

基于 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱和分子对接技术筛选藿香正气水抗新冠病毒潜在质量标志物

张雅莉¹, 韩建勋^{1,2*}, 图尔荪托合提·托合提萨伊普¹, 孙兆增¹, 宋薇¹, 张玉松³, 魏海燕¹, 肖进进¹

1. 谱尼测试集团股份有限公司, 北京 100095

2. 谱尼测试集团北京检验认证科学研究院有限公司, 北京 100095

3. 北京谱尼医学检验实验室有限公司, 北京 100095

摘要: 目的 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 指纹图谱和分子对接技术, 确定藿香正气水 (Huoxiang Zhengqi Shui, HZS) 抗新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 的潜在质量标志物 (quality markers, Q-Marker)。方法 对 27 批 HZS 样品建立 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱, 结合化学计量学方法, 筛选出 HZS 的差异性成分; 以瑞德西韦为阳性对照, 将 HZS 的差异性成分与 SARS-CoV-2 主蛋白酶 (main protease, Mpro) 进行分子对接, 进一步确定 HZS 的潜在 Q-Marker。结果 通过建立 27 批 HZS 样品的 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱, 标定了 27 种共有化合物; 结合层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 和主成分分析 (principal component analysis, PCA), 确定了其中 14 种共有化合物在 27 批 HZS 样品中具有较大的差异性, 并鉴定出了橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甜橙素、甘草酸、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮、桔皮素、欧前胡素、珊瑚菜素 9 种差异性化合物; 9 种差异性化合物的分子对接结果显示, 橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甘草酸、欧前胡素、珊瑚菜素 6 种化合物能与 SARS-CoV-2 Mpro 的活性氨基酸结合, 具有抑制 SARS-CoV-2 Mpro 的潜能, 可作为 HZS 的潜在 Q-Marker。结论 将 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱、化学计量学分析和分子对接技术交叉使用, 确定了 HZS 的潜在 Q-Marker, 该方法为药物成分鉴定、同一类药物成分差异性分析, 及其功效研究方面提供一定参考。

关键词: 藿香正气水; 质量标志物; UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱; 分子对接; SARS-CoV-2 Mpro 潜在抑制剂预测; 橙皮苷; 氧化前胡素; 新比克白芷内脂; 甘草酸; 欧前胡素; 珊瑚菜素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)19-6023-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.009

Screening potential Q-Marker from Huoxiang Zhengqi Shui based on UPLC-Q-TOF-MS fingerprints and molecular docking

ZHANG Ya-li¹, HAN Jian-xun^{1, 2}, TUERSUNTUOHETI·Tuohetisayipu¹, SUN Zhao-zeng¹, SONG Wei¹, ZHANG Yu-song³, WEI Hai-yan¹, XIAO Jin-jin¹

1. Pony Testing International Group Co., Ltd., Beijing 100095, China

2. Pony Testing International Group Beijing Academy of Inspection and Certification Co., Ltd., Beijing 100095, China

3. Beijing Pony Medical Laboratory Co., Ltd., Beijing 100095, China

Abstract: Objective To screen the potential quality markers (Q-Marker) of anti-coronavirus of Huoxiang Zhengqi Shui (藿香正气水, HZS) based on the ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) fingerprints and molecular docking. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS fingerprints and chemometric methods were employed to establish fingerprints and find out the difference between the peaks for the 27 batches of HZS samples. The SARS-CoV-2 main protease (Mpro) inhibition potential of the differential compounds among the 27 batches of HZS were further predicted by molecular docking with remdesivir as positive control. **Results** The UPLC-Q-TOF-MS fingerprints of 27 batches of HZS samples were set up with 27 common peaks. Combined with hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA), 14 common peaks were determined as differential compounds, and nine of them were identified as hesperidin, oxypeucedanin, neobakangelicol,

收稿日期: 2022-04-12

基金项目: 北京市“科技助力经济 2020”重点专项 (SQ2020YFF0414333); 2020 年苏州市新型冠状病毒感染应急防治专项 (XG56)

作者简介: 张雅莉, 硕士, 中级工程师, 研究方向为药品分析与检测。E-mail: yfh@ponytest.com

*通信作者: 韩建勋, 博士, 副研究员, 研究方向为药品质量与安全控制。E-mail: yfb@ponytest.com

sinensetin, glycyrrhizic acid, 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, tangeretin, imperatorin and phellopterin. Molecular docking results showed that a total of six differential compounds were proven to have a certain inhibitory effect on SARS-CoV-2 Mpro, which can be used as potential Q-Marker of HZS, including hesperidin, oxypeucedanin, neobakangelicol, glycyrrhizic acid, imperatorin and phellopterin. **Conclusion** The potential Q-Marker of HZS was determined by UPLC-Q-TOF-MS fingerprints, chemometric analysis and molecular docking. This method may provide a certain reference for the identification of various drug components, analysis of the differences of the same type drug components and pharmaceutical activity evaluation.

Key words: Huoxiang Zhengqi Shui; Q-Marker; UPLC-Q-TOF-MS fingerprint; molecular docking; SARS-CoV-2 Mpro potential inhibitor prediction; hesperidin; oxypeucedanin; neobakangelicol; glycyrrhizic acid; imperatorin; phellopterin

藿香正气水 (Huoxiang Zhengqi Shui, HZS) 是由苍术、陈皮、厚朴 (姜制)、白芷、茯苓、大腹皮、生半夏、甘草浸膏、广藿香油、紫苏叶油等提取配制而成, 具有解表化湿、理气和中的作用, 用于外感风寒、内伤湿滞或夏伤暑湿所致的感冒、胃肠型感冒等症^[1]。自新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 爆发以来, 中药治疗发挥了不可或缺的作用, 其中藿香正气系列中成药是《新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第九版)》中医学观察期表现为乏力伴胃肠不适者的推荐用药, 现已在抗疫一线初显成效^[2-3]。经查证, 在国家药品监督管理局备案的 HZS 产品共有 162 条记录, 且不同 HZS 产品价格也有很大差异, 同规格的产品价格差异可达 20 倍之多。有文献^[4-6]表明, 不同厂家的 HZS 产品质量差异较大。经查询国家药品监督管理局官网, 近 5 年, 就有 87 条 HZS 违规查处记录, 是中成药中的常见风险监控项目。目前, 有些厂家为了降低生产成本, 采用质量较差的原材料, 或以设备简陋、索价低廉的小厂代为提取浓缩^[7], 这导致了不同厂家 HZS 的质量差异, 从而直接影响了其临床使用中的药物有效性。因此, 对 HZS 进行成分鉴别和成分功效评价, 在提高其药物有效性方面具有重大意义。

中药指纹图谱是我国广为接受的中药质量评价方法, 可以直观地揭示中药化学特征, 从化学信息的角度评价中药质量, 用于筛选能够真实反映产品内在品质的标志物^[8-11]。目前对于 HZS 指纹图谱的建立和质量评价研究, 主要集中在气相和液相色谱指纹图谱, 通过标示 HZS 特征的共有峰图谱, 以评价其均一性和稳定性。例如聂黎行等^[12]建立了 13 个厂家的 28 批 HZS 的 UPLC 指纹图谱, 确定了 18 个共有峰, 并采用层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 和主成分分析 (principal component analysis, PCA) 方法, 对指纹图谱进行了模式识别; 李红梅等^[13]建立了 10 批 HZS 气相色谱指纹图谱, 确定了 16 个共有峰。然而液相色谱和气相色谱指

