

中药防风抗流感病毒活性及不同极性部位的谱效相关性分析

姜晓琳¹,张继秋¹,徐瑞蕊¹,蒋明浩¹,亢倩丽¹,杨勇²,巩丽丽^{2*}

¹山东中医药大学药学院;²山东中医药大学实验中心,济南 250355

摘要:研究防风不同极性部位指纹图谱与抗流感病毒活性的谱效关系,推断防风中具有抗流感病毒活性的有效成分。本实验采用细胞病变效应(cytopathic effect,CPE)法检测防风不同极性部位的抗流感病毒活性;建立防风不同极性部位的UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS指纹图谱;采用Spearman分析、灰色关联度分析(GRA)及偏最小二乘回归(PLSR)分析法分析防风不同极性部位的UPLC特征指纹峰与其抗流感病毒活性之间的谱效关系。在标定的28个特征指纹峰中,确定了1、5、7、11、13、20、24号峰与抗流感病毒活性呈正相关,其对应的物质依次是焦谷氨酸、divaricataicid、升麻苷、亥茅酚苷、补骨脂素、异嗪皮啶、5-羟基-8-甲氧基补骨脂素,为深入研究防风抗流感病毒活性物质基础提供实验基础。

关键词:防风;超高效液相色谱-串联四级杆静电场轨道阱高分辨质谱;抗流感病毒;谱效相关

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)3-0473-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.3.017

Spectrum-activity relationships between UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS fingerprints and anti-influenza virus of *Saposhnikovia divaricata* different polar parts

JIANG Xiao-lin¹,ZHANG Ji-qiu¹,XU Rui-rui¹,JIANG Ming-hao¹,KANG Qian-li¹,YANG Yong²,GONG Li-li^{2*}

¹School of Pharmacy,Shandong University of Traditional Chinese Medicine;

²Experience Center of Shandong University of Traditional Chinese Medicine,Jinan 250355,China

Abstract:The spectral-effect relationship between the fingerprints of different polar parts of *Saposhnikovia divaricata* and the anti-influenza virus activity was investigated,and the effective components of *S. divaricata* with anti-influenza virus activity were deduced. In this study,the cytopathic effect (CPE) method was used to detect the anti-influenza virus activity of different polar parts of *S. divaricata*,and the UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS fingerprints of different polar parts of *S. divaricata* were established;Spearman analysis,gray correlation analysis (GRA) and partial least squares regression (PLSR) analysis were adopted to analyze the spectral-effect relationship between the characteristic fingerprint peaks of UPLC and its anti-influenza virus activity. Among the 28 characteristic fingerprint peaks of calibration,peaks 1,5,7,11,13,20 and 24 were positively correlated with the anti-influenza virus activity,and the corresponding constituents were pyroglutamic acid,divaricataicid,prim-o-glucosylcimifugin,sec-o-glucosylhamaudol,psoralen,isofraxidin and 5-hydroxy-8-methoxypsoralen. The collective results will provide experimental basis for in-depth research on the active substance basis of anti-influenza virus of *S. divaricata*.

Key words:*Saposhnikovia divaricata*;UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS;anti-influenza virus;spectrum activity relationship

防风为伞形科植物防风(*Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk.)未抽花茎的干燥根。味辛、甘,微温,归膀胱、肝、脾经,有祛风解表、胜湿止痛、

止痉的功效^[1,2]。防风的化学成分主要包括色原酮类、香豆素类、有机酸、多糖类等^[3,4]。Yao等^[5]通过研究白芷、防风、紫苏叶单味药材及配伍体外对呼吸道核胞病毒的影响,结果证明防风具有抗呼吸道核胞病毒的活性,且与紫苏配伍后效果显著,但是关于其单一味药抗病毒活性的药效成分及作用机制尚未见报道。因此本实验欲采用CPE法证实防风单味

收稿日期:2019-12-16 接受日期:2020-04-15

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81774167);山东中医药大学2019年大学生创新训练计划(S201910441036)

*通信作者 Tel:86-531-89628192;E-mail:lilygong.sd@163.com

药的抗流感病毒活性及其抗流感病毒活性成分。近年来指纹图谱技术用于中药研究非常广泛,能够对中药复杂的化学成分进行表征,但是无法体现与药效的关联性。中药谱效关系学是将指纹图谱与其药效作用结合起来,不仅可以使指纹图谱中化学成分体现出相应的药效,而且还能阐明指纹图谱特征与药效的相互关系,确定相应的药效物质基础,从而使构建的药效指纹图谱更有针对性的控制中药质量^[6]。高效液相色谱-串联四级杆静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS)采用高效液相色谱对复杂混合物进行快速分离,结合高性能四级杆的母离子选择性与高分辨的准确质量数 Orbitrap 检测技术实现对复杂样品的定性和定量分析,具有灵敏度高、准确度高、检测效率高等特点^[7]。本实验建立防风不同极性部位 LC-MS 指纹图谱,比较不同极性部位的抗流感病毒活性,采用 Spearman 分析、灰色关联度分析及最小偏二乘回归分析三种方法分析防风不同极性部位与抗流感病毒活性的谱效关系,根据秩相关系数、关联度及 VIP 值共同推断出主要药效成分,为防风抗流感病毒药效的物质基础研究提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

EYELAN-1100 旋转蒸发器(日本东京理化器械株式会社);XMTD-204 恒温水浴锅(天津赛得利斯实验分析仪器制造厂);1/10 万电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);Centrifuge 5418 离心机(Eppendorf 公司);KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UltiMate 3000 超高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司);UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS(美国 Thermo 公司);SD-CJ-ID 生物安全柜(苏州净化设备厂);HF90 CO₂ 恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司);CKX-31 倒置显微镜(olympus 公司);TC20 细胞计数仪(Bio-Rad 公司);移液枪(Eppendorf 公司)。

