

# 一枝蒿不同溶剂提取物抗病毒作用的谱效关系研究<sup>Δ</sup>

秦子茹<sup>1,2\*</sup>, 贺金华<sup>2</sup>, 顾政一<sup>2#</sup>, 沙先谊<sup>3</sup>(1.新疆医科大学药学院药剂教研室, 乌鲁木齐 830054; 2.新疆药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 3.复旦大学药学院药剂教研室, 上海 201203)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0889-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.08

**摘要** 目的:研究一枝蒿不同溶剂提取物抗病毒作用的谱效关系。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法构建一枝蒿不同溶剂提取物的指纹图谱;进行体外抗流感病毒、乙肝病毒试验,比较其生理活性的差异;采用灰色关联度分析其谱效关系。结果:在构建的一枝蒿不同溶剂提取物的HPLC指纹图谱中确定了9个共有特征峰;各特征峰所代表的各化学成分(以特征峰编号作为该特征峰所代表的化学成分名称)在抗流感病毒中作用的大小顺序依次为9>4>8>6>1>3>7>2>5;在抗乙肝病毒中作用大小顺序依次为7>9>5>8>4>2>1>6>3。结论:一枝蒿不同溶剂提取物的HPLC指纹图谱具有明显的差异,其抗病毒活性与指纹图谱具有一定的相关性。

**关键词** 一枝蒿;提取物;高效液相色谱法;指纹图谱;谱效关系

## Study on the Spectrum-effect Relationship of Anti-virus Effect of *Artemisia rupestris* Extracts from Different Solvents

QIN Zi-ru<sup>1,2</sup>, HE Jin-hua<sup>2</sup>, GU Zheng-yi<sup>2</sup>, SHA Xian-yi<sup>3</sup>(1.Dept. of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2.Xinjiang Institute of Materia Medic, Urumqi 830004, China; 3.Dept. of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the spectrum-effect relationship of anti-virus effect of *Artemisia rupestris* extracts from different solvents. METHODS: The fingerprint chromatogram of *A. rupestris* extracts from different solvents was constructed by HPLC. The differences of physiological activity were compared by anti-influenza virus and anti-hepatitis B virus tests *in vitro*. The spectrum-effect relationship was analyzed using gray relational grades. RESULTS: Nine characteristic peaks were determined in the HPLC fingerprint chromatogram of *A. rupestris* extracts from different solvents. The represented chemical composition of each characteristic peak (characteristic peak number as the name of the chemical composition of this characteristic peak) on the contribution of different peak to inhibit the influenza virus was ranked with 9>4>8>6>1>3>7>2>5; the contribution of different peak to inhibit the hepatitis B virus was ranked with 7>9>5>8>4>2>1>6>3. CONCLUSIONS: There are significant differences in HPLC fingerprint chromatogram of *A. rupestris* extracts from different solvents, and their antiviral activity are correlated with fingerprint chromatogram.

**KEYWORDS** *Artemisia rupestris*; Extracts; HPLC; Fingerprint chromatogram; Spectrum-effect relationship

## 参考文献

- [1] Srivastava AK, Mehdi MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds[J]. *Diabet Med*, 2005, 22(1): 2.
- [2] 谢明进, 刘伟平, 李玲, 等. 双(α-呋喃甲酸)氧钒的合成和抗糖尿病活性[J]. *化学学报*, 2002, 60(5): 892.
- [3] Xie M, Gao L, Li L, et al. A new orally active antidiabetic vanadyl complex: bis(α-furancarboxylato)oxovanadium(IV)[J]. *J Inorg Biochem*, 2005, 99(2): 546.
- [4] Niu Y, Liu W, Tian C, et al. Effects of bis(α-furancarboxylato)oxovanadium(IV) on glucose metabolism in fat-fed/streptozotocin-diabetic rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 572(2/3): 213.
- [5] Vogel HG, Vogel WH. 药理学实验指南: 新药发现和药理学评价[M]. 杜冠华, 李学军, 张永祥, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 699-700.
- [6] Bischof MG, Bernroider E, Krssak M, et al. Hepatic glycogen metabolism in type 1 diabetes after long-term near normoglycemia[J]. *Diabetes*, 2002, 51(1): 49.
- [7] Krssak M, Brehm A, Bernroider E, et al. Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2004, 53(12): 3 048.
- [8] He J, Kelley DE. Muscle glycogen content in type 2 diabetes mellitus[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(5): E1 002.
- [9] 李艳蓉, 高丽辉, 马燕琳, 等. 双(α-呋喃甲酸)氧钒的胰岛素样作用[J]. *药学报*, 2008, 43(3): 318.
- [10] 解雪芬, 朱毅. AMPK与代谢综合征[J]. *基础医学与临床*, 2006, 26(1): 27.
- [11] Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(8): 1 167.
- [12] 李星霞, 余奇, 郭澄. 二甲双胍的临床应用进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(8): 760.