图谱存在一定的片面性, 尚无法实现更为完整全面的质量评价及鉴别目的, 且对共有峰的指认较困难。

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 将具有高分离度、高灵敏度的液相色谱系统, 与能同时提供母离子和碎片离子准确质量数以及元素组成的高分辨质谱有机结合, 通过建立指纹图谱, 可快速分析和表征中药材复杂成分^[14-15]。分子对接技术以结构分子生物学和计算机辅助药物设计相结合的方式, 通过将配体与受体进行对接, 评价其对接体系的稳定性, 筛选与受体活性部位空间和电性特征相匹配的小分子化合物, 具有周期短、操作性强等优势, 已经逐渐成为中药活性成分筛选的重要手段, 广泛应用于中药质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 的筛选过程中^[16-19]。有研究表明, 藿香正气水中的主要成分包括橙皮苷、甘草酸、欧前胡素、厚朴酚等^[5]。其中橙皮苷^[20]和甘草酸^[21]与新型冠状病毒 SARS-CoV-2 主蛋白酶 (main protease, Mpro) 具有较好的结合亲和力, 从而对 SARS-CoV-2 产生一定的抑制作用。因此, 为进一步对 HZS 进行质量评价, 明确不同生产厂家 HZS 的共有物质基础和潜在 Q-Marker, 提高其质量控制水平, 本研究以 25 个厂家共计 27 批 HZS 作为研究对象, 建立了 HZS 的 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱, 标定了其共有峰并进行化合物表征, 通过相似度评价结合 HCA 和 PCA 等模式识别方法评价不同厂家的 HZS 差异性; 并选用 SARS-CoV-2 Mpro 为筛选靶标, 与 HZS 的差异性成分进行分子对接获得抗 SARS-CoV-2 的潜在活性成分, 进一步确定 HZS 的潜在 Q-Marker, 为 HZS 质量评价和有效控制提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

Xevo G2-XS 型超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱, 美国 Waters 公司, MassLynx 4.1 软件; AB135-S 型分析天平 (感量 0.01 mg)、AB204-S 型

分析天平(感量 0.1 mg), 瑞士 Mettler Toledo 公司; Milli-Q 型超纯水系统, 美国 Millipore 公司; 有机相滤膜(尼龙), 0.22 μm , 天津博纳艾杰尔科技有限公司。

1.2 材料与试剂

HZS 产品在网上药店进行采购, 共收集 25 个厂家的 27 个品牌共计 27 批产品, 详见表 1。对照品甘草苷(批号 111610-201908)、橙皮苷(批号 110721-202019)、厚朴酚(批号 110729-202015)均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均 $\geq 98\%$; 对照品甘草酸(批号 C0008456)、欧前胡素(批号 B0002871)均购自曼哈格检测技术股份有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。乙醇、乙腈, 色谱级, 美国 Fisher

Scientific 公司; 甲酸, 美国 Acros 公司, 质量分数 98%; 水为自制超纯水。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

取 HZS 样品 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加入 50%乙醇溶液定容至刻度, 涡旋混匀, 取适量过 0.22 μm 滤膜, 即得供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC[®] HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温 45 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 5 μL ; 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈; 平衡时间 15 min; 梯度洗脱: 0~7 min, 10%~20%乙腈; 7~30 min, 20%~50%乙腈; 30~35 min, 50%~90%乙腈; 35~37 min, 90%乙腈; 37~37.1 min, 90%~10%乙腈; 37.1~40 min, 10%乙腈; 离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气温度 550 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气体积流量 600 L/h; 锥孔气体积流量 50 L/h; 毛细管电压 2 kV; 锥孔电压 40 eV; 离子源: ESI⁺; 工作模式: MS^E 模式; 扫描模式: 灵敏度模式; 扫描范围 m/z 50~1000; 扫描时间 1.0 s; 碰撞能量: 低碰撞能量为 off, 高碰撞能量为 20~40 eV。

2.3 指纹图谱建立

将 27 批 HZS 样品按“2.1”项方法处理后按照“2.2”项方法进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析, 生成基峰离子流(base peak chromatogram, BPI)谱图, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 建立指纹图谱, 并进行相似度分析。

2.4 共有峰鉴定

将 UPLC-Q-TOF-MS 采集的 HZS 样品数据, 导入到 UNIFI 1.9.4 软件中完成质量校正、加和离子设定等处理, 进行化合物峰提取, 并结合 UNIFI 1.9.4 软件自带的中药数据库以及 Chemical Book 等线上数据库进行化合物匹配鉴定。UNIFI 1.9.4 软件参数设置: 高能量下响应阈值为 20, 低能量下响应阈值为 200; 精确质量偏差阈值为 m/z 0.005; 可识别的化合物加和峰形式包括 +H、+H₂O+H、-e 峰。

2.5 数据分析

将 UPLC-Q-TOF-MS 采集的 HZS 样品相关数据, 分别导入到 IBM SPSS Statistics 21.0 软件以及 EZInfo 3.0 软件进行 HCA 和差异显著性检验以及 PCA, 分析不同 HZS 样品的差异性。

2.6 分子对接

将“3.4”项中得到的差异性成分与 SARS-CoV-

表 1 27 批 HZS 样品信息

Table 1 Information of 27 batches of HZS samples

样品编号	厂家	品牌	生产批号
S1	云南白药集团股份有限公司	云南白药	WTEB2102
S2	云南万裕药业有限公司	葵花	210004B
S3	云南裕丰药业有限公司	万通	200001A
S4	云南楚雄天利药业有限公司	健之佳	20200876
S5	云南裕丰药业有限公司	东盛友邦	200002D
S6	云南腾药制药股份有限公司	腾药	20201221
S7	广东一力罗定制药有限公司	好立康	210705
S8	广西灵峰药业有限公司	金鸡	20042902
S9	漳州片仔癀药业股份有限公司	片仔癀	2006038
S10	四川彩虹制药有限公司	康森	210504
S11	四川天府康达药业集团有限公司	府庆	210704
S12	四川泰华堂制药有限公司	泰华堂	210516
S13	四川依科制药有限公司	蜀中	210612
S14	四川省通园制药集团有限公司	育林	200510
S15	四川泰华堂制药有限公司	正远	210607
S16	四川德元药业集团有限公司	德辉	210415
S17	四川禾邦旭东制药有限公司	禾邦	200502
S18	太极集团重庆涪陵制药厂有限公司	太极	2021022
S19	湖南时代阳光药业股份有限公司	永州	20210302
S20	湖南汉森制药股份有限公司	汉森	2004101
S21	湖北东信药业有限公司	东信	210201
S22	武汉太福制药有限公司	太福	210506
S23	天津和治药业集团有限公司	美舒通	210201
S24	天津中新药业集团股份有限公司	隆顺裕	060084
S25	北京同仁堂科技发展股份有限公司	同仁堂	20140162
S26	吉林省抚松制药股份有限公司	林海	191004
S27	吉林隆泰制药股份有限公司	明复	20200614

2 Mpro 进行分子对接筛选出抗 SARS-CoV-2 的潜在活性成分, 进一步确定 HZS 的潜在 Q-Marker。SARS-CoV-2 Mpro 蛋白 (PDB ID: 7AF0) 的晶体结构从 RSCB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获取。运用 PyMOL (version 2.3.1) (<https://pymol.org/>) 可视化软件移除配体和水分子, 用 AutoDock (ADT, version 1.5.6) 软件加氢、加电荷 (compute gastieger), 建立刚性盒子, 盒子的三维坐标参数如表 2 所示。筛选出的 HZS 差异性成分 3D 结构的 SDF 格式文件从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取, 用 PyMOL 可视化软件获得 pdb 格式文件, 用 AutoDock 激活其可旋转的氢原子, 并且以 pdbqt 文件的形式保存。前期工作

表 2 刚性盒子的三维坐标参数

设置参数		数值/nm
盒子的中心坐标值	x	1.224 0
	y	-1.325 1
	z	0.514 5
盒子三维坐标值	x	4.0
	y	6.8
	z	6.8

准备好之后, 打开 Command Prompt 命令提示符窗口进行 Vina 对接。得到的对接结构通过 PyMOL 软件可视化, 通过 Ligplot 软件 (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) 和蛋白质-配体相互作用分析工具 (<https://plip.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) 分析 HZS 差异性成分与 SARS-CoV-2 Mpro 之间形成的氢键、疏水键等作用力。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱建立

将 27 批 HZS 样品的 BPI 谱图以 cdf 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行分析, 以 S1 样品谱图为参照图谱, 设定时间窗宽度为 0.1 min, 进行多点校正后自动峰匹配, 其指纹图谱叠加见图 1, 共确定 27 个共有峰, 以中位数法生成对照指纹图谱 (图 R)。将各样品与 R 进行比较, 得到 S1~S27 的相似度分别为 0.910、0.922、0.972、0.819、0.984、0.982、0.975、0.909、0.927、0.976、0.937、0.790、0.914、0.935、0.837、0.816、0.950、0.973、0.947、0.941、0.900、0.963、0.947、0.966、0.931、0.899、0.855, 各样品的相似度分布在 0.790~0.984, 表明 27 批 HZS 样品质量存在一定的差异性。

