

隔山消抗神经氨酸酶活性及化学成分研究

曹雨^{1,2}, 李金花², 刘海波², 刘艾林³, 张翔², 顾健^{1*}, 黄林芳^{2*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 研究民族药隔山消提取物的神经氨酸酶(NA)抑制活性及活性部位的化学成分, 并通过分子对接技术和NA抑制实验进一步探究其活性成分的NA抑制作用。**方法** 隔山消经石油醚渗漉、乙醇提取、醋酸乙酯萃取和水煎煮后, 得到4个提取部位, 采用荧光法测定4个提取部位NA抑制活性。应用UPLC-Q-Exactive技术快速归属和鉴定最佳活性部位中的化学成分; 利用MOE 2014软件, 以NA为靶点, 对该活性部位中7个主要成分进行分子对接; 再通过荧光法测定该7个成分的NA抑制活性。**结果** 隔山消醋酸乙酯部位NA抑制活性最佳, 半数抑制浓度(IC₅₀)为137.31 μg/mL; 高分辨质谱鉴定了该部位21个化学成分, 包括酚酸类3个、黄酮类2个、鞣质类16个, 其中7个化学成分经与对照品比对而准确鉴定, 13个化合物在该植物中首次报道; 分子对接实验表明五没食子酰葡萄糖、鞣花酸、原儿茶酸对接效果较好, 进一步NA抑制验证实验表明7个化合物均有NA抑制活性, 其中鞣花酸和五没食子酰葡萄糖效果最好, IC₅₀分别为426.67、440.28 μmol/L。**结论** 隔山消提取物具有NA抑制活性, 鞣花酸和五没食子酰葡萄糖为其主要活性成分。

关键词: 隔山消; UPLC-Q-Exactive; 神经氨酸酶; 分子对接技术; 五没食子酰葡萄糖; 鞣花酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)21-4485-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.019

Study on anti-neuraminidase activity and chemical compounds of *Geranium strictipes*

CAO Yu^{1,2}, LI Jin-hua², LIU Hai-bo², LIU Ai-lin³, ZHANG Xiang², GU Jian¹, HUANG Lin-fang²

1. Department of Pharmacy, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory activity of neuraminidase (NA) and the chemical constituents of the active fraction of the extract from *Geranium strictipes*, and further investigate the anti-NA activity of the components by molecular docking technique and NA inhibition test. **Methods** *G. strictipes* was extracted by petroleum ether, ethanol, ethyl acetate and water, and four extracts were obtained. The inhibition activity of NA was determined by fluorescence method and the inhibition rate was calculated. UPLC-Q-Exactive was used to rapidly identify and identify the chemical constituents in the most active sites. Using MOE 2014, seven main components were inserted to NA. And the NA inhibitory activity of these seven major components was determined by fluorescence method, and the inhibition rate was calculated. **Results** The results showed that the ethyl acetate was the most active with the IC₅₀ value of 137.31 μg/mL. Moreover, a total of 20 chemical constituents were identified by UPLC-Q-Exactive, including 3 phenolic acids, 2 flavonoids, and 16 tannins. Among them, seven chemical constituents were identified accurately with the standard and 13 compounds were reported for the first time in the plant. The results of molecular docking showed that pentagalloylglucose, ellagic acid

收稿日期: 2017-04-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目——肉苁蓉自然基金(81473315); 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2017SZ095); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2016-I2M-3-015)

作者简介: 曹雨, 女, 硕士研究生, 研究方向为民族药物化学和药理学。Tel: (010)57833197 E-mail: caoyu0709@139.com

***通信作者** 顾健, 教授, 博士生导师, 主要从事民族药药效物质及其作用机制研究。Tel: (028)85523968 E-mail: gujianed@163.com
黄林芳, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中药资源与质量评价研究。Tel: (010)57833197 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

and protocatechuic acid had better antagonistic effect. Further NA inhibition test showed that all the seven compounds had inhibitory activity, especially for the ellagic acid and pentagalloylglucose which had the best effect and IC_{50} were 426.67 and 440.28 $\mu\text{mol/L}$, respectively. **Conclusion** The extract from *G. strictipes* have the inhibitory activity of NA, and the ellagic acid and pentagalloylglucose are main active components.

Key words: *Geranium strictipes* R. Kunth; UPLC-Q-Exactive; neuraminidase; molecular docking technique; pentagalloylglucose; ellagic acid

隔山消为牻牛儿苗科老鹳草属植物紫地榆 *Geranium strictipes* R. Kunth 的根, 中华人民共和国卫生部《药品标准中药成方制剂》第十二册及《大理中药资源志》均有记载^[1-2], 亦为白族、彝族常用的民间药材, 主要分布于云南中甸、永宁、永胜、大理等少数民族地区^[2]。其具有清热利湿、活血止血功效^[2]。隔山消主要含没食子酸、鞣花酸、3,4-二羟基苯甲酸(原儿茶酸)、没食子酸甲酯和(+)-儿茶素等成分^[3-4], 具有抗菌、抗炎、止咳及促进小肠推进等作用^[5-7]。目前, 有 5 种含紫地榆的成方制剂广泛应用于临床, 分别为千紫红胶囊^[1]、千紫红颗粒^[8]、壮骨丸^[9]、胃肠舒胶囊^[10]和邓氏女金丸^[11]。

