

基于HPLC指纹图谱和网络药理学的石崖茶质量标志物(Q-Marker)预测

皮振宇¹, 李 静¹, 何颂华², 李振麟³, 王 伟¹, 赵晓芳¹, 罗雪菲¹, 冷 静¹, 兰太进^{1*}

1. 广西中医药大学, 广西南宁 530200

2. 广西壮族自治区食品药品检验所, 广西南宁 530021

3. 江苏省中医药研究院, 江苏南京 210028

摘要: 目的 基于HPLC指纹图谱数据的化学模式识别方法和网络药理学技术, 预测石崖茶潜在质量标志物(Q-Marker), 为提升其药材质量标准提供参考。方法 建立10批次广西不同产地石崖茶HPLC指纹图谱, 对其进行化学模式识别分析, 筛选不同批次间差异的主要标志性成分, 并进行成分质谱鉴定; 通过网络药理学对筛选鉴定出的成分构建“成分-核心靶点-通路”网络, 分析预测石崖茶的Q-Marker, 基于可测性原则对Q-Marker进行定量测定。结果 不同批次石崖茶指纹图谱共标定出12个共有峰, 经化学模式识别, 筛选出批次间5个主要差异性成分, 分别鉴定为山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素。网络药理学分析提示5种差异成分直接相关靶点211个, 其映射的KEGG信号通路显著富集在脂质与动脉粥样硬化、内分泌抵抗、甲状腺激素信号通路、人巨细胞病毒感染、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、癌症的中心碳代谢等, 映射的161个信号通路与石崖茶主要功效和现代药理作用密切相关。含量测定结果显示, 不同批次石崖茶中山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷和芹菜素质量分数分别为41.56~96.90、85.45~101.01、7.39~12.96、5.74~15.22、2.65~12.43 mg·g⁻¹。根据Q-Marker的五原则, 初步预测山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素为石崖茶的Q-Marker。结论 初步预测了石崖茶的Q-Marker, 为其药材质量标准的提升提供参考。

关键词: 石崖茶; 质量标志物; 指纹图谱; 化学模式识别分析; 网络药理学; 山茶苷A; 表儿茶素; 儿茶素; 槲皮苷; 芹菜素
中图分类号: R284; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)07-1529-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.012

Prediction of Q-Marker for leaves from *Adinandra nitida* based on HPLC fingerprint and network pharmacology

PI Zhenyu¹, LI Jing¹, HE Songhua², LI Zhenlin³, WANG Wei¹, ZHAO Xiaofang¹, LUO Xuefei¹, LENG Jing¹, LAN Taijin¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Guangxi Institute For Food and Drug Control, Nanning 530021, China

3. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To predict potential Q-Markers for the leaves from *Adinandra nitida* using the chemical pattern recognition method of HPLC fingerprint data and network pharmacology techniques, so as to provide scientific basis for the quality evaluation of the leaves from *A. nitida*. **Methods** Ten batches of *A. nitida* leaf samples from different areas in Guangxi were collected, and the HPLC fingerprint of the leaves from *A. nitida* was established. Chemical pattern recognition analysis was employed to screen the major distinctive ingredients among different batches, and identify these ingredients by mass spectrometry. Utilizing network pharmacology, a "component-core target-pathway" network for the identified ingredients were constructed and analyzed to predict the potential Q-markers for the leaves from *A. nitida*. **Results** The fingerprint identified a total of 12 common peaks. Through chemical pattern recognition, five major distinctive ingredients were screened out between batches, including camelliaside A, epicatechin, catechin, quercitroside, and quercetin. Network pharmacology analysis indicated that those ingredients were associated

收稿日期: 2024-02-20

基金项目: 广西自然科学基金项目(2016GXNSFBA380200); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2023390); 广西中医药大学高层次人才培育创新团队资助项目(2022B006)

第一作者: 皮振宇(1999—), 硕士研究生, 主要从事中医药重塑慢性病糖脂代谢的基础研究及产品开发。E-mail: 949464548@qq.com

*通信作者: 兰太进(1986—), 副教授, 主要从事中医药重塑慢性病糖脂代谢的基础研究及产品开发。E-mail: tj_lan24@163.com

with 221 targets and the signal pathways, which relate to the main effects and modern pharmacological actions of the leaves from *A. nitida*. The content determination results showed that the contents of camelliaside A, epicatechin, catechin, quercitroside, and quercetin in *A. nitida* were 41.56—96.90, 85.45—101.01, 7.39—12.96, 5.74—15.22, and 2.65—12.43 mg·g⁻¹, respectively. According to the five principles of Q-Markers, the preliminary prediction Q-Markers for the leaves from *A. nitida* are camelliaside A, epicatechin, catechin, quercitroside, and quercetin. **Conclusion** This study preliminarily identified and predicted the Q-Markers for the leaves from *A. nitida*, providing a reference for improvement of its quality standard.

Key words: *Adinandra nitida* Merr. ex H. L. Li; Q-Marker; HPLC fingerprint; chemical pattern recognition; network pharmacology; camelliaside A; epicatechin; catechin; quercitroside; quercetin

石崖茶,学名亮叶杨桐叶,系山茶科植物亮叶杨桐 *Adinandra Nitida* Merr. ex H. L. Li 的干燥叶,具有清热解毒、护肝明目、健胃消食等功效^[1],在广西民间广泛用作代用茶,其因生长在悬崖上而得名^[2]。药理研究表明,石崖茶具有一定的抗炎^[3]、抗氧化^[4]、抗菌^[5]和抗肿瘤^[6]作用,对咽炎、肝炎、高血压、高脂血症等有一定的治疗作用^[1,3]。石崖茶富含黄酮类成分,黄酮类成分质量分数可达 28.4%^[7],通过优化提取工艺,石崖茶中总黄酮的提取率可达到 35%^[8],其主要包括山茶苷 A、山茶苷 B、表儿茶素、槲皮苷和芹菜素等^[8]。此外,石崖茶还含有萜类、甾体类、香豆素类化合物等成分^[9-10]。