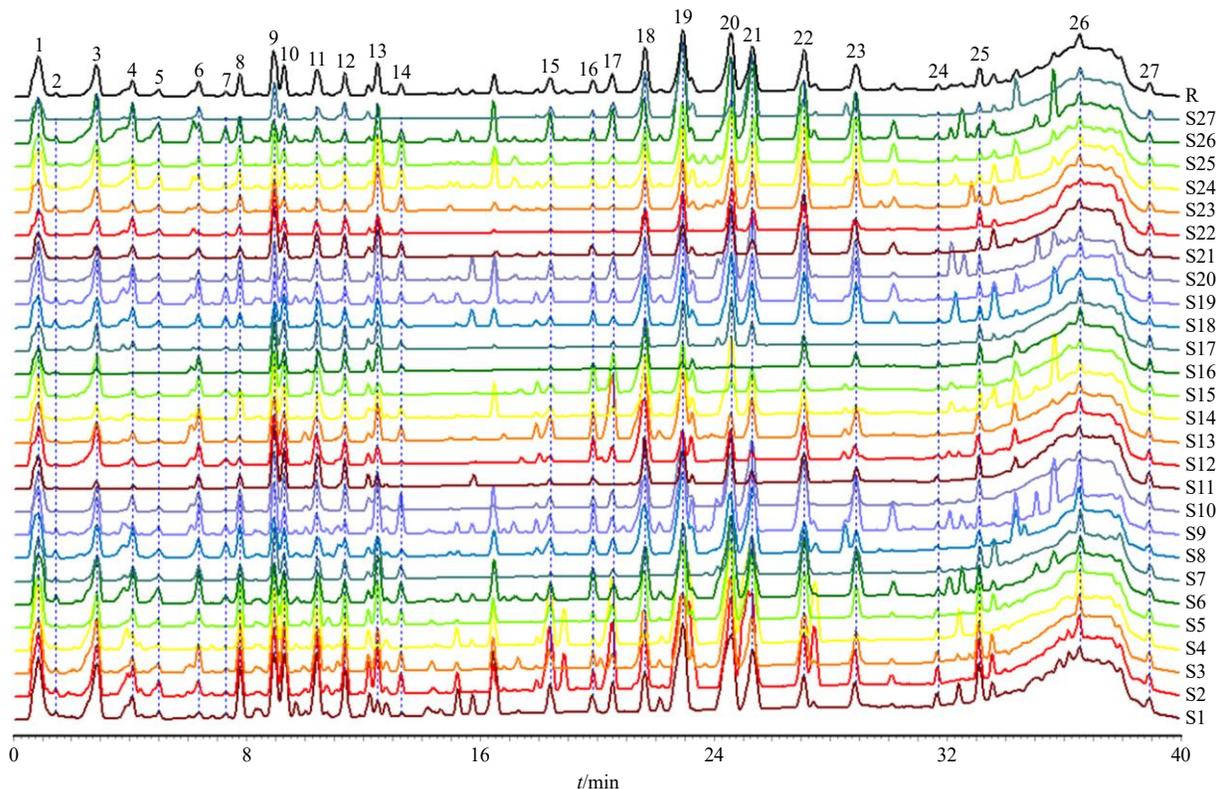


图 1 27 批 HZS 指纹图谱叠加

Fig. 1 Superimposed fingerprint of 27 batches of HZS samples

3.2 主要共有峰鉴定

使用 UNIFI 软件对 27 批 HZS 样品的 MS^E 原始数据进行处理。进行峰识别和对齐后, 得到包含母离子质荷比 *m/z*、保留时间 RT 和离子响应强度的数据矩阵, 结合 UNIFI 软件自带的中药数据库及 Chemical Book 等线上数据库对“3.1”项中确定的 27 个共有峰进行鉴定, 推断出 14 种化合物(表 3),

其中 5 种化合物经过对照品进行比对验证, 1 (槟榔次碱) 号峰来源于大腹皮, 6 (甘草苷)、8 (新甘草苷)、18 (甘草酸) 号峰来源于甘草, 9 (橙皮苷)、15 (甜橙素)、19 (川陈皮素)、20 (3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮, 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, HMOF)、21 (桔皮素) 号峰来源于陈皮, 13 (氧化前胡素)、14 (新比克白芷内脂)、22 (欧前胡素)、

表 3 27 批 HZS 主要共有峰的鉴定

Table 3 Identification of mainly common peaks of 27 batches of HZS samples

峰号	<i>t_R</i> /min	化合物	分子式	准分子离子 (<i>m/z</i>)	$\delta/(\times 10^{-6})$	加和离子	来源药材
1	0.85	槟榔次碱	C ₇ H ₁₁ NO ₂	160.096 1	-5.0	+H ₂ O+H, +H	大腹皮 ^[22-23]
6	6.35	甘草苷*	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.133 4	-0.7	+H	甘草 ^[24]
8	7.76	新甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.133 2	-1.2	+H	甘草 ^[25-26]
9	8.94	橙皮苷*	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.197 7	1.0	+H	陈皮 ^[27-29]
13	12.50	氧化前胡素	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	305.101 8	-0.6	+H ₂ O+H	白芷 ^[30-31]
14	13.30	新比克白芷内脂	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	317.102 0	0.0	+H, +H ₂ O+H	白芷 ^[31]
15	18.40	甜橙素	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.127 8	-1.1	+H	陈皮 ^[29,32]
18	21.64	甘草酸*	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	823.411 3	0.4	+H	甘草 ^[33-34]
19	22.94	川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.138 5	-0.5	+H	陈皮 ^[28-29]
20	24.60	HMOF	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	433.149 2	-0.2	+H, -e	陈皮 ^[29]
21	25.32	桔皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.128 3	0.3	+H	陈皮 ^[28]
22	27.10	欧前胡素*	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.096 5	0.0	+H	白芷 ^[31]
23	28.88	珊瑚菜素	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	301.107 0	0.0	+H	白芷 ^[35]
24	31.69	厚朴酚*	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	267.137 5	-1.5	+H	厚朴 ^[36]

*为经对照品验证

*compound confirmed by reference substance

23 (珊瑚菜素) 号峰来源于白芷, 24 (厚朴酚) 号峰来源于厚朴。

3.3 HCA

将“3.1”项中得到的 27 个共有峰的峰面积数据导入 IBM SPSS Statistics 21.0 软件中, 运用 ward 法, 以平方欧氏(Euclidean)距离为测度, 进行 HCA, 结果如图 2 所示。当平方 Euclidean 距离为 5 时, 各样品聚类效果最好, 27 批 HZS 样品可分为 3 类, S7、S11~S13、S15~S17、S21~S23、S25、S27 聚为一类, S3、S5、S6、S8~S10、S14、S18~S20、S24、S26 聚为一类, S1、S2 和 S4 聚为一类。

3.4 PCA

应用 EZInfo 3.0 软件对正离子模式下各 HZS 样品的 UPLC-Q-TOF-MS 原始数据进行 PCA, 图 3 为其 PCA 得分图。结果显示, 各 HZS 样品分为 3 类, S7、S10~S13、S15~S17、S21、S22、S27 为一类, S6、S8、S9、S14、S18~S20、S23~S26 为一类,

