

基于颜色-特征成分关联分析及网络药理学的金银花质量标志物(Q-Marker)研究

刘艳萍¹, 王 云¹, 贾 哲¹, 张 伟², 张 村^{1*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 封丘县金银花产业发展领导小组办公室, 河南 封丘 453321

摘要: 目的 基于颜色-特征成分关联分析及网络药理学探讨金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 中潜在的质量标志物 (quality markers, Q-Marker)。方法 收集山东、河南和河北 3 个产地共 30 批金银花样品, 建立金银花 HPLC 特征图谱方法, 得到金银花中的非挥发性特征成分, 将其与实验室前期得到的含量较高、具有产地特异性的挥发性成分相结合, 作为金银花潜在的 Q-Marker 候选物; 采用色彩分析仪测定金银花的颜色与 Q-Marker 进行相关性分析, 筛选出与颜色相关的成分; 结合网络药理学方法, 从金银花的适应证和功效 2 个层面对 Q-Marker 候选物的药理活性进行预测, 进一步确定潜在 Q-Marker。结果 建立了金银花非挥发性成分 HPLC 特征图谱, 指认了 9 个特征峰, 结合实验室前期对挥发性成分研究结果, 最终从金银花中得到了 16 种特征性成分; 相关性分析结果表明, 与金银花颜色具有显著相关性的成分有 10 个, 包括绿原酸、当药苷、断氧马钱子苷、芦丁、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、异绿原酸 B、异绿原酸 C、 α -亚麻酸甲酯、正己醛、(E, E)-2,4-癸二烯醛; 网络药理学研究得到 11 种与疾病和药效关联的 Q-Marker, 分别为当药苷、断氧马钱子苷、芦丁、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、异绿原酸 B、异绿原酸 A、芳樟醇、肉豆蔻酸、 α -亚麻酸甲酯、 α -橙花醇、月桂醛。通路富集分析结果显示, 这些成分主要通过丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (recombinant mitogen activated protein kinase kinase 1, MAP2K1)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等 62 个关键靶点作用于细胞凋亡 (apoptosis)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、松弛素 (relaxin)、C 型凝集素 (C-type lectin receptor)、白细胞介素 17 (interleukin 17, IL-17)、结合免疫球蛋白 E 的 Fc 受体 (Fc epsilon RI)、T 细胞抗原受体 (T cell receptor) 等多种信号通路。将颜色和药理活性成分相交, 最终得到 6 种与颜色关联的 Q-Marker, 包括当药苷、断氧马钱子苷、芦丁、异绿原酸 B、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、 α -亚麻酸甲酯。因此, 为提高金银花的质量标准, 可以考虑在《中国药典》标准基础上, 将芦丁、异绿原酸 B、 α -亚麻酸甲酯、芳樟醇和肉豆蔻酸纳入金银花的质量评价体系。**结论** 从理论层面出发, 筛选出能够体现其质量的 Q-Marker, 为全面控制金银花的质量提供依据, 为进一步研究金银花的活性物质及其作用机制提供参考。

关键词: 金银花; 质量标志物; 绿原酸; 当药苷; 断氧马钱子苷; 芦丁; (Z)-二聚断马钱苷烯醛; 异绿原酸 B; 异绿原酸 C; α -亚麻酸甲酯; 正己醛; (E, E)-2,4-癸二烯醛; 网络药理学

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)14-4882-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.024

Q-Marker prediction analysis of *Lonicerae Japonicae Flos* based on color-characteristic components association analysis and network pharmacology

LIU Yanping¹, WANG Yun¹, JIA Zhe¹, ZHANG Wei², ZHANG Cun¹

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Leading Group Office of Fengqiu County Honeysuckle Industry Development, Fengqiu 453321, China

Abstract: Objective To screen the potential quality markers (Q-Marker) of Jinyinhua (*Lonicerae Japonicae Flos*, LJF) based on color-characteristic components association analysis and network pharmacology. **Methods** A total of 30 batches of LJF were collected from Shandong, Henan and Hebei provinces, and HPLC characteristic chromatogram method based on non-volatile components was established to obtain the characteristic components, which was combined with volatile components with high content and province-specific obtained in

收稿日期: 2023-12-02

基金项目: 国家科技基础性工作专项 (2015FY111500); 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地项目 (国中医药科技中药 [2022] 59 号); 中国中医科学院中药研究所横向课题 (H2020113)

作者简介: 刘艳萍, 博士研究生, 主要从事中药炮制研究。E-mail: lyliu92@163.com

*通信作者: 张 村, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药炮制、中药化学研究。Tel: (010)64032658 E-mail: zhc95@163.com

previous laboratory, as potential Q-Marker candidate for LJF. The color of LJF was measured by visual analyzer, and correlation analysis was carried out with Q-Marker, and the components with significant correlation with color were obtained. The pharmacologic activities of Q-Marker candidates were predicted by network pharmacological methods, and potential Q-Marker was further screened out based on two aspects of main efficacy and clinical indications of LJF. **Results** HPLC chromatogram of non-volatile components of LJF was established, and nine characteristic peaks were identified, finally 16 characteristic components were obtained from LJF combined with the previous research results of volatile components. Correlation analysis results showed that 10 components were significantly correlated with the color of LJF, including chlorogenic acid, sweroside, secoxyloganin, rutin, centauroside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C, methyl linolenate, hexanal, (2E,4E)-deca-2,4-dienal; Eleven Q-Markers associated with disease and efficacy were obtained through network pharmacological study, which were sweroside, secoxyloganin, rutin, centauroside, Isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, linalool, myristic acid, methyl linolenate, nerol, lauraldehyde. These components mainly act on apoptosis, epidermal growth factor receptor (EGFR), relaxin, C-type lectin receptor, Interleukin 17 (IL-17), Fc epsilon RI, T cell receptor through 62 key targets, such as mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), recombinant mitogen activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1), mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), tumor necrosis factor (TNF), and so on. In addition, six Q-Markers associated with color were finally obtained, including sweroside, secoxyloganin, rutin, isochlorogenic acid B, centauroside, methyl linolenate. Therefore, in order to improve the quality standard of LJF, rutin, isochlorogenic acid B, methyl linolenate, linalool and myristic acid could be considered to be included in the quality evaluation system of LJF based on the pharmacopoeia standard.

Conclusion From the theoretical level, Q-Markers reflecting the quality of LJF screened by this study can provide a basis for the overall control of the quality of LJF, with view to providing a reference for further research on the active substances of LJF and their mechanism of action

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; quality marker; chlorogenic acid; sweroside; secoxyloganin; rutin; centauroside; isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C; methyl linolenate; hexanal; (2E,4E)-deca-2,4-dienal; network pharmacology

金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 具有清热解毒、疏散风热的功效, 用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等疾病^[1], 是临床常用的大宗中药材之一。由于金银花具有广泛的药用价值以及较强的适应性, 种植范围较广, 除黑龙江、内蒙古、新疆、青海、西藏和海南等地, 在我国大部分省市均有分布, 道地产区主要为山东、河南、河北等省。由于金银花来源十分广泛, 各地生长环境、加工方式、采收时间等不同, 使得各产区金银花药材质量存在较大的差异性。金银花的主要成分包括有机酸类、黄酮类、挥发油类、环烯醚萜类、三萜皂苷类等^[2]。《中国药典》2020 年版以特征图谱和绿原酸、木犀草苷等成分的含量评价金银花的质量^[1], 但未有挥发性成分的体现, 其与金银花外观以及药效成分的相关性尚有待探讨。

药材的颜色和气味是其质量的重要标准之一, 就金银花而言, 有“表面绿色、香气浓者为佳”的说法^[3]。市面上流通的金银花有“晒货”和“烘货”两种规格, 2018 年公布的《中药材商品规格等级》中对金银花的等级进行了划分, 根据金银花的外观颜色可将其分为一等、二等和三等品^[4]。近年来, 诸多学者对金银花的外观与内在品质进行了相关性研究, 如王玲娜等^[5]对不同发育时期金银花颜色与

活性成分进行相关性研究, 结果表明酚酸类、黄酮类和环烯醚萜类成分的含量与金银花的颜色具有相关性。代熙等^[6]发现不同的加工方法得到的金银花性状和成分均存在一定差异, 烘干处理的金银花偏绿, 晒干的偏黄, 杀青烘干的多为黄绿色, 其中, 杀青烘干的金银花中绿原酸和总酚酸含量最高。这些研究结果都提示金银花的外观颜色与内在成分具有一定的相关性。但目前尚未发现将金银花颜色与其药效和主要适应症关联分析的报道。

