

板蓝根正丁醇部位抗病毒活性组分及相关化学成分研究

何立巍, 杨婧妍, 侯宪邦

南京中医药大学, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 研究板蓝根 *Isatidis Radix* 正丁醇部位的抗病毒活性组分及相关成分。方法 利用溶剂法及色谱法提取分离板蓝根正丁醇部位各化学组分, MTT 法体外筛选各组分抗单纯疱疹病毒 1 (HSV-1) 活性, 利用 UPLC-Q-TOF-MS 检测正丁醇部位及各组分的化学成分, 运用 Markview 软件及 Excel 软件进行各组分差异性成分分析, 根据统计结果得到抗病毒相关的化学成分。结果 按照化学成分的相似性, 利用色谱法将板蓝根正丁醇部位分为 20 个组分, 其中 10 个组分具有明显抗病毒活性。UPLC-Q-TOF-MS 检测到正丁醇部位中的 44 个化学成分, 并明确了它们的化学结构, 在各化学组分的分析检测及差异性分析中, 发现了生物碱类、有机酸、糖和氨基酸衍生物共 15 个化学成分与抗病毒活性相关; 尤其是 1-甲氧基-3-甲醛、3-(3',5'-二甲氧基-4'-羟基)-2-吲哚酮、1-甲氧基-3-吲哚酮、3-(甲基硫代) 芥子油苷、氨基葡萄糖-6-磷酸酯在活性组分中量较高。结论 板蓝根正丁醇部位以吲哚类生物碱、有机酸、核苷及氨基酸类成分为主, 其中的单吲哚类、硫苷类及糖和氨基酸衍生物与抗病毒活性密切相关。

关键词: 板蓝根; 抗病毒; UPLC-Q-TOF-MS; 1-甲氧基-3-甲醛; 3-(3',5'-二甲氧基-4'-羟基)-2-吲哚酮; 3-(甲基硫代) 芥子油苷
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章 0253-2670(2017)14-2843-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.007

Antiviral activity and chemical composition of *n*-butanol extract of *Isatidis Radix*

HE Li-wei, YANG Jing-yan, HOU Xian-bang

Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To investigate the antiviral activity and chemical composition of *n*-butanol extract of *Isatidis Radix*. **Methods** Each component of total *n*-butanol extracts was detected by solvent and chromatogram, the anti-HSV-1 activities of each component were detected by MTT assay *in vitro*, each component of total *n*-butanol extracts was analyzed by UPLC-Q-TOF-MS, and the data were analyzed by Markview and Excel software to find the difference among different components. According to statistics, the components related to antiviral activities were obtained. **Results** According to the similarity of chemical composition, 20 components were extracted and separated from *n*-butanol extract of *Isatidis Radix* by chromatography, and 10 components had antiviral activity. Forty-four chemical components were detected by UPLC-Q-TOF-MS from *n*-butanol extracts and their chemical structures were confirmed. Difference analysis of chemical components discovered 15 chemical components such as alkaloids, organic acids, sugars and amino acid derivatives associated with antiviral activity, especially 1-methoxy-3-carbaldehyde, 3-(3',5'-dimethoxy-4'-hydroxy)-2-indolinone, 1-methoxy-3-indolinone, 3-(methylsulfinyl) propylglucosinolate, and glucosamine-6-phosphate in higher levels of the active components, which was worth further study. **Conclusion** The *n*-butanol extract of *Isatidis Radix* mainly contains indole alkaloids, organic acids, nucleosides and amino acids, wherein the single-indole, a sulfur glycosides and sugars and amino acid derivatives are closely related to the antiviral activity.

Key words: *Isatidis Radix*; antiviral activities; UPLC-Q-TOF-MS; 1-methoxy-3-carbaldehyde; 3-(3',5'-dimethoxy-4'-hydroxy)-2-indolinone; 3-(methylsulfinyl) propylglucosinolate

板蓝根 *Isatidis Radix* 为常用中药, 来源于十字花科菘蓝属植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根, 主产于江苏、浙江、福建、河南等省。在我国

已有两千多年的药用历史, 具有清热解毒、凉血利咽之功效, 其突出的优势是对于病毒感染性疾病的预防和治疗具有确切疗效^[1-2]。

收稿日期: 2016-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473316); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20151356)

