

中图分类号: R965; R943 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)08-0125-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.08.030



河蚌多糖生物活性与提取、纯化工艺研究进展*

蒋洁莹, 史万忠[△], 刘瑾, 元唯安, 朱蕾蕾

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

摘要:目的 为河蚌多糖的提取工艺研究和临床应用提供参考。方法 计算机检索维普、中国知网、PubMed数据库1995年1月至2023年9月与河蚌多糖相关的文献, 归纳河蚌多糖的生物活性及其提取、纯化工艺, 比较不同提取、纯化工艺参数下河蚌多糖提取物的差异。结果 河蚌多糖具有免疫调节、抗肿瘤、镇痛、抗炎、抗乙型肝炎病毒、保肝等生物活性。河蚌多糖多以热水(80~100℃)提取法为基础, 辅以微波或超声等提取方法, 但工艺参数差异较大; 提取液多以醇沉方式获得粗提物; 纯化后的河蚌多糖在单糖组成(葡萄糖占比较大)、分子量(400~1 700 kDa)等方面存在一定差异。结论 需加强河蚌多糖提取工艺-药效关系、活性成分构效关系、化学修饰-药效关系等研究, 为相关药物和功能性食品的开发奠定基础。

关键词: 河蚌多糖; 生物活性; 提取; 纯化; 工艺

Research Progress on the Biological Activity, Extraction and Purification Processes of Mussel Polysaccharides

JIANG Jieying, SHI Wanzhong, LIU Jin, YUAN Weian, ZHU Leilei

(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 200021)

Abstract: **Objective** To provide a reference for the research of extraction process and clinical application of mussel polysaccharides. **Methods** The relevant literature in the VIP, CNKI, and PubMed from January 1995 to September 2023 were searched to summarize the biological activities, extraction and purification processes of mussel polysaccharides, and compare the differences in mussel polysaccharide extracts under different extraction and purification process parameters. **Results** The mussel polysaccharides had immune-regulation, anti-tumor, analgesic, anti-inflammatory, anti-hepatitis B virus and liver-protection biological activities. The mussel polysaccharides were mostly extracted based on the hot water extraction (80-100℃), assisted by microwave or ultrasound extraction methods, but the process parameters were greatly different; most of the crude extracts were obtained by alcohol precipitation; after purification of mussel polysaccharides, there were some differences in the monosaccharide composition (glucose accounting for a large proportion) and molecular weight (400-1 700 kDa). **Conclusion** It is necessary to strengthen the research on the extraction process-pharmacodynamic relationship, the structure-activity relationship of active ingredients, the chemical modification-pharmacodynamic relationship of mussel polysaccharides to lay the foundation for the development of relevant drugs and functional foods.

Key words: mussel polysaccharides; biological activity; extraction; purification; process

河蚌属软体动物门瓣鳃纲蚌科, 有背角无齿蚌 *Anodonta woodiana*、三角帆蚌 *Hyriopsis cumingii*、射线裂脊蚌 *Schistodesmus lampreyanus*、褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* 等品种, 以肉、汁入药。目前, 作为中药材基源的主要是三角帆蚌和褶纹冠蚌, 其中三角帆蚌人工养殖率超80%, 为我国特有河蚌资源^[1-2]。河蚌肉收载于浙江省和湖北省的中药材标准^[3-4], 其味甘、咸, 性寒, 归肝、肾经, 有清热解毒、消肿止痛等功效, 主治烦热、消渴、血崩、带下、痔瘕、目赤、湿疹等^[5-6]。河蚌肉中提取的河蚌多糖于2012年被原国家卫生部批准为新资源食品^[7], 有免疫调节、抗炎镇痛、保肝等生物活性。在此, 计算机

检索维普、中国知网、PubMed数据库1995年1月至2023年9月与河蚌多糖生物活性及提取、纯化工艺相关的文献。中文文献检索式为“河蚌”OR“河蚌多糖”; 英文文献检索式为(“freshwater mussel” OR “freshwater calm”) AND “mussel polysaccharide”。剔除重复文献后, 共获得文献585篇(中文文献423篇, 英文文献162篇); 并参考与河蚌相关质量标准及药学专著归纳总结。现报道如下。

1 生物活性

免疫调节、抗肿瘤: 实验研究发现, 河蚌多糖对多种免疫低下模型或肿瘤模型均具有提高免疫、抑制肿

* 基金项目: 上海市“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项[22S21900700, 22S21900800]; 上海中医药大学产业发展中心医结合科创项目[YYKC-2021-01-145]。