质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 是基于成分的特有性、可测定、有效性、质量传递与溯源及配伍环境 5 个原则提出的中药质量控制的新概念^[7], 现已广泛应用于多种中药的质量研究中^[8-10], 为挖掘中药材及其制剂中的药效物质基础研究提供了新思路。已有相关报道从化学物质组成及成分传递、植物亲缘学、化学成分有效性、化学成分可测性以及化学成分特有性对金银花的 Q-Marker 进行了预测分析^[11]。本研究将主要聚焦金银花中含量较高和具有产地特异性的挥发性和非挥发性成分, 将其内在品质 (化学成分) 和外在性状 (颜色) 沟通关联, 并进一步结合基于疾病和药效层面的网络药理学研究, 从化学和生物信息学角度预测分析金银花的潜在 Q-Marker, 为金银花的质量控制及后续开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；XS105DU 型十万分之一分析天平（梅特勒-托利多有限公司）；KQ-300B 型超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；VA400 色彩分析仪，含 CMOS 镜头、颜色校准板与 Alpha soft 14.3 数据分析软件（法国 ALPHA M.O.S 公司）。

1.2 材料

绿原酸（批号 RFS-L00701908029）、当药苕（批号 RFS-Z00902112017）、断氧马钱子苕（批号 RFS-Y08002106016）、木犀草苕（批号 RFS-M02501909016）、异绿原酸 B（批号 RFS-Y06911812012）、异绿原酸 A（批号 RFS-Y06802201024）均购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司；芦丁（批号 CHB170224）购自成都克洛玛生物科技有限公司；异绿原酸 C（批号

BCY-000320）购自江西佰草源生物科技有限公司，以上对照品质量分数均≥98.0%，(Z)-二聚断马钱苷烯醛由中国中医科学院中药研究所王智民研究员课题组提供^[12]，按 HPLC 面积归一化法计算，质量分数为 99.3%，水为娃哈哈纯净水，乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

收集山东省、河南省和河北省的金银花（干品）各 10 批（表 1），经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定，均为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* Thunb.的花蕾，30 批金银花样品分别粉碎过 4 号筛，供实验研究用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex Luna C₁₈ (2) 100A 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；以乙腈 (A) -0.1%磷酸水 (B) 为流动相，梯度洗脱程序为：0~8 min, 14%~19% A；8~14 min, 19% A；18~25 min, 19%~31% A；34~35

表 1 金银花样品信息

Table 1 Sample information of *Lonicerae Japonicae Flos*

编号	产地	收集日期	经度/(°)	纬度/(°)
SD1	山东省临沂市平邑县流峪镇南蒲芦村	2021-10-30	117.62	35.40
SD2	山东省临沂市平邑县保太镇蒋沟村	2021-10-30	117.74	35.60
SD3	山东省临沂市平邑县白彦镇白彦村	2021-10-30	117.56	35.25
SD4	山东省临沂市平邑县流峪镇孟家庄村	2021-10-30	117.72	35.67
SD5	山东省临沂市平邑县龙王河村	2021-10-30	117.58	35.43
SD6	山东省临沂市平邑县铜石镇北张里村	2021-10-30	117.72	35.38
SD7	山东省临沂市平邑县郑城镇孟围子村	2021-10-30	117.69	35.27
SD8	山东省临沂市平邑县武台镇东近台村	2021-10-30	117.74	35.66
SD9	山东省临沂市费县新庄镇新庄村	2021-10-30	117.88	35.10
SD10	山东省临沂市平邑县丰阳镇小城西村	2021-10-30	117.48	35.49
HN1	河南省新乡市封丘县陈固镇赵庄村	2021-11-01	114.50	35.13
HN2	河南省新乡市封丘县黄饶镇大庙杨村	2021-11-01	114.46	35.21
HN3	河南省新乡市封丘县封丘居厢大沙村	2021-11-01	114.41	35.16
HN4	河南省新乡市封丘县陈固镇东陈宫村	2021-11-01	114.33	35.14
HN5	河南省新乡市封丘县黄德村上小街村	2021-11-01	114.46	35.19
HN6	河南省新乡市封丘县黄德镇小石桥村	2021-11-01	114.49	35.20
HN7	河南省新乡市封丘县居厢小沙村村	2021-11-01	114.40	35.15
HN8	河南省新乡市封丘县黄德镇西于村	2021-11-01	114.47	35.21
HN9	河南省新乡市封丘县黄德镇贾庄村	2021-11-01	114.48	35.20
HN10	河南省新乡市封丘县陈固镇西陈宫村	2021-11-01	114.33	35.14
HB1	河北省邢台市巨鹿县堤村乡陈庄村	2021-11-01	115.09	37.20
HB2	河北省邢台市巨鹿县堤村乡陈庄村	2021-11-01	115.09	37.20
HB3	河北省邯郸市魏县军寨	2021-11-01	114.94	36.08
HB4	河北省邢台市巨鹿县堤村乡陈庄村	2021-11-01	115.09	37.20
HB5	河北省邢台市巨鹿县堤村乡野场村	2021-11-01	115.09	37.18
HB6	河北省邢台市巨鹿县堤村乡堤村	2021-11-01	115.10	37.16
HB7	河北省邢台市平乡县城关镇红康村	2021-11-01	114.92	36.99
HB8	河北省邢台市巨鹿县堤村乡陈庄村	2021-11-01	115.09	37.20
HB9	河北省邢台市巨鹿县堤村乡前堤村	2021-11-01	115.11	37.16
HB10	河北省邢台市巨鹿县堤村乡纪家寨	2021-11-01	115.04	37.18

min, 31%~90% A; 35~40 min, 90% A。检测波长 240 nm。体积流量 0.7 mL/min, 柱温 25 °C, 进样 10 μ L。

2.2 供试品溶液的制备

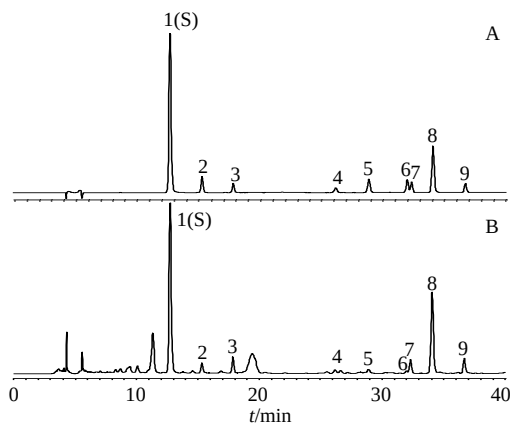
称取不同批次金银花粉 0.5 g(过 4 号筛), 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 75% 甲醇溶液, 密塞称定质量, 超声 30 min, 放冷, 用 75% 甲醇水补足减失质量, 摇匀滤过, 即得。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称定绿原酸、当药苷、断氧马钱子苷、芦丁、木犀草苷、(Z)-二聚断马钱子烯醛、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品适量于量瓶中, 加 75% 甲醇溶液溶解, 定容至刻度, 得质量浓度分别为 772.5、81.0、50.0、50.0、53.0、38.0、71.5、87.0、39.5 μ g/mL 混合对照品溶液。

2.4 特征图谱研究

2.4.1 特征峰的初步确定 根据金银花的特征图谱共指定了 9 个共有峰。其中包括《中国药典》2020 年版中规定的 6 个已知特征峰^[1], 分别为绿原酸、当药苷、断氧马钱子苷、(Z)-二聚断马钱子烯醛、异绿原酸 A、异绿原酸 C, 以及另指认的 3 个色谱峰, 分别为芦丁、木犀草苷、异绿原酸 B。混合对照品溶液和供试品溶液对比图见图 1。



1-绿原酸; 2-当药苷; 3-断氧马钱子苷; 4-芦丁; 5-木犀草苷; 6-(Z)-二聚断马钱子烯醛; 7-异绿原酸 B; 8-异绿原酸 A; 9-异绿原酸 C。
1-chlorogenic acid; 2-sweroside; 3-secoxyloganin; 4-rutin; 5-galuteolin; 6-centauroside; 7-isochlorogenic acid B; 8-isochlorogenic acid A; 9-isochlorogenic acid C.

图 1 混合对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed solution of reference (A) and sample (B)

2.4.2 精密度试验 取金银花药材粉末 (编号 HN1) 0.5 g, 精密称定, 按照“2.2”项下制备供试品溶液。供试品溶液连续进样 6 次, 以峰 1 (绿原酸) 为参照峰。结果显示 9 个色谱峰相对保留时间的 RSD 值小于 0.14%, 相对峰面积 RSD 值小于 4.72% 内。表明该方法精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取金银花药材粉末 (编号 HN1) 0.5 g, 精密称定, 按照“2.2”项下制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 进样分析。以峰 1 为参照峰。结果显示, 9 个色谱峰相对保留时间的 RSD 值小于 1.06%, 相对峰面积的 RSD 值小于 3.94%。

2.4.4 稳定性试验 取金银花药材粉末 (编号 HN1) 0.5 g, 精密称定, 按照“2.2”项下制备供试品溶液。取供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、12、16 和 24 h 进样分析, 以峰 1 为参照峰。结果表明 9 个色谱峰相对保留时间的 RSD 值小于 2.79%, 相对峰面积的 RSD 值小于 3.76%。

