吴茱萸水提物体外肝毒性的谱-毒关系研究Δ

刘舒凌[1*]，王　剑[2]，刘　雯[2]，黄凤玉[2]，蒋东明[2]，林晓彤[2]，蒙已钦[2]，李耀华[1,3#]（1.广西中医药大学教学实验实训中心，南宁　530200；2.广西中医药大学药学院，南宁　530200；3.广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室，南宁　530200）

中图分类号　R284.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）01-0032-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.01.06

摘　要　目的 研究吴茱萸水提物体外肝毒性的谱-毒关系。**方法** 制备16批不同产地吴茱萸水提物。采用超高效液相色谱（UPLC）法以及《中药指纹图谱相似度评价系统（2012A版）》建立吴茱萸水提物的指纹图谱，并进行共有峰指认及相似度评价；以正常人肝细胞L02为对象，考察16批吴茱萸水提物对该细胞的抑制作用；采用灰色关联度法和偏最小二乘回归分析法分析吴茱萸水提物UPLC指纹图谱的共有峰与L02细胞肝毒性的谱-毒关系，并对与吴茱萸体外肝毒性相关性最大的色谱峰的对应成分进行分离、制备及鉴定。**结果** 16批吴茱萸水提物共有27个共有峰，相似度为0.375～0.995；共指认出9个成分，分别为新绿原酸（峰5）、绿原酸（峰9）、隐绿原酸（峰10）、咖啡酸（峰12）、芦丁（峰16）、金丝桃苷（峰17）、去氢吴茱萸碱（峰19）、吴茱萸碱（峰24）、吴茱萸次碱（峰25）。16批吴茱萸水提物对L02细胞的生长均具有显著的抑制作用（$P<0.05$或$P<0.01$），抑制率在6.68%～67.95%之间。经灰色关联度分析发现，关联度大于0.8的共有峰有18个，由大到小依次为峰8＞峰3＞峰23＞峰7＞峰4＞峰9＞峰12＞峰2＞峰19＞峰6＞峰15＞峰5＞峰1＞峰17＞峰21＞峰26＞峰20＞峰14；经偏最小二乘回归分析发现，回归系数为正且变量重要性投影值大于1的共有峰有14个，按回归系数大小排序依次为峰8＞峰3＞峰23＞峰2＞峰7＞峰4＞峰12＞峰9＞峰19＞峰5＞峰17＞峰26＞峰10＞峰15。峰8与吴茱萸体外肝毒性相关性最大，进一步鉴定该峰对应的化学成分为6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸。**结论** 吴茱萸水提物的体外肝毒性作用是其多组分共同作用的结果，其中6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸与其体外肝毒性相关性最大。

关键词　吴茱萸；指纹图谱；肝毒性；L02细胞；谱-毒关系；灰色关联度分析法；偏最小二乘回归分析法

Study on spectrum-toxicity relationship of *in vitro* hepatotoxicity of aqueous extract from *Euodia rutaecarpa*

LIU Shuling[1], WANG Jian[2], LIU Wen[2], HUANG Fengyu[2], JIANG Dongming[2], LIN Xiaotong[2], MENG Yiqin[2], LI Yaohua[1,3]（1. Teaching Center of Experiment and Practical Training, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 3. Key Laboratory of TCM Extraction and Purification and Quality Analysis of Traditional Chinese Medicine in Guangxi University, Nanning 530200, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the spectrum-toxicity relationship of *in vitro* hepatotoxicity of aqueous extract from *Euodia rutaecarpa*. **METHODS** The aqueous extract from 16 batches of *E. rutaecarpa* from different habitats were prepared. The fingerprints of aqueous extract from *E. rutaecarpa* were established by ultra high performance liquid chromatography (UPLC) method and *Similarity Evaluation System of TCM Fingerprint* (2012A edition), and common peaks were identified and the similarity was evaluated. Using normal human hepatocytes L02 as subject, inhibitory effect of aqueous extract from 16 batches of *E. rutaecarpa* to them were investigated. The spectrum-toxicity relationship of UPLC fingerprint of aqueous extract from *E. rutaecarpa* with the hepatotoxicity of hepatocytes L02 was analyzed by grey relational analysis (GRA) and partial least squares regression analysis (PLSR). The corresponding compound of the chromatographic peak with the greatest correlation with the *in vitro* hepatotoxicity of *E. rutaecarpa* were isolated, prepared and identified. **RESULTS** There were 27 common peaks in UPLC fingerprints of aqueous extract from 16 batches of *E. rutaecarpa*, with similarity of 0.375-0.995. Totally 9 peaks were confirmed, i.e. neochlorogenic acid (peak 5), chlorogenic acid (peak 9), cryptochlorogenic acid (peak 10), caffeic acid (peak 12), rutin (peak 16), hyperin (peak 17), dehydroevotarine (peak 19), evotarine (peak 24), rutecarpine (peak 25). The aqueous extract from 16 batches of *E. rutaecarpa* showed significant inhibitory effect on the growth of L02 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the inhibitory rate ranged from 6.68% to 67.95%. GRA showed that there were 18 common peaks with correlation degree greater than 0.8, which were peak 8＞peak 3＞peak 23＞peak 7＞peak 4＞peak 9＞peak 12＞peak 2＞peak 19＞peak 6＞peak 15＞peak 5＞peak 1＞peak 17＞peak 21＞peak 26＞peak 20＞peak 14 in descending order of correlation degree. PLSR showed that there were 14 peaks with regression