石崖茶除作为茶叶食用外,在广西也被用作壮药材,壮药名为茶盟熔,于 2011 年被收录于广西壮族自治区壮药质量标准(第二卷)^[11]。石崖茶在广西有着广泛的分布和应用,主产于桂东北和桂西北地区的多个县(市)^[3,11]。由于石崖茶分布较为广泛,其成分可能会因产地不同存在一定的差异,制定有效的质量控制标准是十分必要的。目前,广西壮族自治区壮药质量标准(第二卷)对石崖茶的质量控制仅规定了山茶苷 A 的含量测定^[1],不能全面控制和评价其质量。

刘昌孝院士^[12]于 2016 年首次提出了质量标志物(Q-Marker)理论,围绕该理论研究人员进行了大量的研究工作,已经取得了迅速的发展和完善^[13-15]。目前,未见有对石崖茶的 Q-Marker 的相关研究。为此,本研究收集广西不同产地的石崖茶样品 10 批次,构建 HPLC 指纹图谱,进行化学模式识别分析,结合网络药理学,预测石崖茶 Q-Marker,为其药材质量标准的提升提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

2695 高效液相色谱仪(美国沃特世公司); Impact II 超高分辨四级杆飞行时间质谱仪(美国布鲁克公司);BSA224S 分析天平(万分之一,瑞士梅特勒-

托利多公司);BP-211D 电子分析天平(十万分之一,德国赛多利斯公司);SCQ-6201A 台式数控超声波清洗机(功率 250 W、频率 25/40 kHz,上海声彦超声波仪器有限公司);DHG-9203A 电热恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);Standard 优普 ULUPURE-H 超低有机物系列超纯水器(四川优普超纯科技有限公司);5418 离心机(德国艾本德股份公司)。

1.2 药材与试剂

石崖茶药材共 10 批,来源信息见表 1,经广西中医药大学中药鉴定学教研室滕建北副教授鉴定为山茶科(Theaceae)杨桐属(*Adinandra* Jack)植物亮叶杨桐 *Adinandra nitida* Merr. ex H. L. Li 的干燥叶;对照品山茶苷 A(批号:20160727,质量分数≥98%)由江苏省中医药研究院中药质量与代谢组研究室提供;表儿茶素(批号:110878-200102,质量分数≥99.7%)、儿茶素(批号:110877-202306,质量分数≥96.6%)、槲皮苷(批号:111538-202007,质量分数≥95.3%)、芹菜素(批号:111901-201603,质量分数≥98.4%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(批号:196077,色谱纯)、甲醇(批号:194404,色谱纯)均购自美国赛默飞世尔科技公司;其他试剂均为分析纯。

表 1 10 批次石崖茶药材样品信息

Table 1 Sample information for 10 batches of *Adinandra nitida*

编号	采集时间	产地
S1	2019 年 6 月	广西桂平
S2	2019 年 4 月	广西环江
S3	2019 年 3 月	广西金秀
S4	2019 年 3 月	广西马山
S5	2019 年 6 月	广西蒙山
S6	2019 年 3 月	广西平乐
S7	2019 年 6 月	广西平南
S8	2019 年 6 月	广西融水
S9	2019 年 3 月	广西上思
S10	2019 年 8 月	广西韶平

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取石崖茶药材粉末1 g,加入50%甲醇50 mL,加热回流2次,每次1 h,合并提取液,冷却后加入适量甲醇定容至100 mL,滤过后即得。

2.1.2 山茶苷A对照品溶液的制备 精密称取山茶苷A对照品适量,加入甲醇定容至刻度,制备得到质量浓度为600.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.3 色谱及质谱条件 (1)色谱条件:ACE Excel 5 C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.1%冰醋酸(B),梯度洗脱(0~8 min, 15%~26% A; 8~19 min, 26%~35% A; 19~24 min, 35%~49% A; 24~35 min, 49%~65% A; 35~40 min, 65%~78% A; 40~50 min, 78%~100% A; 50~55 min, 100%~70% A; 55~60 min, 70%~50% A);检测波长240 nm;柱温25 $^{\circ}\text{C}$;体积流量0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积10 μL 。柱后串联DAD检测器与质谱检测器,DAD检测器出口分流进质谱检测器,分流比4:1。(2)质谱条件:大气压化学电离(APCI)离子源,负离子模式;毛细管电压4000 V;雾化气压力250 kPa;干燥气体积流量2.5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;干燥气温度200 $^{\circ}\text{C}$,Vaporizer温度450 $^{\circ}\text{C}$;质谱扫描模式为全扫描和auto MS/MS扫描;扫描范围 m/z 50~1 300。

2.1.4 方法学考察 (1)专属性试验:取“2.1.2”项山茶苷A对照品溶液和“2.1.1”项石崖茶供试品溶液(S1),在“2.1.3”项色谱条件下分别进样,测定峰面积。结果显示,山茶苷A对照品保留时间为33.424 min,对应石崖茶供试品(S1)的相同保留时间的成分为山茶苷A,表明该方法具有专属性,符合技术要求。

(2)精密度试验:取“2.1.1”项制备的石崖茶供试品溶液(S1)1份,在“2.1.3”项色谱条件下连续进样6次,测定峰面积。结果显示,各主要色谱峰相对保留时间的RSD值为0.117%~0.831%,相对峰面积的RSD值为0.069%~2.922%,表明仪器精密度良好。

(3)重复性试验:取“2.1.1”项制备的石崖茶供试品溶液(S1)5份,在“2.1.3”项色谱条件下进样,测定峰面积。结果显示,各主要色谱峰相对保留时间的RSD值为0.141%~0.495%,相对峰面积的RSD值为0.087%~2.423%,表明该方法的重复性良好。

