖类等成分^[1],具有降血压、降血糖、抗菌、抗病毒、调节免疫力等作用。从夏枯草中分离纯化的多糖有抗 I 型单纯性疱疹病毒(HSV-1)和 II 型单纯性疱疹病毒(HSV-2)的作用,其作用机制不同于目前临床药物阿昔洛韦

(ACV),可能不是直接作用于病毒的复制环节,而是阻止病毒吸附和穿入宿主细胞,以及促进淋巴细胞转化增殖和诱生干扰素等免疫调节作用,因此对标准病毒株和临床耐药株均有效,且不易产生耐药性^[2-6]。

本实验拟采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对水提多糖过程中的提取次数、加水倍量和提取时间进行优选,以体外抗单纯性疱疹病毒活性为评价指标,对超滤纯化多糖技术与传统的醇沉纯化多糖工艺进行比较,为后续将夏枯草多糖开发为抗单纯性疱疹病毒的新药提供科学依据。

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划(编号:2013ZX09103002-020)

作者简介:孔思远(1991.02—),男,硕士研究生,研究方向:中药活性成分研究,E-mail:602552484@qq.com

通信作者:谭红胜(1977.05—),女,博士,副研究员,研究方向:中药活性成分研究及中药新药研发,E-mail:ths97029@163.com

1 仪器与材料

Spectrumlab 752S 紫外-可见分光光度计(上海棱光技术有限公司),CPA2250 电子分析天平(德国赛多利斯),多功能酶标仪(BioTeK Power Wave XS2),冷冻干燥机(Alpha 2-4 LD plus CHRTST),Pellicon XL FILTER Ultrafiltration Cassettes(Millipore Corporation),Labscale TFF System(Millipore Corporation)。

D-葡萄糖、95% 乙醇、蒽酮、硫酸、DMSO(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)、HSV-1 KOS 病毒(美国 ATCC 公司),MTT、台盼蓝(上海生工生物有限公司),PBS 磷酸盐缓冲盐(福建迈新试剂生物技术开发有限公司),DMEM 培养基、FBS(美国 Invitrogen 公司),青霉素-链霉素(杭州吉诺生物有限公司),ACV(中国药品生物制品检定所)。

夏枯草药材购于上海康桥中药饮片有限公司,经上海中医药大学中药学院生药教研室张红梅副教授鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗。

2 方法与结果

2.1 夏枯草多糖的测定

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取无水葡萄糖对照品 50.00 mg,置 25 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度(制成每 1 mL 含无水葡萄糖 0.2 mg 的溶液),即得。

2.1.2 0.1% 硫酸-蒽酮试剂的配制 精密称取 0.1 g 蒽酮,加 100 mL 的 80% 硫酸溶液溶解,即得。

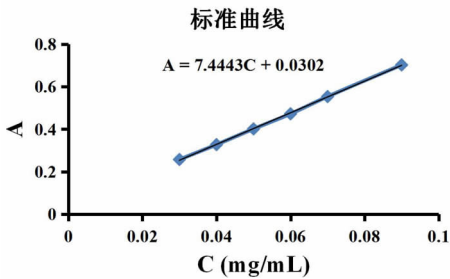


图1 硫酸-蒽酮法测定多糖含量标准曲线

2.1.3 标准曲线的绘制 分别精密量取对照品溶液 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 和 0.9 mL,置具塞试管中,加水至 2.0 mL,精密加入 0.1% 硫酸-蒽酮溶液 5 mL,摇匀,置水浴中加热 15 min,取出,放入冰浴中冷却 15 min,以相应的试剂为空白,参照紫外-可见分光光度法(2015 年版《中华人民共和国药典》通则 0401),在 625 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,含量为横坐标,绘制标准曲线(图 1),得回

归方程为 $A = 7.4443C + 0.0302$, $r = 0.9998$ 。结果表明葡萄糖浓度在 0.03 ~ 0.09 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 精密量取同一标准品溶液,测定吸光度值,重复测定 6 次,求得吸光度值的 RSD 值为 0.00%。说明该仪器的精密度良好。

表 1 精密度试验结果

编号	吸光度(A)	吸光度平均值(A)	相对标准偏差(RSD%)
1	0.441	0.441	0.00
2	0.441		
3	0.441		
4	0.441		
5	0.441		
6	0.441		