Δ 基金项目：广西自然科学基金项目（No.2018GXNSFBA281179）；广西中医药大学博士科研启动基金项目（No.2018BS022）；广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室项目（No.桂教科研〔2014〕6号）

* 副教授，博士。研究方向：中药炮制原理。电话：0771-4928381。E-mail：799247687@qq.com

通信作者：高级实验师，硕士。研究方向：中药民族药质量标准。电话：0771-4928381。E-mail：yaohuali@163.com

coefficient＞0 and variable importance projection value＞1, and the order of regression coefficient was peak 8＞peak 3＞peak 23＞peak 2＞peak 7＞peak 4＞peak 12＞peak 9＞peak 19＞peak 5＞peak 17＞peak 26＞peak 10＞peak 15. Peak 8 had the greatest correlation with *in vitro* hepatotoxicity, and the corresponding compound of this peak was identified as 6-*O*-trans caffeoyl gluconic acid. **CONCLUSIONS** The *in vitro* hepatotoxicity of aqueous extract from *E. rutaecarpa* is the result of multiple component interaction, among which 6-*O*-trans caffeoyl gluconic acid shows closest relation with *in vitro* hepatotoxicity.

KEYWORDS *Euodia rutaecarpa*; fingerprint; hepatotoxicity; L02 cell; spectrum-toxicity relationship; grey relational analyses; partial least squares regression analysis

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa*（Juss.）Benth.、石虎 *E. rutaecarpa*（Juss.）Benth. var. officinalis（Dode）Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa*（Juss.）Benth. var. bodinieri（Dode）Huang 的干燥近成熟果实，其性辛、味苦，有小毒，具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效[1]。相关研究表明，吴茱萸水提物、醇提物、挥发油等不同部位或成分群均具有一定毒性，且主要以肝损伤为主[2－4]。相关研究发现，不同产地吴茱萸药材因其基原、生长环境、采收加工、提取方法等因素的影响，其化学成分、药理活性等方面有所不同，从而在临床疗效和毒性方面存在一定差异[5－8]。谱-效（或谱-毒）关系研究是一种定量分析多种成分与生物活性之间的方法，可将指纹图谱中多种化学成分的变化与药效/毒性结果相联系，以阐明中药效应的物质基础[9－10]。基于此，本研究先制备16批不同产地的吴茱萸水提物，并建立该水提物的超高效液相色谱（ultra high performance liquid chromatography，UPLC）指纹图谱，然后结合人正常肝细胞L02来评价其肝毒性，再利用灰色关联度法和偏最小二乘回归分析法进行谱-毒关系分析，以期为吴茱萸药材肝毒性物质基础的进一步研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究的主要仪器有 Agilent 1290 Infinity Ⅱ型二元泵UPLC仪（美国Agilent公司），CPA225D型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]，HR1200-ⅡB2型生物安全柜（青岛海尔股份有限公司），MCO-18AIC型CO_2培养箱（日本Sanyo公司），MULTLSKAN sky型全波长酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），GL6000-DACO150型动态轴向压缩柱系统（成都格莱精密仪器有限公司），Avance Ⅲ HD500M型超导核磁共振波谱仪（德国Bruker公司），AB SCIEX 5500 Qtrap型质谱仪（美国Absciex公司），Milli-Q型超纯水系统（美国Millipore公司）。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的16批吴茱萸药材（编号S1～S16）由课题组在广西玉林药材市场购买，以及在江西、浙江、四川、广西等吴茱萸种植区收集，经广西中医药大学中药鉴定学教研室马雯芳副教授鉴定为芸香科植物吴茱萸 *E. rutaecarpa*（Juss.）Benth.的干燥近成熟果实（药材来源信息见表1）。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的对照品（批号分别为wkq20010607、wkq19112202、wkq19120203、wkq20011605、wkq19040913、wkq20030203、wkq19092506、wkq20021404、wkq19040801，纯度均大于98%）均购自四川省维克奇生物科技有限公司；RPMI-1640培养基（批号20210607）购自江苏凯基生物技术股份有限公司；胎牛血清（批号11011-8611）购自浙江天杭生物科技股份有限公司；CCK-8试剂盒（批号5130011）购自北京索莱宝科技有限公司；乙腈、磷酸为色谱纯，水为超纯水。

