

薄荷酚类部位抗病毒活性及特征图谱研究

陈向阳¹, 吴莹², 张淑静³, 王谦³, 姜艳艳¹, 刘斌^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

摘要:目的 探讨薄荷酚类部位体外抗流感病毒作用, 并建立薄荷酚类部位 HPLC 特征图谱, 用于薄荷酚类部位的质量评价。方法 MTT 法检测先加药物再接种病毒、药物与病毒同时作用、先接种病毒再加药物 3 种加药方式下薄荷酚类部位抗 PR8 病毒感染 MDCK 细胞的作用; HPLC 法测定 12 批市售薄荷药材酚类部位样品, 建立特征图谱; 并采用“中药指纹图谱相似度评价系统(2.0 版)”进行相似度分析。结果 薄荷酚类部位质量浓度为 0.31~10 μg/mL 在 3 种加药方式下均有不同程度抗 PR8 病毒活性, 尤其在先加药物再接种病毒、先接种病毒再加药物 2 种加药方式下, 6 个稀释质量浓度的薄荷酚类部位均具有明显的抗 PR8 病毒活性, 抑制率分别为 14.17%~41.31%、45.64%~87.48%; 选取了 11 个共有特征峰, 12 批样品相似度在 0.9 以上, 说明各批薄荷酚类部位整体相似度较高。结论 薄荷酚类部位具有较好的体外抗病毒效果; 建立的薄荷酚类部位 HPLC 特征图谱方法简便、稳定、重复性好, 能够反映酚类部位的整体面貌, 为薄荷酚类部位的质量控制和药效稳定提供参考。

关键词: 薄荷; 酚类部位; 抗病毒; HPLC; 特征图谱; 流感病毒

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0640-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.020

Study on antiviral activity and characteristic spectrum of phenolic fraction of *Mentha haplocalyx*

CHEN Xiang-yang¹, WU Ying², ZHANG Shu-jing³, WANG Qian³, JIANG Yan-yan¹, LIU Bin¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore the anti-influenza virus effect of phenolic fraction of *Mentha haplocalyx* *in vitro*, and to establish the HPLC characteristic spectrum of phenolic fraction of *M. haplocalyx* for its quality evaluation. **Methods** MTT method was used to detect the inhibitory effect of phenolic fraction of *M. haplocalyx* on influenza virus PR8 infecting MDCK cells in three ways, including adding drug firstly, adding drug and virus simultaneously and adding virus firstly. The characteristic spectrum of phenolic fraction samples of 12 batches of *M. haplocalyx* was established by HPLC method. The similarity of which was analyzed with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica (2.0 version). **Results** The phenolic fraction at 0.31—10 μg/mL showed antiviral PR8 activities in different degrees under three adding drug ways. Phenolic fraction of *M. haplocalyx* at six dilution concentrations displayed obvious antiviral PR8 effect under two adding drug ways including adding drug firstly and adding virus firstly, and virus inhibition rates of which were 14.17%—41.31% and 45.64%—87.48%, respectively. Total of 11 peaks were chosen as the common characteristic peaks of spectrum with the similarity degrees more than 0.9 of 12 batches of samples, which illustrated that different batches of phenolic fraction of *M. haplocalyx* were of high similarity. **Conclusion** Phenolic fraction of *M. haplocalyx* had better antiviral effect *in vitro*. The characteristic spectrum method established in this paper was simple, stable and reproducible, which could reflect the whole profile of phenolic fraction of *M. haplocalyx* and provide reference for quality control and efficacy stability of phenolic fraction of *M. haplocalyx*.

Key words: *Mentha haplocalyx* Briq.; phenolic fraction; antiviral; HPLC; characteristic spectrum; influenza virus

收稿日期: 2017-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173520)

作者简介: 陈向阳(1990—), 男, 在读博士, 研究方向为中药(复方)有效成分(组分)发现。Tel: (010)84738629 E-mail: chenxiangyang92@163.com

*通信作者 刘斌(1967—), 男, 教授, 研究方向为中药(复方)有效成分(组分)发现与新药创制。Tel: (010)84738629 E-mail: liubinyin67@163.com

