

板蓝根化学成分与抗流感病毒神经氨酸酶活性相关性的探讨

池絮影¹, 傅咏梅², 崔曰新¹, 张蜀¹, 邓红^{1*}

1. 广东药科大学 广东省药物新剂型重点实验室, 广东 广州 510006

2. 国药集团广东环球制药有限公司, 广东 佛山 528200

摘要: **目的** 探讨板蓝根化学成分与体外抗流感病毒神经氨酸酶 (NA) 活性的相关性。**方法** 采用 UPLC 法建立不同产地板蓝根提取液的指纹图谱, 并选取已知共有峰进行定量测定, 采用试剂盒法测定药物抑制流感病毒 NA 活性, 对化学信息和生物效应进行灰色关联分析和单因素相关分析, 以探索其相关性。**结果** 不同产地药材、不同提取方法得到的样品的化学成分量与生物效应均有一定的差异。UPLC 指纹图谱各共有峰中已知峰 (R,S)-告依春和尿苷与抑制流感病毒 NA 活性相关性较强, 其中 (R,S)-告依春量与生物效应显著相关。**结论** 基于 NA 活性检测结果, 初步明确了板蓝根化学成分量与生物效应的相关性, 为板蓝根抗病毒有效成分的筛选和提取提供数据参考。

关键词: 板蓝根; UPLC; 指纹图谱; (R,S)-告依春; 神经氨酸酶; 生物活性; 灰色关联分析; 单因素相关分析

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)22-3982-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.009

Correlation between chemical constituents of *Isatidis Radix* and bioactivity of neuraminidase on anti-influenza virus

CHI Xu-ying¹, FU Yong-mei², CUI Yue-xin¹, ZHANG Shu¹, DENG Hong¹

1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Sinopharm Group Guangdong Medi-world Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528200, China

Abstract: Objective To explore the relationship between chemical constituents of *Isatidis Radix* (IR) and the inhibition of bioactivity of neuraminidase (NA) on influenza virus *in vitro*. **Methods** To establish the chemical fingerprints of IR extraction from different producing areas and determine the contents of common peaks by UPLC. To determine the activity of NA on influenza virus tested with IR by Kit. To analyze the correlation of the chemical information and biological effect by mathematical statistics methods such as grey correlation analysis and one-factor analysis. **Results** The chemical contents and biological effect detection varied markedly in the products from different regions and by extracting methods. The result of comprehensive analysis showed that uridine and (R,S)-goitrin of common components in UPLC-fingerprints related with the inhibition of bioactivity of NA on influenza virus, and the content of (R,S)-goitrin was correlated significantly to the activity of NA. **Conclusion** Based on the biological assay of NA on influenza virus, the correlation of the content of chemical components and biological effect is verified preliminarily, with a view to provide a more reliable data and reference for the selection and extraction of antiviral active ingredients from IR.

Key words: *Isatidis Radix*; UPLC; fingerprints; (R,S)-goitrin; neuraminidase; bioactivity; grey correlation analysis; single factor correlation analysis

板蓝根 *Isatidis Radix* (IR) 来源于十字花科 (Cruciferae) 菘蓝属 *Istatis* L. 植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根^[1], 常用于治疗流感等病毒感染性疾病, 临床疗效确切。《中国药典》2015

年版采用煎煮法制备供试品溶液, 以 (R,S)-告依春为定量指标对其进行质量控制, 但在研究过程中发现, 板蓝根超声提取时 (R,S)-告依春量高于煎煮法, 且不同产地板蓝根超声滤过样品均存在随时间延长

收稿日期: 2016-05-09

作者简介: 池絮影 (1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药制剂研究与开发。Tel: 13480200960 E-mail: cxysheen@163.com

*通信作者 邓红, 女, 本科, 教授级高级工程师, 硕士生导师, 主要从事中药新剂型和质量标准研究。

Tel: (020)39352507 E-mail: dengh361@sohu.com

(R,S)-告依春的量不断增加、数小时方终止的现象。(R,S)-告依春是表原告依春(epiprogoitrin)、原告依春(progoitrin)在内源性黑芥子酶(myrosinase)催化下的降解产物^[2],通常芥子苷通过不同侧链长度和结构的降解产物来发挥生物活性^[3],但芥子苷本身是否具有生物活性则鲜有报道。芥子苷-黑芥子酶系统的降解路径及产物相对清晰,其他多种途径如热降解、化学降解、微生物降解等较为复杂,不同条件下的降解产物差异较大。研究表明^[4], (R,S)-告依春为已知的芥子苷酶解产物,有明显的抗流感病毒作用,但其前体物质是否具有抗病毒活性,以及其化学成分与抗流感病毒神经氨酸酶(neuraminidase, NA)活性的相关性未见文献报道。流感病毒 NA 是影响流感病毒复制、感染和致病的关键酶,NA 抑制剂可以通过抑制 NA 活性而有效地控制流感症状和疾病的传播,NA 活性可以通过检测荧光的变化被表征,NA 活性荧光检测法已发展为抗病毒药物的筛选和活性评价的重要方法^[5]。

