

基于网络药理学和设计空间的乳腺康提取工艺研究

刘博文¹, 戴静¹, 刘晓凤², 闫博文¹, 邓妍¹, 刘涛^{1,2*}

1. 成都大学药学院, 四川 成都 610106

2. 四川天一学院, 四川 德阳 618000

摘要: **目的** 通过网络药理学及设计空间法对乳腺康提取工艺参数进行研究。**方法** 借助网络药理学对乳腺康潜在的活性成分进行筛选, 并与酪氨酸激酶进行分子对接, 结合《中国药典》2020年版确定指标性成分, 采用 HPLC 法运用设计空间进行乳腺康提取工艺研究。**结果** 筛选出乳腺康中甘草查尔酮 A、川陈皮素、蒲公英甾醇等核心成分与酪氨酸激酶的亲和力与临床推荐用药相似; 设计空间得到最佳提取工艺: 浸泡时间为 30 min、溶媒量为 12 倍、提取时间为 45~75 min、乙醇体积分数为 65%~80%、提取 2~3 次。**结论** 实验所得到的工艺合理可行, 验证实验与理论值预测值接近, 具有一定的实用价值。该研究基于质量源于设计 (QbD) 理念的乳腺康提取工艺, 稳定可靠, 为其进一步的工艺开发及质量控制提供思路。**关键词:** 网络药理学; 乳腺康; 酪氨酸激酶; 设计空间; 提取工艺; 甘草查尔酮 A; 川陈皮素; 蒲公英甾醇; 橙皮苷; 甘草酸铵; 咖啡酸

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)06-1634-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.011

Research on extraction process of Ruxiankang based on network pharmacology and design space

LIU Bo-wen¹, DAI Jing¹, LIU Xiao-feng², YAN Bo-wen¹, DENG Yan¹, LIU Tao^{1,2}

1. School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610106, China

2. Sichuan Tianyi University, Deyang 618000, China

Abstract: Objective To explore the extraction process parameters of Ruxiankang (乳腺康) through network pharmacology and design space. **Methods** With the help of network pharmacology, the active ingredients of Ruxiankang were screened, and molecular docking with tyrosine kinase was carried out, combined with "Chinese Pharmacopoeia" 2020 edition to determine the index components, and the extraction process of Ruxiankang by high performance liquid chromatography and design space was studied. **Results** The core components of Ruxiankang screened, such as licochalcone A, nobiletin, and taraxasterol, had affinity with tyrosine kinases similar to those recommended in the clinic, and the optimal extraction process was obtained in the design space: the immersion time was 30 min, and the solvent volume was 12 times, extraction time was 45—75 min, ethanol concentration was 65%—80%, for 2—3 extraction times. **Conclusion** The process obtained in the experiment is reasonable and feasible, the verification experiment is close to the predicted value of the theoretical value, which has certain practical value. The Ruxiankang extraction process is based on the QbD concept, which is stable and reliable, and provides ideas for its further process development and quality control.

Key words: network pharmacology; Ruxiankang; tyrosine kinase; design space; extraction process; licochalcone A; nobiletin; taraxasterol; hesperidin; ammonium glycyrrhizinate; caffeic acid

全球乳腺癌发病率逐年增加, 在女性患恶性肿瘤的患者中, 乳腺癌的病死率高居第 1 位^[1]。目前,

乳腺癌的治疗仍以手术、放化疗、分子靶向治疗等为主。西医治疗可直接杀死肿瘤细胞, 同时也会损

收稿日期: 2020-11-03

基金项目: 四川省科技成果转化项目 (2020ZHC0073); 2019 年德阳市产学研合作科技研发类项目 (2019CK090); 广西壮瑶药重点实验室 2020 年开放课题 (GXZYKF202004); 成都大学 CC 国家众创空间 2020 年度创新创业项目 (ccyg202001003); 四川省大学生创新创业训练计划项目 (S202011079112X)

作者简介: 刘博文 (1996—), 男, 在读研究生, 研究方向为中药药剂学。Tel: 15708143246 E-mail: 2499677479@qq.com