2.4.5 特征图谱建立与评价 采用上述方法对 30 批金银花的样品溶液进行分析, 将数据导入“中药指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 以编号为 HN1 的样品谱图作为参照图谱, 时间宽度为 0.1, 经中位数法生成叠加图谱, 见图 2, 以上述的 9 个成分作为 Mark 峰, 并计算特征图谱相似度。结果见图 3, 可知 30 批样本的相似度均大于 0.98, 说明所选择的 9 个特征峰在不同产区金银花中均有检出, 并且较为稳定, 可作为金银花药材的特征峰。

2.5 非挥发性成分和挥发性成分测定

2.5.1 非挥发性成分相对含量测定 采用上述 HPLC 特征图谱条件对 30 批次金银花样本进行检测。对上述 9 个特征峰的峰面积进行校准, 得到校准峰面积, 结果见表 2。

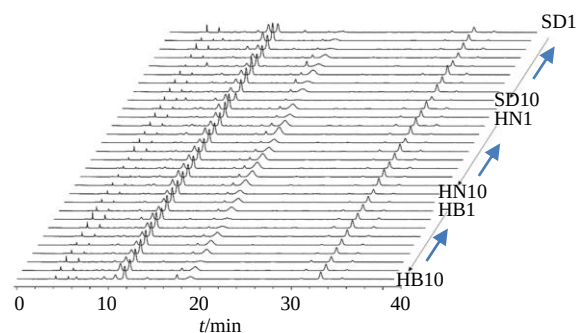


图 2 30 批金银花的 HPLC 叠加图谱

Fig. 2 HPLC superimposed chromatogram of 30 batches of *Lonicerae Japonicae Flos* samples

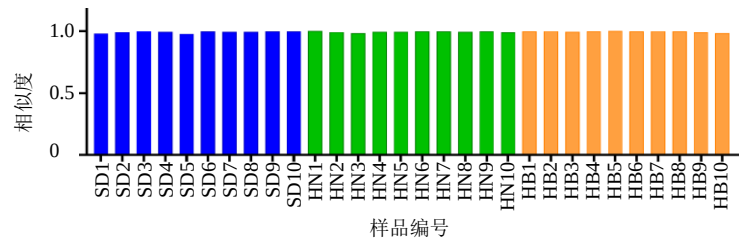


图 3 30 批金银花样本的特征图谱相似度

Fig. 3 Similarity of characteristic chromatogram of 30 batches of *Lonicerae Japonicae Flos* samples

表 2 金银花中 9 个非挥发性成分的相对含量测定结果

Table 2 Relative contents (calibrated peak area) of nine non-volatile components in *Lonicerae Japonicae Flos*

编号	校准峰面积								
	绿原酸	芦丁	木犀草苷	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	当药苷	断氧马钱子苷	(Z)-二聚断马钱苷烯醛
SD01	4 456 859	819 239	353 617	180 499	187 253	151 990	816 831	3 236 972	702 707
SD02	9 360 525	126 019	552 411	90 529	233 242	45 274	393 776	3 760 285	427 984
SD03	7 390 258	470 991	632 654	119 849	226 405	40 821	410 085	4 127 143	833 013
SD04	6 505 810	177 860	1 226 376	114 717	230 824	50 420	329 613	3 062 333	528 463
SD05	6 518 938	247 143	2 170 322	30 182	281 838	11 786	106 740	3 531 729	232 482
SD06	9 203 632	212 223	915 127	158 649	225 453	78 856	624 253	5 697 887	1 022 935
SD07	7 990 479	180 823	1 646 095	80 336	202 262	41 139	294 336	3 890 728	580 030
SD08	6 438 457	146 952	940 423	83 191	131 576	37 252	391 176	4 429 731	474 752
SD09	3 811 379	124 828	612 707	54 442	153 842	24 566	211 646	2 368 458	331 558
SD10	7 688 175	191 144	1 024 956	109 559	132 369	43 076	417 944	4 745 245	650 733
HN01	7 865 806	255 493	729 890	137 816	178 518	79 803	646 636	4 337 335	638 936
HN02	6 972 467	201 976	1 109 859	155 589	124 647	98 932	719 378	4 984 781	830 709
HN03	5 982 396	132 410	1 283 050	153 159	107 742	93 310	617 735	4 799 116	504 758
HN04	6 982 150	192 236	722 224	99 584	226 924	78 921	416 799	2 834 939	438 550
HN05	6 572 007	255 181	888 179	145 491	147 204	104 238	694 566	4 615 528	669 754
HN06	6 492 322	89 362	1 095 687	102 316	90 048	73 776	416 605	3 948 474	711 590
HN07	6 544 197	91 507	1 097 994	95 605	89 369	73 191	410 515	3 903 252	698 226
HN08	6 619 940	70 388	1 115 174	117 116	185 717	101 114	439 144	4 568 144	518 594
HN09	7 292 769	105 267	1 023 565	102 238	150 683	46 613	287 473	4 288 186	511 550
HN10	7 079 865	184 701	702 186	88 626	227 741	35 011	304 938	2 712 739	406 404
HB01	7 765 219	154 635	778 522	86 627	164 320	66 993	403 335	3 802 142	562 587
HB02	7 797 608	221 715	821 924	90 376	188 540	56 423	491 879	4 045 950	585 968
HB03	5 935 964	447 475	584 643	148 339	309 954	85 269	695 282	3 749 872	1 069 480
HB04	8 267 238	424 820	493 511	137 380	147 709	56 825	895 027	4 741 973	907 689
HB05	7 601 854	248 637	894 340	106 984	293 093	62 486	602 814	4 151 965	705 561
HB06	7 781 183	143 798	730 720	77 751	180 140	51 790	377 005	3 703 562	524 800
HB07	7 423 561	167 253	847 866	82 827	277 133	53 116	449 375	3 766 544	580 467
HB08	6 875 578	483 386	424 291	146 182	277 206	92 526	866 243	3 794 937	922 747
HB09	5 779 216	172 614	1 239 424	149 012	242 836	21 212	706 589	4 083 770	641 790
HB10	6 772 994	772 262	1 967 642	67 911	275 517	65 280	431 911	4 357 608	676 972

2.5.2 挥发性成分的相对含量 课题组前期研究发现金银花挥发油中含量较高和具有产区差异性的成分有 7 种, 其中各产区均以芳樟醇、肉豆蔻酸和

α -亚麻酸甲酯的含量较高, 不同地区香味特异性的成分包括 α -橙花醇、正己醛、(E,E)-2,4-癸二烯醛和月桂醛^[13]。7 种挥发性成分的相对含量结果见表 3。

表 3 金银花中 7 个挥发性成分的相对含量

Table 3 Relative contents of seven volatile components in *Lonicerae Japonicae Flos*

样品编号	相对质量分数/%						
	芳樟醇	肉豆蔻酸	α -亚麻酸甲酯	α -橙花醇	正己醛	(E,E)-2,4-癸二烯醛	月桂醛
SD1	2.93	1.88	7.88	2.23	0.00	0.68	0.18
SD2	22.45	7.62	4.54	0.37	2.04	1.30	0.36
SD3	15.86	0.77	3.77	0.50	1.96	0.00	0.18
SD4	13.46	6.34	3.25	0.75	2.57	2.24	0.00
SD5	1.59	0.00	7.17	0.22	3.10	0.83	0.00
SD6	17.70	2.92	5.86	1.86	1.70	1.83	0.25
SD7	30.75	3.59	1.84	1.07	1.94	0.50	0.21
SD8	12.35	22.25	5.18	2.51	0.18	0.86	0.28
SD9	9.05	15.54	5.91	3.16	0.81	1.25	0.20
SD10	17.66	0.56	5.76	1.20	0.00	0.00	0.33
HN1	6.49	18.21	6.64	2.56	0.69	1.03	0.05
HN2	7.31	15.04	6.02	0.00	1.02	3.38	0.20
HN3	15.06	1.37	4.14	1.17	0.00	2.04	0.19
HN4	7.05	1.26	4.53	2.58	4.68	4.14	0.23
HN5	19.16	1.18	3.99	0.66	0.00	2.88	0.07
HN6	19.44	0.65	1.00	0.56	5.48	1.73	0.34
HN7	7.42	9.46	5.33	0.00	2.83	1.23	0.00
HN8	9.22	7.53	2.58	0.64	3.55	2.83	0.20
HN9	14.47	12.03	3.11	1.62	1.38	2.61	0.18
HN10	6.88	14.61	7.66	2.77	0.82	2.13	0.10
HB1	10.88	14.33	4.26	1.48	1.77	0.84	0.11
HB2	11.41	8.61	5.58	1.91	1.86	1.30	0.12
HB3	9.31	15.29	7.20	2.32	0.92	0.82	0.35
HB4	10.38	13.52	4.75	0.00	1.85	0.00	0.00
HB5	8.36	12.45	8.12	2.01	0.52	1.43	0.00
HB6	8.49	6.78	5.33	2.44	2.81	1.78	0.00
HB7	10.57	15.72	5.24	2.44	0.85	1.22	0.00
HB8	5.56	22.93	5.93	0.00	0.15	0.00	0.06
HB9	18.27	7.82	2.91	3.46	0.81	3.53	0.23
HB10	27.49	5.68	3.55	4.50	0.17	0.00	0.00

