

## 不同部位鱼腥草多糖的结构表征与生物活性

和梦瑶, 董泽宇, 张兰兰, 吴婷, 潘思轶, 徐晓云\*

(华中农业大学食品科学技术学院 环境食品学教育部重点实验室

果蔬加工与品质调控湖北省重点实验室 武汉 430070)

**摘要** 鱼腥草是我国传统的药食同源植物,其富含的多糖已被证明具有多种生物活性。目前,关于鱼腥草多糖的研究多集中在全株或地上部分,不同部位鱼腥草多糖结构与活性的差异鲜有报道。本研究对鱼腥草的地下茎、茎和叶 3 个部位的多糖分别进行提取分离,并测定其结构、体外抗氧化活性和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,旨在探究鱼腥草多糖结构与生物活性的关系。结果表明,鱼腥草 3 个部位的多糖均为酸性多糖,均由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖醛酸以及少量的岩藻糖、甘露糖、木糖和葡萄糖醛酸组成,但比例各不相同;分子质量范围是  $4.11 \times 10^4 \sim 1.20 \times 10^6$  u;红外结构基本相同;叶多糖具有较多的甲酯基和乙酰基基团,其含量分别为 0.95% 和 1.05%;3 种多糖的表面形态均为光滑平整的片状结构;叶多糖不具有三螺旋结构而地下茎多糖和茎多糖存在三螺旋结构。叶多糖的体外抗氧化活性与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性最强。试验发现不同部位鱼腥草多糖的结构和生物活性存在差异,研究结果为鱼腥草多糖的构效关系研究提供了理论依据,并为鱼腥草多糖的开发和利用提供理论参考。

**关键词** 鱼腥草; 多糖; 结构; 抗氧化;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶

**文章编号** 1009-7848(2024)03-0276-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.028

鱼腥草, *Houttuynia cordata* Thunb. (*H. cordata*) 是三百草科蕺菜属多年生草本植物,又名折耳根、狗心草。常见于我国长江流域以南各省,多集中在四川、湖北和贵州等地区<sup>[1]</sup>。鱼腥草富含营养价值,同时是传统的药食同源植物,不同部位的应用场景有所不同,中国药典规定入药部分为三白草科植物蕺菜的新鲜全草或干燥地上部分<sup>[2]</sup>。作为食物时,鱼腥草全株皆可食用,尤其是地下茎,深受西南地区人民的喜爱,常被作为蔬菜或调味品。其有显著的清热解毒、消痈排脓等功能,被誉为“中药抗生素”<sup>[3]</sup>。在印度,生食鱼腥草全株来降血糖有着悠久历史<sup>[4]</sup>。鱼腥草中的生物活性物质主要有挥发油、多糖、黄酮类化合物和有机酸等<sup>[5]</sup>。药食同源植物的使用方法传统上多为水煎,多糖作为水提物的主要成分之一,因低毒、生物相容性好、生物活性丰富等而愈受关注<sup>[6]</sup>。研究表明,鱼腥草

多糖是酸性果胶类多糖,具有抑菌<sup>[7]</sup>、抗氧化<sup>[8]</sup>、免疫调节<sup>[9]</sup>、缓解急性肺损伤<sup>[10-11]</sup>等多种生物活性。

多糖的生物活性与其分子质量、单糖组成、分子形状和取代基等结构因素紧密相关<sup>[12]</sup>,而单糖种类多、糖环构型和取代基类型不一等使多糖具有十分复杂的结构,当来源、提取部位和提取方法等不同时,多糖的结构和生物活性具有很大差异<sup>[13]</sup>。当归不同根部多糖均为果胶多糖,具有不同的分子质量和单糖组成,对猪小肠上皮细胞(IPEC-J2)表现出不同程度的抗氧化作用<sup>[9]</sup>。铁皮石斛茎、叶和花多糖具有不同的分子质量、红外结构和表面形态,它们的抗氧化能力和免疫调节能力有所不同<sup>[14]</sup>。目前,关于鱼腥草多糖的研究主要集中于入药部分,鱼腥草不同部位多糖的结构与生物活性的差异有待进一步探索。本研究采用水提醇沉法分别提取鱼腥草地下茎、茎和叶中的多糖,测定其化学成分、分析其初步结构,测定体外抗氧化活性与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,以期鱼腥草多糖的构效关系研究提供理论依据,同时也为鱼腥草多糖在食品加工和医药加工等领域的利用提供理论参考。

收稿日期: 2023-04-16

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2023DJC152); 湖北省创新团队项目(0120210150)

第一作者: 和梦瑶,女,硕士生

通信作者: 徐晓云 E-mail: xuxiaoyun@mail.hzau.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb), 种植于湖北省宜昌市当阳市两河镇, 经农户晒干, 由湖北澳利龙食品有限公司提供。样品经湖北中医药大学药学院鉴定。

甘露糖(mannose, Man)、鼠李糖(rhamnose, Rha)、阿拉伯糖(arabinose, Ara)、葡萄糖(glucose, Glc)、半乳糖(galactose, Gal)、果糖(fructose, Fru)、核糖(Ribose, Rib)、岩藻糖(fucose, Fuc)、木糖(xylose, Xyl)、半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid, GlcA), 购于美国Sigma-Aldrich公司; 乙醇氧化酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、4-硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷、阿卡波糖、DPPH、ABTS和TPTZ, 购于上海源叶生物科技有限公司; 其余试剂均为国药分析纯级。