*通信作者: 刘涛 (1976—), 男, 博士, 研究员级高级工程师, 硕士生导师, 从事中药新药研究及中成药质量再评价研究工作。

Tel: 13378118375 E-mail: liutao057@sina.com

害患者自身正常细胞及免疫系统,随着中医药研究的进步,各种含有中药及其有效成分的新型抗乳腺癌药物的研发,为乳腺癌新的治疗带来可能性^[2],如药物参一胶囊、康莱特注射液^[3]、复方斑蝥胶囊等^[4]。《中国药典》2020年版一部收载69种中药用于乳腺癌疾病的治疗,但多为提高机体自身免疫力。青皮甘草散收载于清代医书《医宗金鉴》卷四十九,由青皮、甘草组成,主治“乳岩”,乳腺康源于青皮甘草散,经加减化裁得到的临床经验方,由青皮、甘草及蒲公英3味药材配伍而成,青皮疏肝破气,用于乳癖、乳痛;甘草解毒,补益气;蒲公英清热解毒,消肿散结,用于乳痛;三药合用,共奏清热解毒、活血消肿、化瘀散结之功。本课题组^[5-6]前期已经对乳腺康注射液质量标准及药效学进行研究。目前,中药复方的提取工艺研究多采用单因素和正交设计实验,无法达到实际提取工艺参数的动态性。设计空间^[7]已被证明为可以保证质量的输入变量和工艺参数的多维组合,在此空间里允许工艺参数的波动,即在设计空间内发生的工艺参数改变通常不被视为工艺变更,不会影响对结果的综合要求,有助于结合产品质量属性控制目标成分,不仅可以有效在误差方面减少损失,还可以提高工艺参数和产品质量之间的关联性。

目前,多数中药工艺研究过程中,多以药材的指标性化学成分作为工艺筛选的指标,但这些化学成分是否与药物临床药效相关尚未可知,本研究借助网络药理学及分子对接技术^[8]对乳腺康有效活性成分进行筛选,得到活性成分群并作为指标性成分,采用设计空间法对乳腺康提取工艺进行研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters-2695 型高效液相色谱仪、Photodiode Array Detector 型检测器,美国 Waters 公司;SQP 电子分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司;FA2004 分析天平,上海良平仪器仪表有限公司;800Y 型高速多功能粉碎机,永康市铂欧五金制品有限公司;MH-3000 型调温电热套,北京中兴伟业世纪仪器有限公司;PS-40 超声波清洗器,AC 200~240 V, 50 Hz,深圳得康清洗设备有限公司;HH-6 型数显恒温水浴锅,天津泰斯特仪器有限公司。

1.2 材料

青皮(批号 180718)、甘草(批号 200703)、蒲公英(批号 190208)均购自成都市荷花池药材市场,

经成都大学药学院刘涛教授鉴定,分别为芸香科柑橘属植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的果皮、豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及菊科蒲公英属植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. 的干燥全草;对照品橙皮苷(批号 wkq18040203)、川陈皮素(批号 wkq20031701)、甘草查尔酮 A(批号 wkq20022102)、咖啡酸(批号 140107)、甘草酸铵(批号 140227),质量分数均≥98%,均购自四川省维克奇生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 乳腺康网络药理学研究

2.1.1 乳腺康成分搜集 采用中药系统药理学数据库和分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、中药分子机制生物信息学分析工具(bio-informatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine, BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>),结合中国天然产物化学成分库,检索获得乳腺康所含的化学成分,表1为筛选出的主要活性成分。

表1 乳腺康主要活性成分的基本信息

Table 1 Basic information of main active ingredients in Rexiankang

药材	MOL ID	化合物	OB/%	DL/%
甘草	MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31
	MOL004083	tamarixetin	32.86	0.31
	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
	MOL005229	artemetin	49.55	0.48
青皮	MOL001798	neohesperidin	71.17	0.27
	MOL001803	sinensetin	50.56	0.45
	MOL004328	naringenin	59.29	0.21
	MOL005828	nobiletin	61.67	0.52
蒲公英	-	taraxasterol	-	-
	-	taraxerol	-	-
	-	taraxerol acetate	-	-

采用中国天然产物化学成分库对蒲公英成分进行了筛选,确定成分后在 TCMSP 中也未查到相关成分的口服生物利用度(OB)及类药性(DL)值

The dandelion components were screened using the Chinese Natural Product Chemical Components Library. After the components being determined, the OB and DL values of the relevant components were not found in TCMSP

2.1.2 活性化合物及靶标蛋白的筛选 口服生物利用度 (OB) 是药物吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 中最重要药代动力学参数之一, 参考文献方法^[9] 在 TCMSP 数据库中用 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 筛选乳腺康的活性成分, 并利用 TCMSP 数据库中的靶点预测功能收集乳腺康中化学成分的靶标蛋白, 借助 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>), 通过导入蛋白名称并设定物种为人, 将检索得到的所有的蛋白靶标校正为 UniProtID, 并得到靶标蛋白所对应的基因名 PTGS1、SCN5A、HSP90AB1、F2、F10 ACHE 等共计 382 个。

2.1.3 筛选疾病基因靶点及韦恩图构建 利用比较毒理基因组学数据库 (comparative toxicogenomics database, CTD, <http://ctd.mdibl.org/>), 以关键词“乳腺癌”及“breast cancer”进行搜集, 得到 10 万余个基因靶点, 根据“Inference score”, 选取数据库中前 500 个基因靶点。将乳腺康得到的 382 个成分基因靶标与利用比较毒理基因组学数据库筛选出乳腺癌的前 500 个疾病基因靶标进行韦恩图构建, 结果见图 1。