(收稿日期: 2014-06-03 修回日期: 2014-09-08)

(编辑: 张 静)

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.U1303224)

\* 硕士研究生。研究方向: 药学。E-mail: 281528274@qq.com

# 通信作者: 研究员。研究方向: 药物新制剂与新剂型。电话: 0991-2828537。E-mail: zhengyi087@126.com

新疆一枝蒿(*Artemisia rupestris* L.),别名岩蒿,为菊科蒿属植物,是新疆道地药材,也是维吾尔医常用传统药材,维医习称一孜乎艾曼尼,全草入药<sup>[1-2]</sup>。研究表明,一枝蒿全草含黄酮、黄酮、挥发油、生物碱、氨基酸、内酯类等多种化学成分<sup>[3-4]</sup>,具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗过敏、保肝等功能<sup>[5-7]</sup>。国内临床资料表明,抗病毒是一枝蒿的主要药理功效之一<sup>[8-9]</sup>。以往对一枝蒿提取物抗病毒作用的系统研究较少,而针对量效关系和作用规律的研究更鲜有报道。本研究运用体外细胞培养技术检测了一枝蒿不同提取部位体外抗病毒的生物活性<sup>[10]</sup>,首次将高效液相色谱(HPLC)指纹图谱和体外药效实验相结合,运用灰关联度分析方法,考察一枝蒿不同溶剂提取物HPLC指纹图谱特征峰与其抗病毒活性的相关性,通过“谱效”关系研究阐明一枝蒿抗病毒作用的药效物质基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2010C型HPLC仪、CLASS-VP V6.14 SP1数据工作站(日本岛津公司);BP211D型电子天平(德国赛多利斯公司);CX22型显微镜(日本Olympus公司);TGL-16M型高速台式冷冻离心机(长沙湘仪离心仪器有限公司)。

### 1.2 药材

一枝蒿(新疆西部加斯特药业有限公司提供人工种植品种,2013年8月采集野生品种)经新疆药物研究所何江副研究员鉴定为真品。

### 1.3 试剂

一枝蒿酮酸对照品(中国科学院新疆理化研究所,批号:111833-201105,纯度:100%);木犀草素对照品(批号:11720-201106,纯度:99.7%);紫花牡荆素对照品(批号:111554-200503,纯度:98.9%);芹菜素对照品(批号:111901-201102,纯度:99.2%);绿原酸对照品(批号:110753-20041,纯度:99.4%)均购自中国食品药品检定研究院;乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)诊断试剂盒、乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)诊断试剂盒均购自上海科华生物工程股份有限公司;甲醇(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);水为纯化水;其余试剂均为分析纯。

### 1.4 病毒与细胞

甲型流感病毒(A3/京科/30/95)、狗肾细胞(MDCK细胞)(均由上海市卫生防疫站提供,经复旦大学实验室传代培养);HepG2 2.2.15细胞(取自北京大学第一医院传染病科病毒室,经复旦大学实验室传代培养)。

## 2 方法与结果

### 2.1 一枝蒿提取物指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Comosil-waters C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.2%甲酸(B),梯度洗脱(0~5 min,8% A→20% A;>5~35 min,20% A→30% A;>35~60 min,30% A;>60~95 min,30% A→27% A;>95~105 min,27% A→30% A;>105~110 min,30% A→33% A;>110~165 min,33% A→45% A;>165~215 min,45% A→60% A;>215~230 min,60% A→80% A;>230~245 min,80% A→95% A;>245~250 min,95% A);流速:1 ml/min;检测波长:370 nm;进样量:10 μl;柱温:30 ℃。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取一枝蒿人工种植和野生药材各500 g,粉碎,分别用30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇和水5 000 ml,加热回流提取3次,每次1 h,滤过,合并滤液,滤液减压浓缩干燥,制成浸膏,备用。50%乙醇提取物适量加