流行性感 冒（流 感）病 毒 致 病 力 强 且 容 易 发 生 变 异，严 重 危 害 人 类 公 共 健 康^[1]。目 前，西 医 治 疗 流 感 的 主 要 措 施 是 接 种 疫 苗，但 流 感 疫 苗 通 常 难 以 及 时 发 挥 作 用^[2]。中 医 药 在 防 治 流 感 方 面 具 有 悠 久 的 历 史 和 良 好 的 临 床 疗 效。2009 年，WHO 将 加 大 从 天 然 药 物 中 寻 找 具 有 免 疫 调 节 功 能 和 抗 病 毒 的 药 物 纳 入 到 世 界 公 共 健 康 工 作 议 程 中。现 代 药 理 研 究 发 现，中 药 在 抗 病 毒 方 面 具 有 独 特 的 优 势，其 所 含 的 酚 类 成 分 是 抗 病 毒 作 用 比 较 明 确 的 一 类 成 分^[3-4]。因 此，从 中 药 中 寻 找 和 开 发 具 有 抗 流 感 病 毒 活 性 的 成 分 已 是 抗 流 感 药 物 研 究 的 热 点 之 一。

解 表 清 热 法 是 中 医 药 防 治 流 感 常 用 的 方 法 之 一^[5]。薄 荷 作 为 中 医 临 床 中 常 用 的 解 表 药 之 一，具 有 宣 散 风 热、清 利 头 目、透 疹 等 功 效，用 于 治 疗 风 温 初 起、风 热 感 冒、头 痛、风 疹、口 疮 等^[6]。研 究 表 明，薄 荷 具 有 一 定 的 抗 病 毒 作 用^[7]。薄 荷 及 其 复 方 水 煎 剂 是 中 医 临 床 常 用 的 服 用 形 式，薄 荷 黄 酮、酚 酸 等 多 种 酚 类 成 分 是 薄 荷 水 提 物 中 的 主 要 化 学 成 分^[8]。本 研 究 在 前 期 工 作 基 础 上^[9]，对 薄 荷 酚 类 成 分 进 行 富 集，探 讨 薄 荷 酚 类 部 位 的 抗 病 毒 作 用；为 进 一 步 评 价 薄 荷 酚 类 部 位 的 质 量，采 用 12 批 市 售 薄 荷 药 材 建 立 了 薄 荷 酚 类 部 位 HPLC 特 征 图 谱。

1 材料

1.1 仪器

TU-1810 型 紫 外-可 见 分 光 光 度 计（北 京 普 析 通 用 有 限 公 司）；Sartorius BT25S 型 电 子 分 析 天 平（北 京 赛 多 利 斯 仪 器 有 限 公 司）；KQ-500DE 型 超 声 波 清 洗 器（昆 山 超 声 仪 器 公 司）；CO₂ 细 胞 培 养 箱（美 国 Thermo 公 司）；超 净 工 作 台（苏 州 智 净 净 化 设 备 有 限 公 司）；TS-8 型 转 移 脱 色 床（海 门 市 其 林 贝 尔 仪 器 制 造 有 限 公 司）；水 平 离 心 机（北 京 医 用 离 心 机 厂）；酶 标 仪（奥 地 利 Tecan 公 司）；光 学 显 微 镜（日 本 Olympus 公 司）。

1.2 试剂与药材

迷 迭 香 酸 对 照 品，成 都 曼 思 特 生 物 科 技 有 限 公 司，批 号 MUST-14020115，质 量 分 数 >98%；利 巴 韦 林 注 射 液，江 苏 涟 水 制 药 有 限 公 司，规 格 100 mg/mL，批 号 1504026411；DMEM 培 养 基，美 国 HyClone 公 司；二 甲 基 亚 砷（DMSO），美 国 Amresco 公 司；胎 牛 血 清（FBS），美 国 Corning 公 司；MTT 粉 末，瑞 士 Geneva Bioinformatics SA 公 司 进 口 分 装；PBS 粉 末，北 京 中 杉 金 桥 生 物 技 术 有 限 公 司；青、链 霉 素 溶 液，北 京 索 莱 宝 科 技 有 限 公 司；0.25%

EDTA-胰 蛋 白 酶，美 国 Gibco 公 司；无 EDTA 胰 蛋 白 酶，北 京 索 莱 宝 科 技 有 限 公 司；色 谱 级 乙 腈，美 国 Fisher 公 司；其 余 试 剂 均 为 分 析 纯。