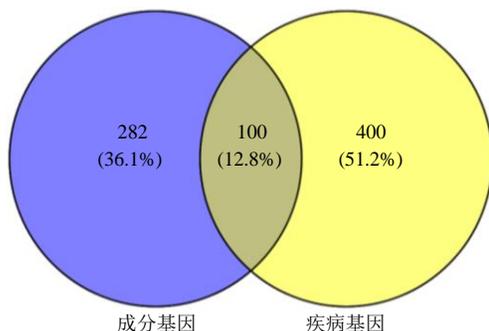


图 1 乳腺康成分基因与乳腺癌基因韦恩图

Fig. 1 Rexiankang ingredients gene and breast cancer gene Venn diagram

2.1.4 成分-靶标-通路相互作用网络的构建 先将化合物基因导入蛋白质相互作用分析平台 STRING (<https://string-db.org/cgi/input.pl>), 获取蛋白相互作用的关系, 再将成分、靶标、通路导入 Cytoscape Version 3.7.2 软件构建成分-靶标-通路网络。设置节点度 (degree) 值大于所有节点连接 2 倍中位数为标准进行筛选, 确定关键节点, 探究乳腺康的作用机制。

成分-靶标-通路相互作用网络总共包括 165 个节点 (71 个成分节点、74 个靶标节点、20 个通路节点) 和 1367 条边, 如图 2 所示, 其中圆形代表基因靶点, 菱形代表成分, 三角形代表通路。一个节

点的度值表示网络中和节点相连的节点的数量, 相互作用构成成分-靶标-通路网络, 根据网络中的拓扑学性质筛选出来的中心度值、亲中心度值、等级值较大的节点进行分析, 越能连接化合物或者靶点的节点在网络中越能发挥枢纽作用, 在该网络中每个成分平均与 13.51 个靶点相互作用, 每个靶点平均与 12.96 个成分相互作用; 每个靶点平均与 9.41 个通路相互作用, 每个通路平均与 34.80 个靶点作用, 因此在乳腺康中存在一个成分与多个靶点相互作用, 也存在一个靶点与多个成分相互作用; 存在一个靶点与多个通路相互作用, 也存在一个通路与多个靶点作用。这体现了中药多成分与多靶点、多通路相互作用的整体性与联系性。

2.1.5 靶点通路分析 为进一步观察作用靶标的生物学功能, 将所有化合物靶点基因导入到 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)^[10] 中对其进行通路富集分析。在 DAVID 的基因列表通用管理面板中复制粘贴基因列表, 选择“OFFICIAL GENE SYMBOL”, List Type 设置为“Gene List”, 提交的基因列表选择对应的物种“Homo Sapiens”, 选择基因本体功能 (Gene Ontology, GO) 生物学过程富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析, 点击“Functional Annotation Chart”获得通路富集结果。使用 Omicshare 数据库 (<https://www.omicshare.com/>) 绘制成气泡图, 用 GraphPad Prism 软件绘制柱状图^[11]。

通过数据库 DAVID 进行的 GO 功能富集分析得到 GO 条目 175 个 ($P < 0.05$), 其中生物过程 (BP) 条目 94 个, 细胞组成 (CC) 条目 35 个, 分子功能 (MF) 条目 46 个, 分别占 54%、20%、26%, 结果如图 3 所示。

KEGG 通路富集分析筛选得到 113 条 ($P < 0.05$) 信号通路, 涉及乙型肝炎、胰腺癌、前列腺癌等, 其中乙型肝炎通路涉及 *E2F1*、*TNF*、*TP53* 等基因; 胰腺癌通路涉及 *PIK3CG*、*E2F1*、*EGFR* 等基因; 前列腺癌通路涉及 *PIK3CG*、*AR*、*CREB1*、*TP53* 等基因, 乙型肝炎、前列腺癌等均含有 *TP53* 基因, 文献表明^[28] *TP53* 基因为乳腺癌作用的重要基因之一。选 P 值最小的 20 个通路进行可视化, 结果如图 4 所示。