水混悬,分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取3次,合并相应萃取液,减压浓缩干燥,制成浸膏,即得一枝蒿(人工种植/野生)30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇、水、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、残留液提取物(下述以S<sub>n</sub>表示),备用。本研究通过预试验发现,石油醚提取物、氯仿提取物抗病毒活性较弱,且色谱峰个数很少,因此在计算共有峰时,将以上4个样品舍去,对余下的16个样品进行活性分析。取上述16种提取物各0.1 g,精密称定,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)15 min,放冷,摇匀,0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取一枝蒿酮酸、紫花牡荆素、绿原酸、芹菜素、山柰素对照品适量,分别加甲醇溶解制成每1 ml含一枝蒿酮酸0.086 4 mg、紫花牡荆素0.048 mg、绿原酸0.056 mg、芹菜素0.041 mg、山柰素0.172 mg的对照品溶液。

2.1.4 精密度试验 取同一供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次,考察各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性。结果,各共有峰相对保留时间稳定,共有峰峰面积比值的RSD为0.61%~2.97%,符合指纹图谱技术要求中精密度试验的有关规定(RSD<3%),表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取同一供试品6份,按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,考察各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性。结果,各共有峰相对保留时间稳定,共有峰峰面积比值的RSD为2.39%~2.98%,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱研究技术的要求。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,分别在0、4、8、12、16、20 h时间进样,考察各共有峰相对保留时间的一致性。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%,表明供试品溶液室温放置在20 h内稳定。

2.1.7 一枝蒿不同溶剂提取物指纹图谱 将一枝蒿16个不同溶剂提取物按“2.1.2”项下方法制成供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录250 min色谱图及各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。然后应用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004年A版)软件建立共有模式,对一枝蒿不同溶剂提取物进行色谱峰匹配,得到HPLC共有峰指纹图谱,并计算相似度。

(1)不同提取部位指纹图谱参数 通过HPLC仪工作站和“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004年A版)软件,得到一枝蒿16个不同溶剂提取物的HPLC图谱叠加图。比较其色谱图,其中有9个色谱峰是共有的,确定为共有峰。其中9号峰紫花牡荆素含量较高、峰面积稳定、分离度较好,故将其作为参照峰。以紫花牡荆素色谱峰为参比峰,计算各相对峰面积。一枝蒿不同溶剂提取物的HPLC图谱叠加图见图1(S1:30%乙醇提取物人工种植品;S2:30%乙醇提取物野生品;S3:50%乙醇提取物人工种植品;S4:50%乙醇提取物野生品;S5:70%乙醇提取物人工种植品;S6:70%乙醇提取物野生品;S7:95%乙醇提取物人工种植品;S8:95%乙醇提取物野生品;S9:水提取物人工种植品;S10:水提取物野生品;S11:50%醇提取物乙酸乙酯萃取部位人工种植品;S12:50%醇提取物乙酸乙酯萃取部位野生品;S13:50%醇提取物正丁醇萃取部位人工种植品;S14:50%醇提取物正丁醇萃取部位野生品;S15:50%醇提取物萃取后人工种植品;S16:50%醇提取物萃取后野生品);一枝蒿不同溶剂提取物HPLC共有峰的相对峰面积见表1。

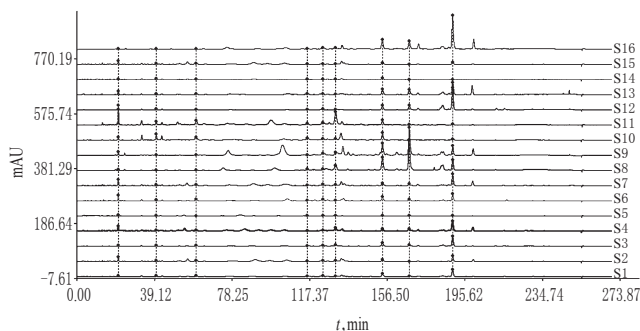


图1 一枝蒿不同溶剂提取物的HPLC图谱叠加图

Fig 1 Overlapping HPLC chromatogram of *A. rupestris* extracts from different solvents

表1 一枝蒿不同溶剂提取物HPLC共有峰的相对峰面积

Tab 1 Relative areas of common peaks of *A. rupestris* extracts from different solvents in HPLC fingerprints