2.6 成分与颜色的相关性分析

2.6.1 颜色测定 采用实验室之前建立的方法, 运用色彩分析仪测定金银花的颜色^[14]。测定样品之前, 利用标准比色板对 IRIS 视觉分析仪进行校正, 校正后将金银花药材分别平铺于玻璃培养皿 ($d \times H$, 6.0 cm $\times$ 1.5 cm) 中, 重复拍照 3 次。该色彩系统中 L^* 代表明度指数, a^* (红-绿轴)、 b^* (黄-蓝轴) 代表色品指数, 样品颜色用总色值 (E^*_{ab}) 表达, 3 次测定的结果取平均值, 结果见表 4。

$$E^*_{ab} = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}.$$

2.6.2 相关性分析 将 30 批金银花样本中 16 种成分的测定结果和色度值导入 SPSS 26.0 进行斯皮尔曼相关性分析, 结果见表 5。色度值中的 L^* 表示样本的明度值, 其值越大则样本越发亮, 呈正相关的成分为断氧马钱子苷和正己醛, 呈负相关的成分包括芦丁、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、异绿原酸 B、异绿原酸 C, a^* 表示红绿分量值, a^* 越大表示红色越明显, 越小表示绿色越明显, 与 a^* 呈显著正相关的成分为当药苷, 呈显著负相关的成分为绿原酸、(E,E)-2,4-癸二烯醛, b^* 表示黄蓝分量值, b^* 越大

表 4 金银花色度值测定结果 (n=3)
Table 4 Results of chroma value of *Lonicerae Japonicae*
Flos (n=3)

样品编号	L*	a*	b*	E* _{ab}
SD1	51.08	6.45	21.61	55.83
SD2	63.45	3.35	22.76	67.49
SD3	59.51	6.87	24.65	64.77
SD4	63.35	4.65	25.44	68.42
SD5	66.95	5.46	26.63	72.26
SD6	60.93	3.61	23.10	65.26
SD7	64.82	5.27	25.77	69.95
SD8	63.26	6.44	24.75	68.24
SD9	49.62	6.83	20.27	54.03
SD10	61.99	3.57	23.46	66.38
HN1	60.63	4.24	23.25	65.07
HN2	60.45	3.68	22.89	64.74
HN3	61.04	3.00	22.88	65.26
HN4	61.99	3.67	23.88	66.53
HN5	60.30	4.54	23.17	64.76
HN6	63.06	4.02	24.81	67.88
HN7	57.94	3.87	21.61	61.96
HN8	62.11	4.58	24.45	66.90
HN9	61.13	3.25	24.08	65.78
HN10	61.46	3.65	23.45	65.88
HB1	62.10	3.21	23.86	66.61
HB2	63.53	4.91	24.44	68.25
HB3	57.65	6.96	23.77	62.74
HB4	58.24	6.08	22.53	62.74
HB5	61.81	4.33	23.83	66.39
HB6	63.32	3.52	23.72	67.71
HB7	62.19	3.47	23.49	66.57
HB8	54.81	6.78	21.46	59.25
HB9	59.51	5.37	23.26	64.12
HB10	61.22	6.58	24.29	66.19

表 5 金银花中成分与颜色的斯皮尔曼相关性分析

Table 5 Spearman correlation analysis between composition and color of *Lonicerae Japonicae* Flos

成分	L*		a*		b*		E* _{ab}	
	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P
绿原酸	0.356	0.053	-0.408*	0.025	0.027	0.887	0.289	0.121
当药苷	-0.355	0.054	0.539**	0.002	-0.094	0.621	-0.329	0.075
断氧马钱子苷	0.413*	0.023	-0.166	0.380	0.491**	0.006	0.445*	0.014
芦丁	-0.576**	0.001	0.057	0.764	-0.417*	0.022	-0.558**	0.001
木犀草苷	0.110	0.564	0.316	0.089	0.191	0.313	0.118	0.535
(Z)-二聚断马钱苷烯醛	-0.363*	0.049	-0.077	0.687	-0.332	0.073	-0.345	0.062
异绿原酸 B	-0.553**	0.002	0.194	0.304	-0.500**	0.005	-0.562**	0.001
异绿原酸 A	-0.114	0.549	-0.151	0.427	-0.062	0.743	-0.111	0.559
异绿原酸 C	-0.517**	0.003	0.328	0.076	-0.229	0.224	-0.482**	0.007
芳樟醇	0.257	0.171	-0.114	0.547	0.279	0.135	0.268	0.152
肉豆蔻酸	-0.258	0.169	0.090	0.635	-0.334	0.072	-0.288	0.122
α-亚麻酸甲酯	-0.287	0.125	0.115	0.544	-0.428*	0.018	-0.331	0.074
α-橙花醇	-0.023	0.903	0.037	0.846	0.061	0.749	-0.006	0.974
正己醛	0.455*	0.012	-0.127	0.504	0.435*	0.016	0.468**	0.009
(E,E)-2,4-癸二烯醛	0.112	0.556	-0.472**	0.008	-0.007	0.971	0.103	0.587
月桂醛	0.018	0.925	-0.027	0.886	0.025	0.896	0.011	0.955

*P<0.05, **P<0.01 表示呈显著相关性。

*P < 0.05 and **P < 0.01 represent significant correlation.

黄色越明显,反之蓝色越明显,与 b^* 呈显著正相关的成分为断氧马钱子苷和正己醛,呈显著负相关的成分为芦丁、异绿原酸 B、α-亚麻酸甲酯,与总色值 E^*_{ab} 呈显著正相关的成分为断氧马钱子苷和正己醛,呈负相关的成分包括芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 C。最终得到 10 个与金银花颜色具有相关的成分,即分别为绿原酸、当药苷、断氧马钱子苷、芦丁、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、异绿原酸 B、异绿原酸 C、α-亚麻酸甲酯、正己醛、(E,E)-2,4-癸二烯醛。

2.7 基于网络药理学的金银花 Q-Marker 预测分析

2.7.1 活性成分确定 将本研究中 16 种化学成分(非挥发性和挥发性成分)作为金银花 Q-Marker 候选物。通过 ChemSpider 网站检索化合物,下载化合物的 2D 结构式,并获得相应化合物的 SMILES 式,用于化合物的靶点预测,结果见表 6。

2.7.2 金银花成分、疾病、功效靶点预测 在 Similarity ensemble approach (SEA) 和 Swiss Target Prediction 网站中对 16 种成分的药物靶点进行收集,并用 Excel 软件进行去重整理,共搜集了 327 个成分靶点。

根据金银花的主要适应证和功效,将咽炎、肺炎作为疾病,将抗病毒和解热作为功效,搜寻相关靶点,其中咽炎的关键词包括: acute sore throat

表 6 金银花化合物信息

Table 6 Compounds information of *Lonicerae Japonicae Flos*

化合物	英文名称	CAS 号	分子式	SMILES
绿原酸	chlorogenic acid	327-97-9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	C1C(C(C(C1(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O
当药苷	sweroside	14215-86-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	C=CC1C2CCOC(=O)C2=COC1OC3C(C(C(C3)O)O)O
断氧马钱子苷	secoxyloganin	58822-47-2	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	COC(=O)C1=COC(C(C1CC(=O)O)C=C)OC2C(C(C(C2)CO)O)O
芦丁	rutin	153-18-4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	CC1C(C(C(C1O)OCC2C(C(C(C2)OC3=C(OC4=CC(=CC(=C4C3=O)O)O)C5=CC(=C(C=C5)O)O)O)O)O)O
木犀草苷	cynaroside	5373-11-5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C3O)O)O)O)O
异绿原酸 B	isochlorogenic acid B	14534-61-3	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	C1C(C(C(C1(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)OC(=O)C=CC3=CC(=C(C=C3)O)O
异绿原酸 A	isochlorogenic acid A	2450-53-5	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	C1C(C(C(C1(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)OC(=O)C=CC3=CC(=C(C=C3)O)O
异绿原酸 C	isochlorogenic acid C	57378-72-0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	C1C(C(C(C1(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)OC(=O)C=CC3=CC(=C(C=C3)O)O
芳樟醇	linalool	78-70-6	C ₁₀ H ₁₈ O	CC(=CCCC(C)C)C=O
肉豆蔻酸	myristic acid	544-63-8	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	CCCCCCCCCCCC(=O)O
α-亚麻酸甲酯	methyl linolenate	301-00-8	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	CCC=CCC=CCC=CCCCCCCC(=O)OC
α-橙花醇	nerol	106-25-2	C ₁₀ H ₁₈ O	CC(=CCCC(=CCO)C)C
正己醛	hexanal	66-25-1	C ₆ H ₁₂ O	CCCCCC=O
(Z)-二聚断马钱子烯醛	centaurosides	82474-97-3	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₉	COC(=O)C1=COC(C(C1CC=C(C=C)O)C2C(C(OC=C2C(=O)OC3C(C(C(C3)CO)O)O)C=C)C=C)OC4C(C(C(C4)CO)O)O)O
(E,E)-2,4-癸二烯醛	(2E,4E)-deca-2,4-dienal	25152-84-5	C ₁₀ H ₁₆ O	CCCCC=CC=CC=O
月桂醛	lauraldehyde	112-54-9	C ₁₂ H ₂₄ O	CCCCCCCCCCCC=O

