

## 基于凝集活性检测的板蓝根颗粒质量生物测定方法研究

唐慧英<sup>1,2</sup>, 鄢丹<sup>1\*</sup>, 张少锋<sup>1,2</sup>, 李寒冰<sup>1</sup>, 刘荣华<sup>2</sup>, 肖小河<sup>1\*</sup>

(1. 解放军中药研究所 解放军第302医院, 北京 100039;

2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

**摘要:** 建立可用于板蓝根颗粒质量生物测定的新方法。采用红细胞凝集活性检测法, 对20批板蓝根颗粒抗病毒活性进行生物测定, 并以流感病毒神经氨酸酶 (NA) 抑制试验进行药效学验证。结果显示, 所建立方法简便易行, 重复性良好 (RSD = 2.0%); 所有测试样品均为阳性反应 (效价值 U 介于 2~11 之间), 具有较好的适用性; 红细胞凝集活性测定结果与流感病毒 NA 抑制活性测定结果之间相关性良好 ( $r^2 = 0.8783$ )。结果表明, 红细胞凝集活性测定法具有与药效相关、重复性好、经济安全、专属灵敏等特点, 可用于表征板蓝根颗粒质量生物活性信息, 以补充和完善板蓝根颗粒现行质量控制标准。

**关键词:** 板蓝根颗粒; 质量控制; 生物测定; 凝集活性; 红细胞

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2010) 04-0479-05

## Agglutinated activity bioassay method for the determination of antiviral potency of Banlangen granula

TANG Hui-ying<sup>1,2</sup>, YAN Dan<sup>1\*</sup>, ZHANG Shao-feng<sup>1,2</sup>, LI Han-bing<sup>1</sup>, LIU Rong-hua<sup>2</sup>, XIAO Xiao-he<sup>1\*</sup>

(1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**Abstract:** To establish a bioassay method and quality standard of Banlangen granula, agglutinated activity assay was used in the analysis of the traditional Chinese medicine, Banlangen granula. It showed that masculined effect could be picked up effectively and the products quality of different pharmaceutical factories and different batch numbers from the same factory could be revealed conveniently, accurately, quickly and directly with this method (valence value was between 2 and 11). The established bioassay method had a good reproducibility with RSD = 2%. The dependability of the activity of red cell agglutination and restraining influenza virus NA was conspicuous ( $r^2 = 0.8783$ ). In conclusion, this bioassay method is suitable to control and evaluate the quality of Banlangen granula. Thus the method may provide a simple and effective technique in supervising and examining the quality of other traditional Chinese medicine.

**Key words:** Banlangen granula; quality control; bioassay; agglutinated activity; erythrocyte

板蓝根颗粒 (Banlangen granula) 具有清热解毒、凉血利咽功效, 主要用于防治流感和病毒性感染。板

蓝根颗粒化学成分复杂、药效物质不明确, 现行版中国药典主要以精氨酸为鉴定指标<sup>[1]</sup>, 但是精氨酸并不是板蓝根颗粒的主要药效成分, 也不是专属性成分, 因此精氨酸的检识对板蓝根颗粒的质量控制意义较弱。

从生物活性测定角度, 建立与药效相关的中药质量生物测定方法已逐渐成为中药质量控制与评价研究的新趋势<sup>[2-5]</sup>。现代药理研究<sup>[6-11]</sup>表明, 板蓝根颗粒具有抗病毒、抑菌等药理作用, 且经鸡胚法、神经

收稿日期: 2009-08-04.

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09502-022, 2009ZX09308-005); 国家杰出青年科学基金项目 (30625042); 国家自然科学基金项目 (30873385).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66933324, Fax: 86-10-63879915,

E-mail: pharmacy302@126.com;

Tel: 86-10-66933325, Fax: 86-10-63879915,

E-mail: yd277@126.com

氨酸酶 (NA) 抑制试验等均已证实其抑制流感病毒作用与其凝集素的血凝活性具相关性。红细胞凝集活性的产生与抑制流感病毒、免疫应答及抗肿瘤等有关<sup>[12, 13]</sup>。如某些植物血凝素 (糖蛋白类成分) 可借助对糖基特异的识别和可逆结合的特点, 发挥阻断病毒与细胞的融合起到抗病毒作用, 并表现出与红细胞表面受体结合而发生凝集的特性。