1.2 材料

防风(批号 2019.03.22),经由山东中医药大学中药鉴定教研室徐凌川教授鉴定为伞形科防风属植物防风(*Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk.) 的干燥根。环己烷(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);二氯甲烷(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);乙酸乙酯(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);正丁醇(分析纯,天津市富宇

精细化工有限公司);甲醇(G,R,天津市四友精细化学品有限公司);利巴韦林注射液(Rebavimrin injection,山东鲁抗辰欣药业股份有限公司,批号 1612246411,浓度 50 mg/mL);酪氨酸(批号 140609-200610,纯度:99.57%)、咖啡酸(批号 110885-201703,纯度 99.65%)、7-羟基香豆素(批号 111739-200501,纯度 99.48%),均购于上海恒远生物科技有限公司;娃哈哈纯净水、蒸馏水;DMSO 溶液(1427C108);DMEM 培养基(Gibco 公司);PBS 缓冲溶液(Gibco 公司);胰酶(Gibco 公司);新生牛血清(ABW);青霉素和链霉素(Hyclone);MDCK 细胞(由山东省医学科学院基础医学研究所微生物室提供,本科室保存);H1N1 病毒(2000 年 10 月引自中国预防医学科学院病毒所毒种室)。

2 实验方法

2.1 防风不同极性部位的制备

称取 200 g 防风药材,粉碎,过 2 和 4 号筛,得粗粉。加十倍量甲醇,超声提取 30 min,重复两次,合并滤液,抽滤,得到滤液。减压回收溶剂,得到浸膏。加入适量的蒸馏水,制成混悬液,然后依次用等量的环己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水各萃取两次,得到各部位的萃取液。减压回收各部位溶剂,得到各极性部位浸膏和粉末。

2.2 防风不同极性部位的抗病毒活性

2.2.1 防风不同极性部位供试品溶液的制备

称取防风各极性部位浸膏适量,用 DMEM 培养基溶解,配成 50 mg/mL 的溶液。

2.2.2 病毒毒力的测定

将处于对数生长期的 MDCK 细胞用 0.25% 的胰酶消化,调整细胞浓度至 1×10^4 个/mL,每孔 100 μ L 接种至 96 孔板,恒温培养箱内培养长至单层,弃掉培养液。依次加入 10 倍系列稀释的 H1N1 病毒液 100 μ L,每个浓度重复四孔,同时设置细胞对照。在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 条件下恒温培养箱内培养 24 h,各孔分别加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μ L,培养 4 h,吸弃染液,加入 DMSO 溶液 100 μ L,室温下脱色 10 min,震荡 6 min,酶标仪测 490 nm 下的 OD 值,根据 Reed-Muench 公式计算病毒的半数感染浓度 TCID₅₀。

细胞存活率 = 各组 OD 值 / 正常细胞 OD 值 \times

细胞比距 = (高于 50% 病变率 - 50%) /

(高于 50% 病变率 - 低于 50% 病变率) \times 100%

TCID₅₀ = Antilog (Ig 高于 50% CPE 百分率病毒

稀释度 + 比距 × 稀释因子对数)

2.2.3 药物对细胞的毒性作用

按照 2.2.1 中方法将防风各极性部位药物用 DMEM 培养基按 2 倍比稀释 10 个浓度梯度, 依次接种于 MDCK 细胞已经长成单层的 96 孔板中, 每个浓度重复 3 孔, 同时设置正常细胞对照组, 37 °C, 5% CO₂ 条件下恒温培养箱内培养 24 h, 倒置显微镜下观察细胞病变程度, 用 MTT 染色, 用酶标仪在 490 nm 下测定 OD 值, 根据 Reed-Muench 公式计算细胞半数中毒浓度 TC₅₀, 找到最大无毒浓度 TC₀。

2.2.4 药物体外抗病毒实验方法

将 1 × 10⁴ 个/mL 处于对数生长期的 MDCK 细胞接种于 96 孔板上, 每孔 100 μL, 待细胞长成单层后, 吸弃培养液, 将药物从最大无毒浓度开始, 按二倍比系列稀释共 12 个浓度, 设细胞对照、病毒对照、利巴韦林为阳性对照 (10 mg/mL), 每个浓度重复 3 孔, 除细胞对照外, 各孔加入 50 μL 含 100 个 TCID₅₀ 的病毒液, 混合均匀。37 °C, 5% CO₂ 条件下培养箱中培养, 观察病毒对照组病变情况, 待细胞出现 90% 及以上病变时采用 CPE 法记录各组药物抑毒情况, 用 MTT 法测量 OD 值, 根据 Reed-Muench 公式计算防风各极性部位的半数有效浓度 (EC₅₀) 及治疗指数 (TI), C 为供试品初始浓度。

$$EC_{50} = [Antilog(\text{高于 } 50\% \text{ CPE 百分率病毒稀释度的值-比距})] \times C$$

$$\text{治疗指数 (TI)} = \text{半数毒性浓度 (TC}_{50}\text{)} / \text{半数有效浓度 (EC}_{50}\text{)}$$

2.3 防风不同极性部位 LC-MS 指纹图谱的建立

2.3.1 防风不同极性部位供试品溶液的制备

称取防风甲醇总提取物及相当于生药量 1 g 的环己烷部位、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和萃取后水部位浸膏, 用 70% 甲醇溶解, 配成浓度分别为 11.52、3.75、0.63、5.97、150.75 mg/mL 的供试品溶液。