提取物	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
S1	0.059	0.094	0.107	0.106	0.121	0.055	0.468	0.077	1.000
S2	0.434	0.084	0.194	0.042	0.223	0.154	0.448	0.039	1.000
S3	0.036	0.056	0.070	0.057	0.061	0.168	0.402	0.158	1.000
S4	0.203	0.063	0.090	0.090	0.173	0.424	0.235	0.299	1.000
S5	0.380	0.109	0.232	0.047	0.257	0.067	0.585	0.259	1.000
S6	0.261	0.045	0.131	0.053	0.121	0.098	0.252	0.217	1.000
S7	0.013	0.026	0.033	0.031	0.060	0.073	0.228	0.215	1.000
S8	0.138	0.047	0.111	0.082	0.180	0.038	0.521	0.455	1.000
S9	1.397	2.329	2.546	2.180	1.590	1.243	7.785	0.367	1.000
S10	0.927	0.174	0.401	0.110	0.377	0.415	0.756	0.099	1.000
S11	0.036	0.007	0.038	0.158	0.287	0.570	1.419	3.437	1.000
S12	0.174	0.020	0.053	0.044	0.316	0.424	1.686	3.758	1.000
S13	1.559	3.985	4.144	3.777	2.193	1.638	8.013	0.372	1.000
S14	13.242	3.649	7.806	3.988	4.027	28.153	8.149	0.459	1.000
S15	0.929	0.325	0.277	0.869	3.216	1.933	1.318	2.794	1.000
S16	0.011	0.005	0.005	0.010	0.074	0.039	0.323	0.272	1.000
均值	1.237	0.689	1.015	0.728	0.830	2.218	2.036	0.830	1.000
RSD, %	261.81	195.55	210.58	185.32	150.60	312.93	146.53	151.74	0

(2)一枝蒿16个不同溶剂提取物相似度的比较 对16个

不同溶剂提取物的HPLC图谱进行相似度计算,结果显示各部位相似度较低,各部位成分差异较大,以S4为对照图谱。一枝蒿不同溶剂提取物相似度评价结果见表2。

## 2.2 体外抗流感病毒试验

2.2.1 药物细胞毒性试验 将MDCK细胞按 $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 接种于96孔培养板,100  $\mu\text{l}$ /孔,置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 中培养24 h后,成细胞单层。加入用细胞维持液稀释的不同质量浓度待测药物(200、100、50、25、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 中继续培养72 h,显微镜观察细胞形态。以MTT法在590 nm波长处测定光密度(OD),计算细胞存活率,确定药物的半数毒性浓度( $\text{TC}_{50}$ )和最大无毒浓度( $\text{TC}_0$ )。每个质量浓度药物加入3孔,同时设正常细胞对照。阳性对照药物的细胞毒性试验按同法进行。细胞存活率(%)=(试验孔OD/对照孔OD) $\times 100\%$ 。

2.2.2 细胞病变抑制试验 按“2.2.1”项下方法得MDCK细胞单层。用不含血清的MEM培养液洗涤细胞2次,加入30倍致50%细胞病变浓度( $\text{TCID}_{50}$ )的病毒液,100  $\mu\text{l}$ /孔,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 吸附2 h,然后吸去病毒液,加入无毒质量浓度范围内倍比稀释的5个质量浓度的药物,分别为200、100、50、25、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。再经37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养72 h,每日显微镜下观察细胞病变(Cytopathic effect, CPE)情况。每个质量浓度药物加入3孔,试验同时设正常细胞对照组、阳性药物对照(利巴韦林)组及病毒对照组,与试验组同时观察CPE情况。以发生CPE细胞比例表示CPE的程度,按以下6级标准判断:(-)细胞正常生长,无病变出现;(±)细胞病变少于整个细胞单层的10%;(+)细胞病变少于整个细胞单层的25%;(++)25%~50%细胞产生病变;(+++)50%~75%细胞产生病变;(++++)75%~100%细胞产生病变。根据CPE的程度,采用Ree Muench法计算,确定药物半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ ),并结合细胞毒性试验结果得到药物治疗指数(Treatment index, TI)= $\text{TC}_{50}/\text{IC}_{50}$ 。

在一枝蒿不同溶剂提取物中,S2、S5、S6号呈现一定的抗流感病毒作用;S2、S3、S4、S5、S7、S8、S11、S12、S13、S14、S16号呈现一定的抗乙型肝炎病毒作用。一枝蒿不同溶剂提取物抗流感病毒活性结果见表3。

表2 一枝蒿不同溶剂提取物相似度评价结果

Tab 2 Results of similarity evaluation of *A. rupestris* extracts from different solvents

