

裸花紫珠醇提取物 UPLC 指纹图谱建立及抗呼吸道合胞病毒谱效关系研究^Δ

邵冰梅^{1*}, 李小锋², 闫蓓蓓³, 刘启峰⁴, 秦焕云¹, 赵祥君¹, 侯林^{1#}(1. 山东中医药大学青岛中医药科学院, 山东青岛 266000; 2. 江西普正制药股份有限公司国家企业技术中心, 江西吉安 343100; 3. 山东中医药大学药学院, 济南 250300; 4. 泰安市立医院神经外科, 山东泰安 271000)

中图分类号 R917;R978.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)20-2465-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.20.04



摘要 目的 建立裸花紫珠醇提取物的指纹图谱,分析其体外抗呼吸道合胞病毒(RSV)活性并进行谱效关系研究。方法 以10%、30%、50%、70%、90%乙醇为溶剂,制备4批裸花紫珠药材的20批醇提取物。采用超高效液相色谱法,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》绘制20批裸花紫珠醇提取物的指纹图谱并进行相似度评价;采用致细胞病变效应法和MTT法考察裸花紫珠醇提取物对RSV的体外抑制活性;运用Pearson相关性分析、灰色关联度分析、正交偏最小二乘(OPLS)分析进行谱效关系研究。结果 20批裸花紫珠醇提取物有25个共有峰,相似度为0.912~0.998,共有峰峰面积的RSD为33.54%~162.28%。20批裸花紫珠醇提取物对RSV的平均半数抑制浓度为9.55~272.23 μg/mL;Pearson相关性分析、灰色关联度分析、OPLS分析结果表明,共有峰8、10、12、16、18~19、22~24与药效指标的Pearson相关系数($P<0.05$)和回归系数均为负值,关联度均大于0.6,变量重要性投影值均大于1。结论 20批裸花紫珠醇提取物成分相似但含量差异明显,且具有不同程度的体外抗RSV活性,其中共有峰8、10、12、16、18~19、22~24对应成分可能是裸花紫珠抗RSV的特征成分。

关键词 裸花紫珠;醇提取物;呼吸道合胞病毒;指纹图谱;抗病毒;谱效关系

Establishment of UPLC fingerprint and study on anti-respiratory syncytial virus spectrum-effective relationship of ethanol extract from *Callicarpa nudiflora*

SHAO Bingmei¹, LI Xiaofeng², YAN Beibei³, LIU Qifeng⁴, QIN Huanyun¹, ZHAO Xiangjun¹, HOU Lin¹(1. Qingdao Academy of Chinese Medicinal Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong Qingdao 266000, China; 2. National Enterprise Technology Center, Jiangxi Puzheng Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangxi Ji'an 343100, China; 3. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China; 4. Dept. of Neurosurgery, Tai'an Municipal Hospital, Shandong Tai'an 271000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To establish the fingerprint of the ethanol extract from *Callicarpa nudiflora*, analyze its anti-respiratory syncytial virus (RSV) activity *in vitro*, and study the relationship between spectrum and effect. **METHODS** Using 10%, 30%, 50%, 70% and 90% ethanol as solvent, 20 batches of ethanol extracts from 4 batches of *C. nudiflora* were prepared. The fingerprints for 20 batches of ethanol extracts from *C. nudiflora* were mapped by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC), and the similarity evaluation was conducted by using the *Similarity Evaluation System for Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprints* (2012 edition). The cytopathic effect method and MTT method were used to investigate the *in vitro* inhibitory activity of the ethanol extracts from *C. nudiflora* on RSV. Pearson correlation analysis, grey correlation degree and orthogonal partial least squares (OPLS) analysis were used to study the spectrum-effect relationship. **RESULTS** There were 25 common peaks in 20 batches of ethanol extracts from *C. nudiflora*, and the similarities ranged from 0.912 to 0.998, and the RSDs of common peak areas were 33.54%-162.28%. The average values of IC_{50} for RSV of 20 batches of ethanol extracts from *C. nudiflora* were 9.55-272.23 μg/mL. The results of Pearson correlation analysis, grey correlation analysis and OPLS analysis showed that the Pearson correlation coefficients ($P<0.05$) of the common peaks 8, 10, 12, 16, 18-19, 22-24 with pharmacodynamic

indicators and regression coefficients were all negative, the correlation coefficients were all greater than 0.6, and the values of variable importance in projection were all greater than 1. **CONCLUSIONS** Twenty batches of ethanol extracts from *C. nudiflora* have similar components but significant differences in content, and exhibit different degrees of anti-RSV activity *in vitro*. The corresponding components of