(4)稳定性试验:取“2.1.1”项制备的石崖茶供

试品溶液(S1)1份,在制备后的0、2、4、8、12、24 h分别进样,按“2.1.3”项色谱条件测定峰面积。结果显示,各主要色谱峰的相对保留时间的RSD值为0.191%~0.393%,相对峰面积的RSD值为0.063%~2.994%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.5 HPLC指纹图谱的建立及相似度分析 取10批石崖茶药材,按“2.1.1”项下制备供试品溶液,在“2.1.3”项色谱条件下分别进样对照品溶液和供试品溶液,记录色谱图。将样品谱图cdf文件导入中药色谱指纹相似度评价系统(2012版),以S1样品色谱图为参照图谱,采用中位数法对色谱峰进行多点校正,10批次石崖茶HPLC指纹图谱叠加图见图1-A,山茶苷A对照品HPLC色谱图和指纹图谱共有模式色谱图见图1-B、C。通过自动分析和人工核对,共确定12个共有色谱峰,通过与对照品色谱峰比较,指认9号色谱峰为山茶苷A。相似度计算结果显示,10批石崖茶样品HPLC指纹图谱相似度为0.935~0.996(表2)。

2.1.6 基于指纹图谱数据的偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA) 以标定的12个共有色谱峰的相对峰面积为变量,将其导入SIMCA软件进行PLS-DA分析。PLS-DA分析结果如图2-A所示,不同产地石崖茶大致聚集为3类,I类包括S1(桂平)、S3(金秀)、S4(马山)、S5(蒙山)、S6(平乐)、S7(平南)、S10(韶平);II类包括S9(上思);III类包括S2(环江)、S8(融水)。进一步分析显示,产自桂东地区桂平、金秀、马山、蒙山、平乐和平南的石崖茶聚集在一起;而产自桂北地区环江、融水的石崖茶聚集成群;产自桂南地区上思的石崖茶单独成群。结果提示,产自不同地理位置的石崖茶,呈现不同的HPLC指纹图谱特征。

为找到导致不同产地石崖茶HPLC指纹图谱差异的主要成分,本研究进一步分析12个共有色谱峰的变量重要性投影(VIP)正态分布图,结果见图2-B,筛选出VIP值大于1的5个色谱峰:9号峰、4号峰、1号峰、8号峰和10号峰。结果提示,上述5个色谱峰对应的成分可能在区分不同产地石崖茶中起到了重要作用,是石崖茶的主要标志性成分。

2.1.7 VIP值大于1的5个色谱峰的质谱鉴定 取“2.1.1”项下供试品溶液,按“2.1.3”项色谱和质谱条件对VIP值大于1的5个色谱峰进行鉴定,一级质谱全扫描的APCI负离子模式总离子流图见图3。结合二级质谱碎片离子信息和对照品,鉴定1号色谱峰为儿茶素、4号色谱峰为表儿茶素、8号色谱峰

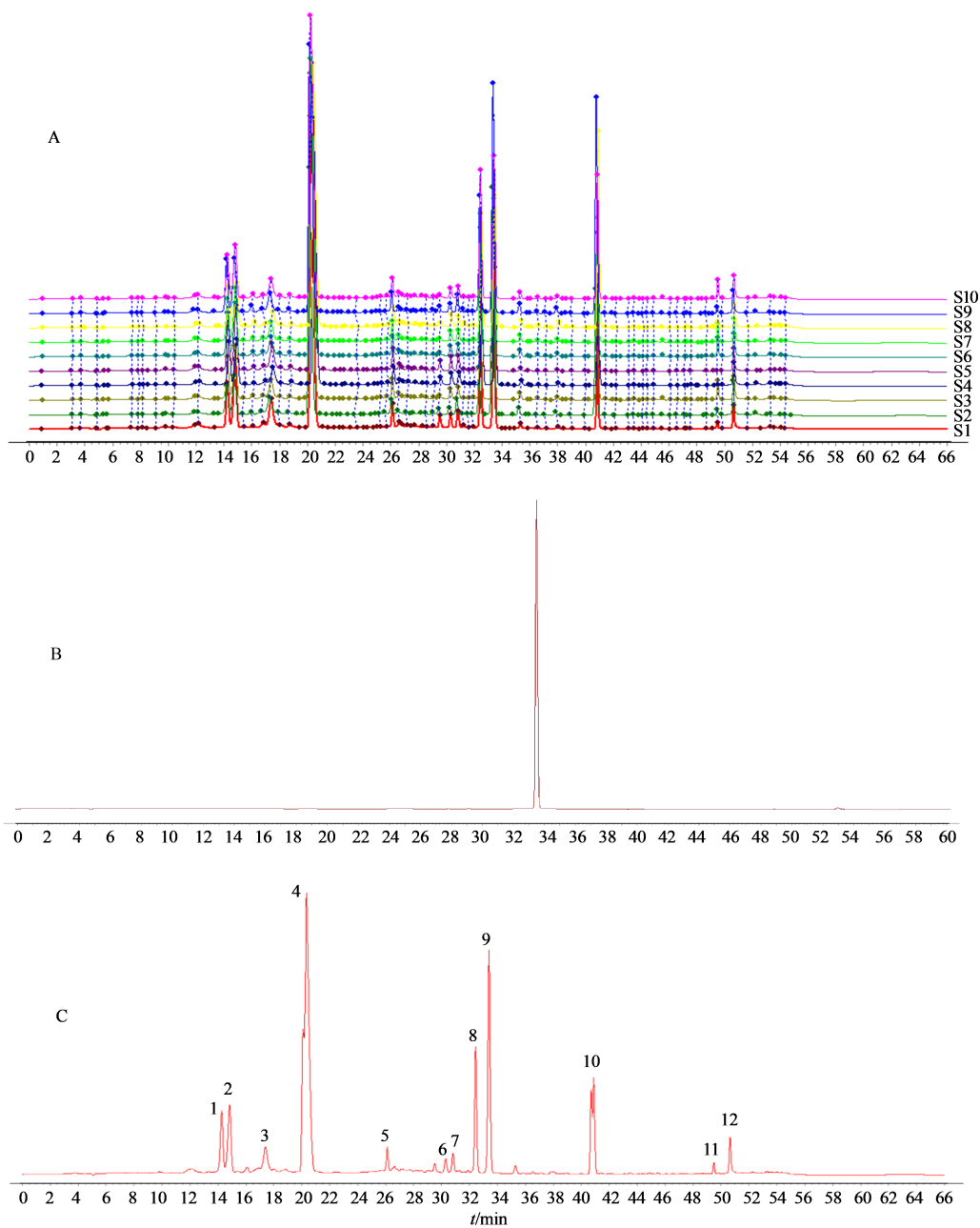


图1 10批次石崖茶样品HPLC指纹图谱叠加图(A)、山茶苷A对照品HPLC色谱图(B)和指纹图谱共有模式色谱图(C)
Fig. 1 Overlaid HPLC fingerprint chromatogram for 10 batches of *A. nitida* samples (A), HPLC chromatogram of camelliaside A (B), and common mode chromatogram of the fingerprint (C)