流行性感感冒由流感病毒感染引起, 严重威胁人类的健康^[12], 近年来流感病毒 H1N1、H3N8、H5N1、H7N9 不断蔓延, 抗流感病毒药物研究成为当前的研究热点。流感病毒表面分布 3 种重要的蛋白刺突, 分别为神经氨酸酶(neuraminidase, NA)、血凝素(hemagglutinin, HA)和基质蛋白 M2。由于 NA 具有病毒复制所必需的酶活性, 故常作为抗流感病毒药物靶点。目前有效抑制 NA 的药物主要有 2 种^[13], 即扎那米韦(zanamivir)和奥司他韦(oseltamivir)。然而, 由于 NA 突变性强, 扎那米韦口服利用度低, 奥司他韦副作用较大, 其应用受到了限制。因此, 亟待从天然药物中发现毒副作用较小的 NA 抑制剂。

本实验首次将隔山消乙醇部位、醋酸乙酯部位、水提取部位及石油醚部位进行 NA 抑制活性初筛, 并首次采用 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱^[14-15]分析隔山消醋酸乙酯提取部位的化学成分, 共鉴定了 21 个化学成分, 包括酚酸类 3 个、黄酮类 2 个、鞣质类 16 个, 其中 13 个化合物为隔山消中首次发现。通过分子对接技术^[16-17]对准确鉴定的 7 个成分进行抗 NA 活性虚拟筛选; 再进一步采用免疫荧光法进行抗 NA 活性验证研究, 为抗流感病毒药物研发提供参考。

1 材料

1.1 药材与试剂

隔山消样品于 2012 年 4 月采收于云南大理, 经

中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授鉴定为牻牛儿苗科老鹳草属植物紫地榆 *Geranium strictipes* R. Kunth 的根。

奥司他韦(瑞士 Roche 公司, 批号 B1058); 对照品 (+)-儿茶素(批号 16030812)、原儿茶酸(批号 16032112)、没食子酸(批号 16022801)、鞣花酸(批号 13010903)购自成都曼思特生物科技有限公司, 对照品没食子酸甲酯(批号 160405)、没食子酸乙酯(批号 140730)、五没食子酰葡萄糖(批号 150827)购自成都克洛玛生物科技有限公司, 7 种对照品质量分数均 $\geq 98\%$; P0309 NA 抑制剂筛选试剂盒(上海碧云天公司); 96 孔荧光酶标板(美国 Costar 公司); 甲醇(色谱纯, 美国默克公司); 甲酸、乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 二甲基亚砜(DMSO, 美国 Amresco 公司); 娃哈哈饮用纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器

UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场阱高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔公司); Ultimate 3000 超高效液相色谱系统(美国戴安公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm , 美国沃特世科技有限公司); HX-200 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂); ESJ200-4 万分之一电子天平(沈阳龙腾电子有限公司); BT25S 十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-400KDE 型超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司); 多功能连续波长酶标仪(奥地利泰肯公司); MH-2 微量振荡器(海门其林贝尔仪器制造有限公司); MCO-15AC 二氧化碳培养箱(日本三洋电机株式会社)。

2 方法

2.1 隔山消提取部位的制备^[13]

将隔山消药材样品粉碎成粗粉, 取粗粉 500 g, 先用石油醚浸泡 1 d 后渗漉提取至提取液颜色变浅(5 倍药材量), 回收石油醚, 得石油醚提取物; 残渣挥去石油醚, 用 80%乙醇湿润后, 再用 3 倍量 80%乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回

收乙醇至无醇味,用等体积醋酸乙酯萃取 2 次,合并醋酸乙酯萃取液,回收醋酸乙酯至干,得醋酸乙酯萃取物;母液浓缩至干,得乙醇提取物;残渣挥干乙醇,用 3 倍量的水煎煮 2 次,每次 2 h,合并水煎液,浓缩至干,得水提取物。

2.2 各提取部位 NA 抑制活性检测

2.2.1 阳性药及样品溶液的配制 称取阳性药奥司他韦及按“2.1”项下方法制得的 4 种干燥提取部位样品,用 DMSO 溶解,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的母液,实验时用缓冲液稀释至质量浓度为 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.2 NA 抑制活性检测 按照碧云天 NA 抑制剂筛选试剂盒说明书操作^[18]。在 96 孔荧光酶标板内每孔加入 70 μL 缓冲液、10 μL NA,分别加入 1、2、5、7.5、10 μL (母液为 100 $\mu\text{g/mL}$) 和 7.5、10 μL (母液为 200 $\mu\text{g/mL}$) 隔山消各提取物和奥司他韦母液,使药物终质量浓度分别为 0、10、20、50、75、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$,另设空白对照,每一待测质量浓度设 3 个复孔;每孔再加入 0~10 μL Milli-Q 水使总体积为 90 μL 。振动摇匀 1 min 后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min。加入 10 μL NA 荧光底物,再振动 1 min,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 进行荧光值 (F) 测定,激发波长为 322 nm,发射波长为 450 nm。根据以下公式计算药物对 NA 的抑制率。

$$\text{抑制率} = (F_m - F_s) / (F_m - F_0)$$

F_m 为未加药物孔的荧光值, F_s 为加入药物孔的荧光值, F_0 为空白对照荧光值

2.2.3 数据处理 根据待测样品的质量浓度与相应的 NA 抑制率,利用 SPSS 19 软件拟合回归曲线,得到奥司他韦及 4 个提取部位的 NA 半数抑制浓度 (IC_{50})。