### 1.2 设备与仪器

Beta2-8LD真空冷冻干燥机, 日本尼康公司; MultiskanSkyHigh全波长酶标仪、ICS5000离子色谱系统, 美国Thermo Fisher Scientific公司; DAWM HELEOS II 18角度激光光散射仪, 美国Wyatt公司; JSM-6390LV扫描电镜, 日本NTC公司; IS50傅里叶变换红外光谱仪, 苏州奥普斯等离子体科技有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 不同部位多糖的提取与分离 将干燥的鱼腥草的地下茎、茎和叶分离后分别粉碎过筛, 采用水提醇沉法分别制备不同部位粗多糖, 以料液比1:20, 提取温度95℃, 提取时间2h的条件提取2次, 提取液离心后合并上清液, 将上清液旋转蒸发浓缩至1/4体积, 加入4倍体积的无水乙醇在4℃下静置过夜。过滤取沉淀, 并用无水乙醇清洗沉淀3次以除去部分小分子物质, 得到粗多糖。将粗多糖配制成8 mg/mL溶液, 用Sevag法除蛋白6次(多糖溶液:Sevag试剂=4:1, V/V), 旋转蒸发除去残留的有机试剂。将样品溶液装入3 500 u透析袋中, 用纯水透析2 d, 收集后冻干得到鱼腥草地下茎多糖(*H.cordata* rhizome Polysaccharide, RHCP)、鱼腥草茎多糖(*H.cordata* stem Polysaccharide, SHCP)和鱼腥草叶多糖(*H.cordata* leaf Polysaccharide, LHCP)。

1.3.2 成分组成测定 以葡萄糖为标准品, 采用苯酚-硫酸法测定多糖中中性糖含量<sup>[15]</sup>; 以半乳糖醛酸为标准品, 采用间羟基联苯法测定多糖中酸性糖含量<sup>[16]</sup>; 以牛血清白蛋白为标准品, 采用考马斯亮蓝法测定多糖中蛋白质含量<sup>[17]</sup>; 多糖中游离酚和结合酚的提取方法参考Diana等<sup>[18]</sup>稍作改动, 游离酚的提取方法为: 将样品与80%无水乙醇混合(料液比为1:80), 超声分散均匀后室温提取1 h, 将上清液旋转蒸发至干后加水复溶。结合酚的提取方法为: 提取游离酚后的样品残渣与2 mol/L NaOH溶液混合(料液比为1:40), 至于水浴摇床振荡1.5 h, 后以6 mol/L HCl调节pH值为2±0.2, 用乙酸乙酯萃取3次, 合并萃取液后旋转蒸发至干, 蒸馏水复溶。游离酚与结合酚含量的测定方法采取福林酚法, 标准品为没食子酸<sup>[19]</sup>。

1.3.3 分子质量测定 分子质量的测定采用GPC-MALS系统, 使用Shodex-OHPak SB-806 HQ色谱柱, 并配备TSK gel PWxL保护柱。将样品用0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub>溶液配制成质量浓度为1 mg/mL的溶液, 并以8 000 r/min离心10 min, 过0.45 μm滤膜后进样。流动相为0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub>溶液, 流速为0.3 mL/min。

1.3.4 单糖组成分析 取干净的色谱瓶, 称取适量多糖样品, 加入1 mL 2 mol/L TFA酸溶液, 121℃加热2 h。通氮气吹干。加入甲醇清洗, 再通氮气吹干, 重复甲醇清洗2~3次。加入无菌水溶解, 转入色谱瓶中待测。

采用Thermo ICS5000离子色谱系统, 利用脉冲安培检测器(PAD; Dionex-ICS 5000系统)对单糖组分进行分析检测。采用Dionex™ CarboPac™ PA20(150×3.0 mm, 10 μm)液相色谱柱, 进样量为5 μL。流动相A (H<sub>2</sub>O), 流动相B (0.1 mol/L NaOH), 流动相C (0.1 mol/L NaOH, 0.2 mol/L NaAc), 流速为0.5 mL/min, 柱温为30℃。洗脱梯度: 0~26 min, A相/B相/C相(体积比95:5:0), 26~42 min A相/B相/C相(体积比85:5:10), 42~52 min, A相/B相/C相(体积比60:0:40), 52~60 min A相/B相/C相(体积比95:5:0)。

1.3.5 红外光谱分析 分别取冷冻干燥后的RHCP、SHCP、LHCP与KBr混合研磨, 压片, 于傅里叶变换红外光谱仪下进行扫描。

1.3.6 乙酰基含量测定 参考李银莉<sup>[20]</sup>的方法稍作修改。取 100  $\mu\text{L}$  样品溶液和不同浓度五酰基葡萄糖溶液(0.1~1.6 mg/mL),加入 200  $\mu\text{L}$  碱性羟胺溶液(0.1 mol/L NaOH 溶液与 0.3 mol/L 盐酸羟胺溶液等体积混合),反应 20 min,加入 2 mol/L HCl 溶液,反应 20 min,加入 0.37 mol/L HCl-FeCl<sub>3</sub> 溶液,用蒸馏水定容到 1 mL,反应 10 min 后于 500 nm 波长下测定吸光度。

1.3.7 甲酯基含量测定 参照曹凤等<sup>[21]</sup>的方法稍作修改。准确称取 10 mg RHCP、SHCP 和 LHCP,用 1 mL 蒸馏水使其溶解,加入 1 mL 2 mol/L NaOH 溶液,室温静置 1 h,加入 1 mL 2 mol/L HCl 溶液,室温静置 15 min,最后用 PBS(0.1 mol/L pH 7.5)定容至 5 mL。取 0.5 mL 水解后的样品或不同质量浓度的甲醇标准溶液(2~60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),加入 3.5 U/mL 乙醇氧化酶并混匀,室温静置 15 min,加入 1 mL 戊二酮溶液(含 0.02 mol/L 2,4-戊二酮、2 mol/L 乙酸铵、0.05 mol/L 乙酸),混匀后 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min,冷却至室温,在 412 nm 波长下测定吸光度。

1.3.8 扫描电镜分析 将冷冻干燥后的 RHCP、SHCP 和 LHCP 粘在样品台上,进行喷金处理,在 10 kV 加速电压下进行观察,选择 200 $\times$ 和 1 000 $\times$  图像放大率。

1.3.9 刚果红试验 参考 Zheng 等<sup>[22]</sup>的方法稍作修改,将 2 mL 多糖溶液(2.5 mg/mL)与 2 mL 刚果红溶液(80  $\mu\text{mol}$ )混合。然后逐渐向混合物中添加不同浓度的 NaOH 溶液(最终 NaOH 浓度分别为 0,0.1,0.2,0.3,0.4 和 0.5 mol/L),混合物在 400~600 nm 波长下进行波长扫描。