表2 10批次石崖茶样品相似度评价结果
Table 2 Similarity assessment results for 10 batches of *A. nitida* samples

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.996	S6	0.996
S2	0.948	S7	0.996
S3	0.996	S8	0.978
S4	0.995	S9	0.935
S5	0.992	S10	0.996

为槲皮苷、9号色谱峰为山茶苷A、10号色谱峰为芹菜素,鉴定结果见表3。

2.2 网络药理学对石崖茶 Q-Marker 的预测分析
2.2.1 “成分-靶点”网络构建 将鉴定出的VIP值大于1的5个成分(山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素)信息输入 SuperPred 靶点数据库(<https://prediction.charite.de>)和中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)进行数据挖掘,获得上述5个成分直接相关靶点211个,“成分-靶点”关系见图4-A。

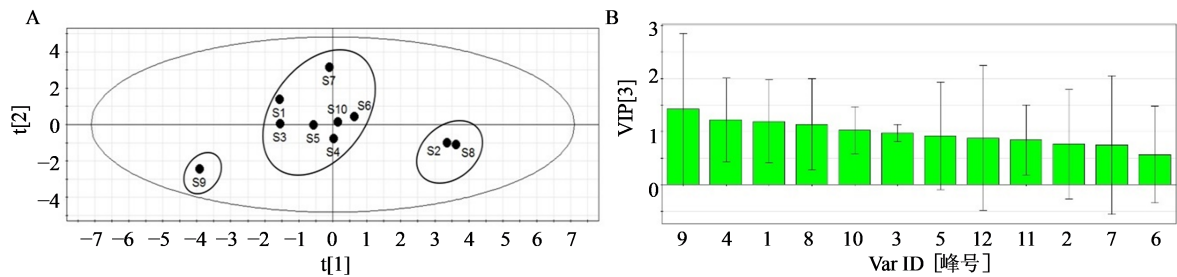
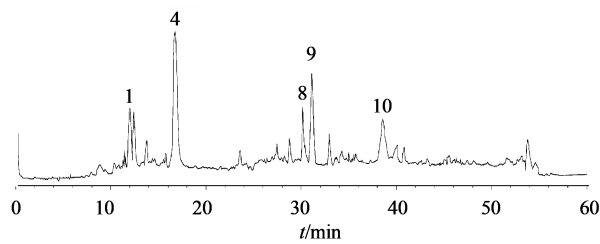


图 2 10 批次石崖茶样品 HPLC 指纹图共有峰的 PLS-DA 得分图(A)和 VIP 值(B)

Fig. 2 PLS-DA score plot (A) and VIP value (B) of common HPLC fingerprint chromatograms for 10 batches of *A. nitida* samples



1-儿茶素;4-表儿茶素;8-槲皮苷;9-山茶苷A;10-芹菜素。
1-catechin ; 4-epicatechin ; 8-quercitroside ; 9-camellianin A ;
10-apigenin.

图 3 石崖茶供试品溶液 APCI 负离子模式下的总离子流图
Fig. 3 Total ion flow spectrum of *A. nitida* solution under negative ion mode of APCI

2.2.2 靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将获得的 211 个靶点蛋白导入 STRING (<https://cn.string-db.org/>), 设置物种为 Homo sapiens, 选择 Minimum required interaction score 为 0.900, 获得 PPI 网络(图 4-B)。将 STRING 获得的 PPI 网络关系导入软件 Cytoscape 3.10.1 进行 CytoNCA 分析, 以度中心性(degree)、介数中心性(betweenness)、紧密中心性(closeness)参数大于其相应中位数为筛选标准^[16], 得到 19 个核心靶点, 分别是 TP53、CYP3A4、CYP1A1、 ESR1、 CYP2C9、 AKT1、 CYP2C8、 MAPK3、 MAPK1、 HSP90AB1、 SRC、 CBR1、

表 3 1、4、8、9、10 号色谱峰的鉴定结果

Table 3 Identification results of chromatographic peaks 1, 4, 8, 9, and 10

峰号	相对保留时间/min	分子式	[M-H] ⁻	成分名称
1	14.270	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.091 4	儿茶素(catechin)
4	20.260	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.071 1	表儿茶素(epicatechin)
8	32.460	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.092 7	槲皮苷(quercitroside)
9	33.408	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₅	619.523 9	山茶苷 A(camellianin A)
10	40.870	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.209 1	芹菜素(apigenin)

CYP2C19、CYP19A1、HIF1A、EGFR、PTGS2、PIK3R1、PIK3CA。其中, 芹菜素与 19 个核心靶点全部相关联, 表儿茶素、儿茶素与相同的 3 个核心靶点(CYP2C19、CYP2C9、MAPK1)相关联, 山茶苷 A 和槲皮苷分别与不同的 1 个核心靶点(CYP3A4、PIK3R1)相关联, 结果见图 4-D。