本实验采用底物荧光法(fluorometric assay with 4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- α -D-neuraminic acid, FL-MUNANA method)检测板蓝根体外抑制 NA 的生物活性,建立基于病毒 NA 活性检测的板蓝根抗病毒活性评价方法^[6-7]。通过对化学分析结果与经典的流感病毒 NA 抑制实验结果进行关联分析,探索板蓝根抗病毒的活性物质,探讨板蓝根提取工艺的合理性。

1 仪器与材料

板蓝根药材,批号 1311004、1403204、1406408、1407403、1407406、1408403、1504221、1504222 和 1504223,产地山东;批号 1406409、1407404,产地甘肃;批号 1406410、1407405,产地黑龙江;批号 1407402,产地安徽;批号 1407401,产地河南;批号 1406403,产地陕西;分别编号为 S1~S16,经广东省药物新剂型重点实验室中药组何伟教授鉴定,原植物为十字花科菘蓝属植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根;达菲胶囊,批号 B3017,主要成分为磷酸奥司他韦,上海罗氏制药有限公司;NA 抑制剂筛选试剂盒 P0309,批号 0802151509、1003191511,江苏碧云天生物技术研究; (R,S)-告依春对照品(批号 111753-201304,质量分数 99.9%)、腺苷对照品(批号 110876-200204,质量分数 100.0%),中国食品药品检定研究院;尿苷对照品,批号 8-SCC-56-1,质量分数 98.0%,Toronto

Research Chemicals Inc.; 鸟苷对照品,批号 LE20031,质量分数 98.0%,北京百灵威科技有限公司;甲醇,HPLC 级,Merck 公司;蒸馏水,Watsons 公司;其他试剂均为分析纯。

超高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;分析柱为 Phenomen Kinetex (100 mm×4.6 mm, 2.6 μ m); CP225D 型电子分析天平、BS224S 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;Varioskan Flash 全波长扫描式多功能酶标仪,美国 Thermo Scientific 公司;96 孔荧光酶标板,上海蔚宏生物科技有限公司;微量加样器,50、200、1 000 μ L,美国 Thermo Scientific 公司。

2 方法与结果

2.1 化学成分分析

2.1.1 色谱条件 使用 Waters Acquity UPLC H-Class 液相色谱仪,色谱柱为 Phenomen Kinetex (100 mm×4.6 mm, 2.6 μ m),流动相为甲醇-0.02% 磷酸水溶液,梯度洗脱:0~4 min, 1%~3%甲醇;4~14 min, 3%~8%甲醇;14~15 min, 8%~50% 甲醇;15~16 min, 50%~1%甲醇;16~17 min, 1%甲醇;体积流量为 0.6 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}$ C;检测波长为 254、229 nm;进样量为 2 μ L。

2.1.2 混合对照品溶液的制备^[8] 分别取对照品尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春及腺苷约 10、10、20、12.5 mg,精密称定,共置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品储备液;精密量取上述溶液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,制得含尿苷 20.58 μ g/mL、鸟苷 20.70 μ g/mL、(R,S)-告依春 40.68 μ g/mL 及腺苷 25.06 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

(1) 提取溶剂的选择:参考《中国药典》2015 年版板蓝根项下配制方法^[1],分别选用 6 种不同溶剂(水,乙醇,5%、10%、30%、50%甲醇)各 50 mL 进行提取,回流 2 h,放冷,用相应溶剂补足减失的质量,考察不同溶剂的提取结果,见表 1。经比较,乙醇提取时色谱峰峰形不佳,纯水和 5%、10%甲醇提取率较高且较接近,提取率随着甲醇体积分数的升高而降低。因纯水价廉易得,故选取水为提取溶剂。

(2) 提取方法的考察:取同批板蓝根药材(批号 1406408),采用水作为溶剂,比较煎煮、超声(功率 300 W)、回流 3 种方法的提取效果,结果见表 2。

表1 不同溶剂提取药材(批号1407403)比较

Table 1 Comparison on medicinal material (batch 1407403) extracted by different solvents

溶剂	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	尿苷	鸟苷	(R,S)-告依春	腺苷
水	0.220	0.121	0.310	0.274
5%甲醇	0.170	0.105	0.256	0.238
10%甲醇	0.146	0.130	0.308	0.274
30%甲醇	0.111	0.097	0.249	0.216
50%甲醇	0.103	0.086	0.165	0.186