第一作者: 蒋洁莹, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药制剂与药物分析, (电子信箱)jjy_2009@sina.com。

[△]通信作者: 史万忠, 男, 博士, 主任药师, 研究方向为中药制剂与药效物质基础, (电子信箱)shwzh@hotmail.com。

瘤生长作用,其可通过多种途径发挥作用,如增强模型小鼠的细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫反应^[8-9];通过增强B淋巴细胞的转化增殖及降低血浆的环磷酸腺苷/环磷酸鸟苷水平促进机体的免疫功能^[10];抑制肿瘤细胞的DNA合成和细胞增殖,提高模型小鼠的胸腺指数,从而增强胸腺的免疫功能^[11-12];改善模型小鼠腹腔巨噬细胞的趋化、增殖、吞噬功能,增强机体的免疫功能^[13]等。

镇痛、抗炎:以河蚌多糖为主要组成成分的药品可用于治疗癌症疼痛、瘀血阻络和急性软组织损伤。研究显示,由河蚌多糖组成的制剂及其拆方成分河蚌多糖,河蚌多糖粗提物及其分级醇沉物,在小鼠热板法、应激性慢性疼痛模型、巴豆油致耳郭肿胀模型及大鼠尿酸钠致关节炎镇痛模型、角叉菜胶致足跖肿胀模型中均有明显的镇痛和抗炎作用^[14-15]。河蚌多糖对膝骨关节炎有潜在治疗作用,其主要单体成分河蚌葡聚糖可降低模型大鼠 β -连环蛋白和基质金属蛋白酶13基因的表达水平,从而发挥保护软骨、抗炎镇痛、改善骨关节炎相关症状的作用^[16-17];且能改善因异常力学刺激引起的半月板组织损伤(如细胞死亡、多糖丢失),抑制病理性过度肥大及钙化相关基因的表达^[18]。

抗乙型肝炎病毒、保肝:河蚌多糖能通过提高机体免疫力,抑制乙型肝炎病毒的复制和乙型肝炎表面抗原、乙型肝炎e抗原的分泌,发挥抗乙型肝炎病毒的作用^[19-20]。河蚌多糖可改善模型小鼠肝脏细胞的水样变性和脂肪变性,降低肝细胞内一氧化氮的含量,从而抑制肝细胞发生炎性反应,其保肝作用可能与其抗炎活性有关^[21-22]。

2 提取与纯化

提取:多数多糖类物质易溶于水,故常采用水提法^[23-29],即依次通过河蚌肉绞碎、热水提取、除蛋白质、醇沉等步骤获得河蚌多糖粗提物。提取温度多为80~100℃;除蛋白质多采用Sevag法,但也有研究无该步骤^[20-21];部分研究在热水提取前采用丙酮+无水乙醇或石油醚+乙酸乙酯作为试剂增加脱脂工序^[21,23];醇沉工艺中加入95%乙醇(至乙醇体积分数为70%~80%)或无水乙醇(至乙醇体积分数为95%)。为提高河蚌多糖的提取率,微波或超声可作为辅助手段,即依次通过微波、热水提取、透析或微波、热水提取、Sevag除蛋白等步骤获得河蚌多糖粗提物^[27-28],也有报道采用超声-稀碱-低温(4℃)的提取方法^[30]。在大生产中,河蚌水提液过滤困难,一般需使用压滤并加入助滤剂,也有研究采用先醇沉后水提的方法^[29]。但不同提取工艺获得的河蚌多糖粗提物的得率和纯度差异较大。河蚌肉中结合型河蚌多糖需酶解后参照游离型多糖的方法

进行提取^[31]。

纯化:目前,用于保健品或药品中的河蚌多糖多为河蚌的粗提物,其分离、纯化多采用色谱法(离子交换色谱-凝胶色谱法),不同文献报道的河蚌多糖构成差异较大,有的仅含葡萄糖的葡聚糖^[23-24,26],有的含鼠李糖、阿拉伯糖、岩藻糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖^[25],但葡萄糖均为主要组分;获得的河蚌多糖分子量大小也有差异(400~1700 kDa)。河蚌多糖的提取、纯化工艺及其多糖组成比较见表1。