2.1.6 成分-靶点分子对接分析 先从 RSCB PDB 数据库 (<https://www.rscb.org/>) 下载酪氨酸激酶

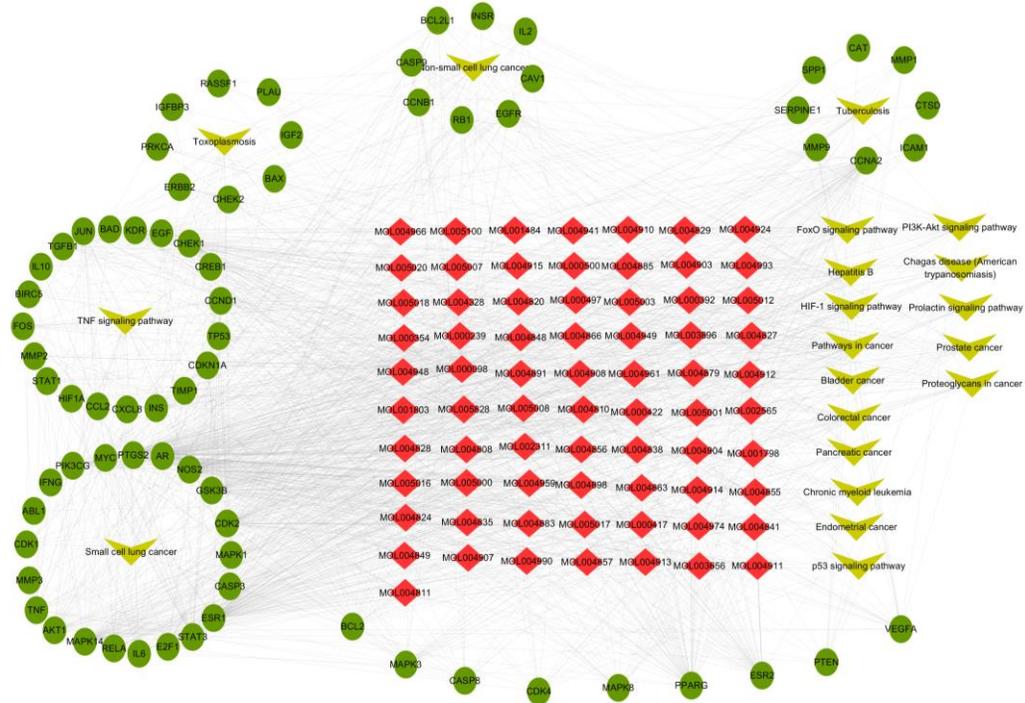
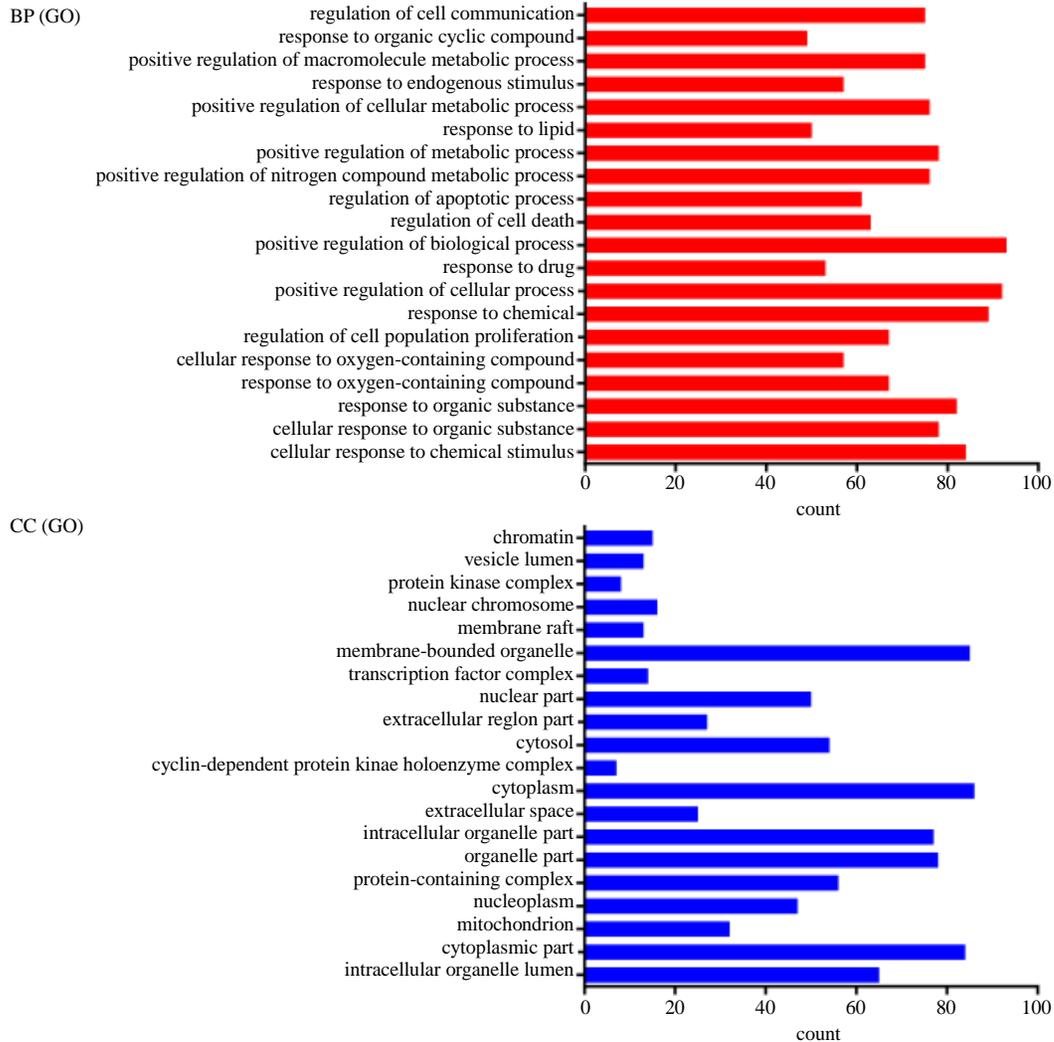