^Δ 基金项目 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(No. 2021CXGC010511, No. 2020CXGC010505)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药新药研发、抗感染中药药效及物质基础。E-mail:shaobingmei325@126.com

通信作者 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药新药研发及中成药二次开发、中医药大健康产品研发、抗感染中药药效及物质基础。E-mail:13789801721@163.com

common peaks 8, 10, 12, 16, 18-19, 22-24 may be the characteristic components of anti-RSV of *C. nudiflora*.

KEYWORDS *Callicarpa nudiflora*; ethanol extract; respiratory syncytial virus; fingerprint; anti-virus; spectrum-effect relationship

裸花紫珠为马鞭草科植物裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 的干燥叶^[1], 主要分布于我国海南、江西、广西等地, 以海南五指山产者为上品^[2]。该药具有收敛止血、消炎解毒的功效, 可用于治疗细菌感染引起的急性传染性肺炎、消化道和呼吸道出血^[3]。目前, 研究者已从裸花紫珠中分离出300多种成分, 主要为苯丙素类、挥发油类、黄酮类、倍半萜类、环烯醚萜类、三萜类、二萜类等成分^[4]。

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV) 是有包膜的单股负链RNA病毒, 属单股负链病毒目肺病毒科, 其基因组可编码11种蛋白^[5]。中药具有多成分、多靶点的协同作用, 可作用于多条通路, 且不易产生耐药性, 在治疗呼吸道病毒感染性疾病中具有广阔的应用前景^[6]。已有文献报道, 裸花紫珠乙酸乙酯部位是其抗单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV) 的主要活性部位, 可直接灭杀病毒, 也可通过增强机体免疫来发挥抗HSV的作用^[7]; 裸花紫珠颗粒及裸花紫珠乙酸乙酯部位均具有较好的体外抗肠道病毒71型(human enterovirus 71, EV71) 的作用, 治疗指数(therapeutic index, TI) 分别为35.26、8.1^[8-9]。

谱效关系研究可从中药指纹图谱和药效学研究出发, 阐释中药发挥药效的物质基础^[10]。本课题组前期研究证实, 裸花紫珠醇提物对RSV有较好的抑制作用。虽已有研究建立了裸花紫珠的指纹图谱并报道了其抗病毒作用^[7-9, 11], 但其抗RSV作用的物质基础尚不明确。基于此, 本研究拟首先建立20批裸花紫珠醇提物的超高效液相色谱(UPLC) 指纹图谱, 对其抗RSV的谱效关系进行研究, 并建立数学模型表征裸花紫珠醇提物抗RSV的药效成分, 以期裸花紫珠的进一步开发利用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用仪器包括Waters Acquity H-Class型UPLC系统(美国Waters公司)、Spectra Max M5型酶标仪(美国Molecular Device公司)、CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司)等。

1.2 主要药品与试剂

4批裸花紫珠药材由江西普正药业股份有限公司提供, 分别产自海南五指山(C₁)、广西南宁(C₂)、江西吉安锦源(C₃)、江西吉安井冈山(C₄), 经江西普正药业股份有限公司吴永忠研究员鉴定均为马鞭草科植物裸花紫珠 *C. nudiflora* Hook. et Arn. 的干燥叶。

胎牛血清(批号10270-106)购自美国Clark公司;

DMEM培养液(批号812207)、乙二胺四乙酸(EDTA)-0.25%胰酶(批号2323363)、磷酸盐缓冲液(PBS, 批号BYHC1713)、青-链霉素双抗(批号HYT11280746)均购自美国Gibco公司; MTT试剂(批号1636C097)购自美国VWR公司; 乙腈、乙酸均为色谱纯, 二甲基亚砜(DMSO)等其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