2.2.3 京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析 利用 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)对 19 个核心靶点进行 KEGG 信号通路富集分析。结果显示, KEGG 信号通路显著富集在脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、内分泌抵抗(endocrine resistance)、甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling

pathway)、人巨细胞病毒感染(human cytomegalovirus infection)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、癌症的中心碳代谢(central carbon metabolism in cancer)等 161 个信号通路, 排名前 20 的信号通路见图 4-C。上述显著富集的信号通路与石崖茶防治高血脂等心血管疾病、病毒等感染性疾病及抗肿瘤等作用存在密切联系, 也与石崖茶主要功效清热解毒密切相关。结果表明, 5 个成分直接对应的靶点网络经 PPI 拓扑分析后得到的 19 个核心靶点能在一定程度上反映石崖茶功效在分子水平上的解释。

2.2.4 “成分-核心靶点-信号通路”网络的构建 将

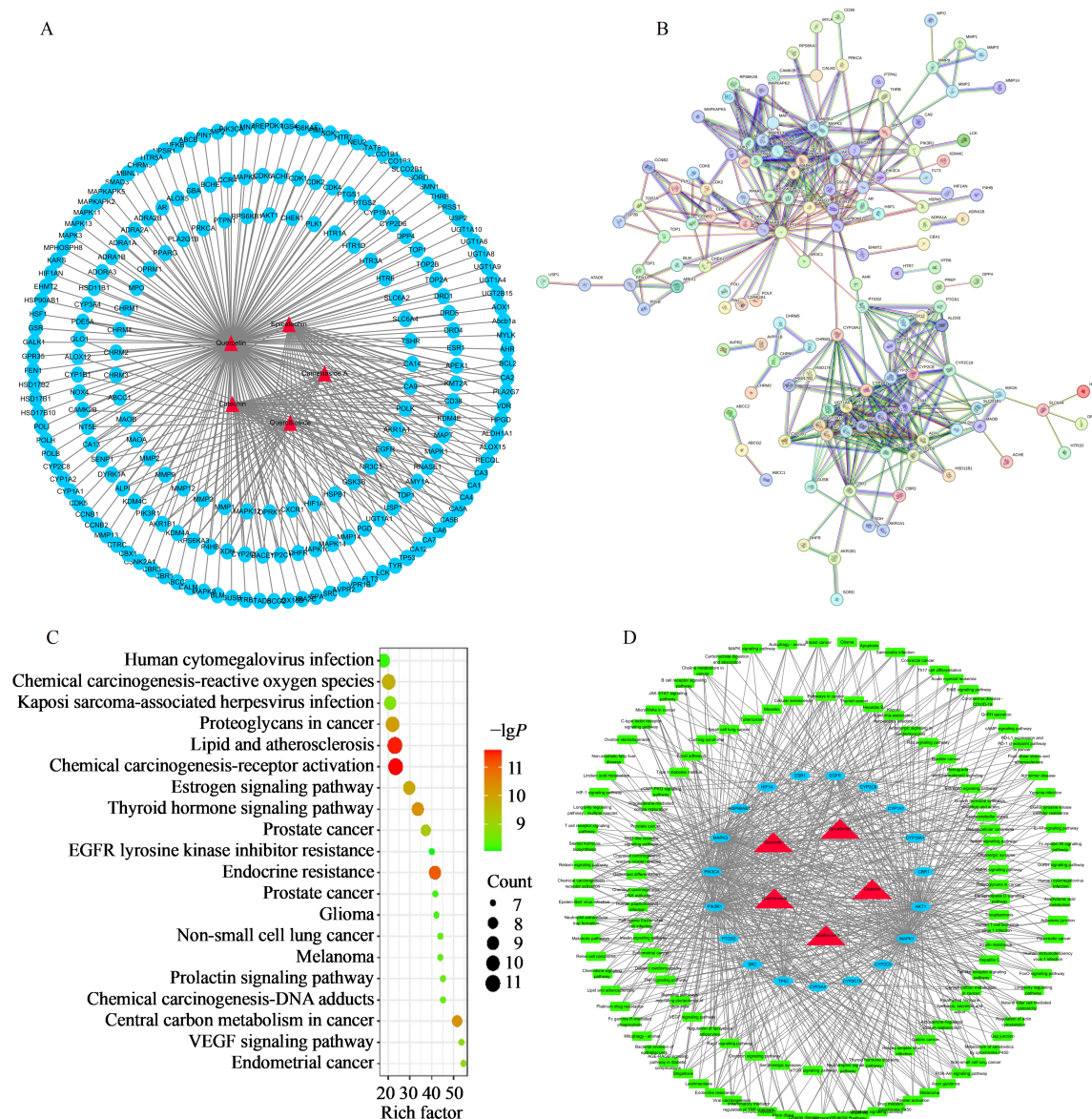


图4 “成分-靶点”网络(A)、靶点PPI网络(B)、KEGG信号通路富集分析(C)和“成分-核心靶点-信号通路”网络(D)
Fig. 4 "Component-target" relationship diagram (A), target PPI network (B), KEGG signaling pathway enrichment analysis (C) and "component-core target-signal pathway" network (D)

筛选得到的VIP值大于1的5个成分,19个核心靶点和161个信号通路导入软件Cytoscape 3.10.1,构建“成分-核心靶点-信号通路”网络,结果见图4-D。从“成分-核心靶点-信号通路”网络可以看出,与芹菜素相关联的19个核心靶点映射到161条信号通路,与表儿茶素、儿茶素相关联的3个核心靶点映射到112条信号通路,与槲皮苷相关联的1个核心靶点映射到100条信号通路,与山茶苷A相关联的1个核心靶点映射到8条信号通路。

2.3 石崖茶潜在Q-Marker的定量测定

根据指纹图谱和网络药理学结果,提示山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素为石崖茶潜在

Q-Marker。基于可测性原则,对上述潜在Q-Marker进行定量测定。

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称取10批次石崖茶药材,按照“2.1.1”项下方法制备得到供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液的制备 (1)山茶苷A对照品溶液:精密称取山茶苷A对照品适量,加入甲醇定容至刻度,制备得到质量浓度为 $200.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的山茶苷A对照品溶液。(2)表儿茶素对照品溶液:精密称取表儿茶素对照品适量,加入甲醇定容至刻度,制备得到质量浓度为 $200.13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的表儿茶素对照品溶液。(3)儿茶素对照品溶液:精密称取儿茶素