2.3.2 LC-MS 液质条件

Halo-C₁₈ 柱 (100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm), 流动相 0.05% 甲酸水溶液 (A)-0.05% 甲酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 4 min, 5% B; 4 ~ 8 min, 5% → 15% B; 8 ~ 23 min, 15% → 75% B; 23 ~ 28 min, 75% → 100% B; 28 ~ 30 min, 100% B), 柱温 30 °C, 进样量 3 μL, 体积流量 0.3 mL/min。源内温度 320 °C, 辅助气温度 350 °C, S-lenS RF 水平 55%, 分辨率 70 000, 质谱扫描范围 *m/z* 80 ~ 1 200。

2.3.3 精密度试验

取防风甲醇总提取物样品制备供试品溶液 1 份, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 以 7 号峰为参照物峰, 计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 其 RSD 值均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验

取防风甲醇总提取物样品制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 记录色谱图, 以 7 号峰为参照物峰, 计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 其 RSD 值均小于 3%, 表明实验重复性良好。

2.3.5 稳定性试验

取防风甲醇总提取物样品制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录色谱图, 以 7 号峰为参照物峰, 计算各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 其 RSD 值均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 数据分析

本实验数据的 Spearman 分析、灰色关联度分析及偏最小二乘回归分析采用 Excel 2016、Simca-p 19.0 软件处理。

3 结果与分析

3.1 抗流感病毒实验结果

根据文献^[8], 一般认为 TI 值 ≥ 2.00, 证明药物有抗病毒活性, TI 值 ≥ 4.00, 其抗病毒成分有研究价值。本实验研究结果表明, 防风不同极性部位药物对 H1N1 流感病毒均有不同程度的抑制作用, 其中水部位药物抗 H1N1 流感病毒活性最高, 其 TI 值为 54.32, 甲醇总提取物部位药物抗 H1N1 流感病毒活性次之, 其 TI 值为 48.76, 其他部位的抗 H1N1 流感病毒活性相对较弱, 见表 1

3.2 数理统计与显著性检验

本文表格中 TC₅₀、EC₅₀ 由 CPE 观察得到。采用 SPSS 19.0 软件分析上述数据。选择单因素方差分析, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P* = 0.05 为显著性水准, 分析结果见图 1。与阳性对照药利巴韦林 (EC₅₀ 为 7.843 6 μg/mL, TI 为 36.25) 比较, 甲醇总提取物与萃取水部位差异显著 (*P* < 0.05), 抗流感病毒活性较强。

3.3 样品中成分的鉴定

取“2.3.1”的供试品溶液, 按照“2.3.2”的色谱条件进行分析, 得到防风不同极性部位指纹图谱, 见图 2。使用 Xcalibur 3.0 软件 (Thermo 公司, 美国)

表 1 防风不同极性部位抗 H1N1 病毒活性的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 Detection results of anti-H1N1 virus activity in different polarity parts of *S. divaricata* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

部位 Part	TC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)	TI
甲醇总提物 Total methanol extract (S1)	52.903 9 ± 0.068 00	1.085 0 ± 0.000 60	48.76 ± 0.006 00
环己烷部位 Cyclohexane (S2)	50.972 5 ± 0.000 30	9.292 6 ± 0.000 47	5.49 ± 0.001 50
二氯甲烷部位 Dichloromethane (S3)	34.706 4 ± 0.033 00	6.483 6 ± 0.004 47	5.35 ± 0.004 90
乙酸乙酯部位 Ethyl acetate (S4)	20.927 6 ± 0.000 30	6.691 1 ± 0.000 72	3.13 ± 0.000 06
正丁醇部位 N-butanol (S5)	56.908 4 ± 0.000 26	6.933 8 ± 0.000 64	8.21 ± 0.002 19
萃取后水部位 Water (S6)	3 726.006 0 ± 0.000 80	68.594 0 ± 0.000 62	54.32 ± 0.002 01
利巴韦林 Rebavirin injection (S7)	284.330 5 ± 0.002 09	7.843 6 ± 0.001 86	36.25 ± 0.000 56