表1 16批吴茱萸药材的来源信息

编号	产地	批号	每千粒质量/g	粒径/mm
S1	江西樟树市	20200825	20.0	0.41
S2	安徽宣城市	20200912	12.0	0.34
S3	广西河池市	20200818	23.0	0.42
S4	贵州都匀市	20200814	5.4	0.22
S5	江西樟树市	20190830	16.0	0.34
S6	湖南怀化市	20190904	16.8	0.34
S7	陕西	20200922	16.8	0.35
S8	四川	20200915	26.4	0.42
S9	浙江金华市	20200820	5.6	0.20
S10	浙江丽水市	20200824	5.6	0.20
S11	广西玉林市	20190919	38.4	0.44
S12	四川	20190729	12.8	0.32
S13	四川	20190928	41.6	0.50
S14	云南大理市	20190902	16.0	0.38
S15	浙江杭州市	20190905	16.8	0.35
S16	浙江兰溪市	20190925	24.0	0.43

1.3 细胞

本研究所用人正常肝细胞L02购自上海美轩生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 吴茱萸水提物UPLC指纹图谱的建立

2.1.1 吴茱萸水提物的制备 参考文献[5]方法进行制备。将吴茱萸药材打粉过二号筛，精密称取药材粉末2 g置于100 mL锥形瓶中，加水40 mL浸泡30 min后，加热回流30 min，抽滤，收集滤液；残渣继续加水40 mL，加热回流30 min，抽滤。合并2次滤液，置于蒸发皿中，水浴浓缩至浸膏；将浸膏加水溶解，以10 mL量瓶定容后，即得质量浓度为0.2 g/mL的吴茱萸水提物（以生药量计）。

2.1.2 色谱条件 色谱柱为Waters HSS-T3 C_{18}（150 mm×3.0 mm，1.8 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B）（梯度洗脱：0～3 min，8% A→12% A；3～15 min，

12% A→15% A；15～40 min，15% A→30% A；40～47 min，30% A→45% A；47～50 min，45% A→60% A；50～54 min，60% A→70% A；54～60 min，70% A→80% A；60～65 min，80% A→90% A；65～70 min，90% A→100% A）；流速为0.2 mL/min；检测波长为254 nm；柱温为30 ℃；进样量为2 μL。

2.1.3　供试品溶液的制备　取“2.1.1”项下吴茱萸水提物1 mL置于10 mL量瓶中，加50%乙腈溶液定容至刻度；取定容后的溶液适量，以13 000 r/min离心10 min，取上清液，以0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4　混合对照品溶液的制备　精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的对照品各适量，加甲醇溶解制成上述成分质量浓度分别为0.120、0.146、0.124、0.186、0.113、0.116、0.134、0.122、0.128 mg/mL的混合对照品溶液。

2.1.5　精密度试验　取“2.1.3”项下制备的供试品溶液（S1样品的水提物），按“2.1.2”项下色谱条件连续测定6次，记录色谱图，以19号峰（去氢吴茱萸碱，该峰面积相对较大、出峰时间适中、峰形良好）为参照峰，计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示，各色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.38%（n=6）、相对峰面积的RSD均小于2.51%（n=6），表明该方法精密度良好。

2.1.6　重复性试验　取吴茱萸药材（S1样品）适量，按“2.1.1”项下方法制备水提物6份，然后按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，以19号峰为参照，计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示，各色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.37%（n=6）、相对峰面积的RSD均小于2.95%（n=6），表明该方法重复性良好。

2.1.7　稳定性试验　取“2.1.3”项下制备的供试品溶液（S1样品的水提物），于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时分别按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，以19号峰为参照峰，计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示，各色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.56%（n=6）、相对峰面积的RSD均小于2.89%（n=6），表明该供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.8　16批不同产地吴茱萸水提物样品的UPLC指纹图谱生成　分别取16批不同产地吴茱萸药材样品适量，按“2.1.1”项下方法制备水提物，然后按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。采用《中药指纹图谱相似度评价系统（2012A版）》，以S1样品的色谱图为参照（其色谱峰峰形较好，峰信号强度适中），设置时间窗宽度为0.1 s，采用多点校正法进行色谱峰匹配生成叠加指纹图谱，详见图1；采用中位数法生成对照指纹图谱（R），详见图2。