2.1.5 稳定性试验 精密量取夏枯草水提液样品溶液,按标准曲线的制备项下方法操作,每 5 min 测定 1 次吸光度,测定值在 90 min 内保持稳定,其 RSD 值为 0.86%。表明处理后的提取液在 90 min 内测定过程中状态稳定。

表 2 稳定性试验结果

编号	时间(min)	吸光度(A)	吸光度平均值(A)	相对标准偏差(RSD%)
1	5	0.499	0.494	0.86
2	10	0.497		
3	20	0.496		
4	30	0.495		
5	45	0.494		
6	60	0.491		
7	75	0.488		
8	90	0.488		

2.1.6 重复性试验 取夏枯草药材粉约 0.5 g,6 份,精密称定,按已确定的提取方法提取,测定,其 RSD 值为 2.09%,多糖含量为 10.56 mg/g。

表 3 重复性试验结果

编号	称样量(g)	含量(mg/g)	平均含量(mg/g)	相对标准偏差(RSD%)
1	0.5038	10.25	10.56	2.09
2	0.5007	10.39		
3	0.5005	10.48		
4	0.5003	10.69		
5	0.4992	10.77		
6	0.5013	10.79		

2.1.7 加样回收率试验 称已知含量的夏枯草药材粗粉约 0.25 g,共 6 份,精密称定,置圆底烧瓶中,加水 50 mL,分别加入 0.212 mg/mL 的葡萄糖对照品水溶液 0.8、1.0、1.2 mL 各 2 份,加热回流提取 90 min,提取液过滤,转移至 50 mL 量瓶中,加水至刻

度,摇匀。精密量取 5 mL,加入 95% 乙醇 25 mL,摇匀,4 500 r/min 离心 10 min,倾去上清液,沉淀加水溶解,转移至 10 mL 量瓶中,按拟定的含量测定方法测定,计算回收率。结果平均回收率为 97.49%,其 *RSD* 值为 2.17%。表明该测定方法准确。

表 4 加样回收率结果

编号	称样量 (g)	含量 (mg)	对照品加入前含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	对照品测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.2501	2.64	0.26	0.17	0.44	100.97	97.49	2.17
2	0.2519	2.66	0.27	0.17	0.43	98.48		
3	0.2492	2.63	0.26	0.21	0.47	95.72		
4	0.2514	2.65	0.26	0.21	0.47	97.92		
5	0.2484	2.62	0.26	0.25	0.51	96.57		
6	0.2477	2.62	0.26	0.25	0.50	95.25		

2.3 影响提取主要因素的优化 选择提取次数、加水倍量、提取时间为考察因素,以夏枯草多糖含量(夏枯草多糖含量=多糖质量/药材质量)和浸膏得率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计优选最佳水提工艺条件,因素与水平见表 5。

表 5 因素与水平

水平	因素		
	A 提取次数/次	B 加水倍量/倍	C 提取时间/h
1	1	10	0.5
2	2	12	1
3	3	14	1.5

表 6 正交试验的设计和结果

试验号	A	B	C	D(空白)	多糖含量(mg/g)
1	1	1	1	1	5.28
2	1	2	2	2	6.65
3	1	3	3	3	8.38
4	2	1	2	3	11.23
5	2	2	3	1	13.26
6	2	3	1	2	11.08
7	3	1	3	2	16.06
8	3	2	1	3	13.14
9	3	3	2	1	15.56
K1	20.31	32.56	29.49	34.10	
K2	33.57	33.05	33.44	33.79	
K3	44.75	35.02	33.70	32.74	
R	8.15	0.82	2.74	0.45	

表 7 多糖含量方差分析

方差来源	SS	df	MS	F	P	显著性
A 提取次数	254051.8	2	127025.9	302.971	0.003	* <i>P</i> < 0.05
B 料液比	2819.457	2	1409.729	3.362	0.229	<i>P</i> > 0.05
C 提取时间	28097.203	2	14048.601	33.507	0.029	* <i>P</i> < 0.05
误差	838.535	2	419.267			
总误差	285807	8				

2.2 浸膏得率的测定 参照浸出物测定法(2015 年版《中华人民共和国药典》通则 2201),精密量取 20 mL 供试品溶液,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 105 ℃干燥 3 h,移至干燥器中,冷却 30 min,迅速精密称定重量。