1.3 细胞与病毒

人喉鳞癌细胞Hep-2和RSV均由山东中医药大学中医药抗病毒平台提供。

2 方法与结果

2.1 裸花紫珠醇提物指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

以Acquity UPLC BEH-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 为色谱柱, 以乙腈(B)-0.1%乙酸溶液(C)为流动相进行梯度洗脱(0~3 min, 11%B; 3~10 min, 11%B→14.5%B; 10~20 min, 14.5%B→18%B; 20~22 min, 18%B→21%B; 22~32 min, 21%B→30%B; 32~43 min, 30%B→95%B); 柱温为35℃; 流速为0.20 mL/min; 检测波长为350 nm; 进样量为2 μL。

2.1.2 裸花紫珠醇提物的制备

取4批裸花紫珠药材, 粉碎; 称取上述粉末各5份, 每份40 g, 分别加入10%、30%、50%、70%、90%乙醇400 mL, 超声提取45 min×2次, 迅速抽滤, 合并滤液, 旋转蒸发回收溶剂后冷冻干燥, 即得裸花紫珠醇提物样品S₁~S₂₀ (C₁~C₄批药材的上述5种醇提物分别对应S₁~S₅、S₆~S₁₀、S₁₁~S₁₅、S₁₆~S₂₀, 得率为10.52%~26.95%)。

2.1.3 供试品溶液的制备

取上述20批裸花紫珠醇提物样品各0.1 g, 精密称定, 分别置于25 mL具塞容量瓶中, 加50%甲醇溶解, 超声至完全溶解, 放冷后以50%甲醇定容, 摇匀, 经0.22 μm微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 方法学考察

(1) 精密度考察: 精密称取“2.1.3”项下供试品溶液(编号S₃), 按“2.1.1”项下色谱条件重复进样6次。以13号峰(保留时间适中、分离度良好且峰面积相对较大, 下同)为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间的RSD均不高于0.95% (n=6), 相对峰面积的RSD均不高于2.86% (n=6), 说明方法精密度良好。

(2) 重复性考察: 精密称取裸花紫珠醇提物样品(编号S₃), 共6份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。以13号峰为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间的RSD均不高于1.20%

($n=6$), 相对峰面积的RSD均不高于3.42%($n=6$), 说明方法重复性良好。

(3)稳定性考察:精密称取“2.1.3”项下供试品溶液(编号 S_3), 分别于室温静置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以13号峰为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间的RSD均不高于0.68%($n=6$), 相对峰面积的RSD均不高于3.12%($n=6$), 说明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.5 指纹图谱建立及相似度评价

取20批裸花紫珠醇提取物样品各适量, 采用“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图; 将图谱信息导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》, 以编号 S_3 样品的图谱为参照, 将时间窗宽度设为0.1 s, 经多点校正自动匹配, 生成叠加指纹图谱; 经Mark峰匹配, 最终确定了25个共有峰, 并以中位数法生成了对照图谱(R), 具体见图1。

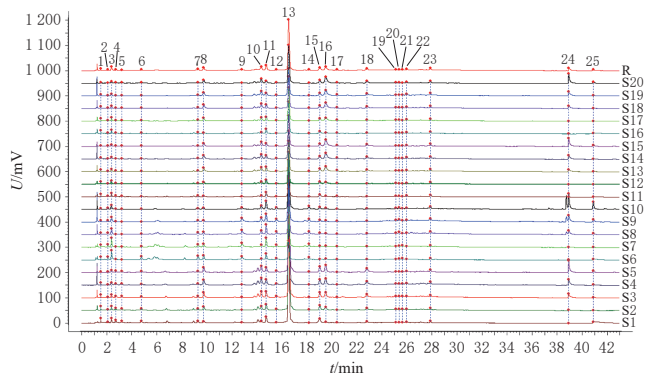


图1 20批裸花紫珠醇提取物样品的叠加指纹图谱和对照图谱

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》计算各样品指纹图谱与对照图谱(R)的相似度, 结果显示, $S_1 \sim S_{20}$ 样品与对照指纹图谱的相似度依次为0.989、0.994、0.998、0.998、0.997、0.912、0.981、0.984、0.986、0.985、0.992、0.996、0.980、0.973、0.968、0.994、0.995、0.980、0.979、0.981, 说明各批裸花紫珠醇提取物样品所含化学成分相似, 一致性较高。