12 批 市 售 薄 荷 药 材 购 买 于 北 京 不 同 药 店，经 北 京 中 医 药 大 学 中 药 学 院 刘 春 生 教 授 鉴 定 为 薄 荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 地 上 部 分，具 体 来 源 见 表 1。

表 1 12 批 薄 荷 药 材 来 源
Table 1 Sources of 12 batches of *M. haplocalyx*

编 号	来 源	编 号	来 源
S1	北 京 弘 景 堂 大 药 房	S7	北 京 润 丰 大 药 房
S2	同 仁 堂 大 药 房	S8	友 谊 仁 博 大 药 房
S3	北 京 福 瑞 宏 达 大 药 房	S9	北 京 康 泰 民 生 堂 大 药 房
S4	北 京 嘉 事 堂 大 药 房	S10	馨 百 康 大 药 房
S5	德 寿 堂 大 药 房	S11	国 医 养 身 堂 大 药 房
S6	北 京 正 济 堂 大 药 房	S12	北 京 广 生 堂 大 药 房

1.3 细胞和病毒

犬 肾 MDCK 细 胞 和 PR8 流 感 病 毒（TCID₅₀ 为 10^{-5.028}/0.1 mL）由 军 事 医 学 科 学 院 微 生 物 流 行 病 研 究 所 一 室 提 供。

2 方法与结果

2.1 薄荷酚类部位制备

参 照 文 献 方 法^[9]，取 薄 荷 药 材 以 16 倍 量 30% 乙 醇 提 取 3 次，每 次 1.5 h；合 并 3 次 提 取 液，减 压 回 收 溶 剂 至 无 醇 味，残 留 物 以 3 000 r/min 离 心 30 min，取 上 清 液 得 质 量 浓 度 为 0.1 g/mL（以 生 药 量 计）的 上 样 液，使 用 冰 醋 酸 调 节 上 样 液 pH 值 为 3，通 过 HPD-400 型 大 孔 吸 附 树 脂 柱，待 吸 附 结 束 后，先 用 20% 乙 醇 洗 脱 2 个 柱 体 积，弃 去 洗 脱 液；大 孔 吸 附 树 脂 柱 继 续 用 70% 乙 醇 洗 脱 3 个 柱 体 积，收 集 70% 乙 醇 洗 脱 液，回 收 溶 剂 至 干，残 留 物 减 压 干 燥，得 薄 荷 酚 类 部 位（总 酚 酸 质 量 分 数 为 49.02%），避 光 保 存 在 干 燥 器 中。

2.2 薄荷酚类部位抗病毒活性研究

2.2.1 细 胞 毒 性 测 定 取 接 种 MDCK 细 胞 并 已 长 成 单 层 的 96 孔 细 胞 培 养 板，加 入 不 同 质 量 浓 度 薄 荷 酚 类 部 位 和 利 巴 韦 林 药 液，同 时 设 置 对 照 组。将 细 胞 培 养 板 置 于 37 ℃、5% CO₂ 培 养 箱 中 培 养，每 日 观 察 细 胞 生 长 情 况，72 h 后，采 用 MTT 法^[8]检 测 每 孔 吸 光 度（A）值。在 受 试 期 间，对 照 组 细 胞 形 态 正 常。MTT 结 果（表 2）显 示 薄 荷 酚 类 部 位 和 利 巴 韦 林 的 无 毒 质 量 浓 度 分 别 为 0~10 μg/mL 和 0~3.13 μg/mL。

表 2 细胞毒性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Table 2 Determination of cell cytotoxicity ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值	组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值
对照	—	2.030±0.056	对照	—	1.693±0.065
薄荷酚类部位	5	2.038±0.025	利巴韦林	1.57	1.763±0.109
	10	2.105±0.020		3.13	1.609±0.091
	20	1.694±0.068*		6.25	1.068±0.103*
	40	0.446±0.068*		12.50	0.860±0.064*
	80	0.239±0.066*		25.00	0.826±0.070*
	160	0.173±0.039*		50.00	0.801±0.064*

与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group

2.2.2 抗病毒实验 根据病毒的复制周期, 设计 3 种给药方式实验, 每个实验均设置对照组、病毒组、薄荷酚类部位组和利巴韦林组。采用 MTT 法检测 A 值并计算病毒抑制率。

病毒抑制率 = (药物组 A 值 - 病毒组 A 值) / (对照组 A 值 - 病毒组 A 值)