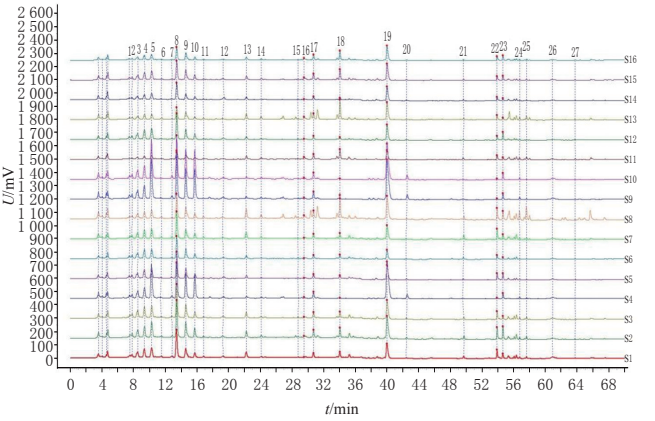


图1　16批不同产地吴茱萸水提物的UPLC叠加指纹图谱

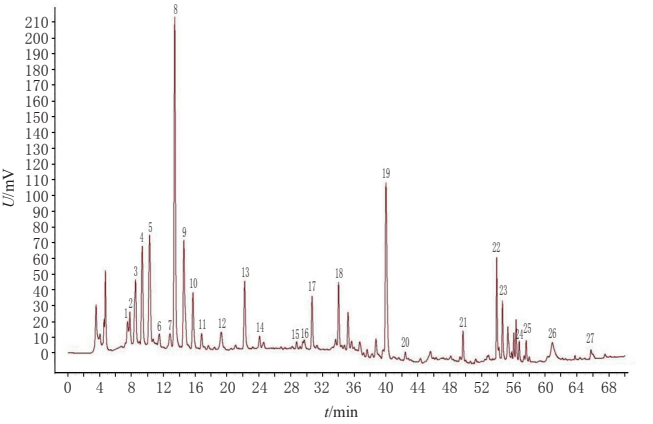
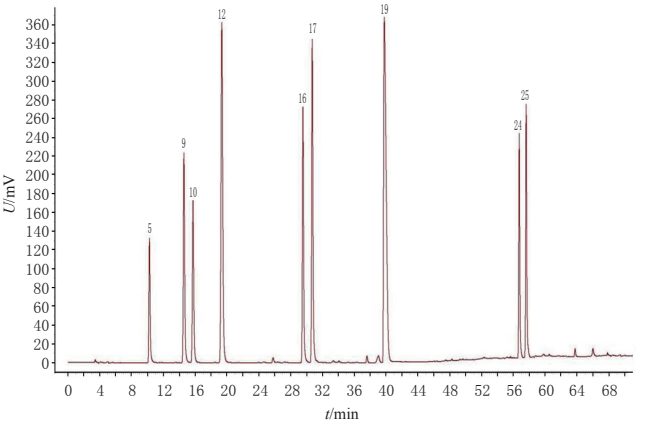


图2　吴茱萸水提物样品的对照指纹图谱（R）

2.1.9　共有峰的指认　取“2.1.4”项下混合对照品溶液适量，按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，得到如图3所示的混合对照品溶液色谱图。由图1和图2可知，16批不同产地吴茱萸水提物样品中含有27个共有峰，通过与图3进行比对，指认出其中9个成分，分别为新绿原酸（峰5）、绿原酸（峰9）、隐绿原酸（峰10）、咖啡酸（峰12）、芦丁（峰16）、金丝桃苷（峰17）、去氢吴茱萸碱（峰19）、吴茱萸碱（峰24）、吴茱萸次碱（峰25）。



5：新绿原酸；9：绿原酸；10：隐绿原酸；12：咖啡酸；16：芦丁；17：金丝桃苷；19：去氢吴茱萸碱；24：吴茱萸碱；25：吴茱萸次碱

图3　混合对照品溶液的色谱图

2.1.10　相似度评价　将16批不同产地吴茱萸水提物样品的UPLC指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012A版）》中进行相似度评价。结果，16批样品的相似度在0.375～0.995范围内，表明不同产地的吴茱萸水提物存在一定差异，详见表2。

2.2　吴茱萸水提物的体外肝毒性考察

2.2.1　细胞培养　将L02细胞以含10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的RPMI-1640培养基（以下简称“培养基”），在37 ℃、5%CO_2的恒温培养箱中培养。当细胞生长至融合度为80%～90%时，以胰酶消化传代，用于后续实验。

2.2.2　细胞抑制率的检测　参考文献[11－13]方法进行吴茱萸水提物的体外肝毒性评价。取对数生长期的L02细胞，调整细胞密度为5×10^4 mL^{-1}，按每孔100 μL接种于96孔板，培养24 h后，吸弃培养基；将细胞分为阴性组和吴茱萸S1～S16水提物组（0.5 mg/mL，药物浓度根据本课题组前期预实验设置），每组设6个复孔，阴性组加入培养基200 μL，各给药组加入相应含药培养基200 μL。各组细胞培养48 h后，每孔弃上清液，以PBS洗涤1次，加入10%CCK-8试剂100 μL，培养2 h后，采用酶标仪于450 nm波长处测定每孔光密度（OD）值并计算细胞抑制率（%）[细胞抑制率＝（1－$OD_{给药组平均值}/OD_{阴性组平均值}$）×100%]。采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析，数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Dunnet检验，检验水准$\alpha=0.05$。结果显示，与阴性组比较，吴茱萸S1～S16水提物组细胞的OD值均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），细胞抑制率在6.68%～67.95%之间，详见表3。