2.1.6 共有峰峰面积差异性分析

通过计算20批裸花紫珠醇提取物样品指纹图谱各共有峰峰面积的RSD来进行差异性分析。结果显示, 25个共有峰峰面积的RSD为33.54%~162.28%, 其中峰2、6、9、14、24峰面积的RSD均超过90%, 提示20批样品的成分含量有所差异, 以峰2、6、9、14、24较为明显。

2.2 裸花紫珠醇提取物体外抗RSV的药效研究

2.2.1 细胞复苏与培养

将装有Hep-2细胞的冻存管置于37 °C水浴中, 使其迅速复苏后转移至含DMEM培养液6 mL的无菌离心管中, 以1 000 r/min离心3 min, 弃去上清液; 加入新鲜DMEM培养液10 mL, 吹打后将细胞转移至细胞培养皿

中, 于37 °C、5%CO₂、75%相对湿度条件下培养; 6 h后, 更换培养液, 继续培养, 待单层细胞融合至80%后传代培养。

2.2.2 病毒毒力测定

将Hep-2细胞以 1.5×10^4 个/孔接种于96孔板中, 于37 °C、5%CO₂下培养12 h。RSV病毒液按10倍比用细胞维持液(即含2%胎牛血清的DMEM培养液, 下同)稀释8个梯度(即 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-1}$), 加至长成单层的细胞中培养36 h(每个病毒稀释度设置6孔), 采用致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)法观察病毒感染情况, 按照Reed-Muench公式^[12]计算得RSV的病毒滴度为 3.4×10^7 TCID₅₀/mL(TCID₅₀为半数组织培养物感染量)。

2.2.3 裸花紫珠醇提取物细胞毒性及抗RSV活性测定

将20批裸花紫珠醇提取物样品研细后分别溶于细胞维持液中, 得质量浓度为1 mg/mL的供试药液。将Hep-2细胞以 1.5×10^4 个/孔接种于96孔板中, 于37 °C、5%CO₂下培养12 h。将细胞分为空白对照组、模型对照组、药物组(裸花紫珠醇提取物质量浓度分别为0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25、0.015 625、0.007 812 5 mg/mL, 质量浓度按前期预实验结果设置), 每组设置3个复孔。除空白对照组外, 其余各组细胞均接种100个TCID₅₀的病毒液(病毒加入量根据“2.2.2”项下结果设置), 药物组细胞同时加入相应药液。培养36 h后, 采用CPE法观察病毒感染情况, 采用MTT法, 以酶标仪于490 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值来评估细胞活力, 通过GraphPad Prism 5软件拟合裸花紫珠醇提取物对Hep-2细胞的半数毒性浓度(CC₅₀)和对RSV病毒的半数抑制浓度(IC₅₀), 并计算TI值($TI = CC_{50}/IC_{50}$)^[13-14]。上述实验平行2批进行, 1批用于拟合CC₅₀, 1批用于拟合IC₅₀。

结果(表1)显示, 随着提取溶剂极性的减小, 裸花紫珠醇提取物的细胞毒性有逐渐增强的趋势, 其中 S_{10} 样品的细胞毒性最强, CC₅₀为(87.03 ± 6.85) μg/mL。20批裸花紫珠醇提取物对RSV有不同程度的抑制作用, 其中 S_{10} 样品的抗RSV活性最强, 其IC₅₀为(9.55 ± 1.35) μg/mL; S_{15} 样品的抗RSV活性次之, 其IC₅₀为(11.07 ± 1.16) μg/mL; S_2 样品的TI值最大, 为27.53; S_{11} 样品的TI值最小, 为3.63。

2.3 裸花紫珠醇提取物抗RSV活性的谱效关系评价

2.3.1 Pearson相关性分析

采用SPSS 22.0软件, 对裸花紫珠醇提取物指纹图谱的共有峰峰面积与IC₅₀进行Z-score标准化处理, 采用Pearson相关性分析对二者的关系进行评价。结果(表2)显示, 峰8、10、12、16、18~19、22~24的峰面积与IC₅₀呈负相关, 相关系数分别为-0.573、-0.731、-0.523、-0.531、-0.497、-0.452、-0.497、-0.595、-0.619($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。可以推测, 这9个共有峰对应成分可能与裸花紫珠醇提取物的抗RSV活性有关, 且其峰面积越大, 裸花紫珠醇提取物的IC₅₀越小, 抗RSV活性可能越强。