提取物	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	对照图谱
S1	1.000	0.582	0.923	0.703	0.149	0.727	0.718	0.413	0.301	0.348	0.203	0.892	0.760	0.453	0.432	0.890	0.819
S2	0.582	1.000	0.491	0.421	0.097	0.439	0.446	0.211	0.171	0.218	0.183	0.467	0.428	0.379	0.395	0.465	0.509
S3	0.923	0.491	1.000	0.751	0.162	0.752	0.679	0.494	0.352	0.323	0.231	0.961	0.812	0.351	0.293	0.960	0.863
S4	0.703	0.421	0.751	1.000	0.191	0.598	0.588	0.455	0.349	0.235	0.420	0.753	0.637	0.236	0.284	0.739	0.772
S5	0.149	0.097	0.162	0.191	1.000	0.196	0.195	0.257	0.186	0.140	0.178	0.155	0.207	0.210	0.176	0.162	0.278
S6	0.727	0.439	0.752	0.598	0.196	1.000	0.611	0.451	0.334	0.371	0.247	0.745	0.697	0.460	0.358	0.743	0.761
S7	0.718	0.446	0.679	0.588	0.195	0.611	1.000	0.350	0.254	0.202	0.216	0.675	0.583	0.523	0.812	0.671	0.705
S8	0.413	0.211	0.494	0.455	0.257	0.451	0.350	1.000	0.702	0.261	0.196	0.503	0.591	0.285	0.148	0.558	0.769
S9	0.301	0.171	0.352	0.349	0.186	0.334	0.254	0.702	1.000	0.197	0.132	0.357	0.452	0.218	0.113	0.401	0.678
S10	0.348	0.218	0.323	0.235	0.140	0.371	0.202	0.261	0.197	1.000	0.327	0.217	0.321	0.575	0.189	0.235	0.415
S11	0.203	0.183	0.231	0.420	0.178	0.247	0.216	0.196	0.132	0.327	1.000	0.135	0.176	0.304	0.231	0.116	0.376
S12	0.892	0.467	0.961	0.753	0.155	0.745	0.675	0.503	0.357	0.217	0.135	1.000	0.836	0.236	0.254	0.991	0.851
S13	0.760	0.428	0.812	0.637	0.207	0.697	0.583	0.591	0.452	0.321	0.176	0.836	1.000	0.341	0.253	0.836	0.840
S14	0.453	0.379	0.351	0.236	0.210	0.460	0.523	0.285	0.218	0.575	0.304	0.236	0.341	1.000	0.708	0.264	0.477
S15	0.432	0.395	0.293	0.284	0.176	0.358	0.812	0.148	0.113	0.189	0.231	0.254	0.253	0.708	1.000	0.254	0.410
S16	0.890	0.465	0.960	0.739	0.162	0.743	0.671	0.558	0.401	0.235	0.116	0.991	0.836	0.264	0.254	1.000	0.871
对照图谱	0.819	0.509	0.863	0.772	0.278	0.761	0.705	0.769	0.678	0.415	0.376	0.851	0.840	0.477	0.410	0.871	1.000

表3 一枝蒿不同溶剂提取物抗病毒活性结果(μg/ml)

Tab 3 Results of anti-virus activity of *A. rupestris* extracts from different solvents(μg/ml)

提取物	抗流感病毒作用			抗乙型肝炎病毒作用					
	IC <sub>50</sub>	CPE抑制率, %	TI	IC <sub>50</sub> (HBs)	HBsAg抑制率, %	IC <sub>50</sub> (HBe)	HBeAg抑制率, %	IC <sub>50</sub> (DNA)	胞外DNA抑制率, %
S2	76.0	25	1.45	106.2	62.3	-	-	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	-	138.4	53.6
S4	-	-	-	60.9	74.7	407.9	43.7	147.3	52.5
S5	65.8	50	3.80	257.0	39.1	-	-	136.8	53.4
S6	76.0	25	1.99	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	-	152.3	59.9	-	-	160.0	49.1
S8	-	-	-	221.5	47.0	199.6	44.9	-	-
S11	-	-	-	-	-	130.6	70.6	170.3	42.7
S12	-	-	-	26.4	81.7	101.8	72.9	137.7	52.1
S13	-	-	-	841.8	40.1	-	-	175.6	72.5
S14	-	-	-	149.0	63.5	-	-	207.6	54.1
S16	-	-	-	-	-	-	-	247.9	57.3