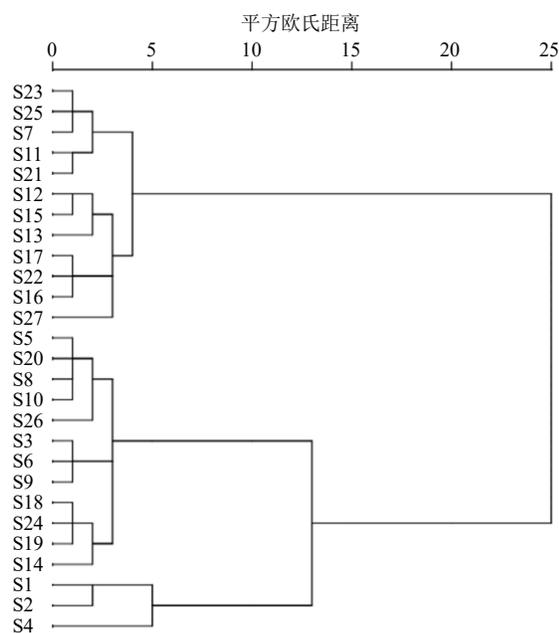


图 2 27 批 HZS 样品的 HCA

Fig. 2 HCA of 27 batches of HZS samples

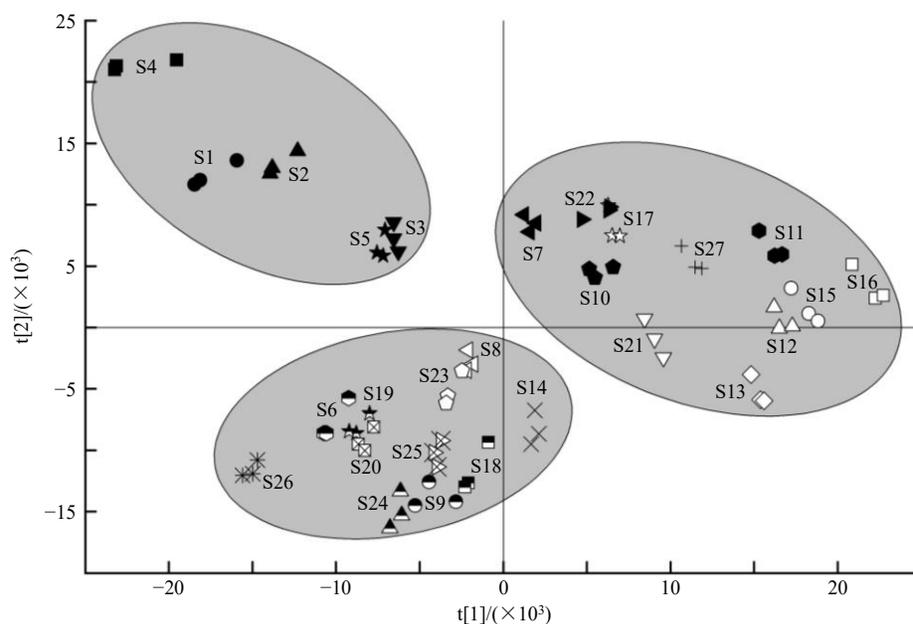


图3 27批 HZS 样品的 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plots of 27 batches of HZS samples

S1~S5 为一类。除 S3、S5、S10、S23、S25 样品外，其他样品的 PCA 结果与“3.3”项 HCA 结果一致。

通过载荷散点图进一步对影响 HZS 质量的化学成分进行比较和分析。在载荷散点图中的各个点表示各个质荷比-保留时间变量，根据变量离原点的距离判定变量对主成分的权重影响，离原点越远则表明该变量对主成分的影响权重越大^[37]。图 4 为各 HZS 样品 27 个共有峰的 PCA 载荷散点图，可以看出 9（橙皮苷）、18（甘草酸）、20（HMOF）、21（桔皮素）、26 号峰对主成分 1 的贡献率较大，10、13

（氧化前胡素）、14（新比克白芷内脂）、15（甜橙素）、16、17、22（欧前胡素）、23（珊瑚菜素）、25 号峰对主成分 2 的贡献较大，说明以上 14 种化合物在 27 批 HZS 样品中的相对含量存在较大差异，是 HZS 的差异性成分。

3.5 潜在 Q-Marker 的确定

以药物瑞德西韦为阳性对照，以 HZS 9 种已鉴定出的差异性成分橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甜橙素、甘草酸、HMOF、桔皮素、欧前胡素、珊瑚菜素作为研究对象，分别与 SARS-CoV-2

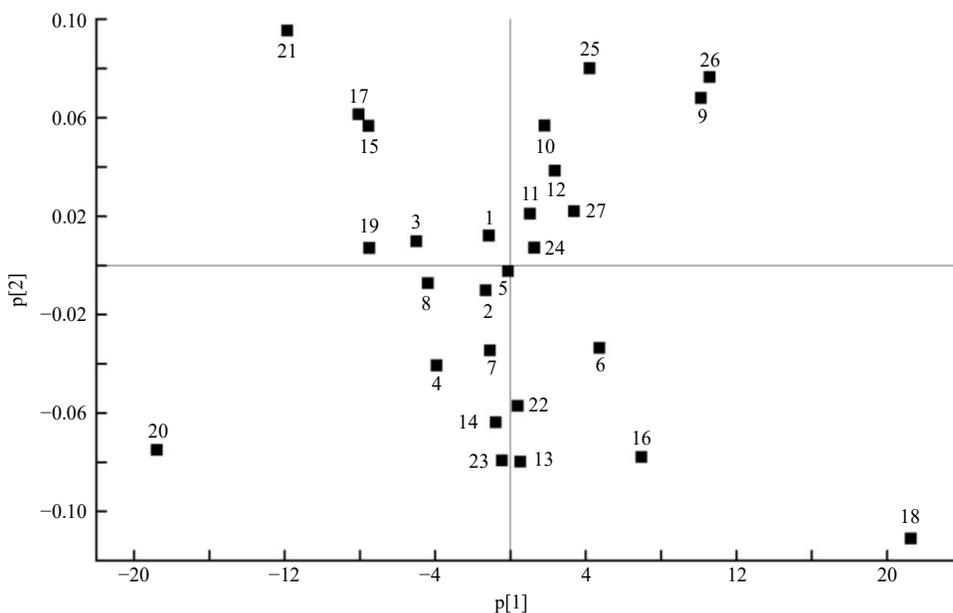


图4 27批 HZS 样品的 PCA 载荷散点图

Fig. 4 Loading plots of 27 batches of HZS samples

Mpro 进行对接,以结合能大小、结合位点等作为评价指标,筛选出对 SARS-CoV-2 Mpro 可能有抑制作用的 HZS 潜在活性成分,作为 HZS 的潜在 Q-Marker。阳性对照和 9 种差异性成分与 SARS-CoV-2 Mpro 的对接结果如表 4 所示。由表 4 可知,瑞德西韦与 SARS-CoV-2 Mpro 的结合能为-28.88 kJ/mol,差异性成分中橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甜橙素、甘草酸、HMOF、桔皮素、欧前胡素、珊瑚菜素与 SARS-CoV-2 Mpro 的结合能分别为-36.84、-26.37、-28.46、-26.37、-38.09、-25.53、-26.37、-28.04、-28.46 kJ/mol,可见这 9 种差异性

成分与 SARS-CoV-2 Mpro 结合能接近于阳性对照与 SARS-CoV-2 Mpro 的结合能。有文献显示,复合物的稳定性主要由配体和受体之间形成的氢键和疏水键等作用力大小决定,形成的作用力越多,配体与受体结合的稳定性越高^[38-39]。由表 4 可知,瑞德西韦与 SARS-CoV-2 Mpro 结合,形成 2 个氢键和 13 个疏水键,橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甜橙素、甘草酸、HMOF、桔皮素、欧前胡素、珊瑚菜素与 SARS-CoV-2 Mpro 结合分别形成了 9、2、3、3、8、3、3、1、1 个氢键和 9、8、7、7、8、6、6、8、7 个疏水键,这可能是这 9 种化合物与

表 4 HZS 的差异性成分与 SARS-CoV-2 Mpro 的结合能、氢键和疏水键信息

Table 4 Binding affinity, interactions with SARS-CoV-2 Mpro and binding sites of differential compounds in HZS