(1) 药物对病毒侵入细胞的阻断作用 将不同质量浓度酚类部位和利巴韦林药液加入到已长成单层 MDCK 细胞的培养板中, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h; 吸弃药液, 加入 100 μL 100 TCID₅₀ 的病毒液, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h, 吸弃病毒液, 加入 DMEM 维持培养液继续培养, 每日观察细胞病变 (CPE) 情况, 当病毒组 CPE 达 75% 以上时, 测定各孔 A 值。结果 (表 3) 显示, 薄荷酚类部位和利巴韦林分别在 0.31~10 μg/mL 和 0.10~3.13 μg/mL 对 PR8 病毒侵入细胞具有一定的阻断作用, 最大病毒抑制率分别为 41.31%、52.41%。

(2) 药物对病毒的直接灭活作用 将 100 μL 100 TCID₅₀ 病毒液与不同质量浓度药物稀释液等量混合, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h, 再加入到已长成单层 MDCK 细胞的培养板中, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h, 吸弃上清液, 加入 DMEM 维持培养液继续培养, 每日观察 CPE 情况, 当病毒组 CPE 达 75% 以上时, 测定各孔 A 值。结果 (表 3) 显示, 薄荷酚类部位在 5~10 μg/mL 对 PR8 病毒具有一定的直接灭活作用, 其最大病毒抑制率为 43.54%, 而利巴韦林对 PR8 病毒的抑制率较低。

(3) 药物对病毒穿入细胞后的抑制作用 将 100 μL 100 TCID₅₀ 病毒液加入到已长成单层 MDCK 细胞的培养板中, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养

箱中孵育 2 h; 吸弃病毒液, 加入不同质量浓度药物稀释液继续培养, 每日观察 CPE 情况, 当病毒组 CPE 达 75% 以上时, 测定各孔 A 值。结果 (表 3) 显示, 薄荷酚类部位和利巴韦林分别在 0.31~10 μg/mL 和 0.10~3.13 μg/mL 对侵入细胞后的 PR8 病毒具有较高的抑制作用, 最大病毒抑制率分别为 87.48%、64.46%。

2.3 薄荷酚类部位特征图谱研究

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Sunfire C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)、0.5% 甲酸-水溶液 (B); 梯度洗脱: 0~40 min, 5%~15% A; 40~70 min, 15%~19.5% A; 70~90 min, 19.5%~22% A; 90~120 min, 22%~30% A; 柱温 30 °C; 检测波长 285 nm; 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 20 μL。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取迷迭香酸对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解后, 定容至刻度。吸取少量, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

2.3.3 供试品溶液制备 精密称取薄荷酚类部位 20.0 mg 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇超声溶解并定容至刻度, 摇匀, 吸取少量, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

2.3.4 精密度试验 取同一供试品 (S₂) 溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以 6 号峰为参照峰, 各共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别在 0.050%~0.250% 和 1.832%~2.689%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品 (S₂) 溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别在 0、3、6、12、18、24 h 进样, 记录色谱图。以 6 号峰为参照峰, 各共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值

表 3 薄荷酚类部位体外抗 PR8 病毒实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Antiviral effect of phenolic fraction on virus PR8 *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	对病毒侵入细胞的阻断作用		对病毒的直接灭活作用		对病毒穿入细胞后的抑制作用	
		A 值	病毒抑制率/%	A 值	病毒抑制率/%	A 值	病毒抑制率/%
对照	—	1.732±0.099	—	1.748±0.035	—	1.866±0.081	—
病毒	—	0.615±0.036*	—	0.631±0.031*	—	0.777±0.079*	—
薄荷酚类部位	0.31	0.773±0.035 [#]	14.17	0.521±0.035	0	1.274±0.064 [#]	45.64
	0.63	0.920±0.055 [#]	26.93	0.553±0.021	0	1.383±0.059 [#]	55.65
	1.25	0.950±0.004 [#]	29.94	0.569±0.105	0	1.381±0.070 [#]	55.43
	2.50	1.077±0.022 [#]	41.31	0.598±0.023	0	1.368±0.062 [#]	54.27
	5.00	1.059±0.116 [#]	39.70	0.694±0.101	5.60	1.449±0.099 [#]	61.68
	10.00	1.037±0.067 [#]	37.74	1.119±0.086 [#]	43.54	1.730±0.055 [#]	87.48
利巴韦林	0.10	0.760±0.060 [#]	12.95	0.604±0.058	0	0.983±0.067 [#]	18.92
	0.20	0.747±0.077 [#]	11.79	0.618±0.025	0	1.072±0.115 [#]	27.12
	0.39	0.762±0.037 [#]	13.16	0.717±0.061 [#]	7.68	1.123±0.072 [#]	31.80
	0.78	0.747±0.056 [#]	11.79	0.722±0.055 [#]	8.10	1.400±0.084 [#]	57.18
	1.57	1.145±0.061 [#]	47.05	0.678±0.050	4.23	1.481±0.072 [#]	64.65
	3.13	1.202±0.057 [#]	52.41	0.692±0.042	5.45	1.479±0.087 [#]	64.46