对照品适量,加入甲醇定容至刻度,制备得到质量浓度为 $200.41\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的儿茶素对照品溶液。(4)槲皮苷对照品溶液:精密称取槲皮苷对照品适量,加入甲醇定容至刻度,制备得到质量浓度为 $100.89\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槲皮苷对照品溶液。(5)芹菜素对照品溶液:精密称取芹菜素对照品适量,加入甲醇定容至刻度,制备得到质量浓度为 $50.78\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芹菜素对照品溶液。(6)混合对照品溶液:精密称取山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷和芹菜素对照品适量,加入甲醇定容至刻度,制备得到质量浓度

分别为 166.92 、 103.77 、 109.38 、 92.88 、 $42.66\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3.3 色谱条件 同“2.1.3”项下色谱条件。

2.3.4 方法学考察 (1)线性关系考察:取“2.3.2”项对照品溶液制备6个梯度质量浓度的山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素对照品溶液,按“2.3.3”项色谱条件分别测定相应的峰面积,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行回归分析,得到线性回归方程、 R^2 和线性范围,结果见表4。

表4 5种成分的线性回归方程、 R^2 和线性范围

Table 4 Linear equation, R^2 , and linear range of five ingredients

成分	线性回归方程(R^2)	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
山茶苷A	$Y=14\ 986\ X-431.86(R^2=0.999\ 6)$	6.25~200.03
表儿茶素	$Y=25\ 012\ X+16\ 162(R^2=0.998\ 9)$	6.25~200.13
儿茶素	$Y=26\ 141\ X+29\ 414(R^2=0.998\ 8)$	6.26~200.41
槲皮苷	$Y=48\ 253\ X-31\ 114(R^2=0.999\ 4)$	3.15~100.89
芹菜素	$Y=64\ 796\ X-24\ 567(R^2=0.997\ 7)$	1.59~50.78

(2)精密度试验:取“2.3.2”项混合对照品溶液1份,在“2.3.3”项色谱条件下连续进样6次,测定混合对照品溶液中5种成分的峰面积。结果显示,山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素峰面积的RSD分别为0.979%、0.899%、0.686%、0.931%、0.510%,表明仪器精密度良好。

(3)重复性试验:取“2.3.1”项编号S1石崖茶供试品溶液6份,在“2.3.3”项色谱条件下进样,测定样品中5种成分的峰面积,并计算各成分质量分数。结果显示,山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素质量分数的RSD分别为0.932%、1.843%、1.738%、1.673%、1.842%,表明该方法重复性良好。

(4)稳定性试验:取“2.3.1”项编号S1石崖茶供试品溶液1份,在制备后的0、2、4、8、12、24 h分别进样,按“2.3.3”项色谱条件测定峰面积。结果显示,山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素峰面积的RSD分别为1.918%、1.965%、1.960%、1.939%、1.924%,供试品溶液中山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素在24 h内具有良好的稳定性。

(5)加样回收试验:取已知含量的石崖茶药材粉末1 g,共6份,分别加入相同体积的混合对照品溶液,按“2.1.1”项方法制备供试品溶液,在“2.3.3”项色谱条件下进样,分别测定各份样品中5种成分的峰面积,并计算回收率。结果显示,山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素平均回收率分别为101.014%、101.786%、98.760%、102.668%、

101.455%, RSD 分别为 2.520%、3.069%、2.743%、1.768%、1.435%。

2.3.5 样品含量测定 分别吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 $10\text{ }\mu\text{L}$,按“2.3.3”项色谱条件进样,测定峰面积,计算石崖茶药材中山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷和芹菜素的质量分数,HPLC色谱图见图5,测定结果见表5。

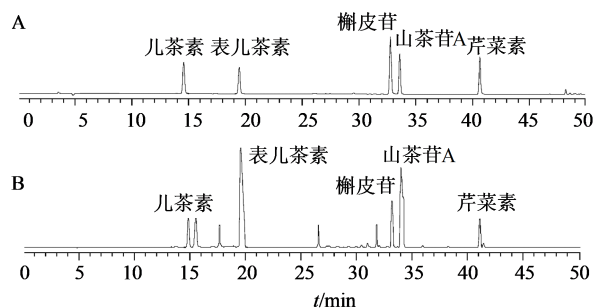


图5 混合对照品(A)和石崖茶供试品溶液(B)HPLC色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of mixed standard solution (A) and *A. nitida* sample solution (B)

3 Q-Marker预测分析

基于Q-Marker的五大原则^[12-14],本研究采用指纹图谱结合模式识别分析、网络药理学方法对石崖茶Q-Marker进行了预测。

石崖茶所含成分山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷和芹菜素均属黄酮类成分^[15],从生源途径来看,这些黄酮类化合物均源自苯丙烷类代谢途

表5 10批次石崖茶样品中5种黄酮类成分的定量测定结果

Table 5 Content determination of five flavonoid ingredients in 10 batches of *A. nitida* samples

样品	山茶苷 A/(mg·g ⁻¹)	表儿茶素/(mg·g ⁻¹)	儿茶素/(mg·g ⁻¹)	槲皮苷/(mg·g ⁻¹)	芹菜素/(mg·g ⁻¹)
S1	59.46	85.45	8.93	12.30	12.43
S2	57.56	89.63	12.95	9.38	2.65
S3	71.66	100.58	11.22	10.49	10.04
S4	50.25	95.92	10.92	9.07	6.96
S5	51.15	101.01	9.85	8.86	5.28
S6	60.18	103.05	10.94	15.22	8.80
S7	41.56	95.80	9.57	10.85	8.28
S8	57.35	89.54	12.96	9.38	2.65
S9	96.90	88.03	7.39	5.74	9.47
S10	50.26	96.67	10.85	9.08	6.99