板蓝根颗粒抑制流感病毒作用已证实其强弱与板蓝根颗粒的红细胞凝集活性正相关; 在此基础上, 本研究以神经氨酸酶 (NA) 抑制试验进一步验证其与药效的相关性。因此, 通过红细胞凝集试验可以表征板蓝根颗粒抗病毒作用的强弱, 可用于其药效评价和质量控制。在适宜的条件 (电解质、温度、pH) 下, 板蓝根颗粒中凝集素样成分与红细胞结合后, 产生凝集反应的程度, 通过比较凝集反应终点, 以反映其凝集活性的强弱。据此, 建立了基于凝集活性检测的板蓝根颗粒质量生物测定方法, 并通过流感病毒 NA 抑制试验对研究结果验证, 为建立板蓝根颗粒质量生物测定方法提供参考。

## 材料与方法

**仪器与试剂** 恒温培养箱 (SL303AB-3 型); 净化工作台 (CJ-2FD 型); 冷冻离心机 (3-18K/3k30 型); 倒置生物显微镜 (XS2-D2 型); 96 孔微量板 (V 型、底角呈 90°)。

板蓝根颗粒 (有糖/无糖型) 由北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂、广州白云山和记黄埔中药有限公司、云南通大生物药业有限公司等全国 10 余个生产厂家提供; 植物血球凝集素 (phytohemagglutinin, PHA-P, 批号: 048K1887) 由 Sigma 公司提供; 其余试剂均为分析纯。

**磷酸盐缓冲液 (PBS)** 取无水磷酸氢二钠 1.10 g、无水磷酸二氢钠 0.32 g、氯化钠 8.50 g, 加水使溶解成 1 L, 用 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液或 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液调至 pH 7.2, 分装灭菌, 放冷, 4 °C 保存备用。

**阿氏液 (Alsever's 液)** 取枸橼酸 0.5 g、枸橼酸钠 8.0 g、葡萄糖 20.5 g、氯化钠 4.2 g, 加水溶解并稀释至 1 L (pH 6.2 左右), 分装灭菌, 放冷, 4 °C 保存备用。

**1% 红细胞混悬液的制备** 取家兔血数毫升, 与等体积的阿氏液混合, 用适量 PBS 洗涤 3 次, 末次以 2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取压积红细胞适量, 用 PBS 制成 1% 红细胞混悬液, 于 4 °C 保存备用。

**供试品溶液的制备** 取板蓝根颗粒适量, 研细,

称取粉末 (过 3 号筛) 约 10 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入乙醇 100 mL, 称定重量, 充分搅拌, 加热回流 40 min, 放冷, 再称定重量, 用乙醇补足损失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 50 mL, 置水浴上蒸干, 残渣加 PBS 5 mL 使溶解, 除菌过滤, 即得。

**红细胞凝集活性检测** 在“V”形、底角呈 90° 的 96 孔微量板上, 用 PBS 将供试品溶液做 2 倍系列稀释, 每个供试品溶液做两排, 每孔加入 50 μL, 每排最后 1 孔加入 PBS 50 μL 作为阴性对照。再向每孔加入 1% 红细胞混悬液 50 μL, 轻拍微量板 30 s 混匀, 4 °C 静置 2 h 观察结果。

**红细胞凝集活性判断标准与效价计算** 将微量板置于白色背景之上, 将供试品孔与阴性对照孔比较。红细胞沉于底部成一规则的圆点而孔壁未粘有红细胞判为阴性 (-); 孔壁上均匀附着一层红细胞, 或红细胞未全部沉于底部, 部分附着于孔壁上均判为阳性 (+)。

以供试品出现阳性的最高稀释倍数为判定终点。如同批供试品溶液前后排结果相差在 1 个以上稀释度时应重试; 相差 1 个稀释度时, 则以两排结果中出现阳性的较低稀释度为本品的判定终点。按下式计算:

$$U = n - \log_2 C$$

式中  $U$  表示每 1 g 供试品含凝集活性单位;  $n$  表示出现阳性的最高稀释倍数;  $C$  表示供试品溶液的初始浓度 (g·mL<sup>-1</sup>); 供试品溶液每稀释一倍, 为一个凝集活性单位。

**流感病毒神经氨酸酶 (NA) 活性测定** 参考已广泛应用的 NA 抑制剂筛选方法<sup>[14-18]</sup>, 反应在 96 孔板中进行, 首先加入稀释的原酶液 25 μL 和样品溶液 25 μL, 室温下作用 30 min 后加 MUNANA (4-methylumbelliferyl-*D*-*N*-acetylneuraminase) 50 μL, 37 °C 孵育 60 min 后加入终止液 (0.1 mol·L<sup>-1</sup> 甘氨酸, 以 25% 乙醇配制, 1% NaOH 溶液调至 pH 10.7) 200 μL 终止反应, 测定荧光强度值, 设置激发波长为 355 nm, 发射波长 460 nm, 检测温度 37 °C。板蓝根颗粒对 NA 抑制活性的反应抑制率 ( $I$ ) 计算公式为<sup>[19]</sup>:

$$I = \frac{\text{酶活性对照荧光} - \text{样品作用后荧光}}{\text{酶活性对照荧光} - \text{背景荧光}} \times 100\%$$