表1 20批裸花紫珠醇提取物样品的CC₅₀及抗RSV的IC₅₀、TI值($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品编号	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	TI
S1	755.97 ± 24.11	110.21 ± 6.25	6.86
S2	873.23 ± 38.56	31.72 ± 0.52	27.53
S3	405.63 ± 15.61	24.43 ± 1.21	16.62
S4	144.64 ± 7.05	23.80 ± 1.82	6.07
S5	325.77 ± 11.19	17.22 ± 1.21	18.92
S6	1 016.33 ± 16.74	122.93 ± 6.31	8.33
S7	1 217.33 ± 47.44	52.18 ± 2.24	23.33
S8	279.95 ± 10.67	30.46 ± 0.87	9.19
S9	152.37 ± 11.05	18.52 ± 2.16	8.23
S10	87.03 ± 6.85	9.55 ± 1.35	9.12
S11	680.24 ± 24.12	187.24 ± 7.21	3.63
S12	637.53 ± 22.53	42.48 ± 0.59	15.01
S13	264.57 ± 9.50	31.78 ± 1.49	8.33
S14	202.93 ± 4.99	12.68 ± 1.95	16.00
S15	124.97 ± 5.49	11.07 ± 1.16	11.29
S16	1 320.33 ± 67.53	272.23 ± 11.28	4.85
S17	829.67 ± 43.21	83.02 ± 4.23	9.99
S18	555.13 ± 16.79	36.63 ± 0.63	15.15
S19	251.83 ± 7.60	23.39 ± 2.76	10.97
S20	172.07 ± 9.81	18.31 ± 0.60	9.39

表2 各共有峰峰面积与IC₅₀的Pearson相关系数

峰号	相关系数	P	峰号	相关系数	P
1	0.535	0.015	14	-0.167	0.480
2	0.348	0.132	15	-0.298	0.203
3	0.201	0.396	16	-0.531	0.016
4	-0.064	0.788	17	-0.355	0.125
5	0.087	0.715	18	-0.497	0.026
6	0.233	0.322	19	-0.452	0.045
7	0.097	0.684	20	-0.386	0.093
8	-0.573	0.008	21	-0.127	0.593
9	-0.096	0.688	22	-0.497	0.026
10	-0.731	0.005	23	-0.595	0.006
11	-0.189	0.424	24	-0.619	0.004
12	-0.523	0.018	25	-0.061	0.797
13	-0.263	0.263			

2.3.2 灰色关联度分析

灰色关联度分析能进一步反映各化学成分对药效的贡献^[15],故本研究以20批裸花紫珠醇提取物的IC₅₀作为母序列[记为 $X_{0(i)}$ ($i=1,2,\dots,20$)],以各批裸花紫珠醇提取物指纹图谱的25个共有峰峰面积作为子序列[分别记为 $X_{1(k)} \sim X_{25(k)}$ ($k=1,2,\dots,20$)],采用归一化法对数据进行无量纲化处理后,再根据灰色关联度分析方法计算峰面积与IC₅₀的关联度。结果(表3)显示,裸花紫珠醇提取物指纹图谱各共有峰对抗RSV活性贡献最大的为峰1,最小的为峰24;25个共有峰的关联度均大于0.6,提示25个共有峰所对应的化学成分与药效学指标均具有关联性^[16]。

2.3.3 OPLS分析

采用SIMCA 14.0软件,以裸花紫珠醇提取物指纹图谱的25个共有峰峰面积为自变量($X_1 \sim X_{25}$),以其抗RSV的IC₅₀为因变量(Y),进行正交偏最小二乘(orthogonal

表3 各共有峰峰面积与IC₅₀的关联度

峰号	关联度	排名	峰号	关联度	排名
1	0.823	1	17	0.739	14
3	0.803	2	23	0.739	15
2	0.795	3	20	0.733	16
7	0.789	4	8	0.732	17
6	0.786	5	19	0.731	18
4	0.782	6	12	0.729	19
5	0.782	7	9	0.728	20
11	0.762	8	22	0.713	21
13	0.762	8	10	0.710	22
21	0.754	10	16	0.695	23
25	0.753	11	18	0.693	24
14	0.744	12	24	0.656	25
15	0.741	13			

partial least squares, OPLS)分析,得标准化回归方程和变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值。