表2 煎煮法、回流法与超声法结果比较

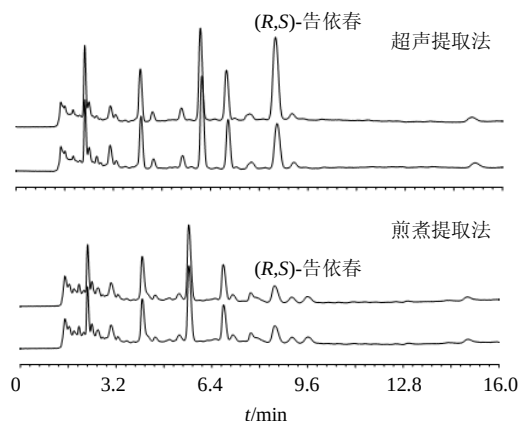
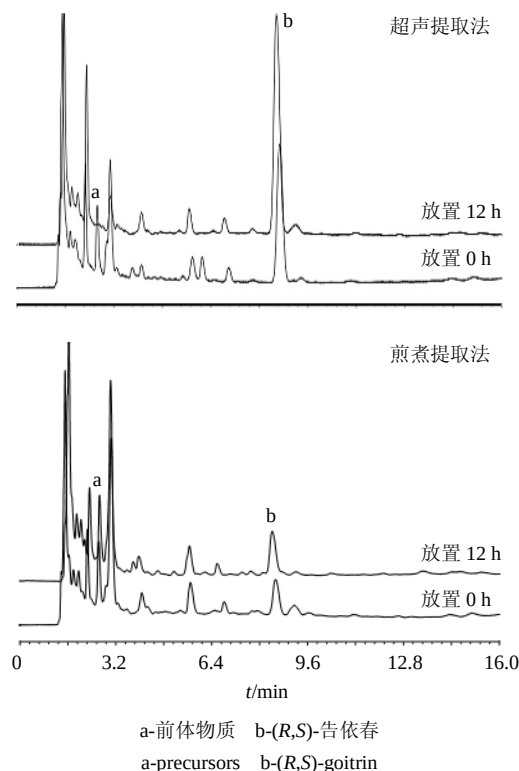
Table 2 Comparison on decocting, reflux, and ultrasonic methods

方法	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	尿苷	鸟苷	(R,S)-告依春	腺苷
煎煮 1 h	0.285	0.251	0.351	0.367
煎煮 2 h	0.289	0.277	0.448	0.372
回流 2 h	0.273	0.286	0.433	0.364
超声 30 min	0.516	0.335	2.816	0.354
超声 40 min	0.586	0.366	2.868	0.361
超声 50 min	0.641	0.390	2.855	0.368
超声 60 min	0.649	0.410	2.871	0.381
超声 70 min	0.644	0.387	2.877	0.356

结果表明煎煮法和回流法提取效果相当, 超声法 30 min 已达前 2 法提取 2 h 效果, 但超声提取的供试品不稳定, 其在室温放置过程中, (R,S)-告依春量显著上升, 直至 12 h 后才趋于稳定, 这与文献报道的板蓝根中可能存在 (R,S)-告依春的前体, 并在自身酶催化下水解相符^[8]。因此, 选取《中国药典》2015 年版规定的煎煮法和超声法为供试品制备方法进一步研究验证。

综上, 取药材粉末(过 4 号筛)约 1 g, 共 2 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入水 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 1 h, 对比《中国药典》提取方法煎煮 2 h, 放冷, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 依法进样, 0 h 和 12 h 的色谱图见图 1。比较图 1 中 2 种提取法制得样品所采集的 254 nm 波长色谱图, 发现板蓝根超声提取时 (R,S)-告依春量高于煎煮法, 且超声提取样品滤过放置后存在 (R,S)-告依春量增长数倍的现象。推测可能存在前体物质, 经查阅文献, (R,S)-告依春是芥子苷类成分表告依春、告依春的酶解产

物, 芥子苷类最大吸收波长约为 229 nm, 截取 229 nm 色谱图(图 2)发现超声提取样品 a 峰随 (R,S)-告依春量增加而递减, 可能为其前体物质。由图 2 可见, 超声提取样品放置 12 h 后, (R,S)-告依春量增至 0 h 时的数倍, 色谱峰 a 消失, 此时 (R,S)-告依春量趋于稳定, 其他色谱峰峰面积不变, 继续考察至 24 h, 溶液稳定。而煎煮样品放置 12 h 后色谱峰无明显变化, 该现象与十字花科植物存在的芥子

图1 不同提取方法色谱图比较 ($\lambda = 254 \text{ nm}$)Fig. 1 Comparison on spectra by different extracting methods ($\lambda = 254 \text{ nm}$)图2 不同提取方法色谱图比较 ($\lambda = 229 \text{ nm}$)Fig. 2 Comparison on spectra by different extracting methods ($\lambda = 229 \text{ nm}$)

苷酶解反应相符^[9-10]。这与胡彦君等^[11]报道的板蓝根制剂制备过程中 (R,S)-告依春的变化趋势一致。

2.1.4 稳定性试验 取超声提取 1 h, 放置 12 h 后的同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样, 测得供试品溶液中各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.076%~0.25%, 相对峰面积的 RSD 为 0.24%~2.2%。

2.1.5 精密度试验 取同一批 (批号 1407406) 药材, 超声 1 h, 静置 12 h, 制得供试品溶液, 连续进样 6 次, 考察各特征色谱峰保留时间的一致性, 各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.019%~0.40%, 相对峰面积的 RSD 为 0.13%~2.1%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取批号 1407406 板蓝根药材, 超声 1 h, 静置 12 h, 平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定。以参比峰腺苷的保留时间和峰面积为参照, 计算得供试品溶液中各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.21%~0.96%, 相对峰面积的 RSD 为 0.99%~3.2%。