注:“-”表示无抗病毒活性

Note:“-”means no anti-virus activity

2.3 体外抗乙型肝炎病毒试验

2.3.1 样品溶液的制备 样品先用二甲基亚砜(DMSO)溶解为母液,临用前用细胞培养液将母液稀释为5个质量浓度。

2.3.2 样品的细胞毒性的检测 HepG2 2.2.15细胞在96孔细胞培养板中培养48 h后,加入上述所配不同质量浓度培养液,继续培养9 d,观察毒性(平行3孔)。

2.3.3 样品对乙型肝炎病毒抗原抑制作用的检测 HepG2 2.2.15细胞在96孔细胞培养板中培养48 h后,加入所配不同质量浓度培养液,继续培养9天(每3 d换液1次),收集上清液,用酶联免疫吸附(ELISA)法检测HBsAg和HBeAg表达(平行3孔)。

2.3.4 样品对分泌的病毒颗粒抑制作用的检测 将“2.3.3”项下上清液取100 μl,加100 μl 8%聚乙二醇8000,振荡混匀。4℃静置4 h或过夜放置,4℃下,以离心半径为12.5 cm、15 000 r/min离心15 min,弃去上清液。加100 μl 12% Chelex-100(树脂),振荡混匀,100℃加热10 min。取上清液2 μl,进行荧光定量聚合酶链反应(PCR)。一枝蒿不同溶剂提取物抗乙型肝炎病毒活性结果见表3。

2.4 一枝蒿不同溶剂提取物指纹图谱特征与其抗病毒作用的灰色关联度分析

2.4.1 原始数据变换(标准化,无量纲化) 原始数据的变换采用均值化变换法。

2.4.2 求绝对差序列 经数据变换的参考序列记为 $X_0(k)$ ,  $k=1, 2, \dots, n$ ;比较序列记为 $X_i(k)$ ,  $i=1, 2, \dots, m$ ;绝对差序列记为 $|X_0(k)-X_i(k)|$ 。

2.4.3 求关联系数 关联系数反映参考序列和比较序列的靠近程度。参考序列 $X_0(k)$ 与比较序列 $X_i(k)$ 的关联系数 $\zeta_i(k)$ ,可由下列公式算出: $\zeta_i(k) = [\min_i \min_k |X_0(k)-X_i(k)| + \rho \max_i \max_k |X_0(k)-X_i(k)|] / [|\min_i \min_k |X_0(k)-X_i(k)| + \rho \max_i \max_k |X_0(k)-X_i(k)|]$ 。其中, $\rho$ 为分辨系数,一般取0.5。 $\min_i \min_k |X_0(k)-X_i(k)|$ 为两极最小差,先分别由各比较序列 $X_i(k)$ 中 $i=1, 2, \dots, m$ 的每一个值与参考序列 $X_0(k)$ 中 $k=1, 2, \dots, n$ 的每一个值之绝对差值中取最小值,再由这些最小值当中选取最小值,记为

$\Delta_{\min}$ 。 $\max_i \max_k |X_0(k)-X_i(k)|$ 为两极最大差,先分别由各比较序列 $X_i(k)$ 中 $i=1, 2, \dots, m$ 的每一个值与参考序列 $X_0(k)$ 中 $k=1, 2, \dots, n$ 的每一个值之绝对差值取最大值,再由这些最大值当中选取最大值,记为 $\Delta_{\max}$ 。 $|X_0(k)-X_i(k)|$ 为各比较序列 $X_i(k)$ 中 $i=1, 2, \dots, m$ 的每一个值与参考序列 $X_0(k)$ 中 $k=1, 2, \dots, n$ 的每一个值之绝对差,记为 $\Delta_{oi}(k)$ 。所以,关联系数 $\zeta_i(k)$ 也可简化为下列公式: $\zeta_i(k) = (\Delta_{\min} + \zeta_i \Delta_{\max}) / (\Delta_{oi}(k) + \zeta_i \Delta_{\max})$ 。 $\zeta_i(k)$ 为比较序列 $X_i(k)$ 的第 $k$ 个元素与参考序列 $X_0(k)$ 的第 $k$ 个元素之间的关联系数。