图 2 乳腺康成分-靶标-通路网络

Fig. 2 Medicinal ingredient-target-pathway network of Ruxiankang



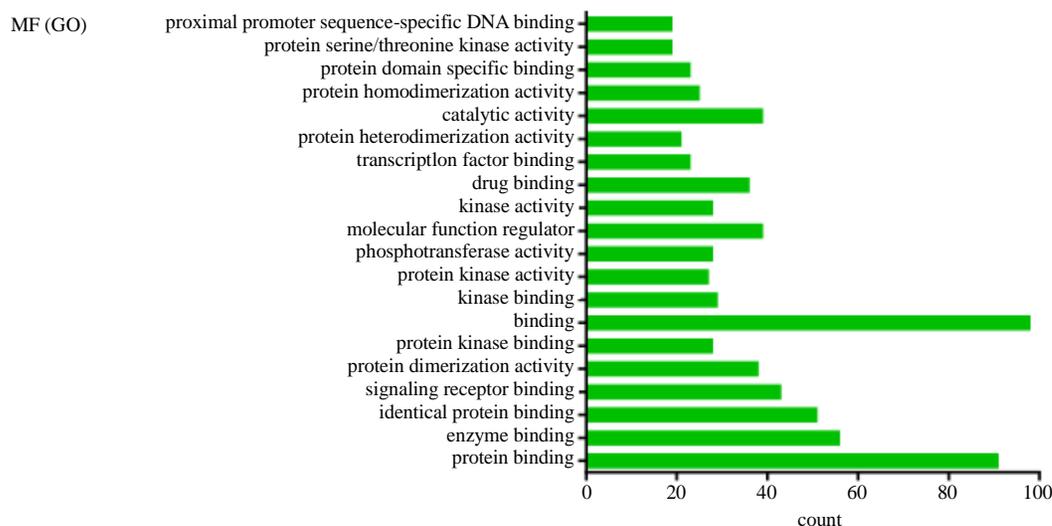


图 3 乳腺康的成分作用靶点 GO 功能分析

Fig. 3 Analysis of GO function of ingredient action targets of Ruxiankang

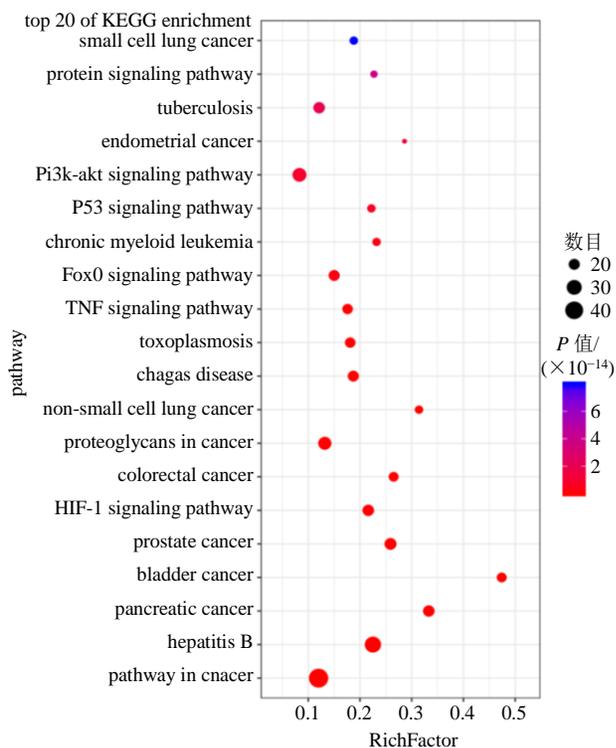


图 4 乳腺康作用靶点 KEGG 通路富集分析的 20 条通路气泡图

Fig. 4 20-Channel bubble map of KEGG enrichment analysis of Ruxiankang

(tyrosine kinase, TK, PDB ID: 2B4S) 的 3D 结构的 pdb 格式文件, 运用 Discovery Studio 2020 Client 软件移除靶蛋白中的非蛋白分子和配体再保存为 pdb 后缀的文件^[12]。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载关键成分 2D 结构的 sdf 格式文件。利用 PyRx 软件先上传去水加氢后

的蛋白质文件, 将其转化为 pdbqt 格式文件, 再上传化合物文件使其能量最小化, 并将其转化为 pdbqt 格式文件, 最后运用 vina 进行对接^[13]。结合能 < 0 说明配体与受体可以自发结合, 研究选取结合能 ≤ -5 kJ/mol^[14] 的活性成分作为乳腺康的筛选依据。