2.1.7 化学指纹图谱的建立 本实验采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”, 将 14 批次的板蓝根药材的色谱图导入软件后, 采用“中位数法”导出 14 批药材指纹图谱的总共有模式, 通过色谱峰多点校正方法, 对 14 批药材的指纹图谱色谱峰进行匹配分析并建立起标准对照指纹图谱 (R), 见图 3^[12-13]。结果 14 批样品与 R 的相似度分别为 0.919、

0.894、0.983、0.893、0.956、0.974、0.992、0.981、0.843、0.975、0.957、0.988、0.978、0.940。14 批板蓝根药材共检出 6 个共有峰 (峰 1~6, 表 3), 保留时间分别为 2.271、4.124、5.920、6.947、7.772、8.532 min, 采用对照品对照, 结合色谱峰的光谱吸收, 鉴定 2、3、4、6 号色谱峰分别为尿苷、腺苷、鸟苷、(R,S)-告依春, 其余为未知峰。

表 3 不同产地板蓝根提取物指纹图谱共有峰相对峰面积
Table 3 Common peak areas of IR fingerprint from different origins

编号	相对峰面积					
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6
S1	70.577	49.691	79.215	56.083	8.239	104.434
S2	65.974	37.247	97.768	66.905	4.345	101.664
S5	134.280	72.269	65.302	69.411	5.801	247.223
S6	61.845	38.668	97.786	69.732	4.949	101.187
S7	46.700	35.038	68.144	41.599	7.569	107.237
S8	84.111	61.778	79.023	70.917	6.062	162.481
S9	135.664	89.124	133.781	102.669	12.266	488.775
S10	121.928	80.762	58.827	80.554	9.668	239.400
S11	92.894	63.242	73.999	64.693	7.043	164.699
S12	117.002	85.090	93.297	95.314	6.987	501.015
S13	125.193	77.162	57.951	65.674	12.597	494.421
S14	108.719	82.600	103.087	100.052	3.794	436.524
S15	81.476	60.243	104.020	79.066	4.254	426.010
S16	71.597	45.445	71.296	50.608	7.374	109.800

峰 2 为尿苷 峰 3 为腺苷 峰 4 为鸟苷 峰 6 为 (R,S)-告依春
peak 2-uridine peak 3-adenosine peak 4-guanosine
peak 6-(R,S)-goitrin

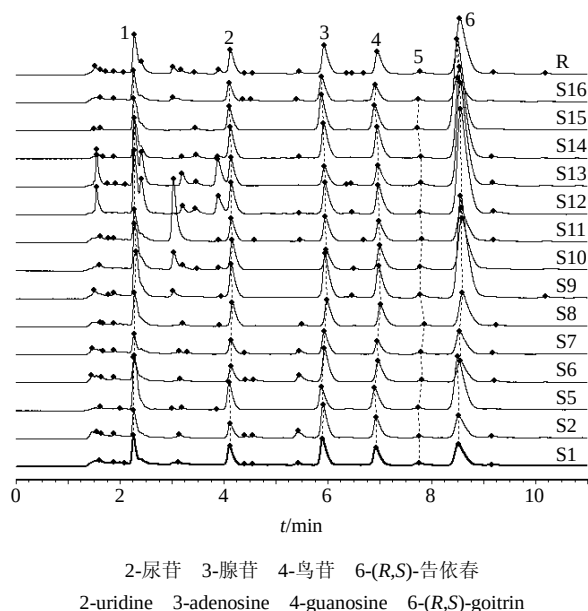


图 3 不同产地板蓝根超声提取样品 UPLC 指纹图谱
Fig. 3 UPLC fingerprints of IR from different sources

2.1.8 定量测定^[14-15] 按“2.1.3”项下超声法配制供试品溶液, 依法进样, 计算样品中尿苷、鸟苷、腺苷和 (R,S)-告依春的量, 结果见表 4。

2.2 板蓝根提取液对 NA 活性抑制的检测

2.2.1 检测原理 化合物 MUNANA 是 NA 的特异性底物, 在 NA 作用下的产物 4M (7-hydroxy-4-methylcoumarin, C₁₀H₈O₃) 在 322 nm 激发波长下, 可以产生 450 nm 荧光, 采用荧光检测器测定该波长荧光强度 (fluorescence intensity, FI) 的变化, 可以灵敏地反映 NA 的活性^[16], 从而间接地表征该药物的 NA 抑制活性。

2.2.2 阳性对照磷酸奥司他韦羧酸盐溶液的制备 磷酸奥司他韦 (Oseltamivir Phosphate, Tamiflu[®], 商品名为达菲) 是其活性代谢产物的药物前体, 口