1.3.10 体外抗氧化活性研究 DPPH 自由基清除能力的测定:参考 Tang 等<sup>[23]</sup>的方法稍作修改。将 0.2 mL 的各浓度样品溶液与 1.8 mL 0.2 mmol/L DPPH 甲醇(体积分数 80%)溶液混合摇匀,室温下避光反应 20 min,在 517 nm 波长下测定吸光度。以 VC 作为阳性对照。清除率通过以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_0$ ——空白组吸光度; $A_1$ ——样品组吸光度; $A_2$ ——样品背景组吸光度; $A_3$ ——对照组吸光度。

ABTS 自由基清除能力的测定:参考 Tang 等<sup>[23]</sup>的方法稍作修改。配制 7.4 mmol/L ABTS 储备液和 2.6 mmol/L K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 溶液,将二者等体积混合后避光静置 14 h,混合物用 80%无水乙醇溶液稀释至吸光度为 0.7 $\pm$ 0.02,即得到 DPPH 工作液。将 0.2 mL 的各浓度样品溶液与 0.8 mL DPPH 工作液混合,室温下避光反应 6 min,在 734 nm 波长下测定吸光度。以 VC 作为阳性对照。清除率通过以下公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_0$ ——空白组吸光度; $A_1$ ——样品组吸光度; $A_2$ ——样品背景组吸光度; $A_3$ ——对照组吸光度。

铁离子还原能力(FRAP)的测定:参考 Tang 等<sup>[23]</sup>的方法稍作修改。配制 255 mmol/L NaCl 溶液(溶剂为 178 mmol/L 乙酸溶液)、10 mmol/L 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ)溶液(溶剂为 40 mmol/L 盐酸溶液)和 34 mmol/L FeCl<sub>3</sub> 溶液,将三者以 10:1:1 的比例混合得到 FRAP 溶液。0.2 mL 的各浓度样品溶液与 1.8 mL 0.2 mmol/L FRAP 溶液混合,室温下避光反应 20 min,在 539 nm 下测定吸光度。以 VC 作为阳性对照。

1.3.11  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的测定 参考石嘉悻等<sup>[24]</sup>的方法稍作修改。将不同浓度的 25  $\mu\text{L}$  RHCP、SHCP 和 LHCP 溶液与 25  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -葡萄糖苷酶(0.25 U/mL)混合,并在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 15 min,向混合物中加入 50  $\mu\text{L}$  0.5 mmol/L pNPG 作为底物并继续孵育 15 min,以 100  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L 碳酸钠终止反应,在 405 nm 波长处测量吸光度。以阿卡波糖作为阳性对照。抑制率通过以下公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中: $A_0$ ——PBS(0.2 mol/L pH 6.8)和 pNPG 溶液的混合物的吸光度; $A_1$ ——样品、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 pNPG 溶液的混合物的吸光度; $A_2$ ——样品和 pNPG 溶液的混合物的吸光度; $A_3$ ——PBS(0.2 mol/L pH 6.8)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 pNPG 溶液的混合物的吸光度。

#### 1.4 数据分析

数据结果以平均值 $\pm$ 标准偏差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采

用GraphPad Prism 8.4 软件进行数据处理和方差分析, $P<0.05$  表示差异显著。红外谱图利用 Origin 2021 软件绘图,其它使用 GraphPad Prism 8.4 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 成分组成分析

RHCP、SHCP 和 LHCP 的化学成分如表 1 所示。RHCP 与其它两种多糖在中性糖含量上存在显著差异,RHCP 中中性糖含量最高,为 32.39%,

SHCP 和 LHCP 中中性糖含量分别为 28.12%和 28.95%; 三者的酸性糖含量无显著差异,分别为 51.85%,52.23%和 52.80%; 三者的蛋白含量也无显著差异,分别为 1.37%,1.59%和 1.34%; 而 RHCP 与 SHCP 和 LHCP 的结合酚与游离酚含量存在显著差异,LHCP 中游离酚与结合酚含量最高,分别为 1.27%和 2.60%。结果表明,鱼腥草不同部位的多糖均为酸性多糖,其中 RHCP 的中性糖含量最高,LHCP 的结合酚与游离酚含量最高。

表 1 RHCP、SHCP 和 LHCP 的化学组成

Table 1 Chemical composition of RHCP, SHCP and LHCP

	中性糖/%	酸性糖/%	蛋白/%	游离酚/%	结合酚/%
RHCP	32.39 ± 0.36 <sup>a</sup>	51.85 ± 0.82 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.09 <sup>a</sup>
SHCP	28.12 ± 0.94 <sup>b</sup>	52.23 ± 1.41 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.07 <sup>a</sup>
LHCP	28.95 ± 0.87 <sup>b</sup>	52.80 ± 1.53 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.60 ± 0.35 <sup>b</sup>

注:同列不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.2 单糖组成分析

对 3 种多糖进行单糖组成测定,结果如表 2 所示,3 种多糖所含单糖种类一致,均由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖醛酸以及少量的岩藻糖、甘露糖、木糖和葡萄糖醛酸组成,但比

例有所不同。RHCP 和 SHCP 各单糖中葡萄糖含量最高,而 LHCP 各单糖中半乳糖醛酸含量最高。与 RHCP 和 SHCP 相比,LHCP 中阿拉伯糖、鼠李糖和半乳糖含量也较高。

表 2 RHCP、SHCP 和 LHCP 的单糖组成 (mol%)

Table 2 Monosaccharide composition of RHCP, SHCP and LHCP (mol%)

	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man	GalA	GlcA
RHCP	1.7	13.5	11.8	12.3	37.4	2.5	1.7	17.4	1.7
SHCP	1.1	14.6	12.0	14.3	26.0	3.1	1.9	24.8	2.1
LHCP	1.3	16.4	13.4	15.0	17.5	4.8	2.7	26.8	2.2

注:Fuc:岩藻糖;Ara:阿拉伯糖;Rha:鼠李糖;Gal:半乳糖;Glc:葡萄糖;Xyl:木糖;Man:甘露糖;GalA:半乳糖醛酸;GlcA:葡萄糖醛酸。

### 2.3 分子质量分析

鱼腥草各部位多糖的分子质量分布如表 3 所示,3 种多糖均存在两个峰,说明 3 种多糖分子质量不均一,其中 RHCP 分子质量最大,主要组分有  $1.20 \times 10^6$  u 和  $3.88 \times 10^5$  u, 分别占比 52.1%和