一般认为配体与受体结合的构象越稳定时能量越低, 发生作用的可能性越大。本研究分子对接结果显示, 与酪氨酸激酶结合能量较低的化合物分别是蒲公英赛醇 (结合能为 -36.40 kJ/mol) 等, 以结合能 ≤ -5 kJ/mol 为筛选标准, 可知, 乳腺康中主要活性成分与酪氨酸激酶结合能远小于 -5 kJ/mol, 如表 2 所示。由此可见, 乳腺康中核心成分与酪氨酸激酶形成构象能量低, 结构稳定, 结合活性高。根据分子对接结果, 查阅相关文献报道^[21-23] 及依据《中国药典》2020 年版一部中对药材指标性成分规定, 最终确定川陈皮素、甘草查尔酮 A、橙皮苷、甘草酸铵、咖啡酸为乳腺康质量控制的活性成分群。

2.2 活性成分群含量测定方法的建立

2.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品甘草查尔酮 A 2.82 mg、川陈皮素 2.58 mg、橙皮苷 5.31 mg、甘草酸铵 7.63 mg、咖啡酸 3.07 mg 分别置于 25、50、50、50、25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度线, 制成质量浓度分别为甘草查尔酮 A 112.8 μg/mL、川陈皮素 51.6 μg/mL、橙皮苷 106.2 μg/mL、甘草酸铵 152.6 μg/mL、咖啡酸 122.8 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取“1.2”项下 3 味中药饮片适量, 加 10~15 倍溶媒, 浸泡 30~60 min,

表 2 乳腺康中活性成分及目前临床报道有效化学药与酪氨酸激酶的结合能

Table 2 Active ingredients in Ruxiankang and binding energy of effective chemical drugs with tyrosine kinase

化合物	化学式	相对分子质量	CAS	与酪氨酸激酶结合能/(kJ·mol ⁻¹)
蒲公英赛醇	C ₃₀ H ₅₀ O	426.72	127-22-0	-36.40
伪蒲公英甾醇	C ₃₀ H ₅₀ O	426.72	464-98-2	-35.60
蒲公英甾醇	C ₃₀ H ₅₀ O	426.72	1059-14-9	-34.80
柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	480-41-1	-32.40
山奈酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	520-18-3	-30.00
川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	402.39	478-01-3	-29.20
刺芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.27	485-72-3	-29.20
甘草查尔酮 A	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338.40	58749-22-7-37-3	-28.00
帕妥珠单抗	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277.40	380610-27-5	-28.00
拉帕替尼	C ₂₉ H ₂₆ ClFN ₄ O ₄ S	581.06	231277-92-2	-30.00

提取 1~3 次, 每次提取 30~90 min, 滤过, 合并滤液, 冷却至室温, 量取总体积, 精密移取 500 μL 提取液加溶媒定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 采用 Supersil ODS 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 进样量为 10 μL; 柱温为 30 °C; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长: 先在全波长 200~400 nm 下测定, 后根据各对照品最大吸收波长切换检测波长; 以乙腈-0.5%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱^[15] (0~20 min, 10%~32%乙腈; 20~50 min, 32%~70%乙腈; 50~60 min, 70%~10%乙腈) 检测甘草酸铵 (237 nm)、橙皮苷 (284 nm)、川陈皮素 (330 nm)、甘草查尔酮 A (361 nm); 以甲醇-0.15%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱^[15] (0~20 min, 20%甲醇; 20~40 min, 20%~30%甲醇; 40~50 min, 30%~20%甲醇) 检测咖啡酸 (323 nm)。

2.2.4 专属性试验 精密移取“2.2.1”项下对照品溶液、“2.2.2”项下供试品溶液各 10 μL, 按“2.2.3”项下色谱条件进样测定。结果表明, 供试品溶液在对照品相同保留时间的出峰位置处分别与对照品色谱峰对应一致。色谱图见图 5。

2.2.5 线性关系考察 分别精密移取甘草查尔酮 A、川陈皮素、橙皮苷、甘草酸铵、咖啡酸对照品溶液 2 mL, 分别采用二倍稀释法, 制得 6 个样品^[16], 采用“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得到回归方程分别为甘草查尔酮 A $Y=45\,536 X+8624$, $r=0.995\,1$; 川陈皮素 $Y=46\,332 X-18\,169$, $r=0.998\,9$; 橙皮苷