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与病毒组比较: [#] $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs virus group

分别在 0.049%~0.636% 和 1.876%~2.968%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 取同一批 (S2) 薄荷药材 6 份，按照“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，再按“2.3.1”项下色谱条件连续进样，记录色谱图。以 6 号峰为参照峰，各共有特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别在 0.513%~0.625% 和 0.807%~2.978%，说明方法重复性良好。

2.3.7 薄荷酚类部位 HPLC 特征图谱的建立 取 12 批薄荷药材 (S1~S12 号样品)，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件分别进样测定，记录色谱图。将所有色谱图导入“中药指纹图谱相似度评价系统 (2.0 版)”进行数据分析处理。设定 S2 号样品色图谱为参照图谱，时间窗宽度设定为 0.1，采用平均数法，经多点校正、自动匹配生成薄荷酚类部位的对照特征图谱见图 1；12 批薄荷酚类部位特征图谱的叠加图谱见图 2。

2.3.8 共有峰的标定 通过与对照品进行比对，确定 6 号峰为迷迭香酸，以其为参照峰，共标定 11 个共有特征峰。计算 12 批薄荷酚类部位特征图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积，见表 4 和 5。11 个共有峰相对保留时间 RSD 值为 0.056%~0.608%，表明 11 个共有峰有较高的吻合度，保留

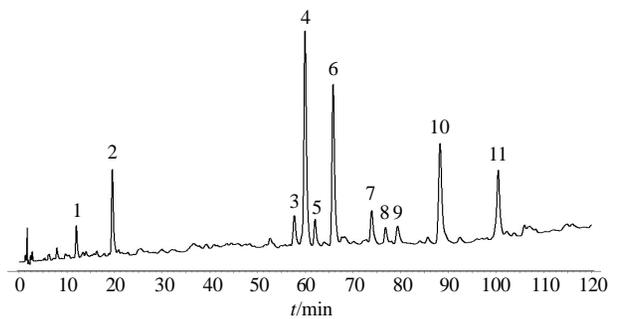


图 1 薄荷酚类部位的对照特征图谱
Fig. 1 Reference characteristic spectrum of phenolic fraction of *M. haplocalyx*

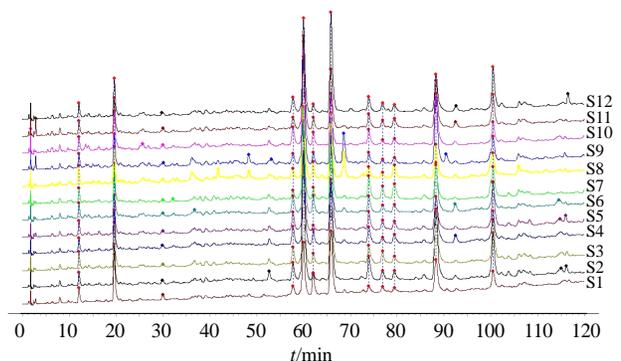


图 2 12 批薄荷酚类部位 HPLC 特征图谱
Fig. 2 HPLC characteristic spectrum of phenolic fraction of 12 batches of *M. haplocalyx*