47.9%。LHCP 的分子质量次之,包括  $2.51 \times 10^5$  u 和  $4.97 \times 10^4$  u 两个组分,分别占比 43.9%和 65.1%。SHCP 的分子质量最低,主要有 47.6%的  $1.31 \times 10^5$  u 组分和 52.4%的  $4.11 \times 10^4$  u 组分。

表 3 RHCP、SHCP 和 LHCP 的分子质量分布

Table 3 Distribution of molecular weight of RHCP, SHCP and LHCP

	Peak 1		Peak 2	
	质量分数/%	Mw/u	质量分数/%	Mw/u
RHCP	52.1	$1.20 \times 10^6$	47.9	$3.88 \times 10^5$
SHCP	47.6	$1.31 \times 10^5$	52.4	$4.11 \times 10^4$
LHCP	34.9	$2.51 \times 10^5$	65.1	$4.97 \times 10^4$

## 2.4 红外光谱分析

通过红外光谱可获得多糖的初步结构信息和主要官能团。3种多糖的红外谱图如图1所示,3种多糖都显示出相似的红外特征吸收峰,3408  $\text{cm}^{-1}$ 和2918  $\text{cm}^{-1}$ 处的峰是多糖的特征峰<sup>[25]</sup>;1628  $\text{cm}^{-1}$ 和1422  $\text{cm}^{-1}$ 处的峰为羧基特征峰,表明多糖中含有糖醛酸<sup>[26]</sup>。1740  $\text{cm}^{-1}$ 和1239  $\text{cm}^{-1}$ 处的峰的吸收峰为乙酰基或者羧酸酯中C=O的特征峰<sup>[27]</sup>。1101  $\text{cm}^{-1}$ 和1021  $\text{cm}^{-1}$ 处的峰为吡喃糖环上C-O-C的伸缩振动吸收峰<sup>[28]</sup>,887  $\text{cm}^{-1}$ 处的峰说明多糖中含有 $\beta$ -构型的糖苷键<sup>[29]</sup>。结果表明鱼腥草各部位多糖均含有糖醛酸,存在吡喃糖环构型和 $\beta$ -构型的糖苷键。与RHCP和SHCP相比,LHCP在1740  $\text{cm}^{-1}$ 和1239  $\text{cm}^{-1}$ 处的峰强较强,可能表明3种多糖中,LHCP含有较多的酯基基团。

## 2.5 乙酰基与甲酯基含量分析

果胶类多糖中半乳糖醛酸的C<sub>6</sub>位常被甲酯化,C<sub>2</sub>或C<sub>3</sub>位可被乙酰化<sup>[30]</sup>。结果如表4所示,RHCP、SHCP和LHCP的乙酰基和甲酯基含量存在显著性差异,RHCP的乙酰基和甲酯基含量最低,分别为0.36%和0.75%。SHCP中乙酰基和甲酯基的含量分别为0.71%和0.96%,LHCP的乙酰基和甲酯基含量最高,分别为0.95%和1.05%。LHCP具有较多的乙酰基和甲酯基可能是由于其半乳糖醛酸含量较高。

## 2.6 扫描电镜分析

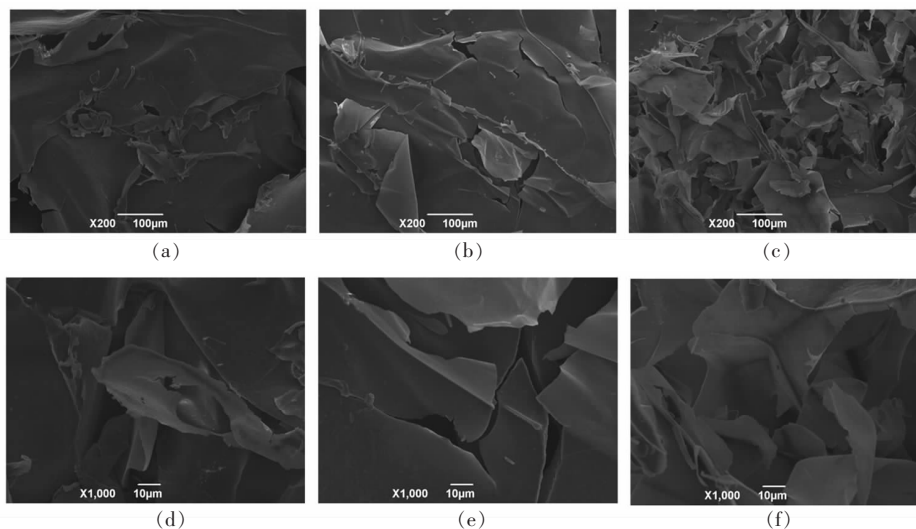


图2 RHCP(a)(b)、SHCP(c)(d)和LHCP(e)(f)的扫描电镜图

Fig.2 SEM of RHCP (a) (b), SHCP (c) (d) and LHCP (e) (f)

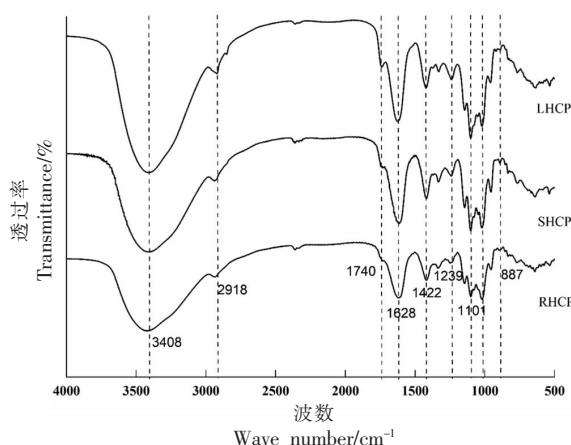


图1 RHCP、SHCP和LHCP的红外谱图

Fig.1 FT-IR spectra of RHCP, SHCP and LHCP

表4 RHCP、SHCP和LHCP的乙酰基与甲酯基含量  
Table 4 Acetyl and methyl ester content of RHCP, SHCP and LHCP