其中,方程的回归系数可反映各自变量对抗RSV活性(即IC₅₀)的贡献大小^[17]。本研究得标准化回归方程为 $Y=0.087 4X_1+0.029 9X_2-0.002 6X_3+0.000 8X_4+0.036 4X_5+0.022 5X_6-0.014 5X_7-0.116 4X_8-0.056 2X_9-0.119 0X_{10}-0.055 3X_{11}-0.119 8X_{12}-0.025 0X_{13}-0.061 0X_{14}-0.019 3X_{15}-0.082 5X_{16}-0.082 1X_{17}-0.064 8X_{18}-0.055 4X_{19}-0.076 0X_{20}-0.044 2X_{21}-0.051 3X_{22}-0.084 4X_{23}-0.097 3X_{24}+0.000 3X_{25}$ 。由此方程可知,峰3、7~24对应的回归系数均为负值,提示其对应成分与IC₅₀呈负相关^[17]。

VIP可解释自变量对因变量的贡献程度,其值越大,说明该自变量对因变量的贡献越大,若其值大于1则表示对该因变量有显著贡献^[17]。结果(图2)显示,25个共有峰中,峰10、24、23、22、8、12、18、1、19、20、16的VIP值均大于1,表明其对应成分对裸花紫珠抗RSV活性具有显著影响。

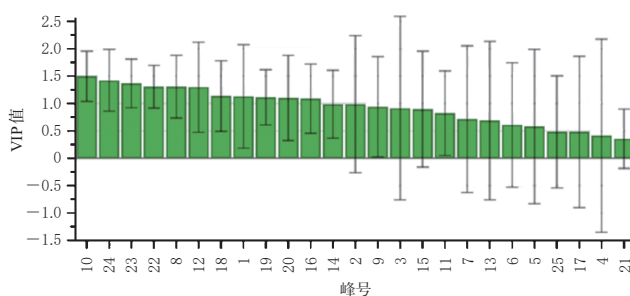


图2 各共有峰的VIP值

3 讨论

3.1 裸花紫珠醇提取物的UPLC指纹图谱

本研究首先建立了裸花紫珠不同醇提取物的指纹图谱。结果显示,20批裸花紫珠醇提取物指纹图谱的相似度为0.912~0.998,共有峰峰面积的RSD为33.54%~162.28%,提示各醇提取物的化学成分相似,但含量有所差异。

3.2 裸花紫珠醇提物的体外抗 RSV 活性

本研究以 Hep-2 细胞为对象,对裸花紫珠不同醇提物的体外抗 RSV 活性进行了评价。结果显示,随着提取溶剂极性的减小,裸花紫珠醇提物的细胞毒性有增强的趋势,其中 S₁₀样品的细胞毒性最强;20 批裸花紫珠醇提物中,S₁₀样品的 IC₅₀值最小,S₁₅样品次之;S₂样品的 TI 值最大,S₁₁样品最小。这提示,各批醇提物对 RSV 有不同程度的体外抑制作用。

3.3 裸花紫珠醇提物抗 RSV 活性的谱效关系

数学模型为中药药效成分筛选提供了分析手段,但每种模型都有自身的局限性;同时,相同的数据使用不同的处理方法也可能会得到完全不同的结果^[18],故本研究采用了 Pearson 相关性分析、灰色关联度、OPLS 分析,以综合评价裸花紫珠醇提物抗 RSV 活性的谱效关系。其中, Pearson 相关性分析可评价 2 个变量相关联的程度,并能反映关联度的方向(正相关、负相关),但无法体现其他变量的影响,故不能评估多种成分的整体作用^[19]。灰色关联度分析方法能评估成分对药效的贡献,但无法描述各成分对药效的综合贡献度和关联度方向^[19],因此在该法基础上联合 OPLS 分析可进一步明确呈正、负相关的药效成分^[20-21]。