表 4 薄荷酚类部位共有峰相对保留时间

Table 4 Relative retention time of common peaks of phenolic fraction of *M. haplocalyx*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	RSD/%
1	0.185	0.185	0.184	0.184	0.183	0.183	0.183	0.182	0.182	0.182	0.182	0.184	0.586
2	0.301	0.300	0.300	0.299	0.298	0.297	0.297	0.296	0.295	0.296	0.296	0.299	0.608
3	0.877	0.877	0.877	0.877	0.877	0.876	0.876	0.877	0.876	0.877	0.876	0.877	0.056
4	0.911	0.911	0.912	0.911	0.911	0.911	0.911	0.910	0.908	0.910	0.910	0.911	0.091
5	0.943	0.942	0.943	0.943	0.943	0.942	0.943	0.942	0.942	0.942	0.942	0.942	0.047
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
7	1.122	1.121	1.122	1.122	1.122	1.123	1.122	1.123	1.125	1.123	1.123	1.123	0.078
8	1.165	1.165	1.166	1.166	1.167	1.167	1.167	1.167	1.169	1.167	1.167	1.167	0.088
9	1.204	1.204	1.205	1.204	1.206	1.205	1.205	1.204	1.207	1.206	1.205	1.205	0.080
10	1.336	1.339	1.339	1.339	1.341	1.342	1.341	1.341	1.345	1.341	1.340	1.339	0.152
11	1.515	1.521	1.522	1.522	1.527	1.527	1.527	1.528	1.536	1.529	1.526	1.521	0.326

表 5 薄荷酚类部位共有峰相对峰面积

Table 5 Relative peak areas of common peaks of phenolic fraction of *M. haplocalyx*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	RSD/%
1	0.135	0.080	0.111	0.131	0.082	0.138	0.164	0.108	0.112	0.175	0.124	0.082	24.563
2	0.517	0.284	0.383	0.449	0.269	0.476	0.380	0.339	0.309	0.598	0.420	0.263	25.880
3	0.183	0.182	0.198	0.329	0.186	0.272	0.124	0.111	0.135	0.379	0.201	0.160	38.281
4	0.878	0.171	1.215	1.576	1.021	1.478	1.697	1.224	1.535	2.216	1.655	0.967	38.001
5	0.266	0.047	0.093	0.169	0.036	0.234	0.185	0.120	0.125	0.235	0.156	0.053	51.988
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
7	0.067	0.253	0.225	0.277	0.169	0.243	0.156	0.264	0.106	0.274	0.214	0.120	34.865
8	0.070	0.085	0.113	0.073	0.064	0.083	0.065	0.131	0.048	0.074	0.090	0.060	27.763
9	0.080	0.067	0.066	0.157	0.069	0.126	0.180	0.218	0.079	0.109	0.163	0.064	44.300
10	0.537	0.891	0.766	1.022	0.377	0.947	0.595	0.520	1.156	1.465	0.943	0.436	38.809
11	0.246	0.515	0.501	0.535	0.484	0.449	0.472	0.546	0.445	0.474	0.573	0.448	16.735

时间稳定。11 个共有峰相对峰面积的 RSD 为 16.735%~51.988%，表明不同成分含量存在差异。

2.3.9 薄荷酚类部位特征图谱相似度的分析 与 12 批薄荷酚类部位样品生成的特征图谱比较分析，各批薄荷酚类部位特征图谱的相似度均在 0.9 以上，S1~S12 相似度分别为 0.963、0.994、0.998、0.994、0.978、0.995、0.988、0.985、0.985、0.973、0.996、0.982，表明 12 批薄荷酚类部位整体质量具有相似性。

3 讨论

薄荷作为薄荷属代表性植物之一，具有药食两用特点。薄荷不仅含有挥发性成分，而且含有大量非挥发性成分，主要包括酚酸、黄酮等多种酚类成分^[10-12]，被认为是薄荷发挥抗炎、抗病毒的主要活

性成分^[13]。因此，本课题组前期工作对薄荷酚类成分进行了富集，得到薄荷酚类部位，研究发现薄荷酚类部位能够通过抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路，抑制炎症因子的表达和分泌，表现出较强的抗炎作用；而后再采用 HPLC-MS/MS 法进一步分析了薄荷酚类部位的化学成分，共鉴定出 15 个酚类成分^[8]。其中，原儿茶醛、咖啡酸、橙皮苷、迷迭香酸等被报道具有明显的抗病毒活性^[14-17]，它们可能协同激发薄荷酚类部位的抗病毒作用，但未见薄荷酚类部位抗病毒作用的研究报道。