称取夏枯草药材 50 g,9 份,按正交设计方案安排加热回流提取,滤过,合并水提液,加水定容至 1 750 mL,摇匀,精密量取 2 mL 置 15 mL 离心管中,加入 15 mL 95% 的乙醇溶液,4 ℃下静置 1 h,离心(4 000 r/min、10 min),倾去上清液,沉淀加水溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加水至刻度,摇匀,精密量取供试品溶液 2 mL,照标准曲线制备项下的方法测定,计算夏枯草中多糖含量和浸膏得率。对试验结果进行直观分析和方差分析,结果见表 6~表 9。

表 8 正交试验的设计和结果

试验号	A	B	C	D(空白)	浸膏得率(%)
1	1	1	1	1	6.89
2	1	2	2	2	7.63
3	1	3	3	3	9.12
4	2	1	2	3	9.35
5	2	2	3	1	10.05
6	2	3	1	2	11.67
7	3	1	3	2	12.18
8	3	2	1	3	15.01
9	3	3	2	1	15.56
K1	23.64	28.42	33.57	32.50	
K2	31.07	32.69	32.54	31.48	
K3	42.75	36.35	31.35	33.48	
R	6.37	2.64	0.74	0.67	

由分析结果可知,提取次数对多糖含量和浸膏得率均有显著性影响,提取时间对多糖含量有显著性影响而对浸膏得率无显著性影响,料液比对多糖含量和浸膏得率均无显著性影响,综合多糖含量和浸膏得率两个指标,从节约时间,降低能耗的生产实际出发,在保证提取充分的前提下,综合分析各个影响因素,拟定最佳工艺条件为 A3B1C3,由于药材的吸水量为药材重量的 2 倍,考虑提取时料液能将药材浸没,选择料液比为 12,因此最佳工艺为第 1 次

加水 14 倍,第 2、3 次加水 12 倍,提取 3 次,提取时间 1.5 h。

表 9 浸膏得率方差分析

方差来源	SS	df	MS	F	P	显著性
A 提取次数	61.869	2	30.934	92.791	.011	$P<0.05$
B 料液比	10.501	2	5.251	15.750	.060	$P>0.05$
C 提取时间	.823	2	.411	1.234	.448	$P>0.05$
误差	.667	2	.333			
总误差	73.860	8				

2.4 验证试验 对所选最佳提取工艺条件进行验证性试验,按优选的工艺条件进行验证,结果见表 10,该水提工艺条件稳定性良好。

表 10 水提多糖验证结果

指标	1	2	3	RSD%
多糖含量(mg/g)	18.38	19.23	18.46	2.51

2.5 纯化工艺 醇沉工艺:预实验结果显示 50%乙醇浓度制备的夏枯草粗多糖纯度(夏枯草多糖纯度=多糖质量/浸膏质量)最高,抗单纯性疱疹病毒活性最好。因此,选择醇沉终浓度为 50%。取夏枯草提取液浓缩至适当密度,加入乙醇使醇沉体积分数达 50%,静置 12 h,离心,收取沉淀,挥去乙醇,冻干,备用。

超滤工艺:预实验结果表明不同截留分子量制备的夏枯草粗多糖纯度无显著差异,而截留分子量 50KDa 所得的样品抗单纯性疱疹病毒活性最好。因此,选择截留分子量 50KDa 的滤膜。取夏枯草水提液原液 200 mL 过 0.45 μm 水相膜,滤液至于 Lab-scale TFF System 样品杯中连接 50KDa Pellicon3® XL 超滤膜包,将上下两压力表的压力差保持在 10psi,并调节回流速度,当样品杯中剩余 10 mL 溶液时收集样品,冻干,备用。

对醇沉和超滤两种纯化工艺制备的样品进行夏枯草粗多糖的纯度测定(硫酸-蒽酮法测定含量,计算纯度),结果见表 11。

表 11 粗多糖纯度 $n=6$

样品	粗多糖纯度(%)
50% 醇沉	12.37 ± 0.33
50KDa 超滤	14.78 ± 0.15

表 12 样本 t 检验

样本	均值	标准差	均值的 标准误	t 值	自由度	显著性
50% 醇沉	12.37	0.398 37	0.230	-9.532	4	$^{**}P<0.05$
50KDa 超滤	14.78	0.181 87	0.105			