化合物名称	结合能/ (kJ·mol ⁻¹)		氢键		疏水键	
	数量	结合位点	数量	结合位点	数量	结合位点
橙皮苷	-36.84	9	Thr24, Cys44, His41, Glu166, Cys145, Thr26	9	Thr45, Met49, Ser46, Gln189, His163, Ser144, Leu141, Gly143, Thr25	
氧化前胡素	-26.37	2	Glu166, Cys145	8	Met165, Met49, Thr25, Leu27, Gly143, Asn142, His164, His163	
新比克白芷内脂	-28.46	3	Arg298, Thr111, Thr292	7	Phe294, Asn151, Asp295, Gln110, Ile106, Ser158, Asp153	
甜橙素	-26.37	3	Lys137, Leu287, Arg131	7	Asp289, Leu286, Leu271, Leu272, Tyr239, Tyr237, Thr199	
甘草酸	-38.09	8	Ser158, Arg298, Asp295, Asn151, Thr111, Gln110	8	Asp245, Gln107, Val104, Asp153, Phe8, Phe294, Ile249, His246	
HMOF	-25.53	3	Lys137, Thr199, Ser284	6	Asp197, Arg131, Leu287, Asp289, Glu288, Leu286	
桔皮素	-26.37	3	Thr199, Leu287, Lys137	6	Asp289, Tyr237, Tyr239, Leu272, Leu271, Leu286	
欧前胡素	-28.04	1	Ser158	8	Phe294, Asp295, Asp153, Val104, Ile106, Gln110, Asn151, Thr111	
珊瑚菜素	-28.46	1	Ser158	7	Phe294, Gln110, Ile106, Asp153, Lys102, Ile152, Asn151	
瑞德西韦	-28.88	2	Thr24, Phe140	13	Thr26, His41, Thr25, Gly143, Cys145, His163, Leu141, Glu166, Met165, Gln189, Ser46, Met49, Asn142	

有些氨基酸残基形成 2 个氢键,因此氢键数量≥氨基酸残基数

some amino acid residues form two hydrogen bonds, so the number of hydrogen bonds ≥ the number of amino acid residues

SARS-CoV-2 Mpro 的结合能小于或者较为接近瑞德西韦的原因。

据文献报道^[40], SARS-CoV-2 Mpro 具有 S1 (Phe140、Leu141、His163、Met165、Glu166、His172)、S2 (Met49、Asp187、Gln189)、S1' (Thr25、Leu27、Cys38、Pro39、Val42、Cys145)、S2' (Thr26、Asn28、Tyr118、Asn119、Gly143) 和 S4 (Leu167、Gln192) 5 个活性口袋,配体通常需要与靶蛋白的关键活性氨基酸残基结合,才能有效抑制其活性^[41]。从结合位点角度分析,瑞德西韦位于 SARS-CoV-2 Mpro 活性口袋 S1、S2、S1'、S2'和 S4 中(图 5),且与 S1 的活性氨基酸残基 Phe140 结合形成 1 个氢键,与 S1、S2、S1'、S2'的活性氨基酸残基 Thr26、Thr25、Gly143、Cys145、His163、Leu141、Glu166、Met165、Gln189、Met49 结合形成 10 个疏水键(表 4 和图 6-

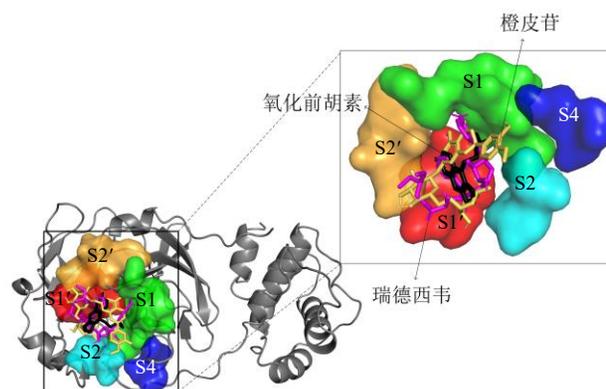


图 5 SARS-CoV-2 Mpro 活性口袋 S1、S2、S1'、S2'和 S4 与配体瑞德西韦、橙皮苷和氧化前胡素对接的 3D 示意图
Fig. 5 Active pockets S1, S2, S1', S2', S4 and 3D structure of docking results of remdesivir, hesperidin and oxypeucedanin with SARS-CoV-2 Mpro

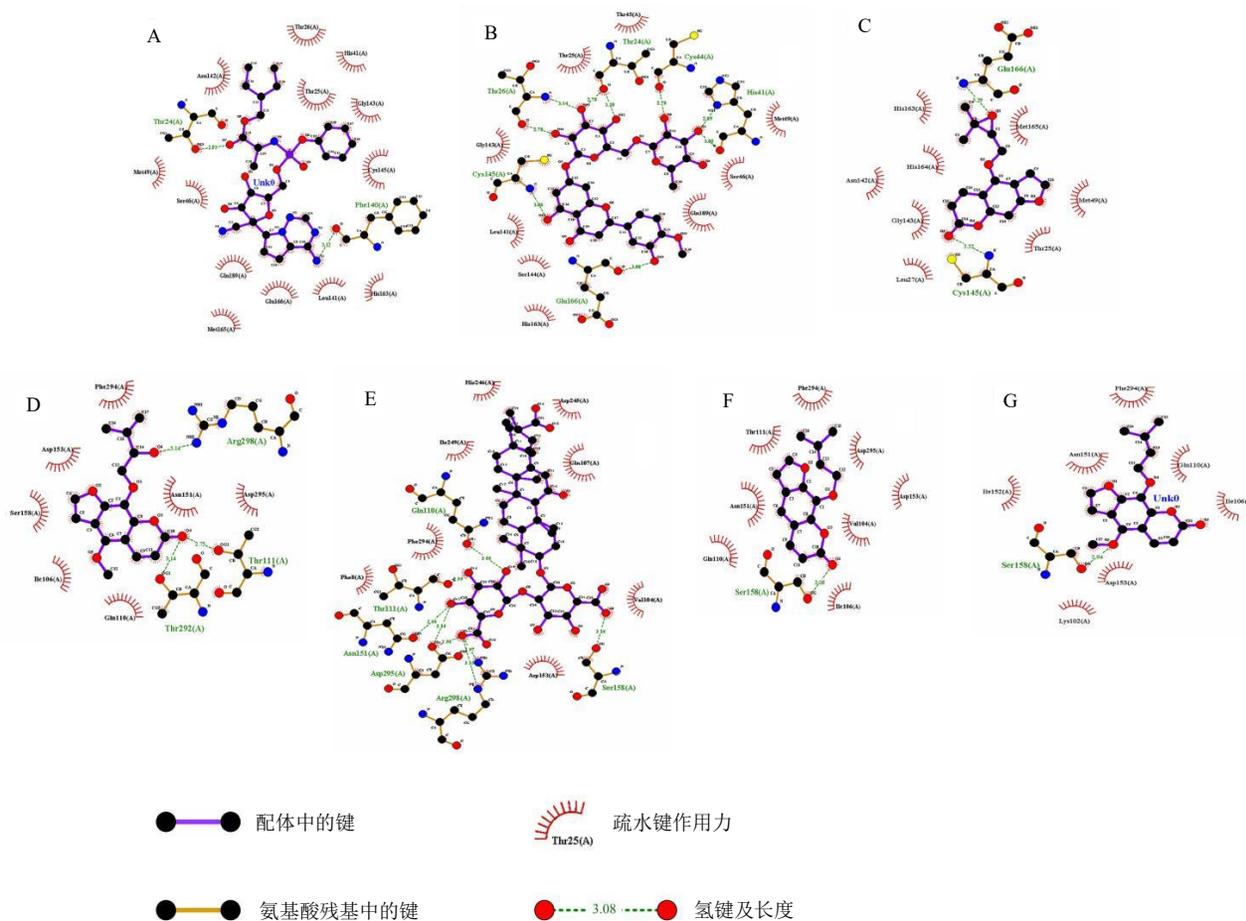


图 6 瑞德西韦 (A)、橙皮苷 (B)、氧化前胡素 (C)、新比克白芷内脂 (D)、甘草酸 (E)、欧前胡素 (F)、珊瑚菜素 (G) 与 SARS-CoV-2 Mpro 的分子对接 2D 图

Fig. 6 2D structure of docking results of remdesivir (A), hesperidin (B), oxypeucedanin (C), neobakangelicol (D), glycyrrhizic acid (E), imperatorin (F) and phellopterin (G) with SARS-CoV-2 Mpro