综合上述 3 种分析方法,本研究以 Pearson 相关系数为负值($P < 0.05$)、关联度大于 0.6、OPLS 模型回归系数为负值且 VIP 值大于 1 的共有峰作为特征峰^[16-17,22],其相对应的化合物即为对药效有较大贡献的特征成分。Pearson 相关性分析结果显示,峰 8、10、12、16、18~19、22~24 的峰面积与抗 RSV 药效指标 IC₅₀的 Pearson 相关系数均为负值($P < 0.05$);灰色关联度分析结果显示,25 个共有峰峰面积与抗 RSV 药效指标 IC₅₀的关联度均大于 0.6;OPLS 分析结果显示,峰 8、10、12、16、18~20、22~24 的回归系数为负值且 VIP 大于 1。综合上述结果可知,峰 8、10、12、16、18~19、22~24 的峰面积与抗 RSV 药效指标 IC₅₀呈负相关,其对应成分可能是裸花紫珠醇提物抗 RSV 的特征成分。

综上所述,本研究成功建立了裸花紫珠不同醇提物的 UPLC 指纹图谱,各醇提物成分一致性较好,但含量有所差异;各醇提物具有不同程度的抗 RSV 活性,其中峰 8、10、12、16、18~19、22~24 对应成分可能是其抗 RSV 的特征成分。本研究基于中药谱效学研究,将成分的“量”与“效”相结合,挖掘出了能反映中药发挥药效的活性成分,可为裸花紫珠的质量标志物筛选及质量控制提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]2020 年版. 北京:中国医药科技出版社,2020:378-379.
National Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia: part I[M]. 2020 edition. Beijing: China Medical

Science and Technology Press,2020:378-379.

[2] 彭云露. 黎药裸花紫珠资源品质差异及转录组学研究[D]. 海口:海南医学院,2021.
PENG Y L. Analysis of quality difference and transcriptomics of *Callicarpa nudiflora*[D]. Haikou: Hainan Medical University, 2021.

[3] 康兴东,叶阳. 裸花紫珠化学成分、药理活性及临床应用研究进展[J]. 特产研究,2021,43(4):95-101.
KANG X D, YE Y. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of *Callicarpa nudiflora*[J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res, 2021, 43(4):95-101.

[4] YANG Y, LI Z Y, SHAO J J, et al. *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.: a comprehensive review of its phytochemistry and pharmacology[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 264:113123.

[5] GATT D, MARTIN I, ALFOUZAN R, et al. Prevention and treatment strategies for respiratory syncytial virus (RSV)[J]. Pathogens, 2023, 12(2):154.

[6] 王忠,陈寅莹,张盈颖,等. 多组分多靶点中药药理作用机制研究中的问题和解决策略[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(5):1-6.
WANG Z, CHEN Y Y, ZHANG Y Y, et al. Problems and solutions in study of multi-component and multi-target mechanism of action of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(5):1-6.

[7] 周芹芹. 裸花紫珠抗单纯疱疹病毒 I 型药效物质基础研究[D]. 济南:济南大学,2017.
ZHOU Q Q. Studies on the material basis for *Callicarpa nudiflora* hook to resist herpes simplex virus I [D]. Jinan: University of Jinan, 2017.

[8] 范路路,田景振,耿巧玉,等. 裸花紫珠颗粒体外抗肠道病毒 71 型及幽门螺杆菌的活性研究[J]. 山东中医杂志, 2018, 37(10):851-855.
FAN L L, TIAN J Z, GENG Q Y, et al. Study of antiviral activity of Luohua zizhu granule on enterovirus 71 and *Helicobacter pylori* in vitro[J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2018, 37(10):851-855.

[9] 杨颖,邵骏菁,温柔,等. 裸花紫珠乙酸乙酯部位人工胃液处理前后化学成分及抗 EV71 活性研究[J]. 中华中医药杂志,2022,37(5):2769-2773.
YANG Y, SHAO J J, WEN R, et al. Study on chemical constituents and anti-EV71 activity of the ethyl acetate extract of *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. before and after artificial gastroenteric fluid treatment[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(5):2769-2773.

[10] 张强,杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述[J]. 时珍国医国药,2022,33(3):680-683.
ZHANG Q, YANG Y T. Overview of the research status of the relationship between spectrum and effect of traditional Chinese medicine[J]. Lishizhen Med Mater Med

Res, 2022, 33(3):680-683.