2.3 隔山消醋酸乙酯部位化学成分检测

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称取“2.1”项下制得的 4 种干燥提取部位样品适量,置于 25 mL 量瓶中,精密加入醋酸乙酯适量,25 $^{\circ}\text{C}$,超声处理 (500 W, 频率 40 kHz) 30 min,放冷,定容,摇匀,滤过,即得。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别精密称取原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯和五没食子酰葡萄糖对照品适量,置于 5 mL 量瓶中,加入醋酸乙酯溶解定容,制备单一对照品储备液,混合对照品溶液储备液均由各对照品储备液混合并稀释得到,各对照品溶液终质量

浓度为 0.1~0.5 mg/mL,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3.3 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为 0.1% 的甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B),梯度洗脱程序: 0~1 min, 100% A; 1~10 min, 100%~0 A; 10~10.1 min, 0~100% A; 10.1~13 min, 100% A。体积流量为 0.3 mL/min,进样室温度 15 $^{\circ}\text{C}$,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量 2 μL 。

2.3.4 质谱条件 离子源为 HESI 源,负离子检测模式,鞘气压力 206.84 kPa;辅助气体积流量 10 L/min;喷雾电压 3.7 kV;离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$;辅助气温度 300 $^{\circ}\text{C}$;扫描模式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500,扫描范围 m/z 100~1 500。

2.3.5 数据处理 Xcalibur 3.0 软件 (赛默飞科技有限公司,美国) 对隔山消醋酸乙酯部位进行质谱数据分析,通过高分辨质谱信息推测其可能的分子式。

2.4 7 种成分与 NA 的分子对接

NA 为抗流感药物的重要靶点,在病毒复制过程中起重要作用。本实验通过 RCSB Protein Data Bank 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 筛选,以 H3N8 禽流感 NA (PDB: 4WA5) 为对接模型,通过 MOE 2014 进行分子对接实验,预测 7 种成分潜在的抗 NA 活性。

2.5 7 种成分 NA 抑制活性验证

2.5.1 阳性药及样品溶液的配制 称取阳性药奥司他韦及 7 种对照品,用 DMSO 溶解,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的母液,实验时用缓冲液稀释至质量浓度为 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5.2 NA 活性检测 按照碧云天 NA 抑制剂筛选试剂盒说明书操作。同“2.2.2”项下方法,在激发波长为 322 nm,发射波长为 450 nm 下,测定各化合物及奥司他韦的 F 值并计算药物对 NA 的抑制率。

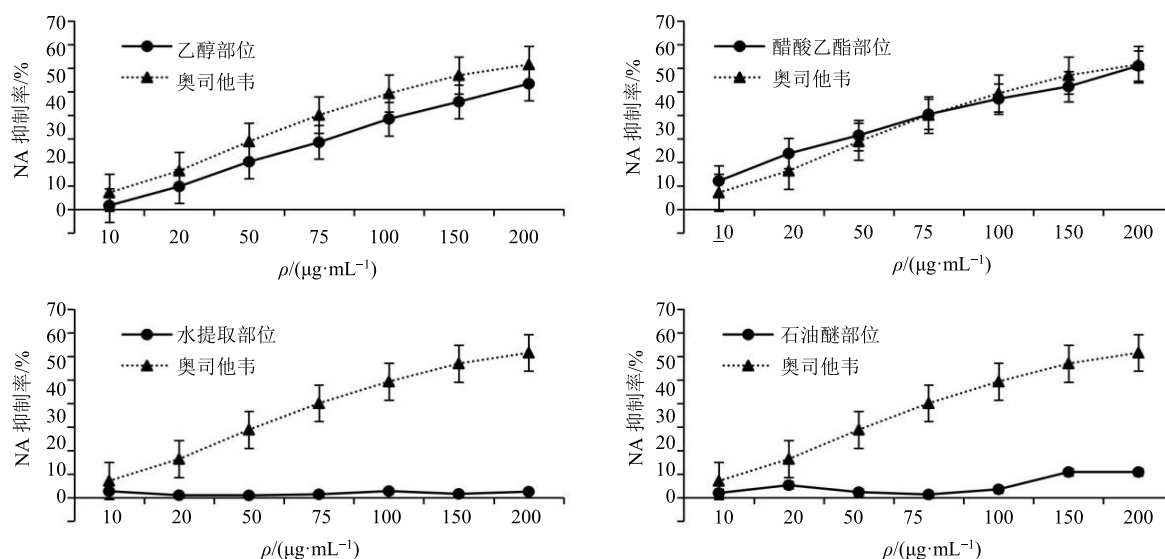
3 结果

3.1 隔山消 4 个提取部位 NA 抑制活性

隔山消 4 个提取部位不同质量浓度样品的 NA 抑制活性结果见图 1。以奥司他韦为阳性对照,结果显示水提部位和石油醚部位无明显的 NA 抑制活性;乙醇部位和醋酸乙酯部位均有 NA 抑制作用,随着样品质量浓度的增加,抑制活性增强, IC_{50} 分别为 166.44、137.31 $\mu\text{g/mL}$ 。