对高分辨质谱信息进行数据分析,并结合相关文献及对照品的比对进行峰的指认,最终确定了 28 个色谱峰所对应的化合物,结果见表 2。

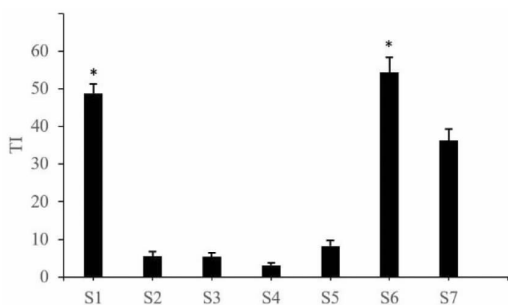
3.4 防风不同极性部位抗流感病毒活性的谱效相关性分析

3.4.1 防风不同极性部位总离子流图分析

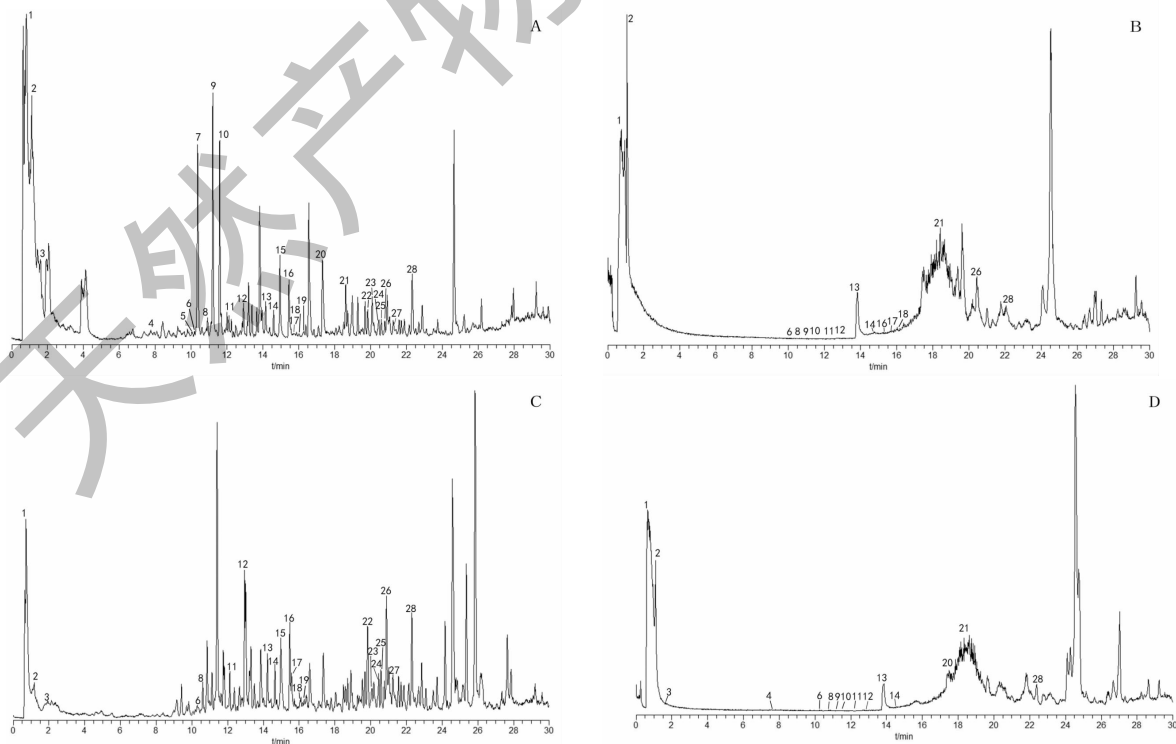
参考文献及对照品,对照甲醇总提物色谱峰,环己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水部位分别鉴定出 16、21、15、15、13 个化合物,如表 3。

3.4.2 Spearman 分析

Spearman 分析不仅能发现线性关系,也能发现单调的非线性关系;对分析的变量数据不需要正态性假设,还可以适用于等级数据(无法定量的顺序

图 1 防风不同极性部位抗流感病毒 TI 值比较 (t 检验)Fig. 1 Comparison of TI anti-influenza virus values in different polar parts of *S. divaricata* (t test)

注:与 S7 比较: * $P < 0.05$ 。Note: Compared with S7, * $P < 0.05$.



续图 2 (Continued Fig. 2)

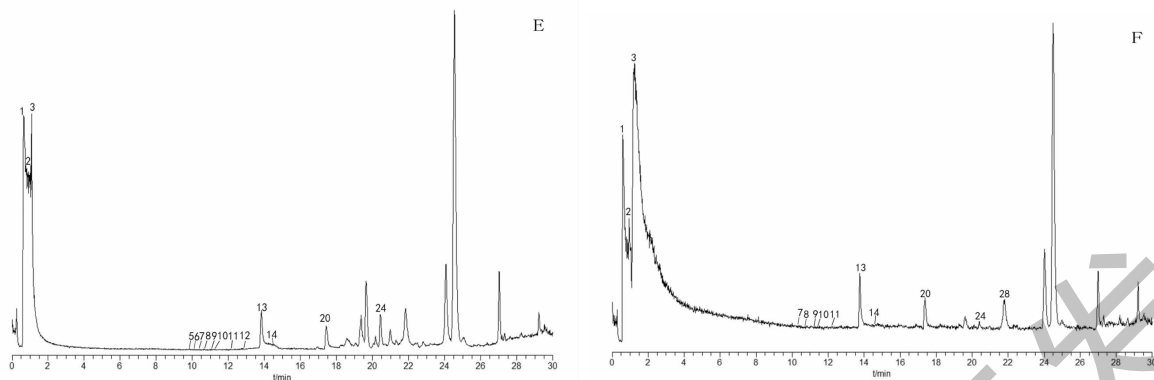


图2 防风不同极性部位在正离子模式下的UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS提取总离子流图

Fig. 2 The extract ion chromatogram of in positive ion mode from *S. divaricata* different polar parts using UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS

注: A: 甲醇提取总部位; B: 环己烷部位; C: 二氯甲烷部位; D: 乙酸乙酯部位; E: 正丁醇部位; F: 萃取后水部位。Note: A: Total part of methanol extraction; B: Cyclohexane part; C: Dichloromethane part; D: Ethyl acetate part; E: n-Butanol part; F: Water part after extraction.