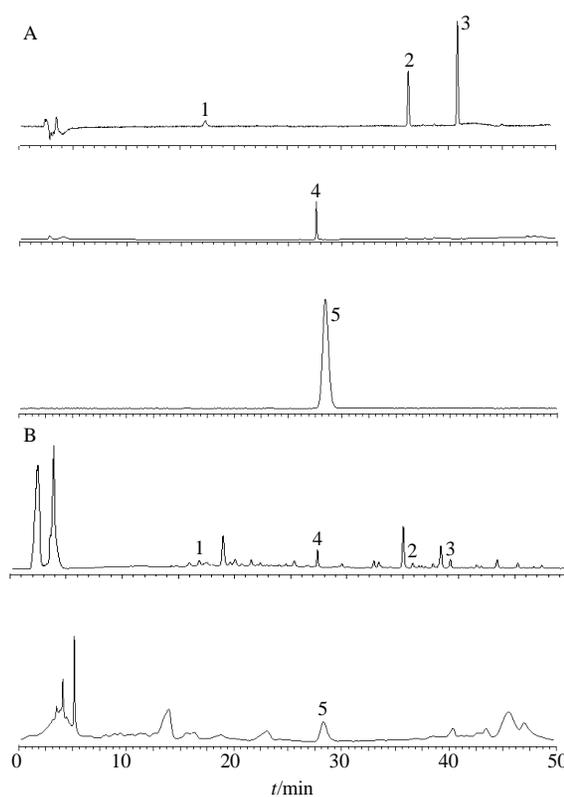


图 5 对照品 (A) 和乳腺康供试品 (B) 溶液的 HPLC 图
Fig. 5 HPLC of reference substances (A) and Ruxiankang testing sample (B)

$Y=20\,421 X-9715$, $r=0.998\,0$; 甘草酸铵 $Y=10\,828 X-22\,550$, $r=0.997\,1$; 咖啡酸 $Y=138\,662 X-199\,822$, $r=0.999\,3$; 结果表明, 甘草查尔酮 A 在 3.5~112.8 μg/mL、川陈皮素在 1.6~51.6 μg/mL、

橙皮苷在 3.3~106.2 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵在 4.8~152.6 $\mu\text{g/mL}$ 、咖啡酸在 3.8~122.8 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 量取对照品溶液适量,按照“2.2.3”项下色谱条件,连续进样测定 6 次,记录峰面积^[17]。计算得甘草查尔酮 A、川陈皮素、橙皮苷、甘草酸铵、咖啡酸峰面积的 RSD 分别为 1.44%、1.95%、1.08%、1.32%、0.36%,结果表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取样品 6 份,依法制备供试品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量^[18]。结果甘草查尔酮 A、川陈皮素、橙皮苷、甘草酸铵、咖啡酸质量分数的 RSD 分别均小于 5%,表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于 0、2、4、8、12、16、20、24 h 进样,按照“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果甘草查尔酮 A、川陈皮素、橙皮苷、甘草酸铵、咖啡酸峰面积的 RSD 均小于 5%,表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定^[19]。

2.2.9 样品测定 将“2.2.2”项下制备的供试品溶液按照“2.2.3”项下色谱条件进样测定。

2.3 设计空间法优化乳腺康提取工艺

2.3.1 关键质量属性(CQA)和关键工艺参数(CPP)的确定 生产工艺风险评估需要保证能够对生产工艺中所有的 CQA 和 CPP 进行充分的控制。

(1) CQA 的确定:对乳腺康提取过程中干膏率和指标性成分含量进行 CQA 确定。结合乳腺康中

网络药理学、文献中药效活性的研究^[29-30]及《中国药典》2020 年版一部中对各药材指标性成分的规定,将干膏得率(Y_1)及甘草查尔酮 A、甘草酸铵、川陈皮素、橙皮苷、咖啡酸的提取量($Y_2\sim Y_6$)作为乳腺康制备工艺的 CQA。

(2) CPP 的确定:对乳腺康提取工艺过程中在药材、溶剂、提取操作、滤过操作等方面所涉及的潜在 CPP [提取时间(X_1)、加溶媒量(X_2)、提取次数(X_3)、浸泡时间(X_4)、乙醇体积分数(X_5)]进行筛选及风险评估。利用 Minitab 18 软件进行 Plackett-Burman 实验设计,筛选出对乳腺康成分含量影响较大的 CPP,结果见表 4。

分别以 $Y_1\sim Y_6$ 对 $X_1\sim X_5$ 进行线性回归,得回归方程: $Y_1=6.36-0.1273X_1+0.447X_2+5.158X_3+0.0327X_4+0.0214X_5$, $Y_2=-2.58\times 10^{-3}+2.0\times 10^{-5}X_1+1.27\times 10^{-4}X_2+4.17\times 10^{-4}X_3+1.9\times 10^{-5}X_4+1\times 10^{-6}X_5$, $Y_3=0.0319+1.038\times 10^{-3}X_1-2.25\times 10^{-3}X_2+0.0205X_3+5.17\times 10^{-4}X_4-3.72\times 10^{-4}X_5$, $Y_4=0.0373-2.57\times 10^{-4}X_1-1.37\times 10^{-4}X_2+4.74\times 10^{-3}X_3+3.79\times 10^{-4}X_4-8.5\times 10^{-5}X_5$, $Y_5=-1.028+4.8\times 10^{-4}X_1+0.0660X_2+0.6533X_3+2.08\times 10^{-3}X_4+5.93\times 10^{-3}X_5$, $Y_6=1.45-0.02851X_1+0.297X_2+1.485X_3+5.7\times 10^{-3}X_4-0.02214X_5$ 。

方差分析见表 5,由表 5 可知 Y_1 、 $Y_3\sim Y_6$ 均对 X_1 、 X_3 或 X_5 显著;标准化效应的 pareto 图见图 6,效应值影响较大的工艺参数分别为 X_1 、 X_3 、 X_5 。结合方差分析和 pareto 图最终筛选出提取时间 X_1 、提取次数 X_3 、乙醇体积分数 X_5 作为 CPP。