径^[16]。苯丙烷类代谢是植物中一类重要的次生代谢途径,涉及到多种次生代谢产物的合成,包括黄酮类、木质素、香豆素等^[17]。在苯丙烷类代谢途径中,苯丙氨酸作为起始分子,经过苯丙氨酸解氨酶的催化作用,脱氨形成肉桂酸。肉桂酸随后在肉桂酸-4-羟化酶的作用下,转化为对香豆酸。接着,对香豆酸在4-香豆酸辅酶A连接酶的作用下,与辅酶A结合形成对香豆酰辅酶A。在查尔酮合成酶的催化下,对香豆酰辅酶A与另一分子丙二酰辅酶A结合,经过缩合、环化等步骤,生成查尔酮。最后,查尔酮在查尔酮异构酶的作用下转化为黄酮或异黄酮^[18-19]。山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷和芹菜素等黄酮类成分,就是在上述途径的不同阶段,经过特定的酶促反应和修饰作用形成的,具有一定的专属性。

石崖茶甘、微苦,性凉,归肝胆经,具有清热解毒的功效^[1]。该功效与其所含的山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷和芹菜素等黄酮类成分的药理作用密切相关。这些成分在现代药理研究中已被证实具有广泛的生物活性,如抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用^[3,20-26]。同时,网络药理学分析显示,上述成分关联多个核心靶点和显著富集的信号通路,这些关联的核心靶点及其映射的信号通路与石崖茶防治高血脂等心血管疾病、病毒等感染性疾病及抗肿瘤作用等存在密切联系^[15],也与石崖茶主要功效清热解毒^[1]密切相关。因此,山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷和芹菜素可作为石崖茶潜在的Q-Marker,具有有效性。

本研究首先建立了不同产地10批石崖茶的HPLC指纹图谱,共确认12个共有色谱峰,通过PLS-DA筛选出导致不同产地石崖茶指纹图谱差异

的主要成分对应的色谱峰5个,经质谱分析指出1号色谱峰(儿茶素)、4号色谱峰(表儿茶素)、8号色谱峰(槲皮苷)、9号色谱峰(山茶苷A)、10号色谱峰(芹菜素),并进行了含量测定,符合Q-Marker筛选的可测性及溯源性原则。

综合考虑,本研究最终将山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素作为石崖茶潜在Q-Marker。

4 讨论

自刘昌孝院士提出Q-Marker理论以来,已有众多相关研究成功地运用基于指纹图谱的化学模式识别,结合网络药理学对常用药材进行Q-Marker的预测分析,为提升药材质量标准提供了有价值的参考^[27-33]。基于指纹图谱的化学模式识别可在药材整体化学成分特征的基础上反映不同批次药材间的成分差异,这些差异成分对药材质量评价具有重要意义^[34-35]。网络药理学属系统生物学范畴,其特点和中医药整体观思想不谋而合,通过构建“成分-核心靶点-通路”网络关系,可快速预测中药成分的潜在作用靶点和通路。此外,结合中药功效与通路的关系,利用网络药理学构建的“成分-核心靶点-通路”网络关系还可以反推出中药活性成分^[36],这为药材质量控制提供了参考。

本研究首次采用基于指纹图谱的化学模式识别方法和网络药理学技术对广西产壮药石崖茶进行Q-Marker预测分析。结果显示,石崖茶HPLC指纹图谱共标定出12个共有峰,经化学模式识别,筛选出批次间5个主要差异性成分:山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素;网络药理学分析显示上述成分关联多个核心靶点和显著富集的信号通路,这些关联的核心靶点及其映射的信号通路与石崖茶主要传统功效和现代药理作用密切相关;

HPLC含量测定结果显示,上述成分在石崖茶中含量较高,常规提取即可检出,具有可测性。根据Q-Marker的五原则,本研究初步预测石崖茶Q-Marker为:山茶苷A、表儿茶素、儿茶素、槲皮苷、芹菜素,可为石崖茶药材质量标准的提升提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准(第二卷)[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011.
Guangxi Zhuang Autonomous Region Food and Drug Administration. *Quality standards of Zhuang medicines of Guangxi Zhuang Autonomous Region (Volume II)* [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2011.
- [2] 莫亚墩. 广西野生石崖茶资源现状调查及其综合利用建议[J]. 南方园艺, 2020, 31(3): 89-93.
Mo Y J. Investigation on the present situation of wild Shiya tea resources in Guangxi and suggestions on its comprehensive development and utilization [J]. South Hortic, 2020, 31(3): 89-93.
- [3] Chen R H, Lian Y Y, Wen S, et al. Shibi tea (*Adinandra nitida*) and camellianin A alleviate CCl₄-induced liver injury in C57BL-6J mice by attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Nutrients*, 2022, 14(15): 3037.
- [4] Liu B G, Yang J G, Ma Y X, et al. Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of ethanol extract and pure flavonoids from *Adinandra nitida* leaves [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(12): 1432-1438.
- [5] 袁尔东, 肖仔君, 刘本国, 等. 亮叶杨桐叶总黄酮提取及抑菌活性的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3): 305-308.
Yuan E D, Xiao Z J, Liu B G, et al. Extraction and antimicrobial activity of flavonoids from *Adinandra nitida* leaves [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2009, 25(3): 305-308.
- [6] Gao H, Liu B G, Liu F, et al. Anti-proliferative effect of camellianin A in *Adinandra nitida* leaves and its apoptotic induction in human Hep G2 and MCF-7 cells [J]. *Molecules*, 2010, 15(6): 3878-3886.
- [7] 陈美珍, 余杰, 余纲哲, 等. 野生石芽茶营养成分与药用成分的分析[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(1): 84-86.
Chen M Z, Yu J, She G Z, et al. Analysis of nutritional components and medicinal components in wild Shi ya Cha [J]. *Nat Prod Res Dev*, 1996, 8(1): 84-86.
- [8] 李巧凤, 罗雪菲, 何颂华, 等. 纤维素酶联合微波提取石崖茶中黄酮类成分的工艺优化及其成分表征[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 15-22, 27.
Li Q F, Luo X F, He S H, et al. Optimization for cellulase-microwave extraction process and its chemical composition of flavonoids substance from *Adinandra nitida* merr.ex H.L.Li [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(6): 15-22, 27.
- [9] 刘书霞, 李振麟, 兰太进, 等. 石崖茶的化学成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(14): 2436-2440.
Liu S X, Li Z L, Lan T J, et al. Chemical constituents from leaves of *Adinandra nitida* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(14): 2436-2440.
- [10] 吕旭辉, 李振麟, 刘书霞, 等. 石崖茶的化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2018, 49(6): 1272-1276.
Lv X H, Li Z L, Liu S X, et al. Chemical constituents from leaves of *Adinandra nitida*(II) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(6): 1272-1276.
- [11] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第五十卷, 第一分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. *Flora of China (Vol. 50, No. 1)* [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [12] 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.
Liu C X, Chen S L, Xiao X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: Quality control for Chinese medicinal products [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [13] 刘昌孝. 中药质量标志物(Q-marker): 提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4517-4518.
Liu C X. Quality marker(Q-marker) of Chinese materia medica: Improving quality standard and quality control theory of CMM and promoting scientific development of CMM industry [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(19): 4517-4518.
- [14] 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.
Liu C X. Five-year review on development of quality markers of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [15] 李水萍, 李妮励, 张永怡, 等. 石崖茶化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1280-1285.
Li S P, Li N L, Zhang Y Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Shiya tea [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(5): 1280-1285.