表4 板蓝根中尿苷、鸟苷、腺苷和 (R,S)-告依春定量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Determination of uridine, guanosine, adenosine, and (R,S)-goitrin in IR ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	尿苷	鸟苷	腺苷	(R,S)-告依春
S1	0.413±0.0003	0.396±0.001	0.300±0.001	0.618±0.002
S2	0.585±0.014	0.585±0.027	0.503±0.004	1.871±0.002
S5	0.542±0.004	0.440±0.003	0.229±0.005	0.927±0.004
S6	0.421±0.009	0.367±0.003	0.281±0.002	0.636±0.004
S7	0.572±0.001	0.542±0.008	0.361±0.006	1.943±0.010
S8	0.539±0.030	0.402±0.003	0.242±0.032	1.901±0.018
S9	0.551±0.001	0.554±0.001	0.393±0.006	1.670±0.015
S10	0.254±0.001	0.376±0.006	0.360±0.003	0.376±0.007
S11	0.233±0.002	0.231±0.004	0.258±0.002	0.409±0.002
S12	0.251±0.003	0.371±0.005	0.374±0.001	0.393±0.001
S13	0.495±0.010	0.395±0.005	0.249±0.001	0.962±0.008
S14	0.338±0.006	0.309±0.005	0.297±0.006	0.404±0.003
S15	0.306±0.002	0.283±0.002	0.269±0.001	0.431±0.014
S16	0.401±0.001	0.448±0.013	0.391±0.002	1.630±0.001

服给药后,在胃肠道被迅速吸收,经肝脏/肠壁酯酶迅速转化为其活性代谢产物磷酸奥司他韦羧酸盐(Oseltamivir Carboxylate)而发挥抗流感病毒作用^[17](图4)。取市售达菲胶囊5粒,精密称定质量,将胶囊内容物研匀,取约相当于25 mg磷酸奥司他韦置25 mL量瓶中,加入水适量,超声至溶解,定容至刻度,振荡摇匀。10 000 r/min离心10 min,取其上清液8 mL至20 mL烧杯,加0.1 g/mL氢氧化钠溶液2 mL,室温搅拌5 h后,用冰醋酸调节pH至7.5左右。参照Lindgårdh等^[18]报道的HPLC方法测定磷酸奥司他韦的水解率,确保其水解完全。

2.2.3 供试品溶液的制备 由于超声和煎煮2种提取方法呈现的差异,提示加热对(R,S)-告依春的量影响大,为了进一步考察提取方式的影响,除超声和按《中国药典》2015年版方法直接煎煮外,增设

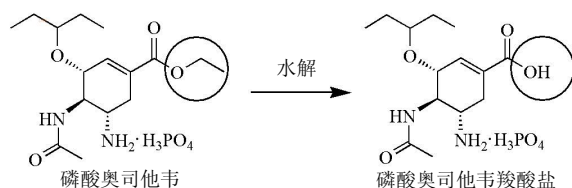


图4 磷酸奥司他韦代谢示意图

Fig. 4 Schematic diagram of Oseltamivir to Oseltamivir Phosphate metabolism

先浸泡后煎煮组,进行NA活性抑制的检测。取板蓝根药材粉末约10 g,置具塞锥形瓶或圆底烧瓶中,加100 mL水,密塞,称定质量,分别按超声1 h、煎煮2 h、浸泡12 h后煎煮2 h 3种方法提取,各3份,放冷,用水补足减失的质量,0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,静置12 h后逐步2倍稀释成8个质量浓度,分别为100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781 mg/mL的供试品溶液。

2.2.4 反应条件与加样步骤 参照碧云天NA抑制剂筛选试剂盒说明,以底物荧光检测法进行检测。在96孔荧光酶标板每孔中首先加入NA检测缓冲液70 μL和NA 10 μL,每孔再加入0或10 μL待筛选的NA抑制剂样品,加入Milli-Q水使每孔总体积为90 μL,37 °C孵育2 min使其充分混合后,每孔加入NA荧光底物10 μL,37 °C孵育30 min后进行荧光测定。为便于活性比较,同时设酶活性对照组(NA+MUNANA,反应后再加入同样体积样品溶液),背景对照组(样品+MUNANA,缓冲液补足至相同体积)。用荧光酶标仪检测NA的活性,设定参数: $E_x=322$ nm, $E_m=450$ nm。

2.2.5 药物抑制率的计算 将测得的荧光值(取复孔均值, $n=4$)代入下式计算,即得样品对NA活性的抑制率。

抑制率=(酶活性对照荧光强度-样品干预后荧光强度)/(酶活性对照荧光强度-背景对照荧光强度)

2.2.6 板蓝根抑制NA活性和量效关系考察结果 分别用板蓝根和磷酸奥司他韦羧酸盐溶液对NA底物MUNANA进行干预,结果见图5,板蓝根的量效曲线走向与阳性对照磷酸奥司他韦羧酸盐溶液一致,说明两者有相同作用趋势和规律,验证了板蓝根可通过抑制NA活性,影响病毒的复制、感染,进而发挥抗病毒活性的作用机制。