3 展望

天然多糖具有多种生理功能,在药学、生物工程、生物化学及食品科学等领域的研究及应用越来越多^[32]。河蚌肉作为珍珠养殖产业采珠过程中主要的加工副产品,资源来源丰富、稳定,其含有的河蚌多糖具有较好的免疫调节、抗肿瘤、镇痛、抗炎、抗乙型肝炎病毒、保肝等生物活性。河蚌多糖粗提物由2~3个不同分子量段的均一分子量多糖组成,单糖组成中葡萄糖占比最大。由于目前对河蚌多糖的分离纯化及不同分子量段多糖与生物活性的相关性研究欠深入,无法确定多糖具体的活性部位,故实际应用中多使用其粗提物。河蚌多糖粗提物中总糖含量(比色法)为70%~90%,蛋白质含量为1%~5%,含量占比小,故部分厂家考虑到生产成本,通常不进行除蛋白工序。多糖的提取、纯化、结构表征及生物活性是其研究中的重要环节。河蚌多糖粗提物的含量测定多以总糖(硫酸-蒽酮法或硫酸-苯酚法)作为质量控制指标,不能准确反映其内在质量。研究表明,不同的分子量影响河蚌多糖的生物学活性^[33],故该指标可用来评价其质量^[34-36]。

河蚌多糖多以热水(80~100℃)提取法为基础,辅以微波或超声等提取方法,但工艺参数差别较大。提取液多以醇沉方式获得粗提物,也有以透析方法获得特定分子量段的多糖,但得率较低。纯化后的河蚌多糖在单糖组成、分子量等方面存在一定差异。上述差异是否与河蚌的品种、养殖水质和环境、育珠情况、提取工艺参数等有关,以及对药效是否有影响,均需进一步研究;河蚌肉中存在结合型河蚌多糖,目前提取工艺和药效方面的研究多针对游离型多糖,故进一步确定结合型多糖与游离型多糖的成分差异及其药效作用,对于充分利用河蚌资源具有积极意义。应利用分析、分离手段及糖链结构鉴定的方法^[37-38],进一步聚焦河蚌多糖的提取工艺-药效关系、活性成分构效关系、化学修饰-药效关系等研究,为相关药物和功能性食品的开发提供基础。

参考文献

[1] 赵明森. 河蚌育珠关键技术[M]. 南京:江苏科学技术出版社,

表 1 河蚌多糖的提取、纯化工艺及组成比较

Tab. 1 Comparison of extraction, purification processes and composition of mussel polysaccharides				
提取方法	提取工艺参数	河蚌多糖粗提物	纯化工艺参数	河蚌多糖(纯化后)
热水提取-醇沉 ^[23]	90~100 ℃, 提取 1~3 h; 浓缩, 加 1~2 倍体积的乙醇醇沉		DEAE-Sepharese 离子交换-凝胶柱层析纯化, 冷冻干燥	仅含葡萄糖(葡聚糖); 分子量 1.7×10 ⁶ Da; 比旋度[α] _D 为 +243.4°(c0.5, H ₂ O); 含 5 种葡萄糖残基(端基, 1,4 连接, 1,2 连接, 1,4,6 连接, 1,3,4 连接), 以 1,4 连接为主
脱脂-热水提取-醇沉 ^[24]	用丙酮和无水乙醇分别浸泡 8 h 和 2 h, 除滤渣, 烘干, 粉碎, 加磷酸缓冲液, 90 ℃ 提取, 浓缩, 95% 乙醇醇沉(乙醇终体积分数为 75%)		纤维素 DE-52 和 Sephadex G-200 柱纯化, 冷冻干燥	包含 2 种多糖, 其中 1 种仅含葡萄糖, 另 1 种含 2 种不同分子量的多糖
热水提取-醇沉-Sevag 除蛋白-醇沉 ^[25]	水料比为 8:1 (mL/g), 温度 80 ℃, 提取 2 次, 每次 4.5 h; 浓缩, 醇沉(乙醇终体积分数为 75%); 以三氯甲烷-正丁醇(5:1, V/V) 除蛋白; 上清液浓缩醇沉(乙醇终体积分数为 95%)	多糖得率为 3.73%; 含 5.71% 鼠李糖、2.21% 阿拉伯糖、1.69% 岩藻糖、3.40% 甘露糖、82.21% 葡萄糖、4.79% 半乳糖	纤维素 DE-52 和 Sephadex G-100 柱纯化, 透析去除小分子杂质, 冷冻干燥	包括 3 个均一分子量的组分, 分子量分别为 432.2, 457.9, 503.1 kDa。组分 1 含 2.12% 阿拉伯糖、97.88% 葡萄糖; 组分 2 含 100% 葡萄糖; 组分 3 含 13.80% 鼠李糖、4.51% 岩藻糖、7.70% 甘露糖、64.92% 葡萄糖、9.07% 半乳糖
脱脂-热水提取-醇沉-Sevag 除蛋白 ^[26]	石油醚和乙酸乙酯脱脂, 100 ℃ 水提 2 次, 醇沉(乙醇终体积分数为 80%), 中性蛋白酶+Sevag 法除蛋白	多糖得率为 2.5%	DEAE-Sepharese 阴离子交换层析柱纯化, 得 3 种组分; 其中第 2 个为主要组分, 经 Sephadex G-200 柱纯化, 获得均一的多糖 HP-1	均一多糖仅含 D-葡萄糖, 其以 1,4 连接的葡萄糖为主链, 单一的葡萄糖为侧链与主链 α-D-葡萄糖残基 O-6 连接, 其分子量为 2.65 kDa
微波-热水提取-透析 ^[27]	微波(功率 550 W, 频率 2 450 MHz), 热水提取(温度 80~85 ℃), 透析袋透析	得率 0.83%, 纯度 93.0%		
微波-热水提取-Sevag 除蛋白 ^[28]	微波(功率 1 080 W, 时间 150 s), 热水提取(温度 50 ℃), Sevag 法除蛋白	得率 4.06%, 除蛋白后蛋白保留率为 65.13%		
醇沉-水浸提 ^[29]	河蚌肉绞碎, 加 1 倍体积的 95% 乙醇(乙醇终体积分数为 70%~75%), 压滤, 滤渣加 0.5~3 倍体积的水, 压滤			
超声-稀碱-低温 ^[30]	超声[功率 250 W, 频率 (26.5±1) kHz] + 5% 氢氧化钠水提液(4 ℃), 提取 1 次	纯度为 90.5%		