由表 11 和表 12 结果可见,超滤技术制备的粗多糖纯度高于传统的醇沉工艺,并且差异有统计学意义。

2.6 毒性实验(MTT 法) 将 Vero 细胞计数后,以 2×10^4 /孔接种于 96 孔板,于 37℃、5% CO₂ 培养长满单层后,弃去培养液,再加入含不同浓度夏枯草多糖的培养基(200、100、50、25 μg/mL),每浓度 3 个复孔,每孔 200 μL,同时设正常细胞对照组和阳性药物对照组(ACV)。于 37℃、5% CO₂ 培养。培养 72 h 后,吸去培养液,加入 MTT,培养 4 h,加入 DM-SO,在 570/650 nm 波长下测定吸光度,计算 CC₅₀ 值。存活率=(药物组-病毒感染组)/(细胞组-病毒感染组)×100%。抑制率=(细胞组-药物组)/(细胞组-调零组)×100%。

由表 13 结果可见,夏枯草醇沉多糖和超滤多糖在 1 600 g/mL 浓度以下均无毒性。

表 13 样本的 CC₅₀ 和抗 HSV-1 的 IC₅₀ (MTT 法)

样品	CC ₅₀ (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)	SI
50% 醇沉	>1600	93.99 ± 13.12	>17.02
50KDa 超滤	>1600	51.35 ± 15.30	>31.16
ACV	>400 μM	0.39 μM ± 0.12	>1 025.64

表 14 样本 t 检验

样本	均值	标准差	均值的 标准误	t 值	自由度	显著性
50% 醇沉	93.9910	13.1195	7.5746	3.664	4	$^{*}P<0.05$
50KDa 超滤	51.3527	15.3046	8.8361			

2.7 体外抗疱疹病毒活性测定实验方法(MTT 法)

将 Vero 细胞计数后,以 2×10^4 /孔接种于 96 孔板,于 37℃、5% CO₂ 培养长满单层后,吸弃培养液,每孔接种病毒液 100 TCID₅₀/孔,于 37℃ 吸附 1 h,吸弃病毒液,再加入不同浓度的夏枯草多糖溶液(200、100、50、25、12.5 μg/mL),每浓度 3 个复孔,每孔 200 μL,同时设正常细胞对照组、病毒对照组、阳性药物对照组(ACV:4、2、1、0.5、0.25 μM)。于 37℃、5% CO₂ 培养 72 h,每天观察 CPE,并记录;显微镜下观察细胞病变程度(CPE),以确定药物对病毒的抑制作用,记录方式:0% 细胞病变为“-”,<25% 细胞病变为“+”,25%~50% 细胞病变为“++”,50%~75% 细胞病变为“+++”,>75% 细胞病变为“++++”,以出现“-”的最小浓度为抗病毒活性最佳。培养 72 h 后,吸去培养液,加入新的培养液,再加入 MTT,培养 4 h,加入 DMSO,在 570/650 nm 波长下测定吸光度,计算 IC₅₀ 值。存活率=

(药物组 - 病毒感染组)/(细胞组 - 病毒感染组) × 100%, 通过 Spss 软件计算夏枯草多糖提取物对 HSV-1 和 HSV-2 抑制作用的 IC_{50} 。 $SI = CC_{50}/IC_{50}$, 治疗指数(SI)越大, 抗病毒活性越好。

由表 13 和表 14 结果表明, 通过 MTT 法筛选, 醇沉工艺和超滤工艺都具有抗疱疹 I 型病毒活性呈差异($P < 0.05$), 且超滤技术制备的样品抗单纯性疱疹病毒活性优于醇沉工艺。

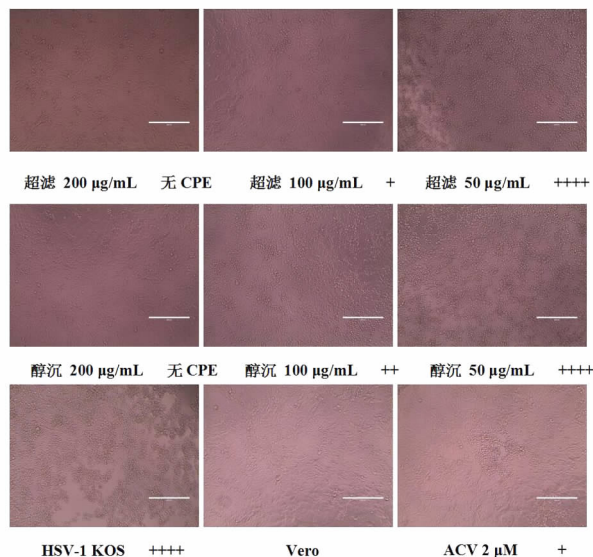


图 2 50% 醇沉和 50KDa 超滤多糖提取物 CPE 图(HSV-1)