2.4.4 求关联度 $r_i$   $r_i$ 为各类关联系数的平均值,公式为 $r_i = 1/n \sum_{k=1}^n \zeta_i(k)$ 。

2.4.5 排关联序 将各子序列对同一母序列的关联度按大小顺序排列起来,组成关联序。

分别以一枝蒿不同极性提取物抗流感、抗乙型肝炎病毒作用的关联度向量(R)值为母序列,以一枝蒿不同溶剂提取物指纹图谱共有峰峰面积数据为子序列。运用灰色分析建模软件,通过Excel文件导入数据,获得一枝蒿不同溶剂提取物色谱指纹特征与其抗病毒作用之间的关联系数和关联序。据关联度的大小,确定各成分对抗流感、抗乙型肝炎病毒作用贡献的大小顺序。结果表明,一枝蒿不同溶剂提取物指纹图谱特征峰对其抗流感病毒的关联度顺序为9>4>8>6>1>3>7>2>5;抗乙型肝炎病毒的关联度顺序为7>9>5>8>4>2>1>6>3。通过对照品比对,其中9号峰为紫花牡荆素,1号峰为绿原酸。一枝蒿不同溶剂提取物的指纹特征与抗流感病毒、抗乙型肝炎病毒的关联系数见表4、表5;一枝蒿不同溶剂提取物指纹特征与抗流感病毒、乙型肝炎病毒的关联度见表6。

表4 一枝蒿提取部位指纹特征与抗流感病毒的关联度

Tab 4 Correlation coefficient of *A. rupestris* extracts from different solvents of fingerprint characteristics and anti-influenza virus

提取物	关联度								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S2	0.381 4	0.661 2	0.564 7	0.665 7	0.525 1	0.418 9	0.663 8	0.333 3	1.000 0
S5	0.398 9	0.343 0	0.343 0	0.736 7	0.343 0	0.490 0	0.343 0	0.606 6	1.000 0
S6	1.000 0	0.351 9	0.633 0	1.000 0	0.423 9	1.000 0	0.374 2	1.000 0	1.000 0

表5 一枝蒿提取部位指纹特征与抗乙型肝炎病毒的关联度

Tab 5 Correlation coefficient of *A. rupestris* extracts from different solvents of fingerprint characteristics and anti-hepatitis B virus

提取物	关联度								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S2	0.800 2	0.940 1	0.894 0	0.854 9	0.674 6	0.834 6	0.981 7	0.783 5	0.995 8
S3	0.684 4	0.791 5	0.789 3	0.806 4	0.871 0	0.735 2	0.977 2	0.684 9	0.992 0
S4	0.929 6	0.802 5	0.827 8	0.934 1	0.608 3	0.921 7	0.790 5	0.703 8	0.991 2
S5	0.801 9	0.994 1	0.787 0	0.826 0	0.551 6	0.747 8	0.867 5	0.775 7	0.994 3
S7	0.457 3	0.512 3	0.512 5	0.535 5	0.739 6	0.483 1	0.634 9	0.504 0	0.981 8
S8	0.781 5	0.721 4	0.882 8	0.882 5	0.556 2	0.610 8	0.858 0	0.726 6	0.989 9
S11	0.339 2	0.333 3	0.348 0	0.471 5	1.000 0	0.424 7	0.965 4	1.000 0	0.410 3
S12	0.395 4	0.355 4	0.368 4	0.371 3	0.986 5	0.404 2	0.885 8	1.000 0	0.417 6
S13	0.932 8	0.384 9	0.449 7	0.384 9	0.498 6	0.794 4	0.621 7	0.703 9	0.721 8
S14	0.492 3	0.829 1	0.492 3	0.718 3	0.581 6	0.492 3	0.761 2	0.502 1	0.507 2
S16	0.343 3	0.343 9	0.340 1	0.356 5	0.820 5	0.350 5	0.661 0	0.406 0	0.971 2

表6 一枝蒿不同溶剂提取物指纹特征与抗流感病毒、乙型肝炎病毒的关联度

Tab 6 Association degree of fingerprint of *A. rupestris* extracts from different solvent with anti-influenza virus and anti-hepatitis B virus

关联序	抗流感病毒作用		抗乙肝病毒作用	
	峰号	关联度	峰号	关联度
1	9	1.000 0	7	0.833 7
2	4	0.850 6	9	0.831 1
3	8	0.735 0	5	0.740 4
4	6	0.727 2	8	0.732 5
5	1	0.695 1	4	0.678 5
6	3	0.635 2	2	0.667 4
7	7	0.595 3	1	0.663 2
8	2	0.589 0	6	0.649 9
9	5	0.573 0	3	0.641 0

### 3 讨论

本研究对一枝蒿的20个提取物进行了研究,在30%乙醇提取物、50%乙醇提取物、70%乙醇提取物、95%乙醇提取物和水提取物样品中,发现50%乙醇提取物峰个数最多、峰面积最大,因此将50%乙醇提取物作为进一步提取物。