- [16] 康亚兰, 裴瑾, 蔡文龙, 等. 药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1336-1341.
- Kang Y L, Pei J, Cai W L, et al. Research progress on flavonoid metabolic synthesis pathway and related function genes in medicinal plants [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(9): 1336-1341.
- [17] Liu W X, Feng Y, Yu S H, et al. The flavonoid biosynthesis network in plants [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12824.
- [18] Tariq H, Asif S, Andleeb A, et al. Flavonoid production: Current trends in plant metabolic engineering and *de novo* microbial production [J]. Metabolites, 2023, 13(1): 124.
- [19] Falcone Ferreyra M L, Rius S P, Casati P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications [J]. Front Plant Sci, 2012, 3: 222.
- [20] 袁尔东, 宁正祥, 刘本国, 等. 亮叶杨桐叶中山茶苷A的分离纯化及其抗氧化性能的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 212-214.
- Yuan E D, Ning Z X, Liu B G, et al. Research on purification and antioxidant activity of camellianin A from *Adinandra nitida* leaves [J]. Sci Technol Food Ind, 2008, 29(4): 212-214.
- [21] Fan F Y, Sang L X, Jiang M. Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease [J]. Molecules, 2017, 22(3): 484.
- [22] Cheng A W, Tan X, Sun J Y, et al. Catechin attenuates TNF- α induced inflammatory response via AMPK-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0217090.
- [23] Li X X, Liu C, Dong S L, et al. Anticarcinogenic potentials of tea catechins [J]. Front Nutr, 2022, 9: 1060783.
- [24] Shay J, Elbaz H A, Lee I, et al. Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 181260.
- [25] Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, et al. The therapeutic potential of apigenin [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1305.
- [26] 杨琳. 槲皮苷药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-63.
- Yang L. Research development of pharmacology activities of quercitrin [J]. Asia Pac Tradit Med, 2015, 11(6): 61-63.
- [27] 梅茜, 夏金鑫, 郭爽, 等. 基于指纹图谱及网络药理学的白芍质量标志物(Q-marker)预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2627-2633.
- Mei X, Xia J X, Guo S, et al. Q-marker prediction analysis of *Paeoniae Radix Alba* based on fingerprint and network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(10): 2627-2633.
- [28] 付梦雅, 敖慧豪, 卜超, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的干姜质量标志物预测分析 [J]. 山东科学, 2023, 36(4): 35-41.
- Fu M Y, Ao H H, Bu C, et al. Forecast analysis of the quality markers of *Zingiberis Rhizoma* based on fingerprints and network pharmacology [J]. Shandong Sci, 2023, 36(4): 35-41.
- [29] 徐蓓蕾, 孙文斌, 王昊, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的秦皮质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 5019-5032.
- Xu B L, Sun W B, Wang H, et al. Predictive analysis of quality markers of *Fraxini Cortex* based on fingerprint and network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15): 5019-5032.
- [30] 杨素德, 吴信华, 高洪邳, 等. 基于网络药理学和指纹图谱的远志抗抑郁质量标志物的预测 [J]. 中南药学, 2023, 21(7): 1820-1826.
- Yang S D, Wu X H, Gao H Y, et al. Predictive of *Polygala Tenuifolia* quality markers for antidepressant effect based on network pharmacology and fingerprints [J]. Cent South Pharm, 2023, 21(7): 1820-1826.
- [31] 黄祖顺, 郭磊, 张爱荣, 等. 基于网络药理学和指纹图谱的安宫牛黄丸质量标志物预测与分析 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(10): 2083-2093.
- Huang Z S, Guo L, Zhang A R, et al. Prediction and analysis of quality markers of Angong Niu Huang Pill based on network pharmacology and fingerprint [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(10): 2083-2093.
- [32] 邢菊玲, 罗宇琴, 吴文平, 等. 不同基原吴茱萸药材中质量标志物预测分析: 基于网络药理学和指纹图谱 [J]. 亚太传统医药, 2023, 19(6): 147-154.
- Xing J L, Luo Y Q, Wu W P, et al. Predictive analysis of quality markers in *Evodia rutaecarpa* from different sources based on network pharmacology and fingerprint [J]. Asia Pac Tradit Med, 2023, 19(6): 147-154.
- [33] 曾梅, 王朝晖, 王志辉, 等. 基于HPLC指纹图谱及网络药理学的杜仲质量标志物预测分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(8): 1283-1296.
- Zeng M, Wang Z H, Wang Z H, et al. Predictive analysis of *Eucommia ulmoides* quality markers based on HPLC fingerprint and network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev, 2023, 35(8): 1283-1296.
- [34] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-