2.3　谱-毒关系分析

2.3.1　灰色关联度分析　以“2.2.2”项下L02细胞抑制率为参考序列，以吴茱萸水提物UPLC指纹图谱中各共有峰峰面积为比较序列，采用均值法对参考数列和比较数列进行无量纲化并计算关联度（当关联度大于0.8时，表明参考序列和比较序列的相关性较大）[14－16]；然后将关联度按大小顺序进行排序，得到关联序，结果见表4。

由表4可知，27个共有峰与L02细胞抑制率的关联度在0.716 4～0.878 0之间；其中，关联度大于0.8的共有峰有18个，依次为峰8＞峰3＞峰23＞峰7＞峰4＞峰9（绿原酸）＞峰12（咖啡酸）＞峰2＞峰19（去氢吴茱萸碱）＞峰6＞峰15＞峰5（新绿原酸）＞峰1＞峰17（金丝桃苷）＞峰21＞峰26＞峰20＞峰14，表明这18个共有峰与肝毒性的关联性较大。

2.3.2　偏最小二乘回归分析　将吴茱萸水提物UPLC指纹图谱中各共有峰峰面积作为自变量（X）、L02细胞抑制率作为因变量（Y），将峰面积归一化处理后导入SIMCA-P 13.5软件，进行偏最小二乘回归分析，结果见图4、图5。

由图4可知，峰1～15、峰17、峰19～26的回归系数为正，表明这些共有峰与吴茱萸的肝毒性作用呈正相关[17]；峰16、18、27的回归系数为负，表明这3个共有峰与吴茱萸的肝毒性作用呈负相关。一般认为，当变量重要性投影（variable importance projection，VIP）＞1时，自变量在解释因变量时具有重要意义[18]。由图5可知，回归系数为正且VIP值＞1的色谱峰共14个，按回归系数由大到小依次为峰8＞峰3＞峰23＞峰2＞峰7＞峰4＞峰12＞峰9＞峰19＞峰5＞峰17＞峰26＞峰10＞峰15，表明这14个共有峰对吴茱萸的肝毒性均有显著影响。

2.3.3　综合分析　将灰色关联度分析中关联度＞0.8、偏最小二乘回归分析中回归系数＞0且VIP值＞1的共有峰进行整合[19]，得到重叠的共有峰13个，分别为峰8、峰3、峰23、峰2、峰7、峰4、峰12（咖啡酸）、峰9（绿原酸）、峰19（去氢吴茱萸碱）、峰5（新绿原酸）、峰17（金丝桃苷）、峰26、峰15，表明这些共有峰所代表的化学成分与吴茱萸的肝毒性相关性强。另外，经上述两种方法分析后发现，峰8与吴茱萸的肝毒性相关性排第1位，由此推测，峰8所对应的化合物可能是吴茱萸水提物的重要肝毒性成分。

表2　16批吴茱萸水提物的相似度评价结果

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	R
S1	1.000	0.775	0.995	0.582	0.796	0.842	0.995	0.858	0.614	0.638	0.670	0.785	0.800	0.719	0.959	0.674	0.895
S2	0.775	1.000	0.756	0.909	0.770	0.804	0.780	0.616	0.920	0.921	0.661	0.755	0.558	0.692	0.708	0.657	0.944
S3	0.995	0.756	1.000	0.581	0.780	0.830	0.989	0.859	0.613	0.637	0.647	0.771	0.806	0.701	0.966	0.656	0.889
S4	0.582	0.909	0.581	1.000	0.600	0.636	0.583	0.412	0.998	0.994	0.457	0.602	0.375	0.540	0.548	0.486	0.851
S5	0.796	0.770	0.780	0.600	1.000	0.977	0.794	0.582	0.631	0.655	0.852	0.990	0.521	0.972	0.713	0.921	0.867
S6	0.842	0.804	0.830	0.636	0.977	1.000	0.841	0.615	0.670	0.698	0.828	0.980	0.564	0.930	0.762	0.888	0.898
S7	0.995	0.780	0.989	0.583	0.794	0.841	1.000	0.867	0.614	0.638	0.683	0.783	0.813	0.718	0.954	0.675	0.897
S8	0.858	0.616	0.859	0.412	0.582	0.615	0.867	1.000	0.434	0.450	0.663	0.567	0.961	0.535	0.908	0.583	0.751
S9	0.614	0.920	0.613	0.998	0.631	0.670	0.614	0.434	1.000	0.998	0.477	0.634	0.392	0.568	0.573	0.509	0.871
S10	0.638	0.921	0.637	0.994	0.655	0.698	0.638	0.450	0.998	1.000	0.495	0.660	0.408	0.589	0.598	0.531	0.885
S11	0.670	0.661	0.647	0.457	0.852	0.828	0.683	0.663	0.477	0.495	1.000	0.836	0.650	0.873	0.661	0.944	0.757
S12	0.785	0.755	0.771	0.602	0.990	0.980	0.783	0.567	0.634	0.660	0.836	1.000	0.507	0.962	0.706	0.921	0.861
S13	0.800	0.558	0.806	0.375	0.521	0.564	0.813	0.961	0.392	0.408	0.650	0.507	1.000	0.485	0.895	0.561	0.704
S14	0.719	0.692	0.701	0.540	0.972	0.930	0.718	0.535	0.568	0.589	0.873	0.962	0.485	1.000	0.646	0.935	0.806
S15	0.959	0.708	0.966	0.548	0.713	0.762	0.954	0.908	0.573	0.598	0.661	0.706	0.895	0.646	1.000	0.655	0.861
S16	0.674	0.657	0.656	0.486	0.921	0.888	0.675	0.583	0.509	0.531	0.944	0.921	0.561	0.935	0.655	1.000	0.774
R	0.895	0.944	0.889	0.851	0.867	0.898	0.897	0.751	0.871	0.885	0.757	0.861	0.704	0.806	0.861	0.774	1.000