作者简介: 何立巍 (1974—), 男, 副教授, 研究生导师, 从事中药及天然药物活性成分及物质基础研究。E-mail: he_lw@163.com

目前对于板蓝根抗病毒物质基础研究方面虽有一些进展,但仍存在很大分歧,抗病毒的活性成分仍未阐明。究其原因,主要是由于板蓝根活性成分复杂,涵盖十大类别的180多个化学成分,并且抗病毒作用机制和靶点存在多样性^[3-4],因而抗病毒药效物质基础研究工作举步维艰。在以往的研究工作中,多采用从化学部位到单体成分提取分离结合活性筛选的传统研究模式,这种模式虽可筛得有效部位,但各部位中的化学成分仍然十分复杂,无法进行深入的结构和作用机制研究;另一方面,很多成分在药材中量较低,无法分离得到单体,造成大量的活性成分漏筛。基于以上研究瓶颈,本课题组在部位和单体成分之间引入了化学组分的研究层次,即结构或性质类似的几个单体成分的混合物;在“组分”的层面进行活性筛选,既可快速检测活性组分中单体的化学结构,又可避免大量活性单体成分的漏筛,为板蓝根物质基础研究工作奠定大量的实验基础。

本实验以板蓝根主要抗病毒活性部位-正丁醇部位为研究对象,对其进行化学组分离,通过系统研究各组分体外抗病毒作用,筛选得到抗病毒相关的活性组分;利用UPLC-Q-TOF-MS检测到正丁醇部位中的44个化学成分,并明确了它们的化学结构,在各化学组分的分析检测及差异性分析中,发现了生物碱类、有机酸、糖和氨基酸衍生物共15个化学成分与抗病毒活性相关。

1 实验材料

1.1 受试药物

板蓝根药材,产地为江苏连云港,经南京中医药大学鉴定教研室陈建伟教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。

称取板蓝根1 kg,用6倍量95%乙醇水回流提取2 h,然后用4倍量70%乙醇水回流提取1 h,合并2次所得醇提液,回收溶剂,得到提取物(150.2 g),提取物加水分散后,分别用二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇依次萃取,得到二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇提取物分别为24.5、29.9、37.7 g。

取正丁醇提取物20 g, C₁₈反相硅胶400 g,柱色谱常压分离,用5%~100%甲醇水溶液进行梯度洗脱。每瓶300 mL收集各流分,利用薄层色谱(TLC)法检查,合并化学成分相近的流分,最终得样品化学组分20份,编号1~20。

1.2 对照药物

注射用阿昔洛韦(规格0.25g,批号H20121749,

华北制药股份有限公司)

1.3 病毒株与细胞

非洲绿猴肾(Vero)细胞,由南京医科大学病毒所提供。常规培养于含10%小牛血清的RPMI 1640培养液中,5% CO₂, 37 °C培养生长成单层,待用。

人类单纯疱疹病毒I型(HSV-I),由南京医科大学病毒所提供。病毒经传代培养,以提高病毒毒力,测定病毒效价(TCID₅₀)约为1×10⁻⁴,待用。

1.4 试剂

小牛血清(四季青公司); RPMI 1640培养基、PBS缓冲液、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购于国药集团化学试剂有限公司;甲醇购于Sigma公司。

1.5 仪器

96孔板(美国Corning公司);电子天平(北京丹佛有限公司);RE-201B数显恒温水浴锅(江苏荣华仪器制造有限公司);Power Wave 340型酶标仪(美国Bio-Tek公司);BC-J80S型CO₂培养箱(上海博迅实业有限公司);CKX31SF型显微镜(OLYMPUS);恒温干燥箱(精宏公司);SW-CT-1F型单人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司);79-1型磁力加热搅拌器(江苏省金坛医疗仪器厂);20~200 μL和100~1 000 μL移液器(Genex Beta);LS-B50L立式压力蒸汽灭菌器(上海华线医用核子仪器有限公司);实验室级超纯水器(默克密理博有限公司);LDZ5-2型低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

Triple Q-TOF 5600质谱仪(AB Sciex公司)配备有电喷雾离子源(09D)系统;快速液相(日本岛津公司),DGU-20A3脱气装置,LC-20AD XR液相,SIL-20A XR自动进样器,CTO-20AC柱温箱。

2 方法与结果

2.1 板蓝根正丁醇部位各化学组分抗病毒活性研究^[5-6]