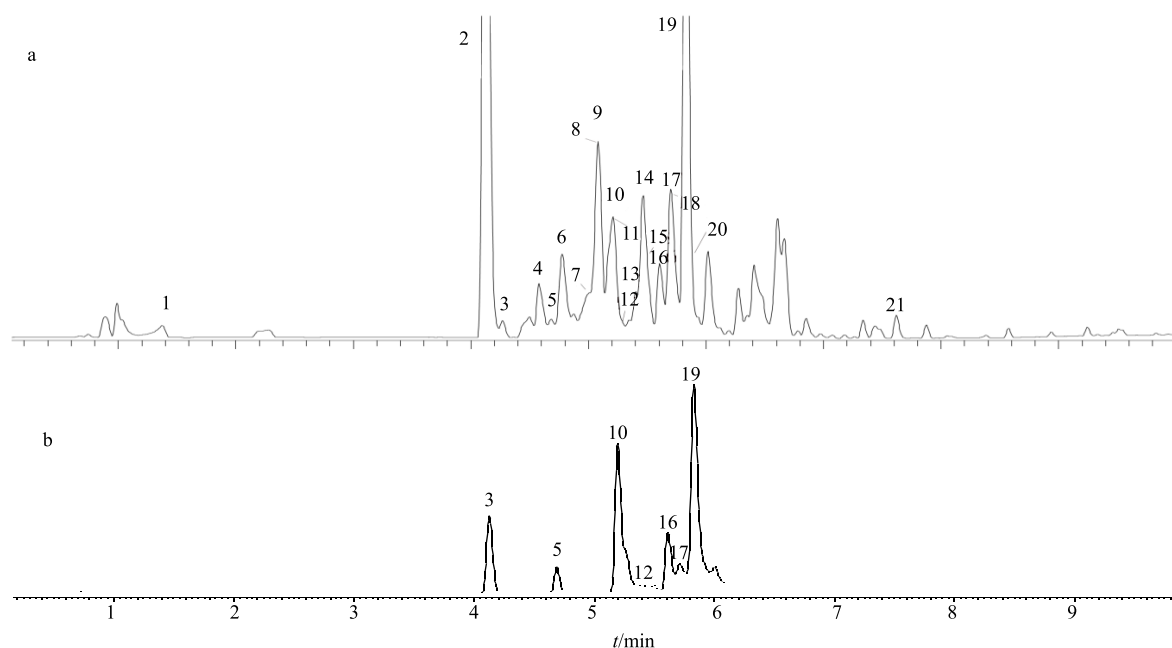
3.2 醋酸乙酯部位化学成分鉴别

为了更准确全面地检测物质信息,对样品处理、

图1 隔山消4个提取部位对NA的抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 1 NA inhibitory activities of four extracts of *G. strictipes* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

色谱条件以及质谱条件等进行了优化, 并对样品进行分析, 在基峰负离子模式下显示更为丰富的信息, 总离子流图见图2。首次通过 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱全面分析隔山消醋酸乙酯提取部位, 共鉴定了21个化学成分, 包括酚酸类成分3个、黄酮类成分2个、鞣质类成分16个; 其中有7个化合物已被报道, 13个化合物为该

植物中首次发现, 分别为莽草酸、没食子酰葡萄糖、没食子酸酯、老鹳草素、鞣料云实素、digalloyl-HHDP-glucose、 β -1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基葡萄糖、trigalloyl-HHDP-glucose、五没食子酰葡萄糖、hexagalloyl glucose、没食子酸乙酯、heptagalloyl glucose、异鼠李素。化合物的保留时间、相对分子量、一级质谱数据及二级质谱碎片离子信息见表1,



3-没食子酸 5-原儿茶酸 10-没食子酸甲酯 12-(+)-儿茶素 16-五没食子酰葡萄糖 17-鞣花酸 19-没食子酸乙酯
3-gallic acid 5-protocatechuic acid 10-methyl gallate 12-(+)-catechin 16-pentagalloyl glucose 17-ellagic acid 19-ethyl gallate

图2 隔山消醋酸乙酯部位 (a) 和对照品 (b) 总离子流图 (负离子模式)

Fig. 2 Total ion chromatogram for ethyl acetate extracts of *G. strictipes* (a) and reference standards (b, negative ion mode)

表 1 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱对隔山消化学成分的鉴定

Table 1 Chemical constituents identified in ethyl acetate extracts of *G. strictipes* by UPLC-Q-Exactive