表2 防风不同极性部位的LC-MS数据

Table 2 LC-MS data of different polar parts of *S. divaricata*

No.	t_R (min)	分子式 Formula	准分子离子 [M + H] ⁺ (m/z)	测量值 Calculated value	质谱数据 Mass data (m/z)	化学成分 Compound
1	0.98	C ₅ H ₇ NO ₃	130.049 9	130.049 3	84.045 0, 86.096 9	焦谷氨酸 ^[14]
2	1.08	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182.081 2	182.081 1	69.034 1, 123.044 5, 136.075 6, 165.054 5	酪氨酸*
3	1.61	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.104 0	268.103 7	136.061 7, 152.056 6, 269.107 5, 284.099 2	腺苷 ^[15]
4	7.75	C ₉ H ₈ O ₄	181.049 5	181.049 3	113.962 2, 131.972 7, 145.028 3, 163.037 8	咖啡因*
5	10.15	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	321.096 9	321.096 9	249.039 9, 303.085 8	divaricatacid ^[10-13]
6	10.27	C ₉ H ₆ O ₃	163.039 0	163.040 0	119.049 9, 131.050 8, 164.043 9	7-羟基香豆素*
7	10.32	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	469.170 4	469.170 0	289.106 0, 307.121 9, 451.162 7	升麻苷 ^[10-13]
8	10.58	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.049 5	193.050 1	133.028 8, 147.118 3	东莨菪素 ^[9]
9	11.18	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	307.117 6	307.118 4	235.061 3, 308.121 6	升麻素 ^[10-13]
10	11.23	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	453.175 5	453.177 7	231.067 0, 273.114 6, 291.126 0	5-O-甲基维斯阿米醇苷 ^[10-13]
11	12.10	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀	439.160 0	439.159 7	261.113 5, 307.123 2	亥茅酚苷 ^[10-13]
12	12.93	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	291.122 7	291.122 6	235.022 9, 246.183 8	5-O-甲基维斯阿米醇 ^[10-13]
13	14.12	C ₁₁ H ₆ O ₃	187.040 0	187.038 7	143.049 7, 188.041 5	补骨脂素 ^[9]
14	14.61	C ₁₂ H ₈ O ₄	217.049 5	217.049 2	202.025 1, 218.051 8	花椒毒素 ^[9]
15	15.16	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.080 8	269.080 1	83.060 9, 228.268 3, 277.105 7	杨芽黄素 ^[16]
16	15.43	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	277.107 1	277.106 4	205.049 9, 259.097 3	亥茅酚 ^[10-13]
17	15.58	C ₁₇ H ₁₈ O ₇	335.112 5	335.112 3	136.060 1, 263.054 2	白当归素 ^[16]
18	16.07	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	231.101 6	231.101 0	90.055 5, 147.091 5, 175.038 4, 232.103 8	骨脂醇 ^[16]
19	16.09	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	319.117 6	319.117 6	247.058 0, 301.105 5	3'-O-乙酰亥茅酚 ^[10-13]
20	17.66	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	223.060 1	223.060 5	193.123 4, 165.077 4, 208.037 0	异嗟皮啶 ^[9]
21	18.56	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	375.143 8	375.145 7	55.055 6, 83.050 6, 257.084 2	莱德博利醇 ^[10-13]
22	19.85	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.096 5	271.096 3	175.122 8, 203.034 1, 215.102 9	异欧前胡素 ^[9]
23	20.10	C ₁₈ H ₂₀ O ₆	333.133 3	333.133 3	177.163 1, 189.075 4, 244.178 0, 259.153 9	9'-O-propionyl lhamadol ^[10-13]

续表 2 (Continued Tab. 2)

No.	t_R (min)	分子式 Formula	准分子离子 [M + H] ⁺ (m/z)	测量值 Calculated value	质谱数据 Mass data (m/z)	化学成分 Compound
24	20.50	C ₁₂ H ₈ O ₅	233.044 4	233.043 7	174.045 5, 218.021 7, 235.063 4	5-羟基-8-甲氧基补骨脂素 ^[9]
25	20.51	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	329.138 4	329.138 2	83.049 7, 229.084 8, 247.095 3	紫花前胡素 ^[9]
26	20.54	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	301.107 1	301.107 1	69.071 0, 218.021 2, 233.044 6	珊瑚菜素 ^[9]
27	21.44	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	347.148 9	347.147 8	217.048 0, 259.094 0	3'-O-2-丁酰亥茅酚 ^[10-13]
28	22.38	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	359.148 9	359.148 7	200.236 5, 279.158 7	3'-O-当归酰亥茅酚 ^[10-13]

注: * 根据对照品确定的物质。

Note: * Substance identified by reference.