A)。而 9 种差异性成分中橙皮苷和氧化前胡素也位于活性口袋 S1、S2、S1'、S2'和 S4 中 (图 5)，橙皮苷与 S1、S1'、S2'的活性氨基酸残基 Glu166、Cys145、Thr26 结合形成 4 个氢键，与 S1、S2、S1'、S2'的活性氨基酸残基 Met49、Gln189、His163、Leu141、Gly143、Thr25 结合形成 6 个疏水键 (表 4 和图 6-B)；氧化前胡素与 S1、S1'的活性氨基酸残基 Glu166、Cys145 结合形成 2 个氢键，与 S1、S2、S1'、S2'活性氨基酸残基 Met165、Met49、Thr25、Leu27、Gly143、His163 结合形成 6 个疏水键 (表 4 和图 6-C)。

此外，还有文献报道^[42-43]，Thr24、His41、Cys44、Thr45、Ser46、Asn142、Ser144、His164、Pro168、Arg188、Thr190、Thr111、Thr292、Phe294、Gln110、Asp153、Gln107、Ile249、His246 等也是 SARS-CoV-2 Mpro 的活性氨基酸残基，可形成 SARS-CoV-2

Mpro 的活性口袋 S5 (图 7)。瑞德西韦、橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甘草酸、欧前胡素、珊瑚菜素落在 S5 口袋中，且与活性氨基酸残基结合 (图 7)。其中，瑞德西韦与 S5 的活性氨基酸残基 Thr24 结合形成 1 个氢键，与活性氨基酸残基 His41、Ser46、Asn142 结合形成 3 个疏水键 (表 4 和图 6-A)；橙皮苷与 S5 的活性氨基酸残基 Thr24、Cys44、His41 结合形成 5 个氢键，与活性氨基酸残基 Thr45、Ser46、Ser144 结合形成 3 个疏水键 (表 4 和图 6-B)；氧化前胡素与 S5 的活性氨基酸残基 Asn142、His164 结合形成 2 个疏水键 (表 4 和图 6-C)；新比克白芷内脂与 S5 的活性氨基酸残基 Thr111、Thr292 结合形成 2 个氢键，与活性氨基酸残基 Phe294、Gln110、Asp153 结合形成 3 个疏水键 (表 4 和图 6-D)；甘草酸与 S5 的活性氨基酸残基 Thr111、Gln110 结合形成 2 个氢键，与活性氨基

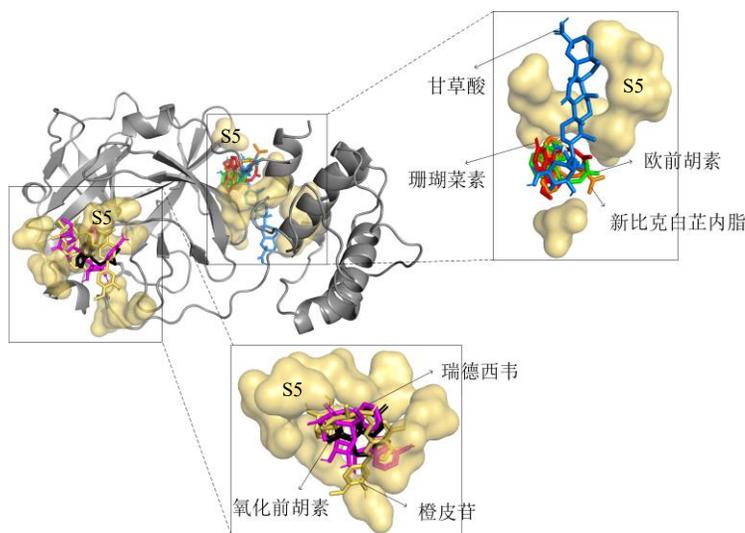


图7 SARS-CoV-2 Mpro 活性口袋 S5 和配体瑞德西韦、橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甘草酸、欧前胡素和珊瑚菜素对接的 3D 示意图

Fig. 7 Active pocket S5 and 3D structure and docking results of remdesivir, hesperidin, oxypeucedanin, neobyakangelicol, glycyrrhizic acid, imperatorin and phellopterin with SARS-CoV-2 Mpro

酸残基 Gln107、Asp153、Phe294、Ile249、His246 结合形成 5 个疏水键(表 4 和图 6-E); 欧前胡素与 S5 的活性氨基酸残基 Phe294、Asp153、Gln110、Thr111 结合形成 4 个疏水键; 珊瑚菜素与 S5 的活性氨基酸残基 Phe294、Gln110、Asp153 结合形成 3 个疏水键(表 4 和图 6-F)。

综上, 9 种差异性化合物中, 只有橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甘草酸、欧前胡素、珊瑚菜素与 SARS-CoV-2 Mpro 的关键活性氨基酸残基结合。因此, 橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甘草酸、欧前胡素、珊瑚菜素可能对 SARS-CoV-2 Mpro 具有一定的潜在抑制作用, 可作为 HZS 的潜在 Q-Marker, 以对 HZS 进行质量评价。

3.6 质量评价

以“3.5”项中确定的 6 种潜在 Q-Marker 橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甘草酸、欧前胡素、珊瑚菜素在 HZS 中的峰面积作为指标, 评价不同 HZS 样品的质量。将各 HZS 样品中 6 种潜在 Q-Marker 化合物的峰面积数据导入 IBM SPSS Statistics 21.0 软件中, 进行差异显著性检验, 组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间两两比较采用最小显著性差(LSD)检验, 结果如表 5 所示。从表 5 中可以看出, 27 批 HZS 样品中 6 种潜在 Q-Marker 的峰面积均存在显著性差异($P < 0.01$)。其中, 橙皮苷峰面积较高的样品有 S1~S4、S10、S11; 氧化前胡素峰面积较高的样品

有 S2、S6、S9、S23~S25; 新比克白芷内脂峰面积较高的样品有 S6、S9、S25; 甘草酸峰面积较高的样品有 S3、S8~S10、S12~S15、S19; 欧前胡素峰面积较高的样品有 S2、S3、S5、S6、S9、S18、S21、S23~S25; 珊瑚菜素峰面积较高的样品有 S2、S3、S6、S9、S18、S19、S25、S26。

综合 6 种潜在 Q-Marker 峰面积比较结果, 27 批 HZS 样品中, 样品 S2、S3、S6、S9、S25 具有较好的抗 SARS-CoV-2 的潜在活性。

4 讨论

通过建立不同 HZS 样品的 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱, 标定了 27 种共有化合物, 相似度在 0.790~0.984, 说明不同 HZS 样品具有一定的差异性; 通过化学计量学分析, 确定了其中 14 种共有化合物为差异性化合物, 共鉴定出了橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甜橙素、甘草酸、HMOF、桔皮素、欧前胡素、珊瑚菜素 9 种差异性化合物。这些差异性化合物主要来源于陈皮、白芷、甘草药材, 因此不同 HZS 样品的差异性可能是以上 3 种药材原材料质量、投料以及工艺参数存在差异性导致的。唐素芳^[4]采用 UPLC-Q-TOF 组学以及指纹图谱等研究方法, 对抽取的 22 个生产厂家、68 批次藿香正气水的质量进行了评价研究, 结果发现个别企业陈皮和白芷的特征峰缺失严重, 处方中甘草浸膏投料普遍不足, 存在提取物投料或替代投料嫌疑, 这与本研究结论基本一致。