峰号	t_R/min	分子式	[M-H] ⁻ (m/z)		MS/MS 碎片离子	化合物
			理论值	实测值		
1 [#]	1.03	C ₇ H ₁₀ O ₅	173.044 45	173.044 39	155, 137, 111	莽草酸
2 [#]	4.09	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.065 97	331.066 77	169, 125	没食子酰葡萄糖
3 [*]	4.13	C ₇ H ₆ O ₅	169.013 15	169.012 94	125	没食子酸
4	4.60	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.076 93	483.077 55	331, 169, 125	β-1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖
5 [*]	4.68	C ₇ H ₆ O ₄	153.018 24	153.018 02		原儿茶酸
6	4.78	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.076 93	483.077 48	169, 125	β-1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖 (异构体)
7 [#]	5.01	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	321.024 11	321.024 84	169, 125	没食子酸酯
8 [#]	5.07	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	951.073 42	951.073 79	633, 465, 197, 169, 125	老鹳草素
9 [#]	5.08	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633.072 24	633.073 06	483, 465, 169, 125	鞣料云实素
10 [*]	5.19	C ₈ H ₈ O ₅	183.028 80	183.028 75	169, 124	没食子酸甲酯
11	5.21	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.087 89	635.088 56	483, 331, 169, 125	β-1,4,6-三-O-没食子酰基葡萄糖
12 [*]	5.27	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.070 66	289.071 66	245, 125, 109	(+)-儿茶素
13 [#]	5.40	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	785.083 20	785.083 92	633, 497, 169, 125	digalloyl-HHDP-glucose
14 [#]	5.46	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787.098 85	787.099 43	635, 393, 169, 125	β-1,2,3,6-四-O-没食子酰基葡萄糖
15 [#]	5.51	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆	937.094 16	937.095 15	787, 635, 169, 125	trigalloyl-HHDP-glucose
16 ^{*#}	5.60	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.109 81	939.110 35	787, 469, 169, 125	五没食子酰葡萄糖
17 [*]	5.71	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.997 89	300.998 75	283, 229	鞣花酸
18 [#]	5.77	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	1 091.120 77	1 091.067 40	939, 769, 469, 169, 125	hexagalloyl glucose
19 ^{*#}	5.83	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.044 45	197.044 51	197, 169, 125	没食子酸乙酯
20 [#]	5.88	C ₅₅ H ₄₀ O ₃₄	1 243.131 72	1 243.132 32	1 091, 939, 197, 169, 125	heptagalloyl glucose
21 [#]	7.62	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.049 93	315.050 87	300, 151	异鼠李素

*与对照品比对鉴定; #首次从隔山消中报道

*identified with a standard reference; #compositions reported for the first time from roots of *G. strictipes*

其中 7 个化合物通过与对照品比较明确鉴定。

3.2.1 酚酸类化合物的鉴定 在负离子模式下, 1 号峰母核离子 m/z 173.044 39 [M-H]⁻, 二级碎片离子主要为 m/z 155、137、111。六元环 3 位脱去 1 分子水后形成 m/z 155 碎片离子峰, 5 位继续脱去 1 分子水形成 m/z 137 碎片离子峰; 二级碎片离子 m/z 111 为母核离子脱去 1 分子 CO₂ 和 1 分子水, 故鉴定 1 号峰为酚酸类化合物莽草酸。3 号峰母核离子 m/z 169.012 94 [M-H]⁻, 脱去 1 分子 CO₂ 形成 m/z 125 碎片离子, 对照品 t_R 为 4.13 min, 据相关文献报道^[4]并与没食子酸对照品质谱比对, 鉴定 3 号峰为没食子酸。5 号峰母核离子 m/z 153.018 02 [M-H]⁻, 其对照品 t_R 为 4.68 min, 与原儿茶酸对照品质谱比对, 鉴定 5 号峰为原儿茶酸。

3.2.2 黄酮类化合物的鉴定 根据 METLIN 数据库及老鹳草属相关文献报道^[19-21], (+)-儿茶素二级碎片离子主要为 m/z 245、125、109, 在本研究中 12 号峰碎片测试结果与文献报道一致, 并经对照品比对, 鉴定 12 号峰为 (+)-儿茶素。21 号峰母核离

子 m/z 315.050 87, 特征碎片离子主要为 [M-CH₃]⁻ m/z 300 和 [M-C₇H₇O₂-C₂HO]⁻ m/z 151, 根据负离子模式下二级质谱碎片信息与文献报道^[21]比较, 鉴定 21 号峰为异鼠李素。

3.2.3 鞣质类化合物的鉴别 根据文献报道^[20], β-1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖母核离子 m/z 483 [M-H]⁻, 其二级特征碎片离子有 m/z 331 和 169, 与实验结果一致, 故 4 号峰和 6 号峰为 β-1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖; 没食子酰葡萄糖母核离子 m/z 331 [M-H]⁻, 根据化学式结构及母核离子推测 2 号峰为没食子酰葡萄糖 (异构体)。在负离子模式下, 11 号峰的母核离子为 m/z 635.088 56 [M-H]⁻, 其二级特征碎片离子有 m/z 483 和 169, 13 号峰的母核离子为 m/z 785.083 92 [M-H]⁻, 其二级特征碎片离子有 m/z 633, 14 号峰的母核离子为 m/z 787.099 43 [M-H]⁻, 其二级特征碎片离子有 m/z 635 和 169, 与该文献的母核结构及二级质谱碎片信息比较, 鉴定 11 号峰为 β-1,4,6-三-O-没食子酰基-葡萄糖, 13 号峰为 digalloyl-HHDP-glucose, 14 号峰为 β-1,2,3,6-四-O-