	乙酰基含量/%	甲酯基含量/%
RHCP	0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.02 <sup>a</sup>
SHCP	0.71 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.02 <sup>b</sup>
LHCP	0.95 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.05 ± 0.01 <sup>c</sup>

注:同列不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

如图2所示,RHCP、SHCP和LHCP的表面形态均呈不规则的破碎的片状结构,而LHCP的碎片表面积最小。高倍镜下观察到3种多糖表面光滑平整、结构紧密,这一现象可能与半乳糖醛酸使多糖分子间作用力增大有关<sup>[31]</sup>。

## 2.7 刚果红试验

具有三股螺旋结构的多糖会与刚果红发生络合反应,增大其最大吸收波长<sup>[32]</sup>。如图 3 所示,刚果红的最大吸收波长为 497 nm,刚果红-RHCP 复合体和刚果红-SHCP 复合体的最大吸收波长均为 509 nm,发生了红移,表明这两者中存在三螺旋结构。NaOH 浓度升高,碱性增强,破坏了多糖分子内和分子间氢键,使三螺旋结构解旋,表现为最大吸收波长降低。而刚果红-LHCP 复合体的最大吸收波长没有发生红移,表明 LHCP 中不存在三螺旋结构。

## 2.8 体外抗氧化活性

通过 DPPH、ABTS 和 FRAP 试验探究 3 种多糖的体外抗氧化能力。RHCP、SHCP、LHCP 和阳性对照 VC 对 DPPH 自由基的清除能力如图 4a、4b 所示,结果显示,RHCP、SHCP 和 LHCP 均具有一定的 DPPH 自由基清除能力,且呈现明显的剂量效应。其中,LHCP 的 DPPH 自由基清除能力最强,当 LHCP 质量浓度为 4 mg/mL 时,其 DPPH 自由基清除率达到 88.05%。其次是 LHCP,在质量浓度同为 4 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率为 67.11%,而 SHCP 在相同浓度下的 DPPH 自由基清除率为 62.86%。

RHCP、SHCP、LHCP 和阳性对照 VC 的 ABTS 自由基清除能力如图 4c、4d 所示,结果表明,RHCP 和 SHCP 和 LHCP 均具有良好的 ABTS 自由基清除能力,并呈现明显的剂量效应。在相同的质量浓度下,ABTS 自由基清除能力由强到弱依次为 LHCP、SHCP 和 RHCP。当质量浓度达到 1 mg/mL 时,LHCP 对 ABTS 自由基的清除能力达到 97.40%,RHCP 和 SHCP 对 ABTS 自由基的清除能力依次为 83.77%和 78.75%。

图 4e、4f 为 RHCP、SHCP、LHCP 和阳性对照 VC 的铁原子还原能力,结果显示 RHCP、SHCP 和 LHCP 均具有铁原子还原能力,且呈现剂量效应。在质量浓度一致的情况下,LHCP 组吸光值>RHCP 组吸光值>SHCP 组吸光值,表明 LHCP 具有最强的铁原子还原能力,而 SHCP 的铁离子还原能力最弱。

结果表明,RHCP、SHCP 和 LHCP 均具有不同程度的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力和铁原子还原能力,说明 3 种多糖都具有一定的体外抗氧

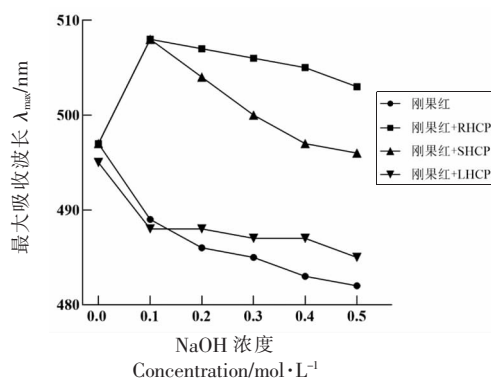


图 3 刚果红-多糖复合物在不同浓度 NaOH 溶液中最大吸收波长的变化

Fig.3 The change of  $\lambda_{\max}$  of Congo red-HCPs in different concentrations of NaOH solution

化能力但能力强弱有所差异。其中 LHCP 的体外抗氧化能力最强,其次是 RHCP 和 SHCP。这种抗氧化活性的差异可能与它们的结构差异有关。分子质量大小会影响多糖的生物活性,通常认为,较低分子质量的多糖,其单位质量内具有更多的还原羟基末端以接受和消除自由基,具有较高的抗氧化活性<sup>[33]</sup>,而在本试验中,3 种多糖分子质量大小依次为 RHCP、SHCP 和 LHCP,而体外抗氧化能力强弱依次为 LHCP、RHCP 和 SHCP,说明其它结构因素对鱼腥草多糖体外抗氧化能力的影响可能较大。多糖的体外抗氧化活性还与单糖组成相关,据报道,糖醛酸被认为是反映多糖抗氧化活性的一个重要指标,由于糖醛酸中含有醛或酮等亲电基团有助于抢夺自由基<sup>[34]</sup>,所以糖醛酸含量越高,多糖的抗氧化能力越强;另外有研究表明多糖中 Gal 和 Ara 含量越高,其抗氧化能力越强<sup>[35]</sup>。LHCP 与 SHCP 和 RHCP 相比,GalA、Gal、Rha 和 Ara 糖含量较高,这可能是 LHCP 抗氧化能力最高的原因之一。LHCP 中具有较高含量的结合酚,研究表明多酚因其较低的氧化还原电位可以结合自由基<sup>[36]</sup>,这也有利于其抗氧化活性的发挥。此外,多糖的抗氧化能力还与多糖分子上的取代基有关,多糖上的羟基被取代为乙酰基或甲酯基后,其电荷密度发生改变,从而影响生物活性<sup>[37]</sup>。研究表明芦荟多糖乙酰基含量较高的组分体外抗氧化能力较强<sup>[38]</sup>。3 种鱼腥草多糖乙酰基和甲酯及含量不同,可能也是其抗氧化活性不同的因素之一。