2.1.1 药物的细胞毒性测定 取生长良好的vero细胞,于96孔细胞培养板温育24 h长成单层,吸弃培养液。测试样品溶液以2 000 μg/mL质量浓度起始,等比稀释为10个质量浓度,将以上质量浓度的各样品分别加至各孔中,每孔0.2 mL,各质量浓度设4个复孔,同时设2个空白细胞对照组。37 °C、5% CO₂温育72 h后每孔加入MTT 20 μL,再放入

37 ℃、5% CO₂ 温育培养箱 4 h 后, 吸弃上清液, 每孔加 DMSO 200 μL, 振荡 5~10 min, 使颗粒溶解, 用酶联免疫检测仪测 490 nm 处吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。细胞存活率= $A_{\text{实验}}/A_{\text{细胞对照}}$ 。使用 SPSS 软件拟合曲线计算半数毒性浓度 (TC₅₀)。无明显细胞毒性 (存活率大于 80%) 表现的质量浓度即为药液的无毒界限^[5]。经检测, 各样品溶液毒性极低, 在质量浓度 2 000 μg/mL 时细胞存活率均大于 80%。

2.1.2 药物的抗病毒筛选 取生长良好的 Vero 细胞, 经胰酶消化后, 加含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养基, 制备细胞悬浮液, 将细胞加入 8×12 孔板制成单层 (约 4×10⁴/孔), 每孔 0.1 mL, 37 ℃、5% CO₂ 孵育 24 h 待细胞长成单层, 吸弃单层细胞上的培养液。每孔加入 20 μL 的病毒稀释液, 细胞对照组加入同体积的磷酸缓冲液 (PBS), 放入 CO₂ 孵育箱 1 h, 使病毒吸附于细胞上。将药液以无毒界限为最高质量浓度向下稀释 4 个质量浓度加入对应细胞孔中, 每个质量浓度设 3 个复孔, 同时设病毒

对照组、细胞对照组, 37 ℃、5% CO₂ 作用 72 h, 接着加入 MTT, 每孔 20 μL, 37 ℃、5% CO₂ 作用 4 h 后弃上清加入 DMSO, 每孔 200 μL, 振荡 5~10 min, 570~630 nm 双波长法测定 *A* 值, 计算病毒抑制率、抑制 50% 病毒细胞病变的药物浓度 (IC₅₀)。根据公式计算治疗指数 (TI, TI=TC₅₀/IC₅₀)。板蓝根不同化学部位对 HSV-1 的抑制作用见表 1。

根据新药药理毒理学研究指导原则, TI>2 表示低毒高效, 1<TI<2 表示高毒低效, TI<1 表示无效。实验结果表明, 板蓝根正丁醇部位组分 2、4、10~16、19 显示出抗病毒活性, 尤其是组分 2 抗病毒活性最高, TI 为 13.46, 病毒抑制率为 68.62%。

2.2 板蓝根正丁醇部位及各组分 UPLC-Q-TOF-MS 检测^[7-9]

2.2.1 供试样品的制备 分别取板蓝根正丁醇部位及其各组分 50 mg, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 密闭塞口, 记录质量, 超声处理 30 min, 冷却, 再记录质量, 甲醇补足损失部分, 离心 20 min (转速 14 000 r/min), 取上清, 即得。

表 1 板蓝根正丁醇部位各组分对 HSV-1 的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of *n*-butanol fraction of *Isatidis Radix* on HSV-1

组分	起始质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	病毒抑制率/%				TC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	TI
		1:1	1:2	1:4	1:8			
1	1.0	38.22	36.54	40.42	46.32	3.27		
2	2.0	67.31	68.62	53.83	43.17	4.91	0.36	13.460
3	1.0	29.24	24.29	40.82	16.86	1.79	31.02	0.058
4	1.0	40.39	57.78	52.31	41.49	2.33	0.48	4.860
5	1.0	31.84	28.57	20.96	15.83	1.74	4.67	0.370
6	2.0	55.76	38.62	14.29	14.49	2.78	1.73	1.600
7	2.0	48.82	29.58	10.85	14.81	3.51	1.97	1.780
8	2.0	23.41	21.65	3.29	5.85	2.99	3.43	0.870
9	2.0	56.43	30.45	23.04	24.35	2.44	1.75	1.390
10	2.0	66.11	53.90	48.93	34.64	3.45	0.60	5.730
11	2.0	69.16	39.70	29.26	21.41	2.48	1.19	2.090
12	2.0	56.43	30.45	23.04	24.35	3.53	1.75	2.020
13	2.0	60.27	41.91	29.55	20.71	2.97	1.33	2.240
14	2.0	67.43	47.75	21.98	18.55	5.95	1.13	5.270
15	2.0	71.77	53.80	17.20	19.02	3.27	1.10	2.960
16	2.0	59.99	35.00	21.73	8.57	3.54	1.49	2.370
17	2.0	1.05	19.26	17.19	10.66	3.72	9.60	0.390
18	2.0	49.18	40.61	34.16	12.67	2.49	1.69	1.470
19	2.0	77.77	53.45	30.97	10.21	2.00	0.90	2.210
20	2.0	34.33	42.68	24.10	19.99	2.33	1.60	1.460