没食子酰基葡萄糖。8 号峰在负离子模式下响应较好, 二级碎片有 m/z 633、465、197、169、125, 根据负离子模式二级质谱碎片信息及母核离子结构和文献报道^[22-23]比较, 鉴定 8 号峰为老鹳草素, 该成分分为老鹳草属特征成分。9 号峰的二级碎片离子主要为 m/z 465、169、125, 与 8 号峰老鹳草素二级碎片离子部分一致, 根据文献报道^[23-24], 推测 9 号峰为鞣料云实素。7、10、19 号峰母核离子分别为 m/z 321.024 84 $[M-H]^-$ 、 m/z 183.028 75 $[M-H]^-$ 和 m/z 197.044 51 $[M-H]^-$, 据文献报道^[4]及与对照品比较, 特征碎片离子分别为 m/z 169、125, m/z 169、124 和 m/z 197、169、125, 鉴定 7 号峰为没食子酸酯, 10 号峰为没食子酸甲酯, 19 号峰为没食子酸乙酯。15 号峰母核离子 m/z 937.095 15 $[M-H]^-$, 二级碎片为 m/z 787、635、169、125, 与文献报道^[25]基本一致, 鉴定 15 号峰为 trigalloyl-HHDP-glucose。16 号峰母核离子为 m/z 939.110 35 $[M-H]^-$, 其二级特征碎片主要有 m/z 787、469, 对照品 t_R 为 5.60 min, 鉴定 16 号峰为五没食子酰葡萄糖。17 号峰在负离子模式下脱去 1 分子羟基, 得到 m/z 283 碎片离子, 另一碎片离子为 m/z 229 与鞣花酸对照品二级碎片比对一致, 故鉴定 17 号峰为鞣花酸。18 号峰、20 号峰在负离子模式下响应较好, 二级碎片分别为 m/z

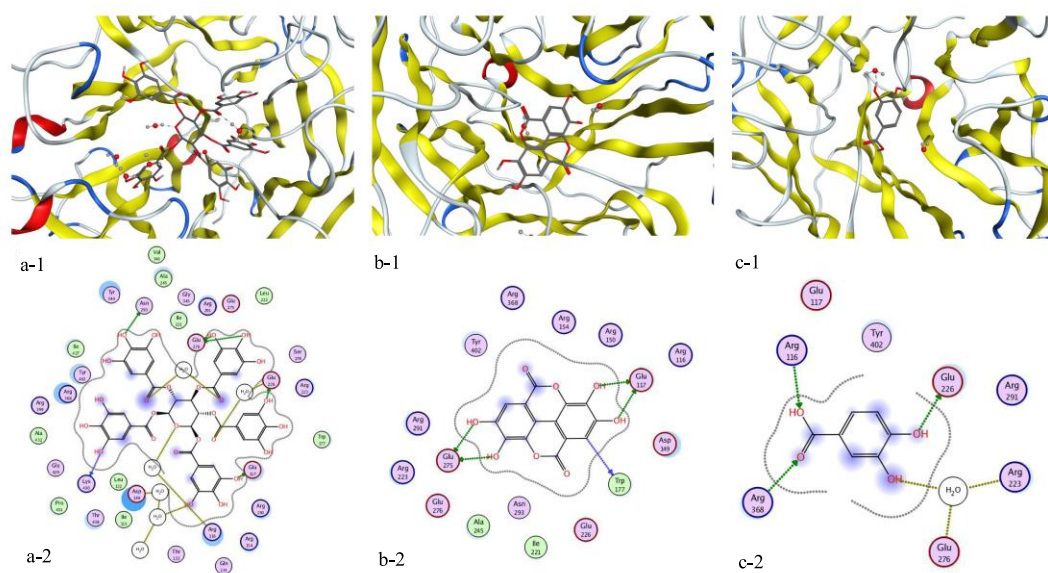
939、769、469、169、125 和 m/z 1091、939、197、169、125, 根据文献报道^[26], 鉴定 18 号峰为 hexagalloyl glucose, 20 号峰为 heptagalloyl glucose。

3.3 7 种成分与 NA 的分子对接结果

以自由能为评价指标, 7 个成分均与 NA 有较好的对接效果, 其对接强弱顺序依次为五没食子酰葡萄糖 (-268.791 kcal/mol)、鞣花酸 (-134.207 kcal/mol)、原儿茶酸 (-82.874 kcal/mol)、儿茶素 (-80.626 kcal/mol)、没食子酸甲酯 (-75.716 kcal/mol)、没食子酸乙酯 (-45.832 kcal/mol)、没食子酸 (-41.141 kcal/mol)。得出五没食子酰葡萄糖、鞣花酸和原儿茶酸抗 NA 效果较好 (图 3)。

3.4 7 种成分的 NA 抑制活性

根据上述实验结果, 醋酸乙酯部位 NA 抑制效果最佳。为了进一步证实该部位的生物活性成分, 本实验对 UPLC-Q-Exactive 定性鉴定出有对照品参照的 7 种成分 (原儿茶酸、儿茶素、鞣花酸、没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯和五没食子酰葡萄糖) 进行 NA 活性筛选, 奥司他韦为阳性对照。如图 4 所示, 7 种成分均具有 NA 抑制作用。将各个成分的 IC_{50} 值与奥司他韦进行比较, 发现儿茶素、没食子酸、没食子酸甲酯和没食子酸乙酯抑制 NA 的活性较差, IC_{50} 值大于 1 000 $\mu\text{mol/L}$; 原儿茶酸



a-1-五没食子酰葡萄糖三级结构 a-2-五没食子酰葡萄糖二级结构 b-1-鞣花酸三级结构 b-2-鞣花酸二级结构 c-1-原儿茶酸三级结构 c-2-原儿茶酸二级结构

a-1-pentagalloyl glucose in third-level structure a-2-pentagalloyl glucose in second-level structure b-1-ellagic acid in third-level structure b-2-ellagic acid in second-level structure c-1-protocatechuic acid in third-level structure c-2-protocatechuic acid in second-level structure