## 结果

### 1 实验方法考察

#### 1.1 红细胞来源 (血源专属性)

取家兔、豚鼠、大鼠、绵羊、鸡和小鼠等 6 种实

验动物血各数毫升, 分别制得 1% 红细胞混悬液。按测定法对分别来源于 6 种实验动物的红细胞进行凝集反应试验。结果显示, 来源于家兔和小鼠的红细胞与板蓝根颗粒凝集素样成分结合后, 在上述实验条件下, 能产生凝集反应 (家兔凝集活性  $U = 9.99$ , 小鼠凝集活性  $U = 3.99$ ), 有明显的凝集反应终点, 说明板蓝根颗粒凝集素样成分的凝集反应有较强的血源专属性。同时, 采用不同浓度板蓝根颗粒样品作用于 1% 兔血红细胞混悬液, 结果显示凝集反应发生强度与样品浓度间存在良好的依赖性, 见图 1。考虑降低实验成本、减少动物损耗等因素, 最终优化选取 3 只或 3 只以上成年雄性家兔混合血, 经 PBS 洗涤等处理后的红细胞, 作为本研究生物活性测定用试验系。

### 1.2 红细胞混悬液活性标化

为满足对方法可靠性验证, 以 PHA-P 对红细胞混悬液的活性进行标化, 以确保本实验结果的可比性与重现性。

取 PHA-P 适量, 用 PBS 制成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  PHA-P 的阳性对照溶液。以此阳性对照为基准, 依法进行操作, 对 5 批红细胞混悬液的凝集活性进行了标化 (每批 6 个复孔)。在上述条件下, 5 批红细胞混悬液的凝集活性基本一致。效价平均值 9.04, RSD 1.8%。因此可将红细胞混悬液活性标化描述为: 以  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 PHA-P 为基准, 1% 红细胞混悬液出现阳性反应的效价平均值  $U = 9.00$ 。

### 1.3 重复性

取同一批板蓝根颗粒 (无糖型, 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号: 8112398), 研磨成粉, 取约 10 g, 精密称定, 共 6 份, 依法测定。效价平均值 9.97, RSD 2.0%。表明所建立的板蓝根颗粒凝

集活性测定方法重复性良好。

### 1.4 中间精密度

为考察实验室内部条件改变对测定结果的影响, 研究过程中分别对同实验室不同人员和不同工作日进行了考察。

**1.4.1 不同实验人员** 对 6 名实验人员进行编号, 称取同批板蓝根颗粒, 研磨成粉, 取约 10 g, 精密称定, 共 6 份, 依法测定。效价平均值 9.95, RSD 1.6%。结果表明, 不同实验人员之间的中间精密度良好。

**1.4.2 不同工作日 (日间精密度)** 分别称取同批板蓝根颗粒, 研磨成粉, 取约 10 g, 精密称定, 共 6 份, 于第 1 天、第 2 天……第 6 天分别平行操作测定。效价平均值 9.92, RSD 1.9%。可以看出, 所建方法不同工作日 (日间精密度) 的中间精密度良好。

### 2 不同来源板蓝根颗粒红细胞凝集活性测定

经上述方法学考察, 建立了基于凝集活性检测的板蓝根颗粒质量生物测定方法及标准, 按所建方法对 20 批板蓝根颗粒质量进行了生物测定, 结果见表 1。

### 3 流感病毒神经氨酸酶 (NA) 抑制试验验证

依法对上述 20 批板蓝根颗粒进行抑制流感病毒 NA 活性的检测, 并考察血细胞凝集活性检测与 NA 抑制试验检测结果的关系。结果见表 1。

结果表明, 板蓝根颗粒的红细胞凝集效价 ( $X$ ) 与其对流感病毒 NA 抑制活性 ( $Y$ ) 之间相关性良好 ( $Y = -0.050 6X + 1.264$ ,  $r^2 = 0.878 3$ ), 两种测定方法结果总体趋势较为一致。