表 3 防风不同极性部位化合物峰强度

Table 3 Peak intensity of compounds in different polar parts of *S. divaricata*

No.	t_R (min)	化学成分 Compound	甲醇总提物 Total methanol extract	环己烷 Cyclohexane	二氯甲烷 Dichloromethane	乙酸乙酯 Ethyl acetate	正丁醇 N-butanol	水 Water
1	0.98	焦谷氨酸	16 656 896	1 417 937	96 786 688	1 169 927	28 388 096	123 714 304
2	1.08	酪氨酸	2 096 446	19 198	57 212 416	1 803 478	50 657 280	356 655
3	1.61	腺苷	984 357 120	1	38 823 680	6 762 210	12 841 472	3 675 857
4	7.75	咖啡酸	30 909	1	1	70 526	1	1
5	10.15	Divaricatacid	20 929 792	1	1	1	218 886	1
6	10.27	7-羟基香豆素	1 017 482	37 940	10 657 536	147 768	159 776	1
7	10.32	升麻苷	849 614 336	1	1	1	405 776	128 689
8	10.58	东莨菪素	132 085 760	668 748	1 189 357	1 139 685	479 701	769 918
9	11.18	升麻素	1 943 527 168	722 018	1	16 292 608	2 780 851	735 639
10	11.23	5-O-甲基维斯阿米醇苷	481 805	176 563	1	260 783	12 658 432	1 276 251
11	12.10	亥茅酚苷	301 423	11 331	2 769 080	300 615	1 038 772	47 722 562
12	12.93	5-O-甲基维斯阿米醇	307 744 512	61 047	319 985 152	121 284	246 495	1
13	14.12	补骨脂素	265 864 960	2 970 235	167 516 160	1 820 817	11 882 276	105 667 046
14	14.61	花椒毒素	350 486 784	872 264	177 823 488	578 885	439 498	368 186
15	15.16	杨芽黄素	1 366 439	1	3 741 431	1	1	1
16	15.43	亥茅酚	535 386 112	117 955	173 363 456	1	1	1
17	15.58	白当归素	25 556 480	86 477	300 310 272	1	1	1
18	16.07	骨脂醇	18 038 784	37 822	266 814 208	1	1	1
19	16.09	3'-O-乙酰亥茅酚	230 840	1	77 080	1	1	1
20	17.66	异嗪皮啶	2 769 505	1	1	91 270	61 224	201 030
21	18.56	莱德博利醇	200 641	501 769	1	153 075	1	1
22	19.85	异欧前胡素	32 901 120	1	6 738 560	1	1	1
23	20.10	3'-O-propionyl lhamaudol	1 640 515	1	2 950 338	1	1	1
24	20.50	5-羟基-8-甲氧基补骨脂素	165 727	1	186 804	1	138 081	374 510
25	20.51	紫花前胡素	516 940	1	651 119	1	1	1
26	20.54	珊瑚菜素	109 174	71 112	109 586	1	1	1
27	21.44	3'-O-2-丁酰亥茅酚	10 281 728	1	4 342 130	1	1	1
28	22.38	3'-O-当归酰亥茅酚	93 454 080	2 038 100	10 063 872	660 508	1	124 592

注: 相应保留时间下未检测到的峰强度为“1”。

Note: The peak intensity not detected at the corresponding retention time is "1".

数据); 对异常数值敏感度低, 因此, Spearman 相关方法适用性更广^[17]。

本实验将防风不同极性部位化合物峰强度与抗流感病毒活性进行相关性分析($P < 0.05$),参考文献^[18],计算 Spearman 秩相关系数(r_s),如表 4, $|r_s| \geq 0.8$ 表示高度相关, $0.5 \leq |r_s| < 0.8$ 表示中度相

关, $0.3 \leq |r_s| < 0.5$ 表示低度相关, $|r_s| < 0.3$ 表示不相关, r_s 为正表示正相关。本实验按照以上参数为标准,确定 1、5、6、7、10、11、12、13、20、24 号峰与药效作用相关。

表 4 Spearman 秩相关系数(r_s)

Table 4 Spearman rank correlation coefficient (r_s)

峰号 No.	秩相关系数 r_s	峰号 No.	秩相关系数 r_s	峰号 No.	秩相关系数 (r_s)	峰号 No.	秩相关系数 r_s
1	0.60	8	-0.09	15	0.06	22	0.23
2	-0.20	9	0.20	16	0.09	23	0.06
3	0.03	10	0.66	17	-0.09	24	0.61
4	-0.14	11	0.49	18	-0.09	25	0.06
5	0.51	12	-0.31	19	0.23	26	-0.09
6	-0.31	13	0.54	20	0.59	27	0.23
7	0.77	14	-0.26	21	-0.09	28	-0.14

3.4.3 灰色关联度分析^[19]

本实验研究防风不同极性部位化合物峰强度对抗流感病毒的抑制作用,将治疗指数(TI)作为母序列,记为 $X_0(k)$;不同极性部位化合物峰强度作为子序列,记为 $X_1(k), X_2(k), \dots, X_{28}(k), n = 1, 2, \dots, 6$ 。采用归一化法对数据进行无量纲化处理, $X_i(k) = X_i(k)/X_i[\text{SUM}(1 \sim k)], i = 0, 1, 2, \dots, 28$ 。

(1) 关联度系数计算

$$\xi_i(k) = (\Delta \min + \rho * \Delta \max) / (\Delta_i(k) + \rho * \max); \Delta_i(k) = |X_i(k) - X_0(k)|$$

$$\Delta \min = \min |X_0(1) \sim X_i(k)|, \Delta \max = \max |X_0(1) \sim X_i(k)|$$

ρ 为分辨系数, $0 \leq \rho \leq 1$, 通常取 $\rho = 0.5$

(2) 关联度计算 $r_i = \sum_{k=1}^k \xi_i(k)$

将防风不同极性部位化合物峰强度与抗流感病毒活性进行灰色关联度分析,参考文献^[19],以 $\gamma \geq 0.75$ 表示子序列对母序列有影响,计算关联度 γ ,如表 5。确定 1、3、5、7、8、9、11、12、13、20、22、23、24、25、26、28 号峰对抗流感病毒活性有影响。

表 5 灰色关联度(γ)

Table 5 The gray sequence (γ)

峰号 No.	关联度 γ	峰号 No.	关联度 γ	峰号 No.	关联度 γ	峰号 No.	关联度 γ
1	0.82	8	0.77	15	0.74	22	0.75
2	0.66	9	0.77	16	0.75	23	0.77
3	0.79	10	0.72	17	0.70	24	0.85
4	0.74	11	0.80	18	0.69	25	0.77
5	0.77	12	0.76	19	0.75	26	0.76
6	0.71	13	0.82	20	0.79	27	0.75
7	0.76	14	0.75	21	0.71	28	0.78