2.2.7 不同提取方法的板蓝根提取液对NA抑制率

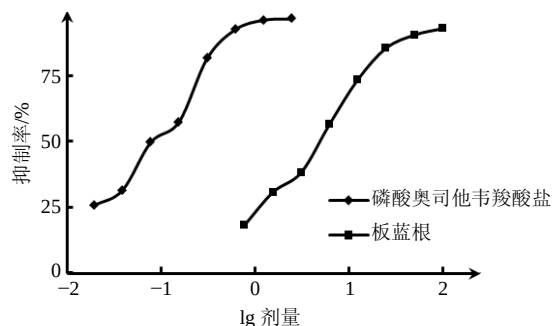


图5 剂量对数与抑制率曲线关系

Fig. 5 Linear relationship of logdose-prohibition

的比较 按照上述反应方法测定不同提取方法的板蓝根提取液在相同生药浓度下对 NA 的抑制活性,以量(生药质量浓度)/效(抑制率)关系作图。由图 6 可直观地看出,不同提取方法样品对 NA 的活性抑制存在明显差异,各质量浓度的抑制率超声提取法相比于直接煎煮法差异显著;在相同生药质量浓度下,超声提取法的抑制率最强(高达 93%);浸泡后煎煮法次之,这可能与浸泡时芥子苷与黑芥子酶充分接触,有利于自身酶解反应有关;直接煎煮法最弱。说明超声提取法能更大程度地提取板蓝根中抗病毒有效成分,推测前体药物要转化为(R,S)-告依春才起效,故下一步选用超声法进行提取,比较不同产地不同批次板蓝根药材对 NA 活性抑制能力。

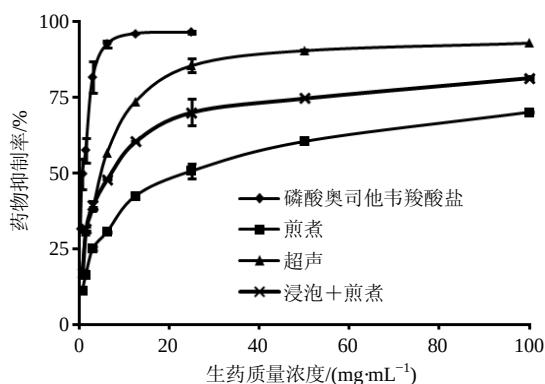


图 6 板蓝根抑制 NA 活性的量效关系曲线图

Fig. 6 Dose-effect relationship

2.2.8 线性关系考察 经不同提取方法量效曲线比较,确定以超声提取法提取板蓝根,测定板蓝根提取液的 NA 抑制率。以对数生药质量浓度与抑制率作图,可知板蓝根提取液在生药质量浓度 3.125~25.000 mg/mL 时与其抑制率呈线性相关,回归方程 $Y=52.831 X+13.513$, $r=0.991 5$,在此质量浓度范围内选取生药质量浓度 20.0 mg/mL 为检测质量浓度,与定量测定时的质量浓度一致。

2.2.9 精密度考察 取同一份板蓝根(批号 1407406),按“2.2.3”项下超声法制备供试品溶液,分 6 次点样于 96 孔板中参与酶促反应,计算抑制率的 RSD 为 4.5%,精密度试验符合要求。

2.2.10 重复性考察 取同一批板蓝根药材(批号 1407406),按“2.2.3”项下超声法制成 6 份供试品,测定的抑制率 RSD 为 9.1%,说明该方法具有较好的重复性。

2.2.11 稳定性考察 取同一供试品溶液(批号

1407406),按“2.2.3”项下超声法制备供试品溶液,分别于 0、2、4 h 点样测定,计算抑制率的 RSD 为 4.2%,表明供试品溶液在 4 h 内是稳定的。

2.2.12 不同来源的板蓝根抑制 NA 活性的测定 取药材粉末(过 4 号筛)约 1 g,精密称定 3 份,置具塞锥形瓶中,加入水 50 mL,密塞,称定质量,超声提取 1 h,放冷,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,滤过,静置 12 h 后(生药浓度为 20 mg/mL);另取含尿苷 20.58 μg/mL、鸟苷 20.70 μg/mL、(R,S)-告依春 40.68 μg/mL 及腺苷 25.06 μg/mL 的混合对照品溶液,依法测定。测得 14 批板蓝根药材抑制流感 NA 活性的能力,计算抑制率,结果见表 5。结果表明,不同产地不同批次的板蓝根对 NA 的抑制率存在差异,抑制率为 78.57%~97.76%,平均值为 85.87%。其中山东产地的板蓝根药材抑制率均较高,批号 1406409 药材的抑制率最低。测得对照品抑制率为 79.79%,与药材检测结果接近,证明指标成分具备一定的 NA 抑制活性。

2.3 板蓝根化学成分与抑制 NA 活性的关联分析

2.3.1 灰色关联分析 灰色系统理论^[19-20]是对“部分信息已知,部分信息未知”的不确定性系统中有限数据序列进行量化分析,通过灰色关联度来确定系统因素间的影响程度,从而掌握系统整体动态运