表3　不同产地吴茱萸水提物对L02细胞的抑制情况（n=6）

组别	OD值($\bar{x}\pm s$)	细胞抑制率/%
阴性组	1.098±0.069	
吴茱萸S1水提物组	0.715±0.036[a]	34.87
吴茱萸S2水提物组	0.352±0.031[a]	67.95
吴茱萸S3水提物组	0.712±0.023[a]	35.09
吴茱萸S4水提物组	0.817±0.053[a]	25.60
吴茱萸S5水提物组	0.835±0.069[a]	23.96
吴茱萸S6水提物组	0.986±0.018[a]	10.17
吴茱萸S7水提物组	0.849±0.043[a]	22.64
吴茱萸S8水提物组	0.595±0.033[a]	45.79
吴茱萸S9水提物组	0.438±0.033[a]	60.12
吴茱萸S10水提物组	0.527±0.017[a]	51.98
吴茱萸S11水提物组	1.024±0.018[b]	6.68
吴茱萸S12水提物组	0.756±0.066[a]	31.17
吴茱萸S13水提物组	1.001±0.020[a]	8.84
吴茱萸S14水提物组	0.928±0.011[a]	15.48
吴茱萸S15水提物组	1.013±0.004[b]	7.69
吴茱萸S16水提物组	1.004±0.013[a]	8.53

a：与阴性组比较，P<0.01；b：与阴性组比较，P<0.05

表4　吴茱萸水提物UPLC指纹图谱与L02细胞抑制率的关联度及关联序

关联序	峰号	关联度	关联序	峰号	关联度
1	8	0.878 0	15	21	0.820 7
2	3	0.873 8	16	26	0.818 8
3	23	0.870 9	17	20	0.816 5
4	7	0.869 8	18	14	0.808 7
5	4	0.860 8	19	10	0.798 8
6	9	0.855 4	20	24	0.796 7
7	12	0.854 3	21	11	0.794 6
8	2	0.847 9	22	13	0.792 8
9	19	0.843 7	23	22	0.792 0
10	6	0.836 1	24	27	0.767 0
11	15	0.835 9	25	25	0.748 7
12	5	0.829 2	26	16	0.731 8
13	1	0.828 9	27	18	0.716 4
14	17	0.827 4			

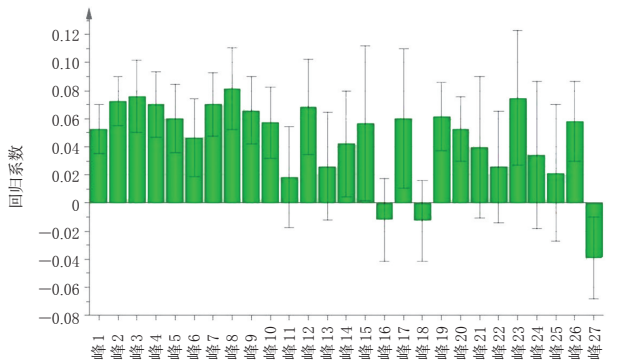


图4　吴茱萸水提物各共有峰与L02细胞抑制率的回归系数图

基于此，笔者参考文献[20]方法，采用制备液相色谱法对吴茱萸水提物的峰8进行分离、纯化。色谱条件如下：色谱柱为C_{18}制备柱（60 cm×15 cm，10 μm），流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液（13∶87，V/V），检测波长为254 nm，流速为450 mL/min，柱温为30 ℃。经反复制备后，