### 讨论

本文采用血细胞凝集活性测定法进行板蓝根颗粒生物效价测定, 为药效成分不清、缺乏适宜的化

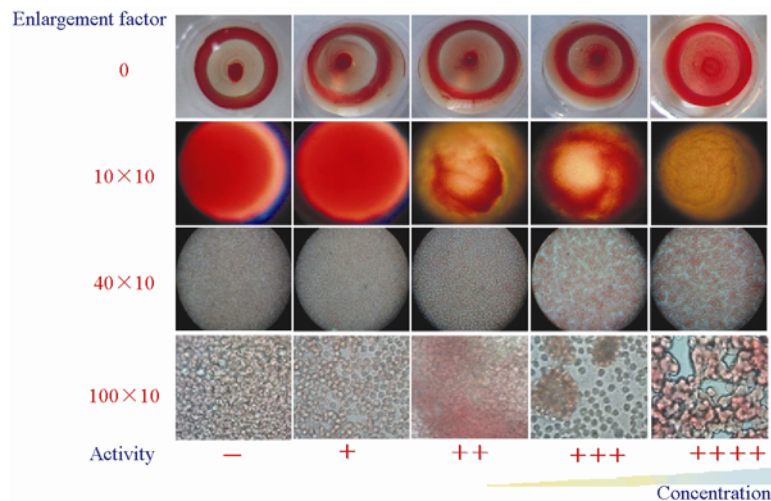


Figure 1 Observation and judgment of hemagglutination

**Table 1** Determination results (valence value) of Banlangen granula

Serial	Agglutination	IC <sub>50</sub> /mg·mL <sup>-1</sup>
BLgkl_01	7.52	0.93
BLgkl_02	7.07	1.01
BLgkl_03	8.96	0.76
BLgkl_04	8.87	0.81
BLgkl_05	10.01	0.84
BLgkl_06	11.07	0.62
BLgkl_07	8.12	0.84
BLgkl_08	10.07	0.75
BLgkl_09	8.97	0.97
BLgkl_10	11.04	0.65
BLgkl_11	4.04	1.08
BLgkl_12	5.07	0.98
BLgkl_13	10.97	0.67
BLgkl_14	4.01	1.08
BLgkl_15	9.98	0.71
BLgkl_16	2.01	1.13
BLgkl_17	3.21	1.11
BLgkl_18	2.04	1.11
BLgkl_19	3.12	1.12
BLgkl_20	4.08	1.01

学测定指标药物的药效评价和质量控制提供了新的研究思路和方法。实验测得所有测试样品均为阳性反应, 效价值U介于2~11之间, 所建立方法简便易行, 重复性好 (RSD = 2.0%), 且红细胞凝集活性测定结果与流感病毒 NA 抑制活性测定结果之间相关性良好 ( $r^2 = 0.8783$ )。结果表明, 红细胞凝集活性测定法具有与药效相关、重复性好、经济安全、专属灵敏等特点, 可用于表征板蓝根颗粒质量生物活性信息, 以补充和完善板蓝根颗粒现行质量控制标准。

中药质量生物活性测定方法所用的试验系可采用整体动物、离体器官、血清、微生物和组织、细胞、亚细胞器、受体、离子通道和酶等, 其选择的基本原则应遵循: ① 与实验原理和测定指标密切相关; ② 选择背景资料清楚、影响因素少、检测指标灵敏和成本低廉的试验系; ③ 遵循“优化 (refinement), 减少 (reduction) 和替代 (replacement)”的“3R”原则, 如尽可能使用小鼠、大鼠和家兔等来源多、成本低的实验动物。结合经济、伦理和推广应用考虑, 本研究在血源专属性考察的基础上选择以兔血作为试验系。

鸡胚培养法、流感病毒 NA 抑制法是测定板蓝根颗粒抗流感病毒的常用方法, 而临床疗效是其质量最终和最好的评价方法, 但是二者所受影响因素较多, 如人体、动物差异的影响、周期长、费用高, 缺少灵敏性等, 因而不适合作为板蓝根颗粒生物检定

的常规方法。本文采用的红细胞凝集活性测定法以体外细胞生物反应试验为基础, 借助红细胞凝集与板蓝根颗粒抗病毒有较强的相关性而建立, 实验过程中注重方法的专属性、整体的可控性、疗效的相关性, 并兼顾了经济环保的要求。该方法弥补和完善了现行质量控制标准, 为板蓝根颗粒等抗病毒类药物质量生物测定研究提供了技术参考。