2.2.2 色谱条件 采用 Polar-Silica 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m, 赛芬公司), 柱温为 40 $^{\circ}$ C; 流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 90% B; 5~45 min, 90%~82% B; 45~47 min, 82%~60% B; 47~52 min, 60%~90% B; 体积流量为 0.8 mL/min, 进样量为 5 μ L。

2.2.3 质谱条件 采用 TOF MS-IDA-MS/MS 模式, 正离子检测, 喷雾电压 5 500 eV, 离子源温度(TEM) 550 $^{\circ}$ C, 气帘气(CUR N₂) 40 psi (1 psi=6.895 kPa), 雾化器(GSI N₂) 60 psi, 辅助气(GS2 N₂) 60 psi, 去簇电压(DP) 70 eV, TOF MS 扫描范围 m/z : 50~1 500。IDA 条件下设置: 碰撞电压(CE) 35 eV, 碰撞电压差(CES) 10 eV, 开启动态背景扣除。

2.2.4 数据处理 对于目标化合物, 采用 Peak View 软件中 XIC Manager 功能对其进行筛查和鉴定, 对于非目标化合物主要利用 Formula finder 软件, 根据测得的化合物相对分子质量、同位素分布以及化学逻辑来测定化合物的元素组成, 再结合特征碎片, 进行未知化合物的分析与判别。

由 Chemspider、PubMed、ScienceDirect 等数据库检索收集已证实从板蓝根中获得的化学成分的信息, 自行建立数据库, 其中包括化学名称、分子式、

相对分子质量以及化学结构。将数据库引入 Peakview 软件, 利用提取离子色谱(XIC)完成目标化合物的筛选, 通过一级质谱和二级质谱数据, 推测板蓝根中各部位所含化学成分。运用 Markview 软件进行主成分分析(PCA), 比较不同组分间的差异, 并通过所得结果形成的载荷图分析各组分间的差异成分, 同时运用 Excel 软件中的 CORREL 函数计算药效学数据集与各组分内所含成分峰强度数据集的相关系数, 最后结合 PeakviewTM 筛查到的化合物及文献研究鉴定化学标志物。

3 结果与分析

3.1 板蓝根正丁醇萃取总部位化学成分分析

板蓝根正丁醇部位动态背景扣除(BPC)图谱, 见图1。从板蓝根正丁醇部位中鉴定出44个化合物, 其中主要包括17个吲哚类生物碱成分、7个有机酸类成分、6个核苷类成分、6个氨基酸类成分、4个喹唑酮及喹啉类生物碱成分以及2个黄酮类成分、1个芥子苷及含硫化合物成分、1个苯丙素类成分。结果见表2。