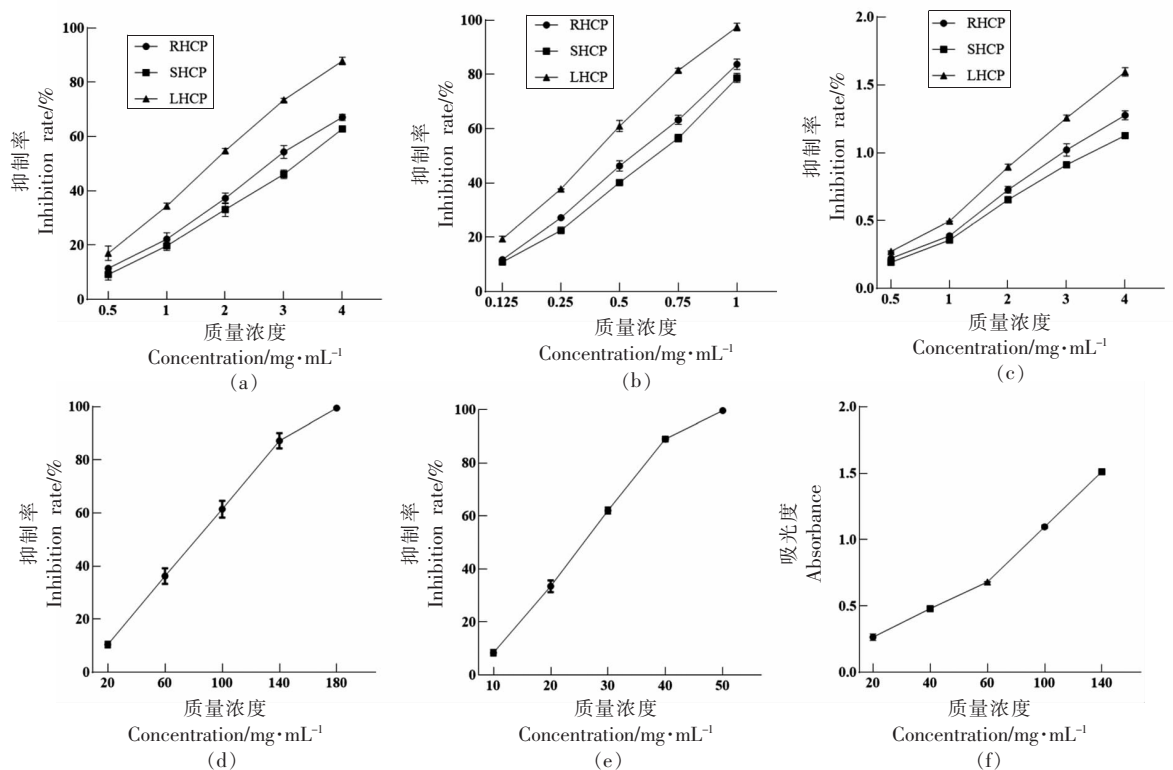


图4 RHCP、SHCP 和 LHCP 的 DPPH 自由基(a)、ABTS 自由基(c)清除能力和铁离子还原能力(e), VC 的 DPPH 自由基(b)、ABTS 自由基(d)清除能力和铁离子还原能力(f)

Fig.4 DPPH radical (a), ABTS radical (c) scavenging capacity and iron ion reducing capacity (e) for HCPs, and DPPH radical (b), ABTS radical (d) scavenging capacity and iron ion reducing capacity (f) for VC

## 2.9 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性

鱼腥草各部位多糖与阳性对照阿卡波糖的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性如图5所示,可以看出,鱼腥草各部位多糖的抑制能力不如阿卡波糖,但都具有一定的抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的潜力,且呈现出明显的剂量效应。其中LHCP对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用最为显著,在质量浓度为6 mg/mL时,LHCP对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制率为69.58%,而在相同浓度下,阿卡波糖的抑制率为80.83%,SHCP的抑制率为56.70%,RHCP的抑制率最低为44.68%。

多糖对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制能力与其分子质量、单糖组成、取代基和高级结构等有关。从分子质量来看,分子质量越低,越容易发挥降糖活性,但分子质量太低,则无法形成具有活性的特定结构,所以多糖分子质量在合适的范围内才能发挥最佳活性。在本试验中,RHCP的分子质量最高,LHCP的分子质量次之,SHCP的分子质量最

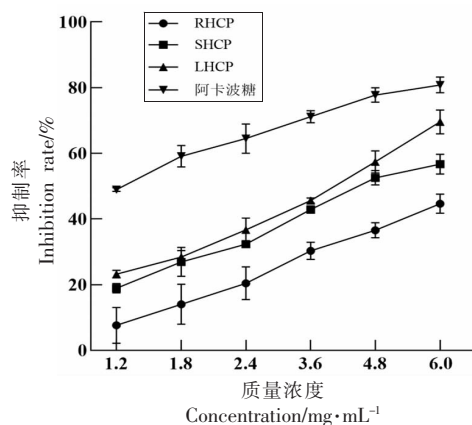


图5 RHCP、SHCP 和 LHCP 的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性  
Fig.5  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of RHCP, SHCP and LHCP

低, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力强弱依次为 LHCP、SHCP 和 RHCP。LHCP 较强的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力可能得益于其合适的分子质量范围。单糖组成是影响多糖 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力的重要因

素,研究表明,多糖中 Gal<sup>[34,38-39]</sup>、Man<sup>[34,38]</sup>、Ara<sup>[22,38]</sup>和糖醛酸<sup>[38-39]</sup>含量越高,其 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力越强。可能是由于多糖与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶作用的活性中心与这些糖单元有关,所以 LHCP 表现出较强 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力的一个重要因素是它具有较高含量的 GalA、Gal、Rha 和 Ara。多糖上的取代基也是影响其生物活性的重要因素,红枣多糖经乙酰化改性后, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力显著提高<sup>[39]</sup>。LHCP 较强的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力可能也得益于其较多的乙酰基基团。多糖的空间构象与生物活性紧密相关,研究表明多糖的三螺旋结构在其活性发挥上有着重要作用<sup>[40]</sup>。在由海蒿子提取分离纯化得到的不同多糖组分中,具备三螺旋结构的多糖组分表现出最强的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力<sup>[41]</sup>。而灵芝不同多糖组分中,存在三螺旋结构的多糖组分 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力最弱<sup>[42]</sup>。LHCP 不具有三螺旋结构,而 SHCP 和 RHCP 具有三螺旋结构,这可能说明,不具有三螺旋结构的鱼腥草多糖可以表现出较强的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力。与高度有序三螺旋结构相比,LHCP 具有更灵活的分子构象,可能有益于其与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶相互作用。