由图 2 结果表明, 50% 醇沉和 50KDa 超滤多糖提取物随着浓度增加, 抑制病毒活性也增加, 通过 MTT/CPE 法实验观察, 发现超滤工艺提取物的抑制疱疹病毒作用优于醇沉工艺提取物。

3 讨论

多糖的含量测定方法常采用比色法, 分别为蒽酮-硫酸法、苯酚-硫酸法和咔唑-硫酸法。蒽酮-硫酸法和苯酚-硫酸法用于测定多糖含量最为广泛的分析方法, 其原理为糖类物质在强酸性条件下水解成单糖分子, 并迅速脱水生成糠醛或其衍生物, 再与酚类或胺类化合物缩合形成有特殊颜色的物质, 该物质在紫外区有特征吸收, 且吸收值在一定范围内与糖质量浓度呈线性关系。在选择测定方法时, 考虑到蒽酮-硫酸法能测定溶液中全部可溶性碳水化合物的总量, 并且蒽酮-硫酸法标准曲线的线性、稳定性和重现性均优于苯酚-硫酸法, 所以本实验选择蒽酮-硫酸法测定夏枯草多糖^[7]。

本实验通过正交设计优选夏枯草的水提取工

艺, 以夏枯草多糖含量和浸膏得率为考察指标, 采用综合评分的方法确定最佳提取工艺为: 药材第一次加 14 倍量水, 第二、三次加 12 倍量水, 提取 3 次, 每次回流 1.5 h。按最佳工艺进行重复性实验, 结果表明稳定性较理想, 该方案节约能耗, 成本低, 适合于产业化生产, 故此方案合理可行。

本实验比较了膜分离超滤技术与传统醇沉工艺对夏枯草活性部位的制备, 结果显示, 用超滤技术制备的夏枯草样品, 多糖纯度和抗单纯性疱疹病毒活性均优于传统的醇沉工艺。二者的纯化原理不同, 超滤是一种膜分离技术, 其工作原理是以选择性透过膜为分离递质, 在外界压力作用下, 原料组分选择性地透过膜, 以达到分离、提纯的目的, 自 20 世纪 80 年代初起被应用于中药的纯化工艺中。醇沉工艺是根据相似相溶的原理, 使不溶于乙醇的成分溶解度下降沉淀的过程。超滤作为新兴的高效膜分离技术, 具有分离精度高、成本低、环保、操作简单等特点, 与传统的水提醇沉纯化多糖相比较, 超滤法显示出其独特的优势, 正被越来越多的中药研究者加以应用, 提示可作为夏枯草开发成抗单纯性疱疹病毒新药有效部位的纯化工艺。

参考文献

- [1] 盖春艳, 孔德云, 王曙光, 等. 夏枯草化学成分研究[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(8): 580-582.
- [2] Xu H X., Lee S H S., Lee S F., et al. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris* [J]. *Antivir Res*, 1999, 44(1): 43-54.
- [3] Zhang Y W., But P PH., Ooi V EC., et al. Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris* [J]. *Antivir Res*, 2007, 75(3): 242-249.
- [4] Cheng C L., Ng K Y., Xu H X. Recent advances in the discovery of novel anti-herpetic agents from Chinese herbal medicines [J]. *Curr Org Chem*, 2010, 14(16): 1714-1726.
- [5] 姜玲海, 冯怡, 徐德生, 等. 夏枯草多糖抗单纯性疱疹病毒及相关免疫学活性初步研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2622-2623.
- [6] Chiu L CM., Zhu W., Ooi V EC. A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of herpes simplex virus antigen in Vero cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93(1): 63-68.
- [7] 张杰, 李春艳, 李劲平, 等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定竹节参多糖含量的比较研究[J]. 中南药学, 2012, 10(6): 421-424.

(2016-07-05 收稿 责任编辑: 洪志强)