3.2 板蓝根正丁醇部位各组分差异性分析

板蓝根正丁醇部位各组分(1~20)的PCA图见图2, 从所有组分的得分图可以看出组分8~20

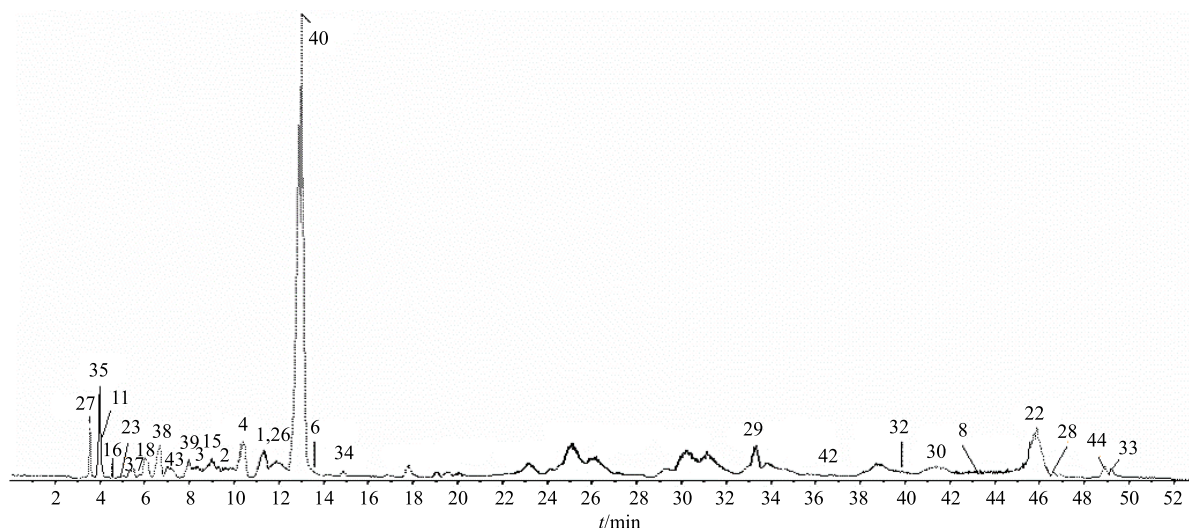


图1 板蓝根正丁醇部位动态背景扣除(BPC)图谱

Fig. 1 Total BPC map of *n*-butanol fraction from *Isatis Radix*

之间差异性较小, 组分1~7与其余组分具有显著差别。各组分中化学成分的差异可能会带来抗病毒活性的差异性, 在“2.1.2”项下的抗病毒活性筛选结果中, 抗病毒最强的组分2、4以及抗病毒活性很弱的组分1、3、5~9均是化学成分差异显著的组分,