图 3 3 种化合物与 NA 预测结合模式

Fig. 3 Predicted binding mode of three compounds with NA

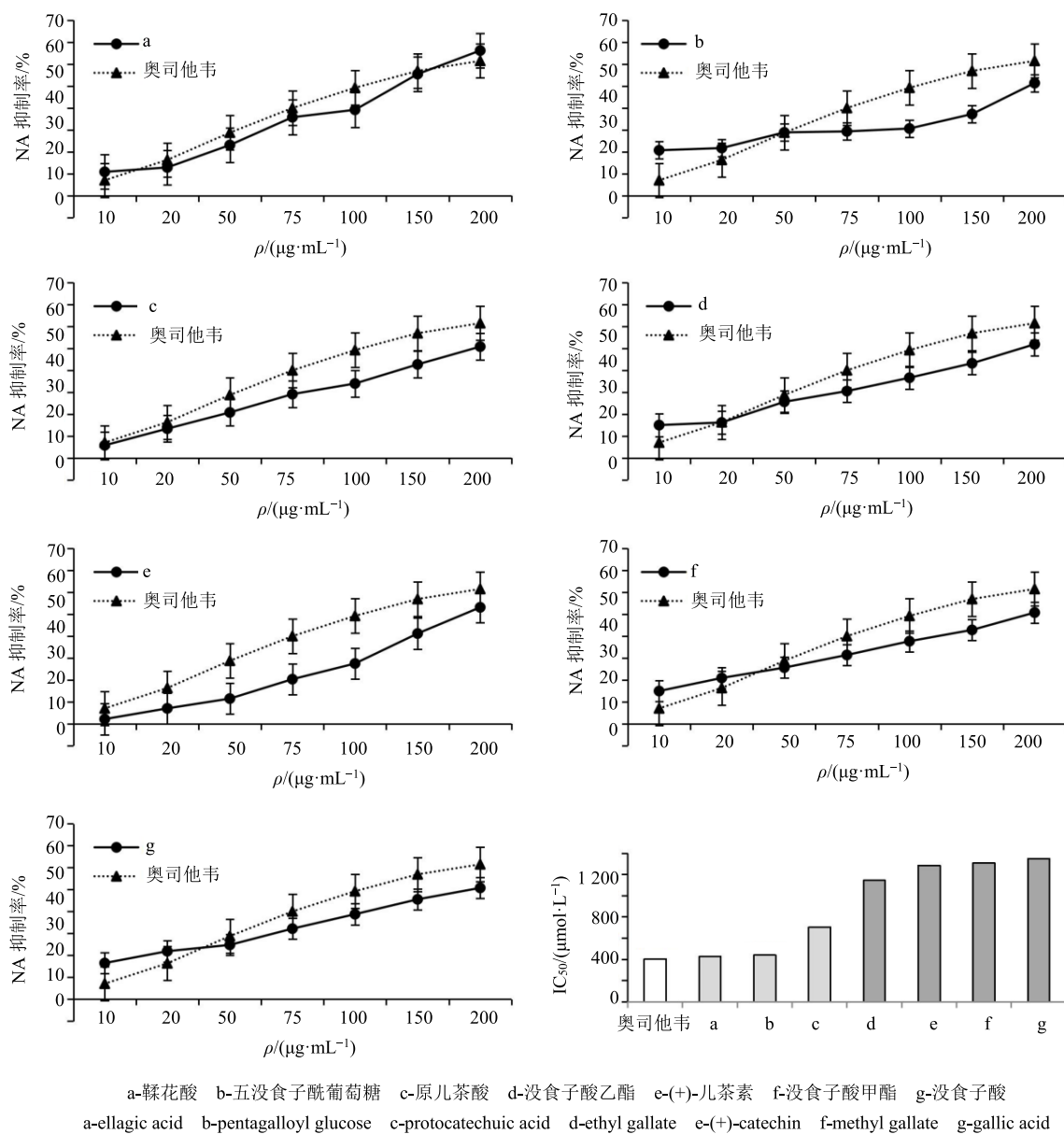


图 4 隔山消醋酸乙酯提取部位 7 种成分 NA 抑制活性结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 NA inhibitory activities of seven components from ethyl acetate extract of *G. strictipes* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

抑制 NA 活性较好, IC_{50} 值为 $706.06 \mu\text{mol/L}$; 鞣花酸、五没食子酰葡萄糖抑制 NA 活性最佳, IC_{50} 值分别为 426.67 和 $440.28 \mu\text{mol/L}$, 其结果与分子对接预测结果基本一致。

4 结论

禽流感病毒具有 H1N1、H5N1、H3N8、H7N9 等多种亚型, 突变性强, 2017 年初, 新型 H7N9 禽流感再次间歇性爆发, 不仅重创家禽养殖业, 还对人类造成生命威胁。由于已上市药物扎那米韦口服利用度低和奥司他韦对中枢神经系统副作用加大, 故从天然药物中开发新型抗流感药物迫在眉睫。

本研究首次对隔山消乙醇、醋酸乙酯、水、石油醚 4 个不同提取部位进行 NA 抑制活性研究, 发现醋酸乙酯部位抑制活性最佳。采用 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱对醋酸乙酯提取部位进行全面分析, 快速鉴定 21 种化学成分, 包括酚酸类 3 个, 黄酮类 2 个, 鞣质类 16 个, 除没食子酸、鞣花酸、3,4-二羟基苯甲酸 (原儿茶酸)、 β -1,4,6-三-O-没食子酰基-葡萄糖、 β -1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖 (异构体)、没食子酸甲酯和 (+)-儿茶素外, 其他 13 个化合物为隔山消中首次报道。采用分子对接技术与 NA 抑制验证实验相结合的模式, 探讨主