## References

- [1] China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 487-488.
- [2] Xiao XX, Jin C, Zhao ZZ, et al. Probe into innovation and development of pattern of quality control and evaluation for Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1377-1381.
- [3] Wang P, Qian ZZ. The readable explanation of the editorial outline of Chinese Pharmacopoeia 2010 edition [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28: 337-340.
- [4] Zhang GJ. Bioassay of General Chinese Medicines (常用中药生物鉴定) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 179.
- [5] Zhou HJ. Drug Bioassay (药品生物检定) [M]. Beijing: People's Medical Press, 2005: 9-11.
- [6] Yamada H. Antiviral compositions containing new glycoprotein from *Isatis tinctoria* [P]. JP: 1160,599 [9960,599], 1999-03-02.
- [7] Lin CW, Tsai FJ, Tsai CH, et al. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds [J]. Antiviral Res, 2005, 68: 36-42.
- [8] Hu XC, Zheng WQ. Resistance to *Isatia indigotica* Fort lectin inhibit influenza virus [J]. J Shanghai Teach Univ (上海师范大学学报), 2003, 32: 62-65.
- [9] Hu XC, He N, Tang SH. A comparative study on different extraction methods on protein in *Isatis indigotica* Fort [J]. J Shanghai Teach Univ (上海师范大学学报), 2004, 33: 66-69.
- [10] Liu SY. Screening on anti-virus efficient composition of Radix Isatidis [J]. J Jiangxi Coll Tradit Chin Med (江西中医学院学报), 1999, 4: 183.
- [11] Hu XC, Du YH. Progression of research on amino acid analysis in Radix Isatidis [J]. J China-Inter Med Sci (中华国际医学杂志), 2004, 4: 130-133.
- [12] Song ZY, Liu JT. Modern Pharmacology (当代药理学) [M]. Beijing: People's Health Press, 1997: 408-409.
- [13] Sun XX, Zhang LL, Sun CL. The anti-virus effect of an

- active ingredient from a Chinese traditional herb — *Isatis indigotica* Fort [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2007, 23: 835–836.
- [14] Cao HP, Tao PZ, Du GH. Establishment and application of high throughput screening model for influenza virus neuraminidase inhibitors *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2002, 37: 930–933.
- [15] Peng Y, Li WK. Recent development of studies on antiviral phytomedicines in abroad [J]. *World Phytomed* (国外医药·植物药分册), 1999, 14: 7.
- [16] Cann AJ. *Virus Culture A Practical Approach* [M]. New York: Oxford University Press, 1999: 56–60.
- [17] World Health Organization. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance [G]. 17–21.
- [18] Colman PM. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies and inhibitors [J]. *Protein Sci*, 1994, 3: 1687–1696.
- [19] Li HB, Yan D, Wang JB, et al. Study on the biological evaluation of *Radix Isatidis* based on neuraminidase activity assay [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2009, 44: 162–166.

### 关于评选第 13 届中国药学会-施维雅青年药物化学奖和专项研究资助项目的通知

中国药学会-施维雅青年药物化学奖和专项研究资助项目是由中国药学会与法国施维雅研究院共同设立的, 每年评选一次, 旨在鼓励中国优秀青年药物化学工作者立足于中国国内致力于新药研究。设奖十多年来, 有力推动了我国优秀青年药物化学工作者的健康成长和科学发展。第 13 届评选工作已经开始, 欢迎国内高等医药院校、科研机构积极推荐青年学者申报。

根据设奖宗旨和国内药物化学学科发展的实际情况, 2010 年的奖励办法为: (1) 继续面向全国, 奖励 3 名从事药物化学研究的青年药物化学 (合成药物和天然药物) 学者; 获奖者每人可获得奖金 15 000 元人民币以及奖杯和证书。(2) 面向边远地区的专项资助项目, 奖励 1 项研究课题, 经费为 50 000 元人民币, 二年内完成; 并颁发专项资助项目证书。(3) 如当年专项资助项目空缺, 则青年药物化学奖奖励名额为 5 名。奖金和专项研究经费均由法国施维雅研究院提供。

有关获奖候选人及专项研究资助项目申请人条件、评审材料报送要求和评审程序和颁奖时间等事宜可从中国药学会网站 ([www.cpa.org.cn](http://www.cpa.org.cn)) 查询相关通知。

联系人和征集截止时间:

联系人: 孙文虹 (010-58699275-819)、鲁毅 (010-58699275-820)

地址: 北京市朝阳区建外大街 4 号建外 SOHO 九号楼 18 层

邮编: 100022 传真: 010-58699125

E-mail: [sunwenhong2002@163.com](mailto:sunwenhong2002@163.com)

征集截止时间: 2010 年 4 月 30 日