### 3 结论

鱼腥草不同部位多糖的结构和生物活性存在差异。在结构上,3种多糖的单糖组成相同但比例不同;分子质量大小不同;乙酰基和甲酯基含量有显著差异;LHCP 与 RHCP 和 SHCP 的空间构象存在差异。生物活性上,3种多糖中 LHCP 表现出最强的体外抗氧化活性与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。LHCP 较强的体外抗氧化活性与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性可能归因于其较高含量的半乳糖、阿拉伯糖、半乳糖醛酸和结合酚、较多的乙酰基和甲酯基基团,并且不存在三螺旋结构。此外,多糖的糖苷键类型和立体构型等也是影响其生物活性的重要因素,鱼腥草多糖结构与生物活性的关系仍需进一步探索。

### 参 考 文 献

- [1] SHINGNAISUI K, DEY T, MANNA P, et al. Therapeutic potentials of *Houttuynia cordata* Thunb. against inflammation and oxidative stress: A review [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 220: 35-43.

[2] YANG L, JIANG J G. Bioactive components and functional properties of *Houttuynia cordata* and its applications[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2009, 47 (12): 1154-1161.

[3] 蔡红蝶,刘佳楠,陈少军,等. 鱼腥草化学成分、生物活性及临床应用研究进展[J]. *中成药*, 2019, 41 (11): 2719-2728.

CAI H D, LIU J N, CHEN S J, et al. Research progress on chemical composition, biological activity, and clinical application of *Houttuynia cordata* [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2019, 41 (11): 2719-2728.

[4] KUMAR M, PRASAD S K, KRISHNAMURTHY S, et al. Antihyperglycemic activity of *Houttuynia cordata* Thunb. in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2014, 2014: 809438.

[5] 陈婧,方建国,吴方建,等. 鱼腥草抗炎药理作用机制的研究进展[J]. *中草药*, 2014, 45(2): 284-289.

CHEN J, FANG J G, WU F J, et al. Research progress on the anti-inflammatory mechanism of *Houttuynia cordata*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(2): 284-289.

[6] ZOU Y F, LI C Y, FU Y P, et al. The comparison of preliminary structure and intestinal anti-inflammatory and anti-oxidative activities of polysaccharides from different root parts of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 295: 115446.

[7] 吴红森,王晓鹏,王磊,等. 鱼腥草多糖的抑菌作用[J]. *中国野生植物资源*, 2012, 31(5): 24-26.

WU H M, WANG X P, WANG L, et al. The antibiotic activity of polysaccharide from *Houttuynia cordata* thunb[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2012, 31(5): 24-26.

[8] TIAN L, ZHAO Y, GUO C, et al. A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(2): 537-544.

[9] KIM J, PARK C S, LIM Y, et al. *Paeonia japoni-*



- ca*, *Houttuynia cordata*, and *Aster scaber* water extracts induce nitric oxide and cytokine production by lipopolysaccharide-activated macrophages[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2009, 12(2): 365–373.
- [10] LU Y, JIANG Y, LING L J, et al. Beneficial effects of *Houttuynia cordata* polysaccharides on ‘two-hit’ acute lung injury and endotoxic fever in rats associated with anti-complementary activities[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018, 8(2): 218–227.
- [11] SHI C C, ZHU H Y, LI H, et al. Regulating the balance of Th17/Treg cells in gut-lung axis contributed to the therapeutic effect of *Houttuynia cordata* polysaccharides on H1N1-induced acute lung injury [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 158: 52–66.
- [12] 谭西, 周欣, 陈华国. 植物多糖构效关系研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21): 4104–4109.
- TAN X, ZHOU X, CHEN H G. structure-activity relationship of plant polysaccharides[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42(21): 4104–4109.
- [13] YUAN J, CHEN S, WANG L, et al. Preparation of purified fractions for polysaccharides from *Monetaria moneta* Linnaeus and comparison their characteristics and antioxidant activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 342–349.
- [14] 张勇. 铁皮石斛茎、叶、花多糖理化性质及抗氧化、免疫调节活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- ZHANG Y. Physicochemical properties, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from the stem, leaf and flower of *Dendrobium candidum*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [15] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350–356.
- [16] FILISSETTI-COZZI T M C C, CARPITA N C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars[J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 197(1): 157–162.
- [17] VAN WILGENBURG M G M, WERKMAN E M A, VAN GORKOM W H, et al. Criticism of the use of coomassie brilliant blue G-250 for the quantitative determination of proteins [J]. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1981, 19(5): 301–304.
- [18] MARTÍN-DIANA A B, GARCÍA-CASAS M J, MARTÍNEZ-VILLALUENGA C, et al. Wheat and oat brans as sources of polyphenol compounds for development of antioxidant nutraceutical ingredients [J]. *Foods*, 2021, 10(1): 115.
- [19] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 299: 152–178.
- [20] 李银莉. 马齿苋多糖的乙酰化修饰及其对胰岛 $\beta$ 细胞活性影响的研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2021.
- LI Y L. Study on the acetylation modification and effects of INS-1 cell activity of polysaccharide from natural *Portulaca oleracea* L[J]. Nanchang: Jiangxi Science & Technology Normal University, 2021.
- [21] 曹风, 刘璇, 毕金峰, 等. 不同品种苹果果胶含量及结构差异分析[J]. *中国农业科学*, 2019, 52(13): 2328–2340.
- CAO F, LIU X, BI J F, et al. Difference analysis of pectin content and structure from various apple cultivars[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(13): 2328–2340.
- [22] ZHENG Q, JIA R B, OU Z R, et al. Comparative study on the structural characterization and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of polysaccharide fractions extracted from *Sargassum fusiforme* at different pH conditions[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 602–610.
- [23] TANG S X, CHENG Y X, WU T, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum*-fermented mulberry pomace on antioxidant properties and fecal microbial community[J]. *LWT*, 2021, 147: 111651.
- [24] 石嘉峰, 张冉, 梁富强, 等. 谷物植物化学物中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选及其分子机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(5): 9–16.
- SHI J Y, ZHANG R, LIANG F Q, et al. Screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from cereal phytochemicals and underlying molecular mechanism [J]. *Food Science*, 2021, 42(5): 9–16.
- [25] JIANG J Y, KONG F S, LI N S, et al. Purification, structural characterization and in vitro antioxidant activity of a novel polysaccharide from *Boshuzhi*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 147: 365–371.