表 5 不同样品对 NA 活性抑制率

Table 5 Inhibitory rate of different samples on NA

批号	荧光值			药物抑制率/%
	样品干预组	背景对照组	酶活性对照组	
1311004	37.100	6.998	200.171	84.42
1407406	12.908	7.914	230.384	97.76
1408403	38.880	8.003	223.718	85.69
1403204	40.560	3.842	247.315	84.92
1504221	32.245	7.176	249.334	89.65
1504222	30.815	8.547	204.901	88.66
1504223	32.355	5.832	233.517	88.35
1406409	46.920	7.793	190.408	78.57
1407404	43.875	7.198	225.539	83.20
1406410	43.560	6.147	189.142	79.56
1407405	33.785	8.920	194.673	86.61
1407402	40.255	8.217	205.964	83.80
1407401	40.700	9.058	210.889	84.32
1406403	35.755	5.735	231.643	86.71
对照品	49.730	1.604	239.709	79.79

动的规律。关联系数和关联度是描述系统各因素之间相互关系的主要参数,它可从整体上或动态上定量分析事物之间的关联程度或影响程度。

对于 14 批药材样品,每个样品的指纹图谱有 6 个共有峰,构成了 6 个子序列,再以不同样品的生物效应作为母序列,依据母序列与子序列关联度的大小,可确定诸峰对生物活性的贡献大小。如表 6 灰色关联度结果可见,指纹图谱各共有峰与抑制 NA 活性相关性排序为峰 2 (尿苷) > 峰 6 [(R,S)-告依春] > 峰 1 > 峰 4 (鸟苷) > 峰 5 > 峰 3 (腺苷),说明已知成分 (R,S)-告依春、尿苷与板蓝根抑制流感病毒 NA 活性能力紧密相关,与定量测定指标成分较为一致。

表 6 板蓝根各色谱峰对抗病毒活性贡献关联度

Table 6 Contribution correlation degree between common peaks in IR and antiviral effects

峰号	关联度	关联序	峰号	关联度	关联序
1	0.764 3	3	4	0.658 5	4
2	0.832 1	1	5	0.569 5	5
3	0.395 5	6	6	0.812 6	2

2.3.2 单因素相关性分析 由上述 (R,S)-告依春定量测定结果与生物检定结果的一致性提示,NA 抑制剂筛选试剂盒法可弥补现行质量控制标准的不足,故进一步将板蓝根超声提取液定量测定结果与 NA 活性抑制结果进行关联分析,旨在阐明化学质量分析与生物活性检测的一致性,使其可靠性得到相互印证。

本研究以各成分量为 x , NA 抑制活性为 y ,以 14 批药材测定结果为统计分析样本,选用 Pearson 法进行相关性分析,采用 SPSS 22.0 统计软件计算,结果显示,板蓝根中的尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春量与 NA 活性抑制率均具有显著相关性 (表 7),2 种检测方法结果总体趋势一致,佐证了选取指标的可靠

表 7 单因素相关性分析

Table 7 Correlation analysis of samples

成分	相关系数
尿苷	0.828**
鸟苷	0.710**
腺苷	0.434
(R,S)-告依春	0.813**

**表示在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关

** indicates a significant correlation at 0.01 level (bilateral)

靠性,验证了板蓝根中 (R,S)-告依春的量与其抗病毒活性的相关性及将 2 种方法联合用于评价板蓝根药材品质的可行性^[21]。

3 讨论

板蓝根超声样品放置时间不同所测得 (R,S)-告依春的量差异显著,但放置至 12 h 后其量较为稳定,前体峰基本消失,故确定供试品配制后放置 12 h,保证其转化基本完全。

本实验采用的定量测定方法^[9-10],经考察采用定量测定项下色谱条件时,前 4 min 的强极性物质难以分离,比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.02% 磷酸水溶液、甲醇-0.1% 磷酸水溶液 4 种流动相的色谱出峰情况。结果表明,甲醇-0.02% 磷酸水溶液系统洗脱可以提高色谱峰分离度,改善峰形,有利于指纹图谱分析。故选其作为流动相系统。

在检测板蓝根提取液对 NA 活性抑制能力时,比较了《中国药典》2015 年版规定的煎煮 2 h 提取法、超声 1 h 提取法,并增加了浸泡 12 h 后煎煮 2 h 的提取方法,考察在提取过程中不同时间点灭活酶对其抑制 NA 活性的影响。本实验通过比较超声提取法和煎煮提取法供试品的色谱图,发现在 229 nm 下超声样品可检出随 (R,S)-告依春量增加而递减的前体物质,解释了超声提取有利于降解产物 (R,S)-告依春的生成,导致超声样品中 (R,S)-告依春量高于煎煮法现象;同时比较了不同提取方法的样品的 NA 活性抑制量效关系,可知超声样品对 NA 活性抑制能力优于直接煎煮样品和浸泡后煎煮样品,说明超声法能更大程度地提取抗病毒有效成分,提示降解产物 (R,S)-告依春的抗病毒活性优于其前体,故选取超声提取法制备供试品,并放置 12 h 待其降解完全后进行检测较为合理,同时提示适当浸泡药材进行提取可促进酶解产物 (R,S)-告依春的生成,更好地发挥抗病毒作用。