这与前面的实验结果相互验证。

3.3 板蓝根正丁醇部位各组分差异性化学成分分析

为进一步对造成不同组分间差异的成分进行识别, 通过载荷图初步筛选, 如图3可见, 载荷图中, 化合物投影点距中心原点越近表明是各组分共有成

表2 板蓝根正丁醇部位 UPLC-Q-TOF-MS 分析

Table 2 UPLC-Q-TOF-MS analysis of *n*-butanol fraction from *Isatis Radix*

峰号	t_R /min	M	分子式	$[M+H]^+$ (m/z)	推测物质
1	11.39	135.054 50	$C_5H_5N_5$	136.061 76	腺嘌呤
2	9.31	267.096 75	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	268.104 42	腺苷
3	8.79	136.038 51	$C_5H_4N_4O$	137.045 86	次黄嘌呤
4	10.26	151.049 41	$C_5H_5N_5O$	152.056 82	鸟嘌呤
5	6.08	112.027 28	$C_4H_4N_2O_2$	113.034 66	尿嘧啶
6	13.29	244.069 54	$C_9H_{12}N_2O_6$	245.075 18	尿苷
7	4.24	177.042 59	$C_9H_7NO_3$	178.049 93	4-甲氧基-2,3-吡啶二酮
8	41.30	299.100 50	$C_{13}H_{17}NO_7$	300.106 47	<i>O</i> -氨基苯甲酸-7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖酯
9	5.78	141.078 98	$C_7H_{11}NO_2$	142.086 30	1-甲氧基-3-吡啶酮
10	6.53	145.052 76	C_9H_7NO	146.060 11	3-吡啶醛
11	4.13	175.063 33	$C_{10}H_9NO_2$	176.070 68	1-甲氧基-3-吡啶甲醛
12	6.45	127.063 33	$C_6H_9NO_2$	128.070 52	2,5-二羟基吡啶
13	6.72	209.068 81	$C_{10}H_{11}NO_4$	210.075 69	3-(3',5'-二甲氧基-4'-羟基)-2-吡啶酮
14	5.78	123.068 41	C_7H_9NO	124.075 70	3-醛基吡啶
15	8.83	162.079 31	$C_9H_{10}N_2O$	163.086 66	arvelxin
16	4.31	170.048 01	$C_{10}H_6N_2O$	171.055 12	(<i>E</i>)-2-(2-oxoindolin-3-ylidene) acetonitrile
17	6.20	278.069 14	$C_{16}H_{10}N_2O_3$	279.075 94	羟基靛玉红
18	6.06	133.052 76	C_8H_7NO	134.060 11	5-羟基-2-吡啶酮
19	5.10	340.127 05	$C_{15}H_{20}N_2O_7$	341.134 35	吡啶-3-乙腈-6- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷
20	6.08	174.079 31	$C_{10}H_{10}N_2O$	175.086 55	1-甲氧基吡啶-3-乙酰胺
21	6.65	147.032 03	$C_8H_5NO_2$	148.038 01	靛红
22	46.08	137.047 68	$C_7H_7NO_2$	138.054 94	邻氨基苯甲酸
23	4.47	142.026 61	$C_6H_6O_4$	143.034 03	5-羟甲基糠醛
23	4.47	142.026 61	$C_6H_6O_4$	143.034 03	5-羟甲基糠酸
24	5.28	123.032 03	$C_6H_5NO_2$	124.039 29	吡啶-3-羧酸
25	4.17	198.052 82	$C_9H_{10}O_5$	199.058 20	丁香酸
26	11.39	118.026 61	$C_4H_6O_4$	119.034 88	琥珀酸
27	3.80	278.224 58	$C_{18}H_{30}O_2$	279.232 13	α -亚麻酸
28	46.26	117.078 98	$C_5H_{11}NO_2$	118.086 24	缬氨酸
29	33.84	155.069 48	$C_6H_9N_3O_2$	156.076 61	组氨酸
30	40.77	131.094 63	$C_6H_{13}NO_2$	132.101 78	亮氨酸
31	34.74	181.073 89	$C_9H_{11}NO_3$	182.081 45	酪氨酸
32	40.31	115.063 33	$C_5H_9NO_2$	116.070 67	脯氨酸
33	49.23	174.111 68	$C_6H_{14}N_4O_2$	175.118 89	精氨酸
34	15.34	266.069 14	$C_{15}H_{10}N_2O_3$	267.077 33	3-(2'-羧基苯基)-4 (3 <i>H</i>)-喹唑酮
35	3.97	248.058 58	$C_{15}H_8N_2O_2$	249.066 16	色胺酮
36	5.20	162.042 93	$C_8H_6N_2O_2$	163.050 11	2,4 (1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-喹唑二酮
37	5.39	186.079 31	$C_{11}H_{10}N_2O$	187.086 60	脱氧鸭嘴花碱酮
38	6.52	592.179 21	$C_{28}H_{32}O_{14}$	593.186 16	蒙花苷
39	8.57	480.126 78	$C_{22}H_{24}O_{12}$	481.133 84	7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖基香叶素
40	13.00	432.083 87	$C_{16}H_{20}N_2O_{10}S$	433.092 82	葡萄糖基芸薹素
41	4.14	182.094 29	$C_{10}H_{14}O_3$	183.101 66	二氢松柏醇
42	37.17	110.036 78	$C_6H_6O_2$	111.044 12	邻苯二酚
43	7.55	99.068 41	C_5H_9NO	100.076 27	4-戊烯酰胺
44	48.92	358.141 64	$C_{20}H_{22}O_6$	359.150 41	表松酯酚

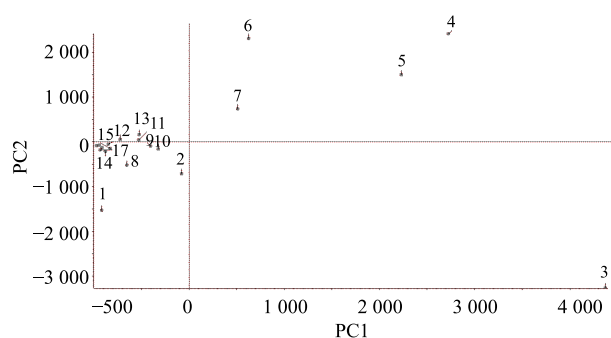


图2 板蓝根正丁醇部位各组分PCA得分

Fig. 2 PCA score chart of *n*-butanol fraction components from *Isatidis Radix*

分,越远表明该化合物对组分差异性的贡献越明显,采用 *t* 检验 ($P < 0.05$),通过 *P* 值发现具有显著性差异的化合物,最终鉴定了15个,它们分属吲哚生物碱类、有机酸及多肽类(表3);这些差异性化学成分可能是各活性组分表现出抗病毒活性的主要原因。

3.4 板蓝根正丁醇部位不同组分间差异性化学成分相对质量分数变化

提取差异成分在各组分间对应的峰强度数值以代替其相对质量分数,对板蓝根正丁醇部位每个组分间同一物质峰强度的平均值和标准差进行计算作图,能够得到差异成分在不同组分间的相对质量分数变化,具体见图4。