(急性喉咙痛) 和 pharyngitis (咽炎); 肺炎的关键词为 pneumonia (肺炎); 抗病毒的关键词为 antiviral (抗病毒); 解热的关键词为 febrile illness (发热性疾病) 和 fever (发烧); 将这些关键词分别输入到 Genecard 数据库中检索, 将同类病症的靶点合并后去重, 再分别以得分大于中位数作为筛选条件进行靶点筛选, 最终得到咽炎靶点 1 954 个, 肺炎靶点 2 801 个, 抗病毒靶点 3 963 个, 热症靶点 3 947

个。将这 4 种类型的疾病靶点分别与成分靶点取交集。分别得到了成分-肺炎靶点 132 个, 成分-咽炎靶点 133 个, 成分-解热靶点 171 个, 成分-抗病毒靶点 110 个。为明确关键的靶点, 又将肺炎和咽炎与成分取得的交集靶点进一步取交集, 得到 93 个成分-疾病靶点; 将解热和抗病毒与成分取得的交集靶点进一步取交集, 得到 81 个成分-药效靶点, 靶点筛选的韦恩图见图 4。

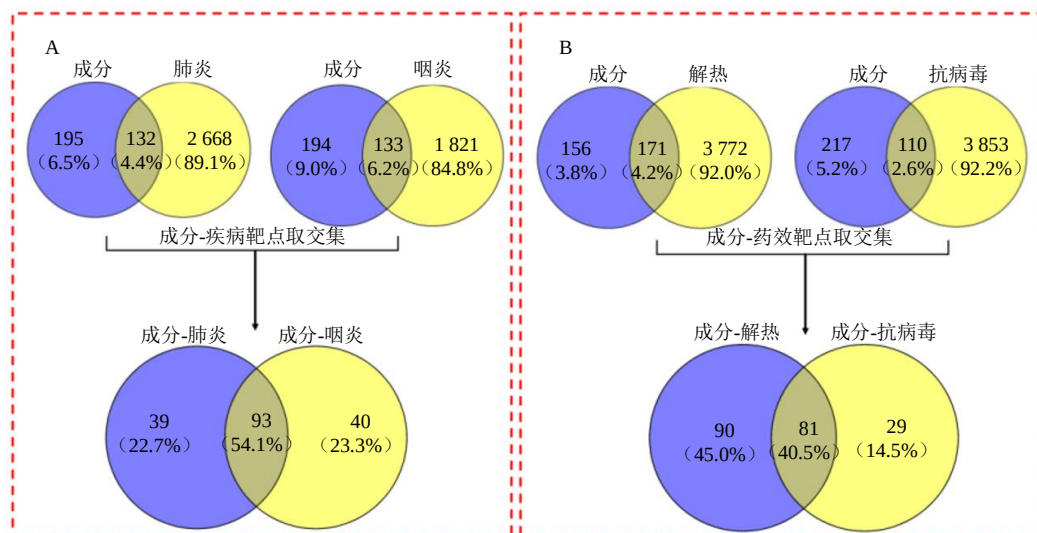


图 4 金银花成分-疾病靶点 (A) 和成分-药效靶点 (B) 的韦恩图

Fig. 4 Venn map of composition-disease target (A) and composition-efficacy target (B) of *Lonicerae Japonicae Flos*

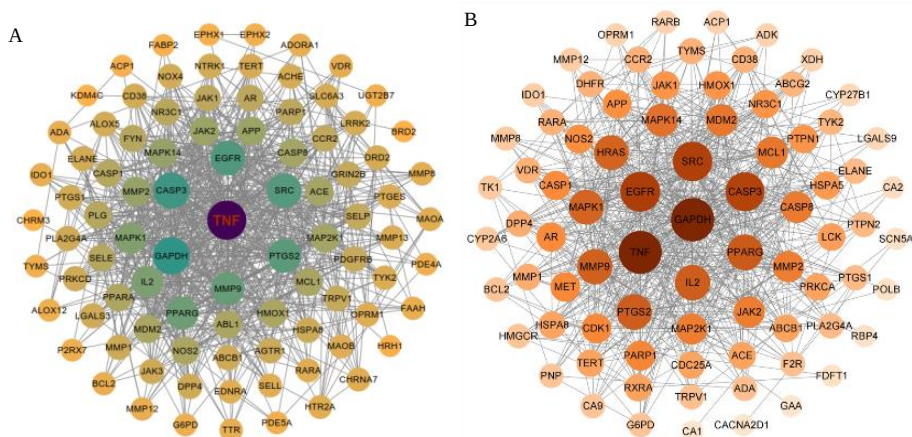
2.7.3 蛋白间相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 将上述得到的成分-疾病靶点和成分-药效靶点导入 String 数据库 (<http://string-db.org/>), 并将物种限定为 “*homo sapiens*”, 置信区间为 >0.9 , 以构建 PPI 网络图, 删除没有关联性的蛋白, 并导出 TSV 格式文件, 将数据导入 Cytoscape 3.9.1 作图, 首先利用 “Network Analyzer” 模块进行拓扑属性分析, 以 “degree” 为评价标准, 对靶点进行排列, 得到蛋白与蛋白间相互作用可视化图, 见图 5。通过 Degree 一倍中位数筛选分别得到 34 个肺炎-咽炎的关键靶点和 28 个解热-抗病毒的关键靶点, 提示这些关键靶点在金银花药理机制中可能发挥关键作用, 其相关的拓扑学参数见表 7 和表 8。其中, 在成分-疾病 (肺炎-咽炎) 的靶点中, 度值排名前 10 的靶点为肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3, CASP3)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、非受体酪氨酸激酶 (sarcoma gene, SRC)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors, PPARG)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL2)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)。在成分-药效 (解热-抗病毒) 的靶点中, 度值排名前 10 的靶点为 GAPDH、TNF、EGFR、SRC、CASP3、PPARG、

PTGS2、IL2、MMP9、HRas proto-oncogene (HRAS)。表明这些靶点可能是金银花治疗肺炎、咽炎, 具有解热和抗病毒作用的关键靶点。

2.7.4 基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析 利用 DAVID 6.8 数据库, 分别对金银花中与肺炎-咽炎相关的 34 个靶蛋白和与解热-抗病毒相关的 28 个靶蛋白进行 GO 分析和 KEGG 分析。

设置 $P < 0.01$, 以 P 值排序, 分别对排名前 10 的 GO 富集分析得到的信号通路进行可视化, 结果见图 6。结果表明, 金银花治疗肺炎-咽炎的关键靶点主要涉及的生物过程包括细胞凋亡过程的正向调节 (positive regulation of apoptotic process)、炎症反应的正向调节 (positive regulation of inflammatory response)、大分子复合物 (macromolecular complex)、膜筏 (membrane raft)、结合酶 (enzyme binding)、相同的蛋白结合 (identical protein binding), 见图 6-A; 金银花具有解热-抗病毒功效的关键靶点主要涉及的生物过程包括凋亡过程 (apoptotic process)、细胞凋亡过程的正向调节、高分子配合物 (macromolecular complex)、线粒体 (mitochondrion)、结合酶、相同的蛋白结合 (identical protein binding), 见图 6-B。

按 P 值大小从成分-疾病和疾病-靶点的 KEGG 分析结果中各获取了前 15 的 KEGG 通路, 结果见图 7。其中成分-疾病的 KEGG 的通路按 P 值大小排列, 见图 7-A, 重要性依次为细胞的增殖与凋亡



A-成分-疾病靶基因; B-成分-药效靶基因。

A-target genes of component-disease; B-target genes of component-efficacy.