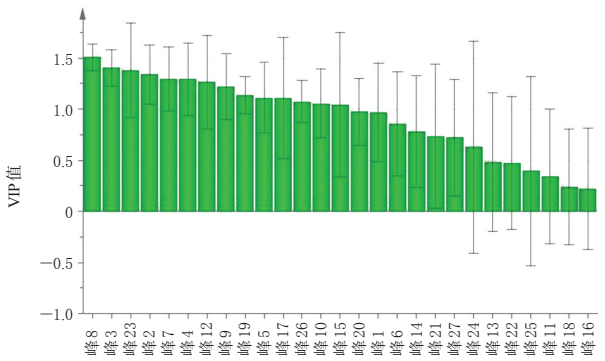


图5　吴茱萸水提物各色谱峰与L02细胞抑制率的VIP直方图

得到高纯度制备液，于40 ℃条件下浓缩，经冷冻干燥后，得到白色固体，即为峰8对应化学成分。经高效液相色谱分析后发现，该化合物纯度较高（约为93%），其色谱图（图略）中未见其他明显杂质峰。进一步进行结构鉴定发现，该化合物为类白色固体，易溶于水、甲醇；电喷雾质谱（ESI-MS）为质荷比（m/z）381[M+Na]$^+$，357[M-H]$^-$；^{1}H-NMR（500 MHz，D_2O）δ：7.41（1H，d，J=15.9 Hz，H-7′），6.98（1H，d，J=2.0 Hz，H-2′），6.93（1H，dd，J=8.3，2.0 Hz，H-6′），6.81（1H，d，J=8.2 Hz，H-5′），6.17（1H，d，J=16.0 Hz，H-8′），4.43（1H，d，J=3.8 Hz，H-2），4.39（1H，dd，J=11.6，3.5 Hz，H-6），4.24（1H，dd，J=11.7，5.8 Hz，H-6），4.15（1H，t，J=3.8 Hz，H-3），4.01（1H，td，J=6.4，3.4 Hz，H-5），3.89（1H，dd，J=7.3，3.8 Hz，H-4）；^{13}C-NMR（126 MHz，D_2O）δ：175.9（C-1），169.3（C-9′），146.9（C-4′），146.0（C-7′），144.1（C-3′），126.8（C-1′），122.7（C-6′），116.0（C-5′），115.0（C-2′），113.9（C-8′），72.2（C-2），71.7（C-4），70.7（C-3），68.6（C-5），65.3（C-6）。以上波谱数据与文献[21]报道基本一致，故鉴定该化合物为6-O-反式咖啡酰葡萄糖酸。

3　讨论

本研究前期对不同流动相（乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%乙酸溶液、乙腈-水）、不同检测波长（215、254、324 nm）进行了考察，结果发现，当流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液、检测波长为254 nm时，所得色谱峰的信息较全、分离度较好且峰形对称、无拖尾现象。

吴茱萸在临床上的用药方式以水煎液为主，因此，本文以吴茱萸水提物进行谱-毒关系研究符合临床的用药特点，具有实际意义。L02细胞是人胚胎期正常肝细胞，适用于药物肝毒性作用的评价[10]。因此，本研究采用L02细胞进行吴茱萸水提物的体外肝毒性评价，结果显示，16批吴茱萸水提物对L02细胞生长均有抑制作用，且抑制率在6.68%～67.95%之间，表明不同产地吴茱萸药材水提物的体外肝毒性作用有所不同。

目前在谱-效（毒）关系分析方法中，常用的数据处理模型有相关分析、回归分析、主成分分析、典型相关分

析、灰色关联度分析等[22]。在实际分析中，很多学者更趋向于采用2种及以上的分析方法来联合应用、相互佐证，以确保分析结果的客观与真实。灰色关联度分析能很好地识别化学成分对药效的贡献，同时对样本数量和数据规律性的要求较低，适用于评价中药化学成分与药效之间的关联程度；但该法缺乏整体性描述，不能识别化学成分对药效是正促进或是负抑制作用[23]。因此，本文又采用偏最小二乘回归分析进行补充，该方法可直观地分析化学成分对药效的综合贡献，更易于辨识系统信息与噪声，且其回归系数更容易解释和分析，可以很好地弥补灰色关联度分析的不足[23]。本研究结果显示，这两种分析方法所得结果大致相似。进一步将两种方法得到的共有峰进行整合，获得了13个肝毒性相关峰，分别为峰8、峰3、峰23、峰2、峰7、峰4、峰12（咖啡酸）、峰9（绿原酸）、峰19（去氢吴茱萸碱）、峰5（新绿原酸）、峰17（金丝桃苷）、峰26、峰15。其中，峰8与吴茱萸肝毒性的相关性排名第1位；经制备液相色谱法分离、纯化、鉴定后发现，该峰对应的物质为6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸。已有研究报道，3-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、4-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸、2-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸为吴茱萸水提物的肝毒性成分，可直接影响L02细胞的增殖[24]。本文所得6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸与上述成分为同分异构体，提示该成分可能是吴茱萸的肝毒性成分。但6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸与上述3种成分是否存在同分异构体间的相互转化，以及是否具有相同的肝毒性作用，仍待进一步研究。由于6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸在单体溶液状态下极不稳定，因此，本研究未对其体外肝毒性作用进行验证和确认。另外，峰3、峰23、峰2、峰7、峰4所对应的化学成分也对吴茱萸的肝毒性有重要贡献，但这些峰具体是什么物质，也有待进一步研究。

综上所述，吴茱萸水提物的体外肝毒性作用是其多组分共同作用的结果，其中6-*O*-反式咖啡酰葡萄糖酸与其体外肝毒性相关性最大。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[S]. 2020年版.北京：中国医药科技出版社，2020：178.