从差异标志物的相对质量分数变化图可见,组

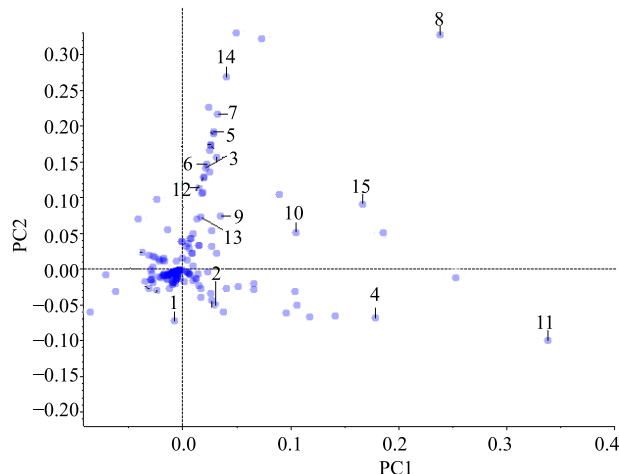


图3 板蓝根正丁醇部位各化学成分载荷图

Fig. 3 loading diagram of *n*-butanol fraction components from *Isatidis Radix*

分2具有1-甲氧基-甲醛、3-(3',5'-二甲氧基-4'-羟基)-2-吲哚酮、1-甲氧基-3-吲哚酮、3-(甲基硫代)芥子油苷、麦角硫因特征性物质,组分4中氨基葡萄糖-6-磷酸盐是其特征性物质,组分13中1-甲氧基-3-吲哚酮为特征物质。以上在抗病毒活性组分中出现的质量分数较高的特征物质推测与抗病毒活性相关。

4 讨论

本实验综合考虑板蓝根抗病毒药效物质基础的复杂性,引入了化学组分和活性组分等概念,便于进行活性筛选和化学成分的定性检测。通过化学组

表3 板蓝根正丁醇部位中各组分显著性差异化合物

Table 3 Significantly different compounds in *n*-butanol fraction from *Isatidis Radix*

编号	<i>t_R</i> /min	分子式	<i>m/z</i>	MS/MS	成分推测	组分归属
1	5.40	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.063 10	133.083 (86), 128.080 8 (100), 117.089 0 (70)	1-甲氧基-3-吲哚甲醛	3~5, 8, 10, 12
2	5.78	C ₇ H ₁₁ NO ₂	141.078 98	142.115 1 (65), 124.106 7 (60), 69.066 6 (100)	1-甲氧基-3-吲哚酮	1~8, 10, 12~14, 16, 20
3	6.38	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	229.095 10	99.076 9 (15), 69.066 4 (30), 86.093 (100)	麦角硫因	3
4	6.53	C ₉ H ₇ NO	145.052 76	146.089 0 (100), 128.079 6 (14), 91.087 1 (33)	3-吲哚醛	2~10, 12~16, 20
5	7.55	C ₅ H ₉ NO	99.068 41	100.108 1 (100), 83.098 1 (28)	4-戊烯酰胺	1~16, 20
6	8.08	C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O ₆	423.173 90	407.156 2 (100), 217.143 9 (85), 175.102 7 (65)	3-(甲基硫代)芥子油苷	3
7	8.66	C ₅ H ₄ N ₄ O	136.038 40	137.076 1 (84), 120.050 7 (11), 119.067 0 (100)	别嘌呤醇	3
8	8.79	C ₅ H ₄ N ₄ O	136.038 51	137.075 (100), 119.066 4 (70), 110.067 1 (40)	次黄嘌呤	1~16, 20
9	8.83	C ₉ H ₁₀ N ₂ O	162.079 31	133.107 1 (100), 145.101 9 (40), 77.070 7 (60)	4-甲氧基-3-吲哚乙腈	3~7, 11, 15, 19
10	10.26	C ₅ H ₅ N ₅ O	151.049 41	152.084 7 (25), 135.060 2 (100), 110.066 7 (35)	鸟嘌呤	2~16, 20
11	11.39	C ₄ H ₆ O ₄	118.026 61	119.065 8 (100), 92.066 7 (50), 65.046 2 (100)	琥珀酸	1, 4~7, 10, 12
12	34.74	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.073 89	182.106 1 (85), 136.117 0 (100), 94.097 4 (95)	酪氨酸	1~4, 6~11
13	40.31	C ₅ H ₉ NO ₂	115.063 33	70.098 0 (100)	脯氨酸	1~9, 11~14, 16
14	46.63	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	248.189 10	249.212 6 (100), 148.141 2 (35)	苦参碱	3
15	14.57	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₈	304.127 40	226.122 2 (76), 190.105 8 (100), 148.100 1 (95)	乙酰天冬氨酸谷氨酸	3, 4, 6, 7