表5 27批 HZS 样品中橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甘草酸、欧前胡素、珊瑚菜素的峰面积比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Peak area of hesperidin, oxypeucedanin, neobyakangelicol, glycyrrhizic acid, imperatorin and phellopterin of 27 batches of HZS samples ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品 编号	峰面积/($\times 10^6$)					
	橙皮苷	氧化前胡素	新比克白芷内脂	甘草酸	欧前胡素	珊瑚菜素
S1	6.02±0.33 ^a	1.81±0.02 ^m	0.88±0.01 ^m	1.50±0.11 ⁿ	1.41±0.03 ^e	2.53±0.07 ^{fg}
S2	5.49±0.09 ^{bc}	4.16±0.09 ^{cd}	2.08±0.08 ^d	4.72±0.42 ^{hi}	1.99±0.08 ^b	3.25±0.15 ^b
S3	5.82±0.05 ^a	4.11±0.03 ^d	1.98±0.03 ^e	6.14±0.01 ^{cd}	2.09±0.04 ^b	3.14±0.04 ^{bc}
S4	5.59±0.09 ^b	0.77±0.02 ^p	0.45±0.02 ^p	1.82±0.03 ^{mm}	0.64±0.02 ^{hi}	1.07±0.05 ^{lm}
S5	4.95±0.05 ^e	3.92±0.04 ^e	1.77±0.03 ^{fg}	5.31±0.18 ^{fg}	1.91±0.07 ^{bc}	2.86±0.09 ^d
S6	3.94±0.05 ^j	4.19±0.06 ^{cd}	2.29±0.05 ^c	5.79±0.15 ^{de}	2.39±0.06 ^a	3.90±0.08 ^a
S7	5.22±0.01 ^d	4.10±0.03 ^d	1.71±0.02 ^g	3.33±0.12 ^{kl}	1.67±0.03 ^d	2.35±0.04 ^{hi}
S8	4.03±0.14 ^j	2.12±0.04 ^l	0.99±0.03 ^{kl}	6.16±0.06 ^{cd}	0.88±0.05 ^g	1.72±0.08 ^{jk}
S9	4.61±0.06 ^{fg}	5.97±0.13 ^a	3.83±0.11 ^a	6.73±0.37 ^b	2.39±0.31 ^a	3.89±0.16 ^a
S10	5.45±0.04 ^{bc}	2.38±0.01 ^k	0.75±0.01 ⁿ	6.12±0.31 ^{cd}	1.45±0.07 ^e	2.24±0.10 ⁱ
S11	5.30±0.07 ^{cd}	1.35±0.01 ^o	0.47±0.01 ^p	5.49±0.30 ^{ef}	1.06±0.02 ^f	1.57±0.01 ^k
S12	4.67±0.03 ^{fg}	1.94±0.02 ^m	0.59±0.00 ^o	7.16±0.09 ^a	1.20±0.02 ^f	1.75±0.02 ^j
S13	4.14±0.04 ^{ij}	3.69±0.06 ^f	1.61±0.04 ^h	7.27±0.17 ^a	1.65±0.05 ^d	2.53±0.04 ^{fg}
S14	4.72±0.05 ^f	2.51±0.07 ^{jk}	1.32±0.06 ⁱ	6.24±0.07 ^c	0.85±0.01 ^g	1.16±0.02 ^l
S15	4.33±0.11 ^{hi}	1.25±0.05 ^o	0.44±0.02 ^p	6.76±0.07 ^b	0.57±0.01 ⁱ	0.99±0.02 ^m
S16	4.33±0.04 ^{hi}	2.42±0.05 ^k	0.92±0.02 ^{lm}	5.06±0.09 ^{gh}	1.16±0.02 ^f	1.61±0.03 ^{jk}
S17	3.53±0.09 ^k	2.43±0.05 ^{jk}	1.01±0.02 ^{kl}	3.11±0.18 ^l	0.35±0.01 ^j	0.69±0.01 ⁿ
S18	2.72±0.09 ^o	2.56±0.13 ^{ij}	1.04±0.04 ^k	5.71±0.07 ^{ef}	1.76±0.05 ^{cd}	3.08±0.11 ^{bc}
S19	2.78±0.06 ^{no}	2.68±0.02 ^{hi}	1.19±0.02 ^j	6.24±0.28 ^c	1.68±0.04 ^d	3.02±0.06 ^c
S20	2.96±0.06 ^{mm}	3.83±0.03 ^e	1.85±0.02 ^f	4.12±0.10 ^j	1.41±0.06 ^e	2.39±0.05 ^{gh}
S21	4.47±0.02 ^{gh}	3.42±0.01 ^g	1.56±0.01 ^h	4.89±0.17 ^h	1.93±0.08 ^{bc}	2.74±0.04 ^{de}
S22	4.00±0.12 ^j	1.64±0.04 ⁿ	0.68±0.02 ⁿ	2.08±0.13 ^m	0.77±0.03 ^{gh}	1.07±0.04 ^{lm}
S23	2.72±0.01 ^o	4.28±0.05 ^c	1.74±0.01 ^g	3.47±0.04 ^{kl}	1.81±0.04 ^{cd}	2.70±0.09 ^{de}
S24	2.05±0.10 ^p	4.26±0.11 ^c	2.01±0.09 ^{de}	4.18±0.05 ^j	1.79±0.04 ^{cd}	2.58±0.05 ^{ef}
S25	3.07±0.12 ^{lm}	5.10±0.06 ^b	2.68±0.06 ^b	3.65±0.10 ^k	2.03±0.04 ^b	3.13±0.07 ^{bc}
S26	1.86±0.01 ^p	2.75±0.02 ^h	1.30±0.01 ⁱ	4.32±0.06 ^j	1.71±0.05 ^d	3.01±0.01 ^c
S27	3.20±0.03 ^l	0.43±0.01 ^q	0.26±0.00 ^q	4.38±0.09 ^{ij}	0.50±0.00 ^{ij}	0.79±0.01 ⁿ

表中同列不同小写字母表示 27 批 HZS 样品中化合物峰面积存在显著差异 ($P < 0.01$)

different lowercase letters in the same column in the table indicate that there are significant differences in peak areas of compounds in 27 batches of HZS samples ($P < 0.01$)

通过分子对接确定了橙皮苷、氧化前胡素、新比克白芷内脂、甘草酸、欧前胡素、珊瑚菜素 6 种差异性化合物对 SARS-CoV-2 Mpro 有潜在抑制作用,可作为 HZS 的潜在 Q-Marker。其中,已有研究结果显示,橙皮苷^[44-46]、甘草酸^[46-49]以及欧前胡素^[50-51]对 SARS-CoV-2 有一定的抑制作用,而氧化前胡素、新比克白芷内脂和珊瑚菜素尚未有文献报道,这为 SARS-CoV-2 小分子抑制剂的研究提供了新思路。《中国药典》2020 年版^[1]规定 HZS 处方中需检

测厚朴和陈皮 2 项原材料含量,二者分别以厚朴酚、和厚朴酚总量以及橙皮苷含量作为评价标准,建议增加处方中白芷和甘草原材料的检测方法,以得到更加综合完整的藿香正气水质量评价体系。

另外,后续研究仍需通过体外实验等进行验证,以进一步确定本研究预测结果的准确性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1881.