要活性成分的 NA 抑制作用。分子对接虚拟预测表明准确鉴定的 7 个化合物与 NA 均有不同程度的亲和力,其中以五没食子酰葡萄糖、鞣花酸、原儿茶酸较好;进一步药理验证实验表明该 7 种成分均具有 NA 抑制作用,与分子对接预测结果基本一致。鞣花酸、五没食子酰葡萄糖抑制 NA 活性最佳,IC₅₀ 值分别为 426.67、440.28 μmol/L,其次为原儿茶酸,IC₅₀ 值为 706.06 μmol/L;其中鞣花酸、五没食子酰葡萄糖的 NA 抑制作用未见报道。中药成分复杂,其药理作用呈现多靶点、多作用的特点。分子对接技术为中药研发提供了一种新的思维模式,更客观地预测药物潜在的作用靶点,为药理学实验提供依据。本实验采用分子对接与药理学实验相结合的研究方式,对抗流感病毒新药研发提供参考。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准. 中药成方制剂 [S]. 第十二册. 1997.
- [2] 耿玲, 陈俊雅, 李洪文, 等. 紫地榆提取物体外抗菌活性研究 [J]. 大理学院学报: 综合版, 2014, 13(10): 14-17.
- [3] 谢苗, 杨淋, 杨晓珍, 等. HPLC 法同时测定紫地榆 3 种提取物中 4 种成分 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1066-1070.
- [4] 杨国红, 陈道峰. 紫地榆的化学成分及其抗艾滋病病毒活性 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 352-354.
- [5] 杨淋, 蓝海. 紫地榆两种不同溶剂萃取物对变异链球菌的体外实验 [J]. 中成药, 2015, 37(8): 1843-1845.
- [6] 朱永红, 吕盼. 民族药紫地榆研究进展 [J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(3): 20-22.
- [7] 耿玲, 李洪文, 陈俊雅, 等. 隔山消对小鼠小肠推进作用的研究 [J]. 大理学院学报: 综合版, 2015, 14(4): 5-7.
- [8] 卫生部药品标准. 中药成方制剂 [S]. 第十一册. 1996.
- [9] 卫生部药品标准. 中药成方制剂 [S]. 第十七册. 1998.
- [10] 国家中成药标准汇编 [S]. 2002.
- [11] 卫生部药品标准. 中药成方制剂 [S]. 第十九册. 1998.
- [12] Li J, Yang X, Huang L. Anti-influenza virus activity and constituents characterization of *Paeonia delavayi* extracts [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1133-1144.
- [13] Yang X Y, Liu A, Liu S, et al. Screening for neuraminidase inhibitory activity in traditional Chinese medicines used to treat influenza [J]. *Molecules*, 2016, doi: 10.3390/molecules21091138.
- [14] 王长生, 董红娇, 包雅婷, 等. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析粗茎秦艽化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3175-3180.
- [15] 董红娇, 陈晓虎, 曾锐. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析民族药小大黄的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2428-2435.
- [16] 周秀娟, 李燕芳, 陈莹, 等. 基于 UPLC-Q Exactive 四级杆-轨道阱液质联用法快速建立清热灵颗粒中潜在中药质量标志物 (Q-Marker) 成分库 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 67-74.
- [17] 郭清莲, 何欢, 潘凌立, 等. BCBP 与牛血清白蛋白相互作用热力学 [J]. 物理化学学报, 2016, 32(6): 1383-1390.
- [18] 李湘淑, 刘叔文, 杨洁. 表没食子儿茶素没食子酸酯抗甲型流感病毒的作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(5): 622-625.
- [19] Graça V C, Barros L, Calhella R C, et al. Chemical characterization and bioactive properties of *Geranium molle* L.: From the plant to the most active extract and its phytochemicals [J]. *Food Funct*, 2016, 7(5): 2204-2212.
- [20] Graça V C, Barros L, Calhella R C, et al. Chemical characterization and bioactive properties of aqueous and organic extracts of *Geranium robertianum* L. [J]. *Food Funct*, 2016, 7(9): 3807-3814.
- [21] Guimarães R, Barros L, Dueñas M, et al. Infusion and decoction of wild *German chamomile*: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds [J]. *Food Chem*, 2013, 136(2): 947-954.
- [22] Boukhris M, Simmonds M S J, Sayadi S, et al. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented *Geranium*, *Pelargonium graveolens* [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(8): 1206-1213.
- [23] Velázquez-González C, Cariño-Cortés R, de Lucio J A G, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Geranium bellum* and its isolated compounds [J]. *BMC Complem Altern Med*, 2014, 14(1): 506.
- [24] Svendsen M T, Andersen K E, Thormann H, et al. Contact sensitization to *Geranium robertianum* L. in an amateur gardener [J]. *Contact Dermatitis*, 2015, 72(6): 420-421.
- [25] Regueiro J, Sánchez-González C, Vallverdú-Queralt A, et al. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2014, 152: 340-348.
- [26] Liu E H, Qi L W, Li B, et al. High-speed separation and characterization of major constituents in radix *Paeoniae Rubra* by fast high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2009, 23(1): 119-130.