一枝蒿药材的主要有效成分为黄酮类和倍半萜类化合物。黄酮类化合物一般采用乙醇、甲醇、乙酸乙酯等提取。一枝蒿酮酸为倍半萜类化合物,虽然结构中含有极性较大的羧基,但水溶性很差,乙醇对其则有较好的提取效果<sup>[11]</sup>。因此,综合黄酮类化合物和一枝蒿酮酸的溶解性,选择50%乙醇作为提取溶剂。在50%乙醇提取物和乙酸乙酯提取物中,化合物峰最多,含量也最高,药理学结果表明,其抗病毒活性也是最强。

中药药效物质辨识一直是中药现代化研究的难点和热点问题。在中药的HPLC指纹图谱中,每一个特征峰代表其内部一种化学成分。中药的药效是其内部各化学成分协同作用的结果,指纹特征与药效必然存在某种关联<sup>[12]</sup>。近年来,很多学者用多种统计分析方法来研究中药指纹图谱与其药效学的关系,灰色关联度方法则是其中之一。灰色关联度分析对样品数量多寡没有严格要求,不要求序列数据必须符合正态分布,不会产生与定性分析大相径庭的结果<sup>[13-15]</sup>,因此本研究采用灰色关联度分析方法进行谱效关系评价。

本研究以体外细胞模型筛选一枝蒿提取物抗病毒效果,同时建立其HPLC指纹图谱,用灰色关联度分析技术,考察各化学成分对药效贡献的大小。从分析结果发现,一枝蒿提取物中4、9号峰在抗流感病毒中起到重要的作用,7、9号峰在抗乙型肝炎病毒中起到重要作用;其他色谱峰所对应的化合物对一枝蒿提取物的抗病毒药效有一定的贡献,也可能是有效

物质,今后将进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 闫秋娟,黎玉红,钟建华.新疆一枝蒿及其制剂的研究概况[J].新疆中医药,2008,26(2):87.
- [2] 刘冲,杨伟俊,顾政一,等.基于GenBank核酸数据库ITS2序列鉴定一枝蒿与其混淆品种[J].中国药房,2014,25(3):278.
- [3] 汪豪,杜慧斌,朱峰妍.新疆一枝蒿化学成分的研究[J].中国药科大学学报,2011,42(4):310.
- [4] 热依木古丽·阿布都拉,仲婕,佐艾热·艾孜江,等.新疆一枝蒿的质量标准研究[J].医药导报,2011,30(9):1 200.
- [5] 雍建平,赵江瑜.3-脱氧一枝蒿酮酸的合成及体外抗流感病毒活性研究[J].时珍国医国药,2011,22(1):19.
- [6] 郭姗姗,高英杰,时宇静.一枝蒿总黄酮体外抗乙型肝炎病毒作用机理的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(10):72.
- [7] 雍建平,聂礼飞.一枝蒿酮酸苯酯类衍生物的合成、体外抗流感病毒和单纯I、II型疱疹病毒活性研究[J].有机化学,2009,29(10):1 640.
- [8] 孟繁龙,李治建.一枝蒿有效部位对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].医药导报,2010,29(10):1 266.
- [9] 葛海涛,王晓磊,苏恺琪,等.复方一枝蒿片体外抗菌作用研究[J].中国医学创新,2014,11(5):101.
- [10] 杨巧丽,顾政一,黄华,等.金蒿抗流感滴丸对小鼠TNF- $\alpha$ 、IL-2和IFN- $\gamma$ 等细胞因子的影响[J].石河子大学学报,2012,30(1):57.
- [11] 雍建平,阿吉艾克拜尔·阿艾萨.一枝蒿酮酸的制备、纯度检测及结构解析[J].计算机与应用化学,2011,28(5):536.
- [12] 陈凯,窦月,陈智,等.板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):275.
- [13] 陶红,林庆锋,张韬,等.治疗手足口病中药的灰关联分析[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):282.
- [14] 陈华国,赵宏宾,赵超,等.虎杖提取物HPLC指纹图谱归属分析及谱效关系初探[J].中国药房,2010,21(19):1 775.
- [15] 刘瑜彬,王晖,唐晓峰,等.灰关联聚类法评价补中益气汤对大鼠气虚发热的效果[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):124.

(收稿日期:2014-07-10 修回日期:2014-12-05)

(编辑:张静)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