[2] 王会，朱兰兰，黄伟，等.提取方式对吴茱萸“质量-毒性”综合评价模式的影响[J].中国药物警戒，2012，9(5)：279-281.

[3] 尹利顺，吕莉莉，龚彦胜，等.吴茱萸挥发油对大鼠长期毒性实验研究[J].中国药物警戒，2015，12(1)：20-25，29.

[4] 黄伟，孙蓉.吴茱萸水提组分对大鼠长期毒性研究[J].中国实验方剂学杂志，2013，19(8)：269-273.

[5] 李莉，赵军宁，易进海，等.吴茱萸多基原、多产地毒性效应特征研究[J].中国中药杂志，2012，37(15)：2219-2222.

[6] 刘珊珊.吴茱萸水溶性成分及其品质评价研究[D].北京：首都医科大学，2016.

[7] 王亮，窦立雯，郭威，等.基于中药传统用法的毒性Q-Marker发现：以吴茱萸为例[J].中草药，2017，48(6)：1159-1166.

[8] 惠慧，陈祺松，田港，等.基于谱效关联分析的吴茱萸抗炎活性的质量标志物研究[J]. 中草药，2021，52(9)：2589-2596.

[9] 刘昌孝，陈士林，肖小河，等.中药质量标志物(Q-Marker)：中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药，2016，47(9)：1443-1457.

[10] 侯磊，王亮，刘闰平，等.基于谱毒关系和肝毒网络整合模式的柴胡水煎液肝毒物质基础研究[J].中草药，2020，51(10)：2798-2806.

[11] 李萌，马致洁，章从恩，等.西红花对皮质酮诱导的PC12细胞损伤的保护作用研究[J].世界中医药，2019，14(4)：833-838.

[12] 时玉霞，李茹柳，邓娇，等.实时细胞分析法建立小肠上皮细胞生长实验模型[J].中国药理学通报，2018，34(2)：290-294.

[13] 张晟瑞，刘舒凌，钟振国，等.吴茱萸不同炮制品对人正常肝细胞L02的体外肝毒性研究[J].中华中医药学刊，2017，35(10)：2664-2667.

[14] 鲁云，洪婉敏，姚晓璇，等.麸炒北苍术饮片粉末的色度值与质量指标的相关性分析及其炮制时间研究[J].中国药房，2021，32(21)：2605-2612.

[15] 王天合，李慧君，张丹丹，等.茯苓水提物UPLC指纹图谱的建立及其镇静催眠作用的谱效关系研究[J].中国药房，2021，32(5)：564-570.

[16] 林婧，梁洁，黄春燕，等.壮药华佗豆不同极性部位HPLC指纹图谱的建立及其镇痛抗炎作用的谱效关系[J].中国药房，2021，32(17)：2079-2084.

[17] 蒋程，李芳琼，叶佐武，等.基于PLSR算法的CR-KP检出率与抗菌药物使用相关性研究[J].中国临床药理学与治疗学，2017，22(8)：904-909.

[18] 吴环宇，许妍妍，卢志强，等.黑顺片血浆指纹图谱与抗心衰作用的谱效关系研究[J].中草药，2015，46(6)：861-865.

[19] 马宁宁，李欣，金华，等.延胡索不同提取物抗炎作用的谱效关系及机制研究[J].中草药，2019，50(10)：2413-2419.

[20] 韦志英，李耀华，韦建华，等.向日葵花盘中色烯类成分研究及其不同部位中含量测定[J].中成药，2021，43(5)：1221-1225.

[21] WANG L，WANG D J，GUO W，et al. Four new caffeoylgluconic acid positional isomers from the fruits of *Evodia rutaecarpa*[J]. J Asian Nat Prod Res，2019，21(11)：1104-1111.

[22] 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.

[23] 瞿领航，曹国胜，涂济源，等.基于灰色关联度与正交偏最小二乘法分析的苍术挥发油燥性谱效关系研究[J].中草药，2019，51(1)：150-156.

[24] 王亮，孙凯滨，吴晓文，等.吴茱萸水煎液肝毒质量标志物确认研究[J].中草药，2019，50(19)：4547-4555.

（收稿日期：2021-08-11　修回日期：2021-11-22）

（编辑：唐晓莲）