3.4.4 偏最小二乘回归(PLSR)法分析

偏最小二乘回归(PLSR)分析法是从应用领域中提出的一种新型多元数据分析方法。近十几年来,它在理论和应用方面都已得到迅速的发展。偏最小二乘回归分析主要适用于多因变量对多自变量的线性回归建模,并可以有效地解决许多用普通多

元性回归无法解决的问题^[20]。本实验以防风不同极性部位化合物峰强度为自变量,抗流感病毒活性为因变量,进行谱效相关性分析。

本实验利用 SIMCA-P 19.0 软件,采用 PLSR 分析法进行谱效相关性分析,计算得到 28 个特征峰与抗流感病毒活性的标准化回归系数(图 2-A)和 VIP

值(图 2-B)。VIP > 1 时,自变量在解释因变量时具有重要意义^[21]。由图 3 可知,峰 1、3、5、7、8、9、11、13、20、22、24、28 的 VIP 值均大于 1,且其回归系数均为正相关,故说明这 12 个峰对应的物质对于细胞抗流感病毒作用有重要影响。

4 讨论

本实验以防风为研究对象,采用 CPE 法对防风总提取物及不同极性部位进行了体外抗流感病毒活性研究。根据测定的 TI 值,抗流感病毒活性顺序为:水部位 > 甲醇总提取物 > 正丁醇部位 > 环己烷部位 > 二氯甲烷部位 > 乙酸乙酯部位。为探究防风中具体的抗流感病毒活性成分,本实验将防风抗流感病毒 TI 值与不同极性部位的共有峰峰强度进行谱效相关分析。采用 Spearman 简单相关对实验进行初步分析,而后运用灰色关联度分析,但灰色关联度分析对数据的要求较低,无法建立相应的数学模型。偏最小二乘回归分析法集多元线性回归、典型相关

分析和主成分分析的基本功能于一体,可操作性高,建立的数学模型较为准确,确保模型较好的精度所需包含的成分数量,保证了模型的推广性^[22]。综合上述分析方法的利弊,本实验联用 Spearman 分析、灰色关联度分析、偏最小二乘回归分析三种方法,可以更全面地分析防风不同极性部位与抗流感病毒活性的谱效关系,以保证分析结果的准确性。

本实验建立了防风不同极性部位的 LC-MS 指纹图谱,确定了 28 种化合物,将 28 种化合物对应的峰强度与抗流感病毒活性指标进行相关计算。由 Spearman 分析、灰色关联度分析、偏最小二乘回归分析方法共同得出 1、5、7、11、13、20、24 号峰对抗流感病毒活性有影响,即焦谷氨酸、divaricatic acid、升麻苷、亥茅酚苷、补骨脂素、异嗪皮啶、5-羟基-8-甲氧基补骨脂素。其中升麻苷、补骨脂素及 5-羟基-8-甲氧基补骨脂素与文献报道中发现的升麻苷、补骨脂素类化合物^[23,24]具有一定的抗流感病毒能力相一致,

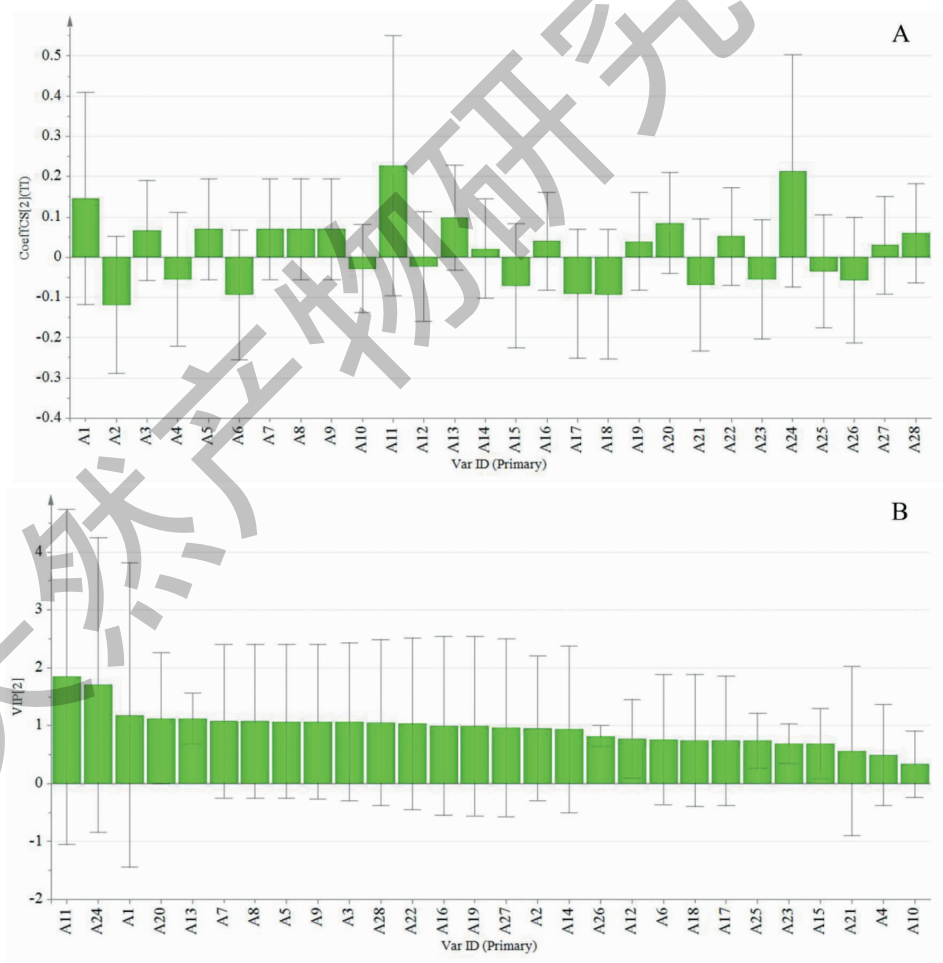


图 3 防风 PLSR 标准化回归系数图 (A) 和对药效的 VIP 贡献图 (B)