图 5 蛋白-蛋白相互作用网络构建

Fig. 5 Construction of protein-protein interaction network

表 7 肺炎-咽炎关键靶点相关拓扑学参数

Table 7 Topological parameters related to key targets of pneumonia-pharyngitis

序号	靶点名称	连接度	中介中心性	节点紧密度
1	TNF	65	0.148	0.776
2	GAPDH	58	0.081	0.732
3	CASP3	54	0.077	0.709
4	EGFR	49	0.054	0.677
5	SRC	48	0.068	0.677
6	PTGS2	46	0.054	0.667
7	MMP9	43	0.024	0.634
8	PPARG	41	0.032	0.629
9	IL2	37	0.025	0.612
10	MAPK1	35	0.019	0.604
11	MAPK14	30	0.011	0.588
12	MMP2	30	0.009	0.581
13	APP	28	0.028	0.581
14	JAK2	28	0.017	0.570
15	ACE	26	0.013	0.559
16	CASP8	26	0.006	0.563
17	MAP2K1	26	0.005	0.563
18	MCL1	25	0.006	0.549
19	HMOX1	24	0.023	0.556
20	NOS2	24	0.020	0.559
21	ABL1	24	0.009	0.545
22	MDM2	24	0.004	0.559
23	PPARA	23	0.018	0.545
24	FYN	21	0.008	0.539
25	CASP1	21	0.006	0.539
26	PLG	21	0.004	0.539
27	NR3C1	20	0.020	0.552
28	AR	19	0.045	0.536
29	PARP1	19	0.003	0.520
30	CCR2	18	0.004	0.514
31	GRIN2B	17	0.015	0.533
32	TRPV1	16	0.028	0.536
33	ABCB1	14	0.017	0.526
34	PLA2G4A	14	0.005	0.523

[细胞凋亡 (apoptosis)]>抗肿瘤耐药性[表皮细胞生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)]>内分泌系统[松弛素 (relaxin)]>机体炎症反应和免疫应答[C 型凝集素 (C-type lectin receptor); IL-17; Fc epsilon RI; T 细胞受体 (T cell receptor); Toll 样受体 (Toll-like receptor); 自然杀伤细胞介导的细胞毒性 (natural killer cell mediated cytotoxicity)]>信号传导 (TNF, 血管内皮生长因子信号 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 促分裂原蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase MAPK); 鞘脂信号通路 (sphingolipid); 叉头框转录因子 (FoxO); PI3K-Akt]。对成分-药效的通路进行排序, 见图 7-B, 重要性依次为细胞的增殖与凋亡 (apoptosi) >

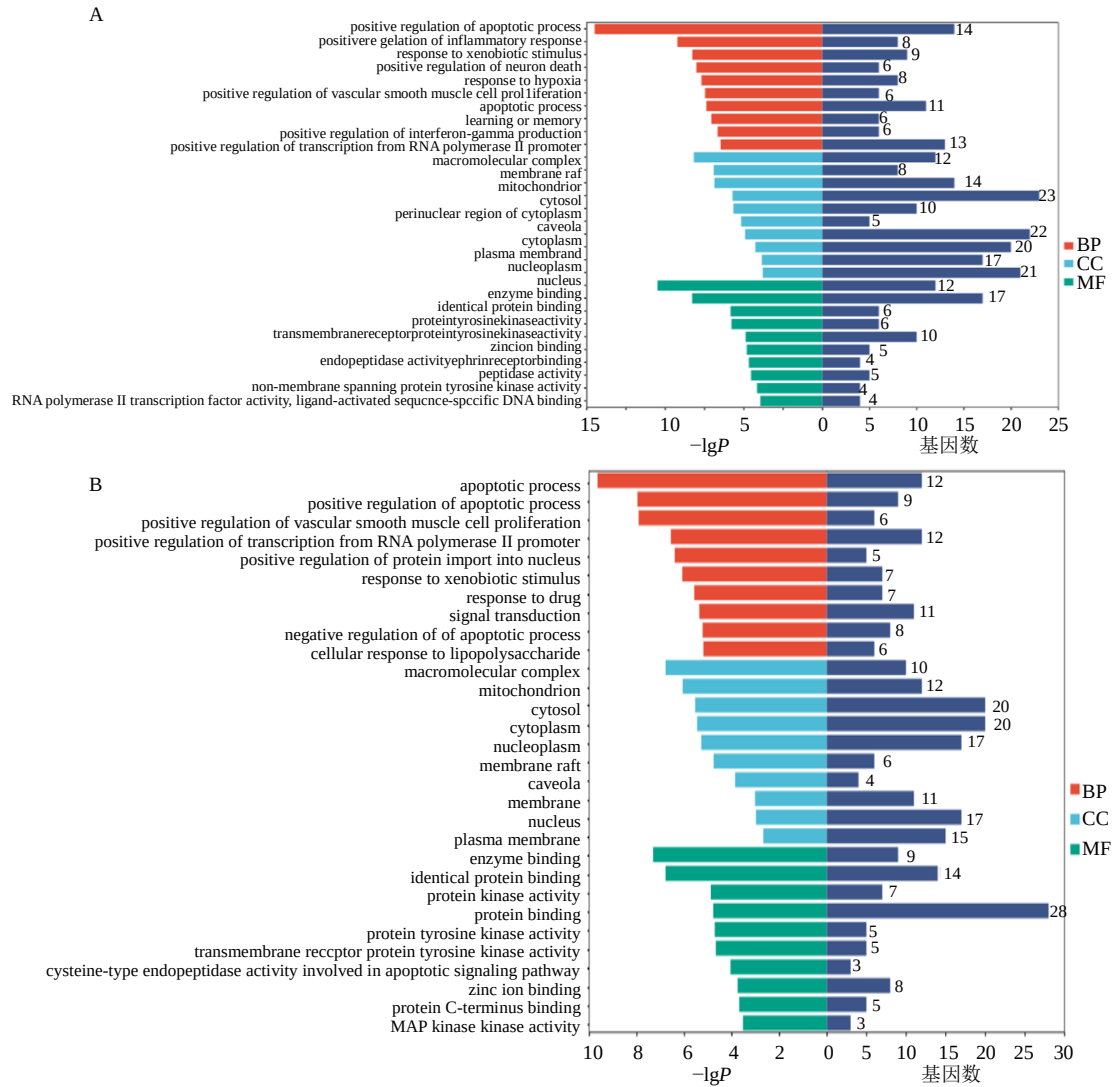
表 8 解热-抗病毒关键靶点相关拓扑学参数

Table 8 Topological parameters related to antipyretic-antiviral key targets

序号	靶点名称	连接度	中介中心性	节点紧密度
1	GAPDH	56	0.150	0.760
2	TNF	55	0.143	0.745
3	EGFR	47	0.062	0.687
4	SRC	46	0.075	0.681
5	CASP3	45	0.045	0.675
6	PPARG	37	0.042	0.637
7	PTGS2	36	0.024	0.622
8	IL2	36	0.035	0.617
9	MMP9	35	0.056	0.612
10	HRAS	34	0.017	0.608
11	MAPK1	34	0.024	0.608
12	MAPK14	29	0.015	0.581
13	MDM2	27	0.007	0.577
14	MCL1	27	0.007	0.572
15	CASP8	26	0.004	0.568
16	MMP2	25	0.005	0.560
17	MAP2K1	25	0.005	0.564
18	JAK2	25	0.005	0.564
19	PARP1	22	0.009	0.545
20	MET	21	0.005	0.549
21	CDK1	21	0.013	0.541
22	CASP1	20	0.006	0.537
23	NOS2	19	0.008	0.545
24	NR3C1	18	0.006	0.534
25	PTPN1	18	0.006	0.530
26	ABCB1	15	0.008	0.523
27	RXRA	15	0.023	0.513
28	CDC25A	15	0.004	0.513

抗肿瘤耐药性[(endocrine resistance) 内分泌耐药; EGFR]>内分泌系统 (relaxin)>机体炎症反应和免疫应答 (C-type lectin receptor、IL-17)>抗细菌感染 [沙门氏菌感染 (Salmonella infection)]>抗病毒感染 [人巨细胞病毒感染 (Human cytomegalovirus infection, Hepatitis B)、乙型肝炎病毒[卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染 (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection, (Hepatitis C)、人类免疫缺陷病毒-1 (Human immunodeficiency virus 1 infection)>信号传导 (TNF、PI3K-Akt、VEGF)。

将成分-疾病关键靶点通过 KEGG 分析得到的 15 条关键通路和成分-药效得到的关键通路通过韦恩图取交集, 见图 8。得到 8 条共有通路, 分别为细胞凋亡 (Apoptosis)、EGFR 酪氨酸激酶耐药性抑制剂 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、松弛素 (Relaxin)、C 型凝集素 (C-type lectin receptor)、白细胞介素 IL-17、TNF、PI3K-Akt、VEGF, 推测金银花可能主要通过这些通路治疗肺炎、咽炎, 发挥解热和抗病毒的功效。

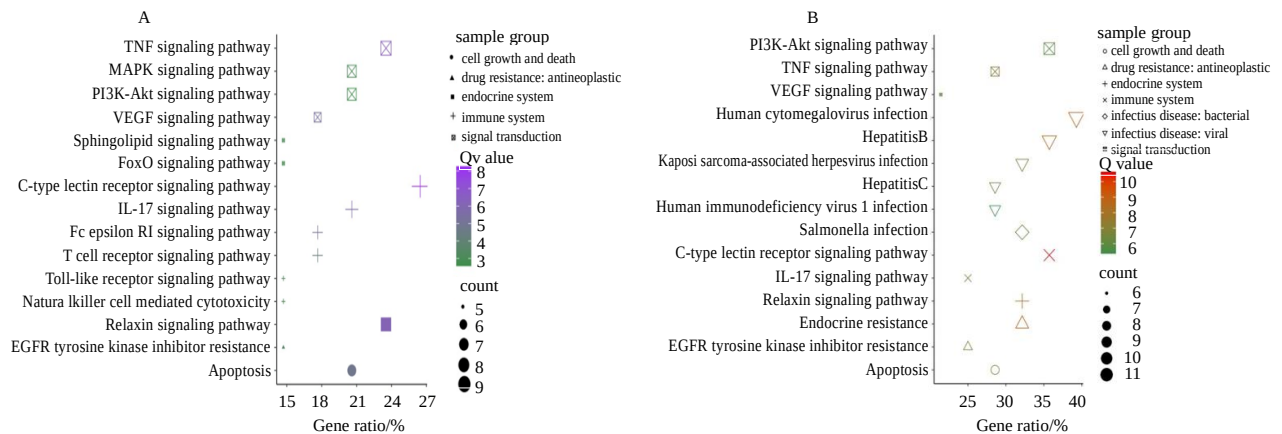


A-肺炎-咽炎相关靶基因；B-解热-抗病毒相关靶基因。

A-target genes of pneumonia-pharyngitis; B-target genes of antipyretic-antiviral.