- [2] 杜海涛, 王平, 马青云, 等. 藿香正气汤抑制新型冠状病毒复制过程的有效成分及机制初探 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(3): 645-651.
- [3] 徐铁龙, 谢青萍, 周旭, 等. 江西省新冠肺炎中医临床应用特征分析 [J]. 江西中医药, 2022, 53(1): 35-38.
- [4] 唐素芳. 藿香正气水质量评价方法研究 [EB]. 天津市: 天津市药品检验研究院, 2018-12-28.
- [5] 聂黎行, 何雨晴, 于建东, 等. 藿香正气水快速质量评价 (II): 超高效液相色谱波长切换法同时测定 7 个成分的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(24): 2192-2195.
- [6] 刘征辉, 叶挺祥, 赵洪芝, 等. 藿香正气水指纹图谱及模式识别对质量控制的研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 2064-2067.
- [7] 孙小红, 葛建, 王国夫, 等. 不同厂家藿香正气水质量比较研究及分析 [J]. 中国药房, 2010, 21(28): 2671-2673.
- [8] Zhang H B, Zhang T J, Xu J, et al. Rapid analysis and identification of absorbed components and their metabolites of Yuanhu Zhitong Dropping Pill in rat plasma and brain tissue using UPLC-Q-TOF/MS with multivariate statistical analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 154-163.
- [9] 胡晓茹, 王海南, 王亚丹, 等. 中成药质量控制的思考与建议 [J]. 中国食品药品监管, 2021(9): 10-15.
- [10] 陈丽华, 肖发林, 黄诗雨, 等. 中药质量评价研究思路及创新发展趋势 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2541-2547.
- [11] 王帅, 包永睿, 李天娇, 等. 中药质量评价关键问题与分析方法探讨 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 132-138.
- [12] 聂黎行, 何雨晴, 戴忠, 等. 藿香正气水快速质量评价 (I): 化学计量学辅助的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(20): 1862-1866.
- [13] 李红梅, 茹鑫, 梁悦, 等. 藿香正气水气相色谱指纹图谱特性研究 [J]. 中成药, 2010, 32(1): 6-10.
- [14] 程斌, 童静玲, 周爱珍, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 谱-效分析的浙贝母化痰质量标志物的初步筛选及含量差异研究 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(6): 462-471.
- [15] 程斌, 周爱珍, 彭昕, 等. 浙贝母 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱的建立及其抗炎质量标志物的分析 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2129-2135.
- [16] 许啸, 张淹, 任雪阳, 等. 基于特征图谱、化学计量学和分子对接的复方阿胶浆质量标志物研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7148-7161.
- [17] 王信, 李莉, 张瑞, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的白花蛇舌草质量标志物预测分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(16): 1633-1641.
- [18] 王慧, 梁燕青, 于兴泰, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的江枳壳质量标志物预测分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(13): 198-208.
- [19] 张雨恬, 伍振峰, 黄艺, 等. 基于网络药理学与分子对接技术的鲜竹沥治疗“咳、喘、痰”机制及其质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7538-7549.
- [20] Jahan R, Paul A K, Bondhon T A, et al. *Zingiber officinale*: Ayurvedic uses of the plant and in silico binding studies of selected phytochemicals with mpro of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Prod Commun*, 2021, 16(10): 1934578X2110317.
- [21] Sinha S K, Prasad S K, Islam M A, et al. Potential leads from liquorice against SARS-CoV-2 main protease using molecular docking simulation studies [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2021, 24(4): 591-597.
- [22] 田莲超, 秦少荣, 易红, 等. 同源中药大腹皮与槟榔中 4 种生物碱的含量比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2850-2856.
- [23] 郁红礼, 汤丽娟, 吴皓, 等. 多指标正交优选大腹皮饮片切制工艺 [J]. 中药材, 2014, 37(12): 2178-2181.
- [24] Wang H, Riemann M, Liu Q, et al. Glycyrrhizin, the active compound of the TCM drug Gan Cao stimulates actin remodelling and defence in grapevine [J]. *Plant Sci*, 2021, 302: 110712.
- [25] 陈佳, 聂黎行, 胡晓茹, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法分析乌拉尔甘草与光果甘草化学成分差异 [J/OL]. 中国药物警戒, 2022, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5219.R.20211014.1627.004.html>.
- [26] 周越美, 冯超, 史煜华, 等. 甘草浸膏 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定研究 [J]. 中国现代应用药理学, 2020, 37(9): 1046-1051.
- [27] Wang T H, Sun Y X, Chen T Y, et al. Spectral properties of the interaction between hesperidin of tangerine peel's active ingredient with protein [J]. *Int J Pharmacol*, 2018, 14(8): 1060-1065.
- [28] Ho S C, Kuo C T. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri Reticulatae Pericarpium*) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 71: 176-182.
- [29] Fu M Q, Xiao G S, Wu J J, et al. Chemical constituents from *Pericarpium Citri Reticulatae* [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 86-91.
- [30] Kiyonga A N, Hong G, Kim H S, et al. Facile and rapid isolation of oxypeucedanin hydrate and byakangelicin from *Angelica dahurica* by using [Bmim]Tf2N ionic liquid [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 830.
- [31] Zhao A H, Zhang Y B, Yang X W. Simultaneous determination and pharmacokinetics of sixteen *Angelica dahurica* coumarins *in vivo* by LC-ESI-MS/MS following oral delivery in rats [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(10): 1029-1036.

- [32] Zhang Y, Yu Y P, Li H, *et al.* Effects of *Citri Reticulatae Pericarpium* and grapefruit juice on the pharmacokinetics of omeprazole in rats [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(3): e13804.
- [33] Al-Kamel H, Grundmann O. Glycyrrhizin as a potential treatment for the novel coronavirus (COVID-19) [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2021, 21(16): 2204-2208.
- [34] van de Sand L, Bormann M, Alt M, *et al.* Glycyrrhizin effectively inhibits SARS-CoV-2 replication by inhibiting the viral main protease [J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 609.
- [35] Han H S, Jeon H, Kang S C. Phellopterin isolated from *Angelica dahurica* reduces blood glucose level in diabetic mice [J]. *Heliyon*, 2018, 4(3): e00577.
- [36] Niu L, Hou Y Y, Jiang M, *et al.* The rich pharmacological activities of *Magnolia officinalis* and secondary effects based on significant intestinal contributions [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 114524.
- [37] 刘慧, 肖金超, 张庆捷, 等. 金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4185-4192.
- [38] Hussein R K, Elkhair H M. Molecular docking identification for the efficacy of some zinc complexes with chloroquine and hydroxychloroquine against main protease of COVID-19 [J]. *J Mol Struct*, 2021, 1231: 129979.
- [39] Naik S R, Bharadwaj P, Dingelstad N, *et al.* Structure-based virtual screening, molecular dynamics and binding affinity calculations of some potential phytochemicals against SARS-CoV-2 [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2021, 40(15): 11-18.
- [40] Mishra D, Maurya R R, Kumar K, *et al.* Structurally modified compounds of hydroxychloroquine, remdesivir and tetrahydrocannabinol against main protease of SARS-CoV-2, a possible hope for COVID-19: Docking and molecular dynamics simulation studies [J]. *J Mol Liq*, 2021, 335: 116185.
- [41] Pan F, Zhou N, Li J X, *et al.* Identification of C-phycocyanin-derived peptides as angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitors via molecular docking and molecular dynamic simulation [J]. *ES Food & Agroforestry*, 2020, 2: 58-69.
- [42] Gajjar N D, Dhameliya T M, Shah G B. In search of RdRp and Mpro inhibitors against SARS CoV-2: Molecular docking, molecular dynamic simulations and ADMET analysis [J]. *J Mol Struct*, 2021, 1239: 130488.
- [43] Skariyachan S, Gopal D, Chakrabarti S, *et al.* Structural and molecular basis of the interaction mechanism of selected drugs towards multiple targets of SARS-CoV-2 by molecular docking and dynamic simulation studies-deciphering the scope of repurposed drugs [J]. *Comput Biol Med*, 2020, 126: 104054.
- [44] Agrawal P K, Agrawal C, Blunden G. Pharmacological significance of hesperidin and hesperetin, two *Citrus* flavonoids, as promising antiviral compounds for prophylaxis against and combating COVID-19 [J]. *Nat Prod Commun*, 2021, 16(10): 1934578X2110425.
- [45] Cheng F J, Huynh T K, Yang C S, *et al.* Hesperidin is a potential inhibitor against SARS-CoV-2 infection [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2800.
- [46] 曾永长, 梁少瑜, 姜倩倩, 等. 经方华盖散抗新型冠状病毒肺炎的网络药理学分析 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(4): 484-491.
- [47] Li J J, Xu D G, Wang L L, *et al.* Glycyrrhizic acid inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking spike protein-mediated cell attachment [J]. *Molecules*, 2021, 26(20): 6090.
- [48] Sun Z, He G Z, Huang N H, *et al.* Glycyrrhizic acid: A natural plant ingredient as a drug candidate to treat COVID-19 [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 707205.
- [49] Zhao Z Y, Xiao Y C, Xu L Q, *et al.* Glycyrrhizic acid nanoparticles as antiviral and anti-inflammatory agents for COVID-19 treatment [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(18): 20995-21006.
- [50] Kiba Y, Oyama R, Misawa S, *et al.* Screening for inhibitory effects of crude drugs on furin-like enzymatic activities [J]. *J Nat Med*, 2021, 75(4): 1080-1085.
- [51] Sathish K C, Daoud A, Saud A, *et al.* In silico molecular docking: evaluation of coumarin based derivatives against SARS-CoV-2 [J]. *J Infect Public Heal*, 2020, 13(11): 1671-1677.

[责任编辑 郑礼胜]