Fig. 3 PLSR normalized regression coefficient graph (A) and contribution of characteristic peaks of *S. divaricata* to VIP (B)

进一步论证了本实验的可靠性,由此可推测,秩相关系数、关联度、VIP 值均高于升麻苷、补骨脂素的焦谷氨酸、divaricatacid、亥茅酚苷、异嗪皮啶同样具有抗流感病毒活性,后期可利用细胞病变效应(CPE)法对焦谷氨酸、divaricatacid、亥茅酚苷、异嗪皮啶四个单体成分的抗流感病毒活性进行测定,进一步证实其抗流感病毒活性。本实验为探究防风的抗流感病毒作用机制提供参考依据,为下一步深入研究防风抗流感病毒活性物质基础及化学结构提供初步方向。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:149-150.
- Gao HX, et al. Research progress of *Saponikovia cata* (Turcz.) Schischk [J]. J Jinggangshan Med coll (井冈山医学专学报), 2004(4):12-14.
- Liu Q, Yu YL, Bi YS, et al. Analysis of essential oil components of *Saposhnikovia divaricata* and *Notopterygium incisum*-in Xuanqi drop pills by GC/MS method [J]. Pharm Care Res, 2014, 14(1):31-34.
- Zhao B, Yang X, Yang X, et al. Chemical constituents of roots of *Saposhnikovia divaricate* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2010, 35:1569-1572.
- Yao MY, Zhou CZ, Chen F, et al. *In vitro* anti-viral trace of compatibility of Radix Angelicae, Radix Saposhnikoviae and Folium Perillae [J]. World J Integr Tradit West Med (世界中西医结合杂志), 2015, 10:782-784.
- Zeng LJ, Lin B, Song HT. Progress in study of spectrum-effect relationship of traditional Chinese medicine and discussions [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40:1425-1432.
- Hua YJ, Xie F, Zhou SD, et al. Analysis of different chemical components of different dosage forms of *Pseudostellaria* by UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS [J/OL]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发): 1-14 [2020-03-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20191211.1117.002.html>.
- Chen YQ, Hou L, Cui QH, et al. Study on in-vitro antiviral activity of seaweed extracts obtained by different methods [J]. Wes J Tradit Chin Med (西部中医药), 2018, 31(3):5-8.
- Ren XL, Huo JH, Sun GD, et al. Analysis of chemical components as coumarin in *Saposhnikovia divaricata* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. China Pharm (中国药房), 2019, 30:349-354.
- Kim HS, Choi G, Lee AY. Ultra-performance convergence chromatography method for the determination of four chromones and quality control of *Saposhnikovia divaricata* Schischk [J]. J Sep Sci, 2018, 41:1682-1690.
- Gui Y, Tsao R, Li L, et al. Preparative separation of chromones in plant extract of *Saposhnikovia divaricata* by high-performance counter-current chromatography [J]. J Sep Sci, 2015, 34:520-526.
- Li L, Gui Y, Jing W, et al. Preparative separation of chromones in plant extract of *Saposhnikovia divaricata* by reverse-phase medium-pressure liquid chromatography and high performance counter-current chromatography [J]. J Liq Chromatogr R T, 2013, 36:1043-1053.
- Li W, Wang Z, Chen L, et al. Pressurized liquid extraction followed by LC-ESI/MS for analysis of four chromones in Radix *Saposhnikoviae* [J]. J Sep Sci, 2015, 33:2881-2887.
- Wang T, Hoi KM, Stöckmann H, et al. LC/MS-based Intact IgG and released glycan analysis for bioprocessing applications [J]. Biotech J, 2018, 13(4):1700185.
- Jimmerson LC, Bushman LR, Ray ML, et al. A LC-MS/MS method for quantifying adenosine guanosine and inosine nucleotides in human cells [J]. Pharm Res, 2016, 34(1):1-11.
- Zhao AH, Yang XW. Time course of phellopterin biotransformation in rat liver microsomes determined by HPLC [J]. Chin J New Drugs, 2017, 26:1837-1842.
- Shinkaiouchi F, Koyama S, Ono Y, et al. Predictions of cleavability of calpain proteolysis by quantitative structure-activity relationship analysis using newly determined cleavage sites and catalytic efficiencies of an oligopeptide array [J]. Mol Cell Proteomics, 2016, 15:1262-1280.
- Song W, Tang SA, Cao BY, et al. Depression-resolving and spirit-tranquilizing effects of different compatibility of flavonoids in Ziziphi Spinosae Semen and spectrum-efficient correlation analysis [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2018, 49:1123-1131.
- Liu XH, Liang J, Ren Y, et al. Spectrum-effect relationship in effect of improving immunity of astragali radix [J]. J Chin Med Materla (中药材), 2012, 35:1978-1981.
- Li Q, Huang Y, Tian K, et al. Rapid quantification of analog complex using partial least squares regression on mass spectrum [J]. Chem Pap, 2019, 73:1-10.
- Ma NN, Li X, Jin H, et al. Spectrum-effect relationship and mechanism of anti-inflammatory effects of different extracts of *Corydalis yanhusuo* [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2019, 50:2413-2419.