图 6 GO 功能富集分析

Fig. 6 GO functional enrichment analysis



A-肺炎-咽炎相关靶基因；B-解热-抗病毒相关靶基因。

A-target genes of pneumonia-pharyngitis; B-target genes of antipyretic-antiviral.

图 7 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis

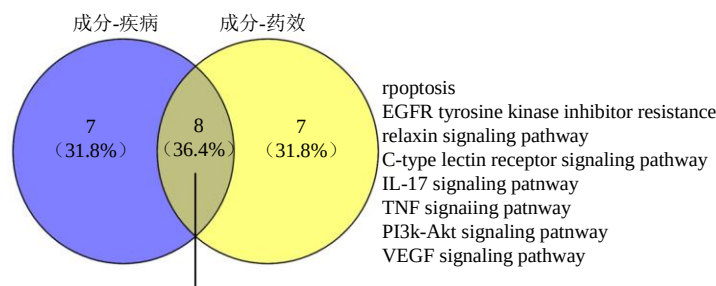


图 8 成分-疾病和成分-药效 KEGG 关键通路的韦恩图

Fig. 8 Venn map of KEGG key pathways of component-disease and component-efficacy

2.7.5 “活性成分-靶点-疾病-通路”网络构建与分析 将上述筛选得到的活性成分、靶点以及关键通路在 Excel 中整合为 network 文件，利用 Cytoscape 3.9.1 构建“活性成分-靶点-疾病-通路”网络图，见图 9。其中图 9-A 是与肺炎-咽炎相关的成分-靶点-通路网络图，从网络图中可知共有 51 个节点，155 条边，节点表示 Degree 值的大小，节点越大表示 Degree 值越大，可知 C12 (α -亚麻酸甲酯，Degree=9)、C16 (月桂醛，Degree=6)、C13 (α -橙花醇，Degree=4)、C6[(Z)-二聚断马钱苷烯醛，Degree=4)、

C11 (肉豆蔻酸，Degree=4)、C2 (当药苷，Degree=3)、C4 (芦丁，Degree=3)、C10 (芳樟醇，Degree=3)、C3 (断氧马钱子苷，Degree=3)、C7 (异绿原酸 B，Degree=3) 的连接度较高，以上 10 个成分可作为金银花治疗肺炎-咽炎的 Q-Marker。这些成分主要通过 MAPK1、MAP2K1、MAPK14、TNF、EGFR 等关键靶点作用于 Apoptosis、EGFR、Relaxin、C-type lectin receptor、IL-17、Fc epsilon RI、T cell receptor、Toll-like receptor、Natural killer cell mediated cytotoxicity 等多种信号通路。

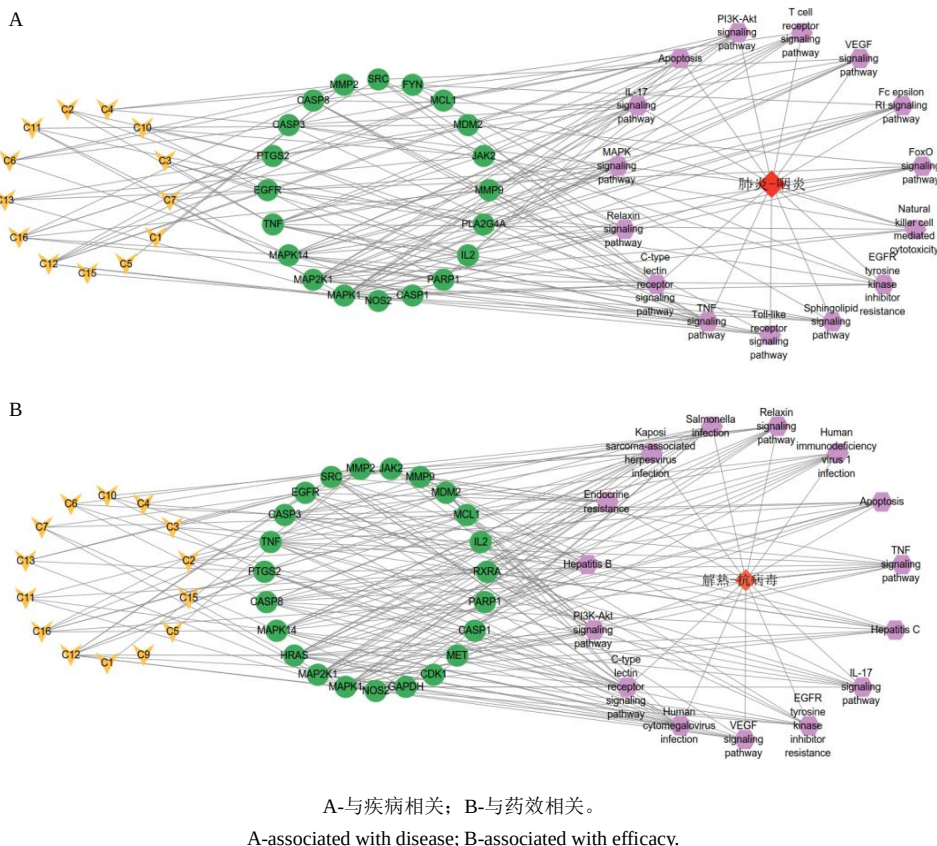


图 9 金银花“活性成分-关键靶点-通路”网络图

Fig. 9 Network prediction of “compound-key target-pathway” of *Lonicerae Japonicae Flos*

图 9-B 是与解热-抗病毒相关的成分-靶点-通路网络图,从网络图中可知共有 55 个节点,193 条边,C12 (α -亚麻酸甲酯, Degree=11)、C16 (月桂醛, Degree=6)、C11 (肉豆蔻酸, Degree=4)、C13 (α -橙花醇, Degree=4)、C7 (异绿原酸 B, Degree=4)、C6[(Z)-二聚断马钱苷烯醛, Degree=4]、C10 (异绿原酸 A, Degree=3)、C4 (芦丁, Degree=3)、C3 (断氧马钱子苷, Degree=3) 的连接度较高,以上 9 个成分可作为金银花解热-抗病毒的 Q-Marker。这些成分主要通过 MAPK1、MAP2K1、HRAS、MAPK14、CASP8 等关键靶点作用于 Apoptosis、Endocrine resistance、EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance、Relaxin、C-type lectin receptor、IL-17、Salmonella infection、Human cytomegalovirus infection、Hepatitis B、Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection、Hepatitis C 等多种信号通路。

2.7.6 金银花外观和特征性药效成分关联分析 由“2.6.2”项分析结果可知,与金银花颜色具有相关性的成分有 10 个,分别为绿原酸、当药苷、断氧马钱子苷、芦丁、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、异绿原酸 B、异绿原酸 C、 α -亚麻酸甲酯、正己醛、(E,E)-2,4-癸二烯醛。网络药理学研究表明,有 11 种成分和金银花的主要功效和适应证具有较强的关联性,可作为其潜在的 Q-Marker,将由外观得到的成分与网络药理研究得到的成分取交集,见图 10。由图可知与金银花颜色和功效均具有相关性的成分有 6 个,分别为当药苷、断氧马钱子苷、芦丁、异绿原酸 B、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、 α -亚麻酸甲酯,这些成分在网络药理学筛选出的 Q-Marker 中占比 54.5%。

3 讨论

本实验以金银花中的 9 种非挥发性成分和 7 种颜色关联的成分 疾病-药效关联的成分

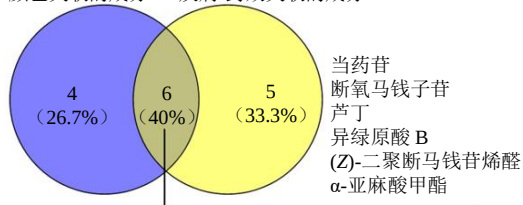


图 10 金银花中与颜色关联的成分和疾病(或药效)关联成分的韦恩图

Fig. 10 Venn map of components associated with color and components associated with disease (or efficacy) in *Lonicerae Japonicae Flos*