本研究以流感病毒 PR8 感染 MDCK 细胞为模型，采用先加药物再接种病毒、药物与病毒同时作用、先接种病毒再加药物 3 种加药方式，初步探讨

了酚类部位和阳性对照药利巴韦林抗病毒作用。研究表明,仅部分浓度的薄荷酚类部位和利巴韦林表现出对病毒的直接灭活作用;但在先加药物再接种病毒和先接种病毒再加药物 2 种加药方式下,各浓度薄荷酚类部位和利巴韦林均表现出显著的抗病毒活性。

为了进一步对薄荷酚类部位的质量进行控制和评价,本研究采用 12 批市售薄荷药材建立薄荷酚类部位 HPLC 特征图谱。首先,通过考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2%甲酸-水溶液及乙腈-0.5%甲酸-水溶液等 4 种流动相系统对色谱图中色谱峰分离度影响,确定以乙腈-0.5%甲酸-水溶液为流动相,各色谱峰分离度较好且保留时间较为合适;其次,比较了 254、285、330 nm 波长下的酚类部位色谱图,结果显示 285 nm 下检测的色谱峰最多;最后,选取了 12 批市售薄荷药材建立了薄荷酚类部位的特征图谱,确定了 11 个共有特征峰,相似度分析结果表明薄荷药材酚类部位整体质量较为一致,同时也间接反映了市售薄荷药材整体质量一致性。

综上所述,薄荷酚类部位具有较好的抗病毒作用,对抗病毒药物的开发具有潜在应用价值,建立的薄荷酚类部位 HPLC 特征图谱能够为薄荷酚类部位整体质量的有效控制和评价提供依据。薄荷酚类部位特征图谱标示出 11 个特征峰,其中迷迭香酸在薄荷酚类部位特征图谱中峰面积所占比例较大且相对稳定,文献报道该成分具有明确的抗病毒活性^[6],因此,迷迭香酸与薄荷酚类部位抗病毒作用可能存在较强的相关性,而其他特征峰与薄荷酚类部位抗病毒活性的相关性有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张晓阳,王 楨,连心逸. 流行性感冒从风毒论治的理论与临床依据 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 10(10): 3945-3947.
- [2] 刘燕,王林林,姚 华,等. 滨蒿总黄酮对流感病毒 PR8 株感染小鼠的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 185-190.
- [3] 黄 华,姚 华,王玉梅,等. 滨蒿总黄酮提取物的抗流感病毒作用 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1452-1454.
- [4] Li T, Peng T. Traditional Chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity [J]. *Antivir Res*, 2013, 97(1): 1-9.
- [5] 云芯芯. 祛湿法治疗流行性感冒的系统评价 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [6] 刘 颖,张援虎,石任兵. 薄荷化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(14): 1086-1088.
- [7] 陈 飞,姚梅悦,张 霞,等. 薄荷抗单纯疱疹病毒有效部位筛选研究 [J]. 山东中医杂志, 2015, 34(4): 289-291.
- [8] Chen X Y, Zhang S J, Xuan Z N, et al. The Phenolic fraction of *Mentha haplocalyx* and its constituent linarin ameliorate inflammatory response through inactivation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells [J]. *Molecules*, 2017, doi:10.3390/molecules22050811.
- [9] 姜艳艳,张 凡,刘 斌. 薄荷总酚酸大孔树脂纯化工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 9-11.
- [10] 张援虎,刘 颖,胡 峻,等. 薄荷中黄酮类成分的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 512-514.
- [11] She G M, Xu C, Liu B, et al. Polyphenolic acids from mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(4): 359-362.
- [12] 徐凌玉,李振麟,蔡芷辰,等. 薄荷化学成分的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2798-2802.
- [13] Mimica-Dukic N, Bozin B. *Mentha* L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(29): 3141-3150.
- [14] Zhou Z, Zhang Y, Ding X R, et al. Protocatechuic aldehyde inhibits hepatitis B virus replication both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antivir Res*, 2007, 74(1): 59-64.
- [15] Utsunomiya H, Ichinosei M, Ikeda K, et al. Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication *in vitro* [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(4): 1020-1024.
- [16] Dong W J, Wei X L, Zhang F Y, et al. A dual character of flavonoids in influenza A virus replication and spread through modulating cell-autonomous immunity by MAPK signaling pathways [J]. *Sci Rep*, 2014, doi:10.1038/srep07237.
- [17] Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, et al. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(9): 3367-3370.