- [26] 孙文静. 地锦多糖的制备及对小鼠免疫增强活性研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021.  
SUN W J. The preparation of polysaccharides from *Euphorbia humifusa* and its immune-enhancing activity in mice[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2021.
- [27] MKADMINI HAMMI K, HAMMAMI M, RIHOUEY C, et al. Optimization extraction of polysaccharide from Tunisian *Zizyphus lotus* fruit by response surface methodology: Composition and antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 476–484.
- [28] YE Z P, WANG W, YUAN Q X, et al. Box–Behnken design for extraction optimization, characterization and *in vitro* antioxidant activity of *Cicer arietinum* L. hull polysaccharides [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 147: 354–364.
- [29] 汪磊. 刺梨多糖的分离纯化、降血糖作用及其对肠道微生态的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.  
WANG L. Isolation, purification and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and their effect on gut microflora[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [30] WILLATS W G, MCCARTNEY L, MACKIE W, et al. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 47(1/2): 9–27.
- [31] 蒋茂婷, 冉艳红, 刘娜, 等. 蒜皮水溶性多糖的制备及结构表征[J]. *食品科学*, 2022, 43(6): 57–65.  
JIANG M T, RAN Y H, LIU N, et al. Preparation and structural characterization of water-soluble polysaccharide from garlic skin [J]. *Food Science*, 2022, 43(6): 57–65.
- [32] 陈海霞. 高活性茶多糖的一级结构表征、空间构象及生物活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2002.  
CHEN H X. Study on the structure characterization, conformation, and bioactivities of polysaccharides from green tea[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2002.
- [33] LIANG X, GAO Y, FEI W, et al. Chemical characterization and antioxidant activities of polysaccharides isolated from the stems of *Parthenocissus tricuspidata*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 119: 70–78.
- [34] RAO R S P, MURALIKRISHNA G. Water soluble feruloyl arabinoxylans from rice and ragi: Changes upon malting and their consequence on antioxidant activity[J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(1): 91–99.
- [35] GONG P, GUO Y X, CHEN X F, et al. Structural characteristics, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharide from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Molecules*, 2022, 27(13): 4192.
- [36] 辛玥, 宋萧萧, 王玉箫, 等. 豇豆不同部位多糖结构特征及抗氧化性能比较[J]. *食品科学*, 2022, 43(16): 61–67.  
XIN Y, SONG X X, WANG Y X, et al. Structural characteristics and antioxidant properties of polysaccharides from different parts of cowpea[J]. *Food Science*, 2022, 43(16): 61–67.
- [37] HU H B, LI H M, HAN M H, et al. Chemical modification and antioxidant activity of the polysaccharide from *Acanthopanax leucorrhizus*[J]. *Carbohydrate Research*, 2020, 487: 107890.
- [38] LIU C H, WANG C H, XU Z L, et al. Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(6): 961–970.
- [39] 焦中高. 红枣多糖的分子修饰与生物活性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012.  
JIAO Z G. Modification and biological activities of *Zizyphus jujuba* fruit polysaccharide[D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2012.
- [40] MENG Y, LYU F, XU X J, et al. Recent advances in chain conformation and bioactivities of triple-helix polysaccharides [J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(5): 1653–1677.
- [41] 曹长靓. 海蒿子多糖的分离纯化、降血糖活性及其体外消化醇解研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.  
CAO C L. Isolation, purification, hypoglycemic activity and *in vitro* digestion and fermentation of polysaccharides from *Sargassum pallidum* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [42] 汪梦雯. 灵芝、香菇和茯苓多糖的提取、结构表征及降糖活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.  
WANG M W. Extraction, structural characterization, and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Fucoxylum* [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2021.

## Structure Characterization and Biological Activity of Polysaccharides from Different Parts of *Houttuynia cordata* Thunb

He Mengyao, Dong Zeyu, Zhang Lanlan, Wu Ting, Pan Siyi, Xu Xiaoyun\*

(Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Hubei Key Laboratory of Fruit & Vegetable Processing & Quality Control, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** *Houttuynia cordata* Thunb (*H. cordata*) is a medicinal and edible homologous plant. The abundant water-soluble polysaccharides of *H. cordata* have been proved to have a variety of biological activities. However, the current research on polysaccharides from *H. cordata* mainly focuses on the whole plant or aboveground parts. The differences in the structure and activity of polysaccharides from different parts of *H. cordata* are rarely reported. In this study, the polysaccharides from the rhizome (RHCP), stem (SHCP) and leaf (LHCP) of *H. cordata* were extracted and separated, and their structural characterization, antioxidant activity *in vitro* and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity were determined. The aim was to explore the relationship between the structure and biological activity of *H. cordata* polysaccharides (HCPs). Results showed that polysaccharides in different parts of *H. cordata* were acidic polysaccharides, which were composed of glucose, galactose, arabinose, rhamnose, galactose uronic acid, and a small amount of fucose, mannose, xylose, and glucuronic acid, but the proportions are different; The molecular weight was  $4.11 \times 10^4$  u to  $1.20 \times 10^6$  u; The infrared structure was basically the same; LHCP had higher content of methyl and acetyl groups, and their contents were 0.95% and 1.05% respectively; The surface morphology of the three polysaccharides was smooth and flat; LHCP was not triple helix polysaccharide, while RHCP and SHCP existed triple helical structure. The *in vitro* antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibition ability of LHCP were the strongest. It was found that the structure and activity of polysaccharides from different parts of *H. cordata* were different, providing a theoretical basis for the study of the structure-activity relationship of HCPs and providing a theoretical basis for the development and utilization of HCPs.

**Keywords** *Houttuynia cordata*; polysaccharide; structure; antioxidant;  $\alpha$ -glucosidase