挥发性成分作为其内在品质特征成分的评价指标,从理论层面探讨其颜色-成分-药理活性的相关性,进一步挖掘金银花中的质量标志物。

颜色和成分的相关性分析结果显示,与颜色相关的成分有 10 个,即绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C、芦丁、当药苷、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、断氧马钱子苷等 7 个非挥发性成分,以及 3 个挥发性成分,分别为 α -亚麻酸甲酯、正己醛、(E,E)-2,4-癸二烯醛。已有文献报道,金银花的颜色与黄酮类、有机酸类、环烯醚萜类等成分具有显著相关性^[15-17],尚未见到对金银花挥发性成分和颜色进行相关性研究的报道。本研究发现挥发性成分中正己醛与 L^* 呈正相关,(E,E)-2,4-癸二烯醛与 a^* 呈显著负相关, α -亚麻酸甲酯与 b^* 呈负相关,即正己醛和(E,E)-2,4-癸二烯醛的含量较高的样本在颜色上偏鲜绿色(河南产区样本), α -亚麻酸甲酯含量较高的样本偏黄(山东和河北产区的样本),与传统感官对 3 个产区金银花样本颜色的判断结果较为一致。

因与外观具有显著相关的成分不一定是药效成分,因此,本实验又采用网络药理学从成分-疾病和成分-药效两个维度对金银花中的药效成分进行筛选。得到了成分-疾病(肺炎和咽炎)关键靶点 34 个(TNF、GAPDH、CASP3、EGFR、SRC、PTGS2、MMP9、PPARG、IL2、MAPK1 等),成分-药效(解热-抗病毒)关键靶点 28 个(GAPDH、TNF、EGFR、SRC、CASP3、PPARG、PTGS2、IL2、MMP9、HRAS 等),这些靶点与 11 个活性成分高度关联,可作为潜在的关键靶点。进一步对关键靶点进行了 KEGG 通路富集分析,分别从疾病和药效层面得到了 15 个关键通路。肺炎、咽炎、解热和抗病毒,在金银花的适应症和功效中并不是独立存在的,而是以复杂的机制相互关联。急性和慢性炎症均是由炎症细胞因子激活导致的,病毒和细菌感染也是肺炎和咽炎常见的病因,而炎症和病毒感染也是发热的诱因。因此,本实验又对 2 个维度的关键靶点-关键通路取交集,得到 Apoptosis、EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance、Relaxin、C-type lectin receptor、IL-17、TNF、PI3K-Akt、VEGF 等 8 条共有通路,得到 8 个共有成分,分别为 α -亚麻酸甲酯、月桂醛、 α -橙花醇、(Z)-二聚断马钱苷烯醛、肉豆蔻酸、芦丁、断氧马钱子苷、异绿原酸 B,成分-疾病富集的通路也是成分-功效富集的通路,进一步证明了药效成分的可信性。推测金银花可能主要通过这些成分发挥

解热和抗病毒的功效,用于治疗肺炎、咽炎等疾病。已有大量文献分别从疾病和功效的层面对金银花中的活性成分进行研究,发现芦丁、异绿原酸 B、异绿原酸 A 等成分具有较好的抗炎、抗病毒作用^[5,18-20],彭莎等^[21]通过系统动力学模型筛选出金银花中的绿原酸和芳樟醇是其发挥清热解毒功效的活性成分。但总体看来,相关研究报道主要集中在非挥发性成分,而对挥发性成分药理相关的研究较少。

在成分-疾病功效-靶点-通路筛选的基础上,通过与金银花颜色进行关联分析,得到 6 个共有成分,包括当药苷、断氧马钱子苷、芦丁、异绿原酸 B、(Z)-二聚断马钱苷烯醛等 5 个非挥发性成分和 1 个挥发性成分,即 α -亚麻酸甲酯,在 11 个网络药理学筛选出的 Q-Marker 中占比 54.5%。说明在进行金银花品质评价时,外观颜色可作为一项重要的评价指标,但是仅外观不足以完全评价金银花品质的优劣,还需借助分析手段对其内在成分的含量进行测定。本次考察的 9 个非挥发性成分中,6 个为药典规定的指标,根据本研究结果,芦丁和异绿原酸 B 不仅与金银花的功效和主要适应症相关,还与金银花颜色具有显著相关性,二者可作为金银花的 Q-Marker; 基于大量样本实验研究可知, α -亚麻酸甲酯、芳樟醇、肉豆蔻酸在 3 个产区金银花中的含量分布分别为 4.50%~5.29%、11.25%~14.38%、6.15%~12.31%,是其主要挥发性成分^[11],并且网络药理学研究结果表明,三者金银花的主要适应症或功效方面均有贡献;此外, α -亚麻酸甲酯作为网络药理学研究结果中与疾病和功效最为相关的成分,同时与颜色也具有显著相关性,因此,这 3 种挥发性成分也可作为金银花的 Q-Marker。由于芦丁含量较低,建议在药典规定的 HPLC 特征图谱基础上增加芦丁特征峰的鉴别;鉴于异绿原酸 B、 α -亚麻酸甲酯、芳樟醇、肉豆蔻酸的含量相对较高,可以考虑在含量测定项下增加这 4 个成分的含量指标,具体的含量标准尚需在建立系统的定量分析方法基础上,通过多批次样品的含量结果而定。

目前,质量标志物 Q-Marker 研究多将化学成分和药理作用进行关联,借助网络药理学、分子对接以及实验验证,证明 Q-Marker 选择的合理性。已有学者提出:通过“性状-质量标志物-生物效应”的饮片质量整体识别的研究思路^[20],该思路的提出对中药质量的品质提升具有重大的意义。本研究将金银花中主要的非挥发性成分、挥发性成分以及药材

的颜色(色度值)进行关联分析,较为全面地展现了金银花的质量及品质内涵,并通过网络药理学分析预测主要成分的药理活性,得出能够体现其质量的 Q-Marker,为证实中药材传统感官评价的合理性提供了新思路。

本实验通过构建颜色-特征成分-疾病-靶点-作用机制网络关联分析,较为全面的反映了金银花颜色、气味、成分和药效的综合作用,为全面控制金银花的质量控制提供依据,为进一步研究金银花的作用机制提供参考。

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]. 四部. 2020: 263.
- [2] 宋亚玲,倪付勇,赵玮武,等. 金银花化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3656-3664.
- [3] 姚月保,杨晓芸,彭莲,等. 基于仿生识别系统对金银花颜色与“气”的鉴别研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(4): 1270-1277.
- [4] 黄文静,熊乐文,张龙霏,等. 不同种质金银花发育过程中黄酮类成分含量变化规律研究 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3156-3164.
- [5] 王玲娜,孙希芳,张芳,等. 不同发育时期金银花颜色与活性成分的相关性分析 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3182-3188.
- [6] 代熙,郭然,黄厚钰,等. 基于 HPLC 多成分定量结合外观性状的金银花质量评价与等级标准的制定 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(5): 821-830.
- [7] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [8] 张雅莉,韩建勋,图尔荪托合提·托合提萨伊普,等. 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 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6023-6034.
- [9] 张树蓉,赵宏苏,佟沫儒,等. 牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53 (16): 5215-5224.
- [10] 张萌萌,王丹,魏大能,等. 基于血清药物化学的花椒温中止痛的质量标志物研究 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2731-2739.
- [11] 刘天亮,董诚明,齐大明. 基于中药质量标志物 (Q-marker) 的金银花指纹图谱体系的构建思路 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 229-235.
- [12] 林丽美. 以银翘药对为对象探讨建立中药药效物质快速发现的方法 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2009.
- [13] 刘艳萍,王云,贾哲,等. 基于 GC-MS 和多元统计方法分析不同产地金银花挥发性成分的差异 [J]. 中国中

- 药杂志, 2022, 47(20): 5508-5519.
- [14] 张雪, 李晓庆, 王云, 等. 焦栀子炒制过程中 HPLC 图谱变化与外观颜色的动态关联研究 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4029-4037.
- [15] 杨晓芸. 金银花颜色气味与化学成分的相关性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [16] 熊吟, 肖潇, 闫永红, 等. 基于色度分析原理的金银花有效成分含量与颜色值相关性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(3): 667-670.
- [17] 熊乐文, 金莹, 黄玮慕, 等. 金银花色泽与酚酸类成分含量相关性研究 [J]. 中成药, 2022, 44(8): 2736-2739.
- [18] Zhao H Q, Lai C, Zhang M M, *et al.* An improved 2D-HPLC-UF-ESI-TOF/MS approach for enrichment and comprehensive characterization of minor neuraminidase inhibitors from *Flos Ionicerae Japonicae* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 175: 112758.
- [19] Gao Y, Wang F X, Liu Q, *et al.* Comparison of anti-inflammatory effects of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(2): 332-341.
- [20] 马涵玉, 钱琪, 牛丽颖. 基于文献计量学的金银花研究现状与热点分析 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1426-1434.
- [21] 彭莎, 霍晓乾, 霍梦琪, 等. 基于系统中药学的金银花清热解毒功效标志物研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3275-3281.
- [22] 秦宇雯, 费程浩, 毛春芹, 等. 基于“性状-质量标志物-生物效应”的饮片质量整体识别研究思路 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1294-1302.

[责任编辑 时圣明]