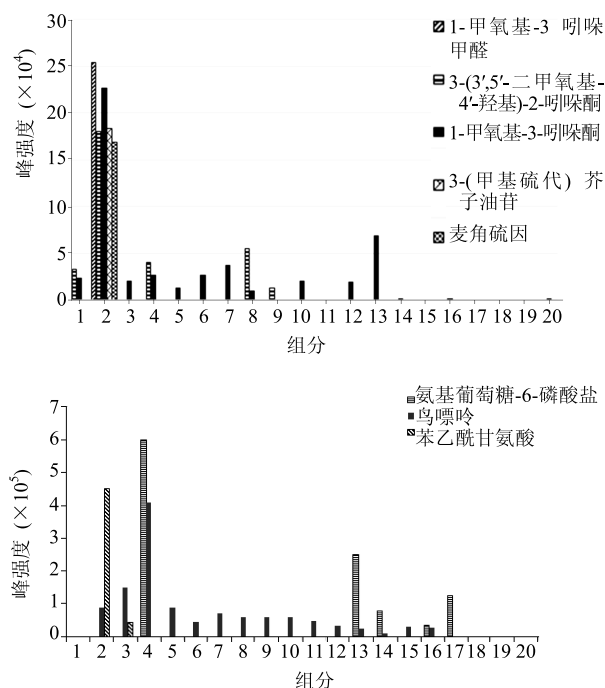


图4 板蓝根正丁醇部位不同组分间差异标志物相对含量
Fig. 4 Relative amounts of site markers in different components from *n*-butanol fraction of *Isatidis Radix*

分的系统筛选,得到了活性组分,并对各活性组分进行了化学成分定性鉴别,尤其利用统计学方法对于化学部位和各组分的差异性成分进行了分析,并结合活性筛选结果,推测出可能对于抗病毒药效贡献较大的潜在活性成分。这些成分的确切抗病毒活性评价,有待后续做进一步药效学研究。在UPLC-TOF/MS分析检测结果中,出现了正丁醇部位和各组分化学成分不相统一的情况。主要是由于正丁醇部位为粗提取物,化学成分较为复杂,离子峰出现相互干扰(图1中未能标出全部离子峰),因而部分化合物可能未检测到。经过进一步分离,各

组分化学物质相对简单和集中,并且采用了二级质谱检测,结果更为准确,很多在正丁醇粗提取物中未检测到的物质,在各组分中得到了鉴定。

本实验所提出的化学组分结合活性研究,关注活性组分中特异性成分及量变化,为中药药效物质基础研究工作提供了新的思路。

参考文献

- [1] 陈连剑,李 婷,李 成. 抗病毒复方制剂的药效学研究 [J]. 中药材, 2003, 26(9): 659-662.
- [2] 孙广蓬,胡志力,孟 红. MTT法检测板蓝根抗巨细胞毒效应 [J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(2): 137-138.
- [3] 何立巍,董 伟,杨婧妍,等. 板蓝根抗病毒有效部位的化学成分及其活性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 2960-2964.
- [4] 何立巍,李 祥,陈建伟,等. 板蓝根抗病毒有效部位的筛选 [J]. 中国药房, 2008, 19(33): 2565-2566.
- [5] Pavic L, Hartman A, Zimmermam A, *et al.* Flowcytometric analysis of herpes simplex virus type-1 susceptibility to acyclovir, ganciclovir and foscarnet [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(12): 2686-2692.
- [6] Englund J A, Zimmerman M E, Swierkosz E M, *et al.* Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center [J]. *Ann Int Med*, 1990, 112(6): 416-422.
- [7] 芮 雯,冯毅凡,石忠峰,等. 不同产地黄芪药材的UPLC/Q-TOF-MS指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 607-611.
- [8] 黄辉强,冯毅凡,芮 雯,等. 紫花杜鹃中黄酮类成分的UPLC/Q-TOF-MS分析 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 875-878.
- [9] 周思思,马增春,梁乾德,等. 基于UPLC-Q-TOF/MS分析附子半夏配伍相反的物质基础 [J]. 化学学报, 2012, 70(3): 284-290.