本实验通过对 14 批板蓝根药材的 UPLC 指纹图谱共有峰相对峰面积与 NA 活性抑制率进行灰色关联分析,可知已知峰 (R,S)-告依春、尿苷与抗病毒生物效应呈显著相关,佐证将上述成分拟作检测指标的可行性。进一步将降解产物 (R,S)-告依春及各已知成分的量与 NA 活性抑制结果进行单因素关联分析,结果显示 (R,S)-告依春、尿苷、鸟苷与 NA 活性抑制结果具有显著相关性,初步验证了 (R,S)-告依春与流感病毒 NA 活性的相关性,佐证所选指标成分的可靠性。

板蓝根成分复杂, 药效物质基础还未明确^[22], 抗病毒作用机制仍未阐明, 常规性状与理化鉴别只能区分药材真伪, 难以辨清优劣。据报道^[23], 表告依春有明显的抗流感病毒作用, 而核苷类成分是板蓝根中的活血有效成分, 能干扰病毒 DNA、RNA 的复制, 抑制病毒增殖, 保护细胞。本实验对板蓝根指标成分, 特别是 (R,S)-告依春量与抗流感病毒 NA 活性的相关性进行了初步探索性研究, 相关性良好, 提示可将生物测定法应用于药材-中间体-成品的过程监控, 掌握生物活性信息的传变规律; 但本实验的生物评价方法较单一, 可进一步引入鸡胚培养法、红细胞凝集检测法等加以佐证; 还可开展体内实验, 研究表告依春和原告依春在体内的降解路径、降解产物及降解前后活性差异, 研究角度有待拓展。相关性较好的成分的活性实验及抗病毒实验方法的拓展有待进一步深入研究。

由于批号 1407403、1406408 药材样品收集量较少, 在前期提取方法考察的研究中已用完, 因此后续研究没有这 2 个批号样品。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Xie Z Y, Shi Y H, Wang Z T, et al. Biotransformation of glucosinolates epiprogoitrin and progoitrin to (R)- and (S)-goitrin in *Radix Isatidis* [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(23): 12467-12472.
- [3] 杨瑛洁, 李淑燕, 胡国伟, 等. 硫代葡萄糖苷的降解途径及其产物的研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2011, 31(7): 1490-1496.
- [4] 徐丽华, 黄芳, 陈婷, 等. 板蓝根中的抗病毒活性成分 [J]. *中国天然药物*, 2005, 3(6): 359-360.
- [5] 薛冰纯, 王滔, 刘二保. 流动注射化学发光法在药物分析中的应用 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(5): 816-820.
- [6] 李寒冰, 鄢丹, 金城, 等. 基于化学荧光测定的板蓝根抗病毒效价检测方法的建立 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(4): 908-912.
- [7] 李寒冰, 鄢丹, 王伽伯, 等. 基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质生物评价的研究 [J]. *药学学报*, 2009, 44(2): 162-166.
- [8] 任国萍, 李铮, 傅欣彤. HPLC 法同时测定板蓝根药材中尿苷、鸟苷、(R,S)-告依春和腺苷 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(19): 2330-2334.
- [9] 谢智勇. 板蓝根中芥子苷的分离纯化与生物转化研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2012.
- [10] 郑程. 板蓝根中芥子苷类动态变化规律与复方板蓝根颗粒质量标准研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2015.
- [11] 胡彦君, 王雅琪, 李冰涛, 等. 板蓝根制剂制备过程中成分变化及其药效相关性研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1515-1519.
- [12] 谢培山. 中药色谱指纹图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [13] 王飒, 盛萍, 姚蓝, 等. 维药多伞阿魏体外抗胃癌活性部位 GC-MS 指纹图谱的研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(19): 2874-2879.
- [14] 池絮影, 傅咏梅, 张蜀, 等. 不同产地板蓝根中 (R,S)-告依春及核苷类成分含量的比较 [J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(6): 745-748.
- [15] 池絮影, 崔曰新, 张蜀, 等. 一测多评法测定板蓝根颗粒中 4 种成分的含量 [J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(10): 137-140.
- [16] Potier M, Mameli L, Bélisle M, et al. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate [J]. *Anal Biochem*, 1979, 94(2): 287-296.
- [17] 刘瑜. 新型流感病毒神经氨酸酶抑制剂的设计、合成与初步活性研究 [D]. 山东: 山东大学, 2011.
- [18] Lindegårdh N, Hien T T, Farrar J, et al. A simple and rapid liquid chromatographic assay for evaluation of potentially counterfeit Tamiflu[®] [J]. *J Pharm Biomed*, 2006, 42(42): 430-433.
- [19] 邓聚龙. 灰色系统理论教程 [M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1990.
- [20] 刘思峰, 杨英杰, 吴利丰, 等. 灰色系统理论与其应用 [M]. 第七版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [21] 孙琴, 李寒冰, 鄢丹, 等. 基于抗菌效价检测的板蓝根颗粒制备过程质量变化评价 [J]. *中草药*, 2012, 43(2): 259-264.
- [22] 国欣, 胡小龙, 王月荣, 等. 板蓝根多糖的系统分离纯化与组成分析 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1508-1514.
- [23] 徐丽华, 黄芳, 陈婷, 等. 板蓝根中的抗病毒活性成分 [J]. *中国天然药物*, 2005, 3(6): 359-360.