2002:58.

[2] 汪桂玲, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1618-1627.

[3] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药材标准(第一册) [EB/OL]. (2017-09-26) [2023-03-20]. http://mpa.zj.gov.cn/art/2017/9/26/art_1228989285_41327950.html.

[4] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药材质量标准[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 186-187.

[5] 陈贵廷. 本草纲目通释[M]. 北京: 学苑出版社, 1992: 2008-2009.

[6] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1848.

[7] 食品安全标准与监测评估司. 关于批准蚌肉多糖作为新资源食品的公告(2012 年第 2 号) [A/OL]. (2012-01-30) [2023-02-28]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7891/201201/3816f2fb5c244876aa118671b86991e8.shtml>.

[8] 袁亚非, 王艳辉, 刘豫安, 等. 河蚌提取物 KAL 增强环磷酰胺造成免疫低下模型小鼠 DTH 及 PFC 的作用[J]. 承德医学院学报, 2000, 17(3): 18-20.

[9] 袁亚非, 王艳辉, 李卫东, 等. 河蚌提取物对小鼠免疫功能的增强作用[J]. 承德医学院学报, 1999, 16(4): 14-17.

[10] 陈文星, 吴皓, 金亦涛. 珠蚌多糖的免疫调节作用研究[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(5): 16-18.

[11] 胡健饶, 曹明富. 三角帆蚌多糖抑瘤作用的实验研究[J]. 中国现代应用药学, 2003, 20(1): 11-13.

[12] 罗宇慧, 彭蕴茹, 叶其正. 河蚌多糖抗肿瘤实验研究[J]. 江苏中医药, 2007, 39(10): 72-73.

[13] QIAO DL, WEI CB, KE CL, et al. Effects of Hyriopsis cumingii polysaccharides on angiogenesis, macrophage chemotaxis, proliferation and phagocytosis [J]. Food Funct, 2015, 6(3): 869-877.

[14] 蔡华芳, 刘雪莉, 钱伯初, 等. 河蚌制剂痛克的镇痛抗炎作用[J]. 中国海洋药物, 1997(3): 32-36.

[15] 史万忠, 刘瑾, 倪嘉纳, 等. 河蚌多糖粗提物的分级醇沉及其活性研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2191-2192.

[16] 潘富伟, 王翔, 熊轶喆, 等. 河蚌葡聚糖 HBP-A 对豚鼠膝关节软骨退变的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2022, 30(19): 1781-1785.

[17] 韦宋谱, 丁道芳, 王学宗, 等. 河蚌葡聚糖含药血清对软骨细胞 β-catenin 和 MMP-13 基因表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(11): 76-79.

[18] 杜国庆, 丁道芳, 冯媛媛, 等. 河蚌葡聚糖对半月板组织损伤及病理性过度肥大和钙化的影响[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(4): 431-437.