- [11] 邓杰仁, 杨义芳, 李小锋, 等. 裸花紫珠 UPLC 指纹图谱的建立[J]. 中成药, 2020, 42(7):1926-1930.
DENG J R, YANG Y F, LI X F, et al. Establishment of UPLC fingerprint of *Callicarpa nudiflora*[J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(7):1926-1930.
- [12] 耿子凯. 经方葛根汤抗甲型 H1N1 流感病毒的作用机制及药效物质研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
GENG Z K. Exploration of the antiviral mechanisms and effective material basis of Ge-gen decoction against influenza A virus (H1N1) infection[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [13] 李忠原, 李保宏, 刘苗苗, 等. 甘草对 5 种病毒的抑制作用及抗 RSV 活性部位的筛选[J]. 中成药, 2022, 44(8):2503-2509.
LI Z Y, LI B H, LIU M M, et al. Effects of *Glycyrrhiza uralensis* on inhibiting five viruses and screening of its active anti-RSV fraction[J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(8):2503-2509.
- [14] 王剑, 侯林, 陈亚乔, 等. 金银花多糖的提取纯化及抗病毒活性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(8):810-812.
WANG J, HOU L, CHEN Y Q, et al. Extraction and purification of the *Lonicera japonica* polysaccharide and its antiviral activity *in vitro*[J]. Chin J Hosp Pharm, 2018, 38(8):810-812.
- [15] 张小艺, 刘久石, 高石曼, 等. 中药谱效关系的研究方法及应用进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20):4405-4411.
ZHANG X Y, LIU J S, GAO S M, et al. Research methods and applications progress on spectrum-effect relationships in study of traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(20):4405-4411.
- [16] ZHU J F, DING H Y, ZHONG L K, et al. Spectrum-effect relationship-based strategy combined with molecular docking to explore bioactive flavonoids from *Sceptridium ternatum*[J]. Molecules, 2022, 27(17):5698.
- [17] 常星, 王露, 程江雪, 等. 基于偏最小二乘回归分析的逍遥软胶囊中柴胡-白芍药对抗抑郁作用谱-效关系研究[J]. 中草药, 2023, 54(8):2509-2515.
CHANG X, WANG L, CHENG J X, et al. Study on spectrum-effect relationship of Bupleuri Radix-Paeoniae Radix Alba herb pair of Xiaoyao soft capsule for anti-depressant effect based on partial least squares-discriminant analysis[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(8):2509-2515.
- [18] 孙启慧, 高燕, 吕凌, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及化学模式识别分析不同剂型双黄连口服制剂的质量差异[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8):3426-3430.
SUN Q H, GAO Y, LYU L, et al. Study on quality differences of Shuanghuanglian oral preparation in different preparations based on HPLC finger print and chemical pattern recognition[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(8):3426-3430.
- [19] 贾富霞, 罗容, 王秀娟. 谱效关系研究方法在中药研究中的应用进展[J]. 北京中医药, 2015, 34(12):996-1000.
JIA F X, LUO R, WANG X J. Application progress of spectrum-effect relationship research methods in traditional Chinese medicine research[J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2015, 34(12):996-1000.
- [20] 卫强, 刘克敏. 中药谱效关系的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(5):634-638.
WEI Q, LIU K M. Research progress on spectrum-effect relationship of traditional Chinese medicine[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(5):634-638.
- [21] 潘杰, 刘德胜, 颜贵明. 数据分析应用于中药谱效关系中的研究进展[J]. 中医药学报, 2018, 46(4):119-122.
PAN J, LIU D S, YAN G M. Research progress of data analysis applied to spectrum-effect relationship of traditional Chinese medicine[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2018, 46(4):119-122.
- [22] 孙仁爽, 赵敏婧. 不同产地老鹳草指纹图谱的建立及抗肿瘤谱效关系研究[J]. 中草药, 2023, 54(15):5003-5010.
SUN R S, ZHAO M J. Establishment of fingerprints and spectrum-effect relationship of anti-tumor activity of *Geranium wilfordii* from different places of origin[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15):5003-5010.

(收稿日期:2023-04-03 修回日期:2023-09-04)

(编辑:张元媛)