表 4 工艺参数的筛选

Table 4 Screening of process parameters

运行序	X_1/min	$X_2/\text{倍}$	X_3	X_4/min	$X_5/\%$	$Y_1/\%$	$Y_2/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_3/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_4/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_5/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_6/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
1	90	10	3	60	0	31.85	0.00	23 230.29	241.00	3 980.52	734.75
2	30	15	3	30	0	31.09	0.00	20 280.94	573.62	7 786.48	630.10
3	30	10	3	60	80	16.33	9.12	16 995.83	2 477.18	2 517.99	520.18
4	30	10	1	60	80	9.76	24.58	7 961.99	974.24	3 242.25	380.56
5	30	15	3	60	0	31.44	0.00	23 775.25	617.72	6 996.73	627.56
6	30	15	1	30	80	10.38	12.29	8 882.64	875.00	2 939.54	358.08
7	90	15	1	60	80	12.74	31.35	12 385.73	849.02	2 525.11	352.68
8	90	15	3	30	80	20.22	24.13	27 047.80	1 441.18	3 291.68	285.88
9	90	10	1	30	0	18.61	0.00	8 282.18	387.20	4 698.76	458.80
10	90	10	3	30	80	19.59	39.91	22 202.87	1 105.51	3 045.72	288.71
11	30	10	1	30	0	16.72	0.00	5 761.22	381.52	4 637.40	439.97
12	90	15	1	60	0	20.39	0.00	11 858.98	535.81	5 280.50	527.69

表 5 方差分析
Table 5 Analysis of variance

来源	自由度	Y ₁					Y ₂				
		离均差平方和	均方	F 值	P 值	显著性	离均差平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5	652.991	130.598	44.37	0.000	极显著	0.000 012	0.000 002	0.74	0.620	
线性	5	652.991	130.598	44.37	0.000	极显著	0.000 012	0.000 002	0.74	0.620	
X ₁	1	310.919	310.919	105.64	0.000	极显著	0.000 008	0.000 008	2.38	0.174	
X ₂	1	14.959	14.959	5.08	0.065		0.000 001	0.000 001	0.37	0.564	
X ₃	1	319.294	319.294	108.48	0.000	极显著	0.000 002	0.000 002	0.65	0.452	
X ₄	1	2.892	2.892	0.98	0.360		0.000 001	0.000 001	0.30	0.604	
X ₅	1	4.927	4.927	1.67	0.243		0.000 000	0.000 000	0.00	0.951	
误差	6	17.659	2.943				0.000 019	0.000 003			
合计	11	670.650					0.000 031				

来源	自由度	Y ₃					Y ₄				
		离均差平方和	均方	F 值	P 值	显著性	离均差平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5	0.028 314	0.005 663	2.67	0.132		0.002 005	0.000 401	8.65	0.010	显著
线性	5	0.028 314	0.005 663	2.67	0.132		0.002 005	0.000 401	8.65	0.010	显著
X ₁	1	0.020 700	0.020 700	9.75	0.021	显著	0.001 267	0.001 267	27.33	0.002	显著
X ₂	1	0.000 379	0.000 379	0.18	0.688		0.000 001	0.000 001	0.03	0.868	
X ₃	1	0.005 018	0.005 018	2.36	0.175		0.000 270	0.000 270	5.82	0.052	
X ₄	1	0.000 721	0.000 721	0.34	0.581		0.000 389	0.000 389	8.39	0.027	显著
X ₅	1	0.001 496	0.001 496	0.70	0.433		0.000 079	0.000 079	1.69	0.241	
误差	6	0.012 738	0.002 123				0.000 278	0.000 046			
合计	11	0.041 052					0.002 284				

来源	自由度	Y ₅					Y ₆				
		离均差平方和	均方	F 值	P 值	显著性	离均差平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5	5.844 71	1.168 94	41.12	0.000	极显著	54.076 0	10.815 2	12.53	0.004	显著
线性	5	5.844 71	1.168 94	41.12	0.000	极显著	54.076 0	10.815 2	12.53	0.004	显著
X ₁	1	0.004 37	0.004 37	0.15	0.709		15.605 0	15.605 0	18.08	0.005	显著
X ₂	1	0.326 63	0.326 63	11.49	0.015		6.612 9	6.612 9	7.66	0.033	
X ₃	1	5.122 13	5.122 13	180.19	0.000	极显著	26.478 4	26.478 4	30.68	0.001	显著
X ₄	1	0.011 72	0.011 72	0.41	0.545		0.087 2	0.087 2	0.10	0.761	
X ₅	1	0.379 85	0.379 85	13.36	0.011		5.292 5	5.292 5	6.13	0.048	显著
误差	6	0.170 56	0.028 43				5.178 6	0.863 1			
合计	11	6.015 26					59.254 6				

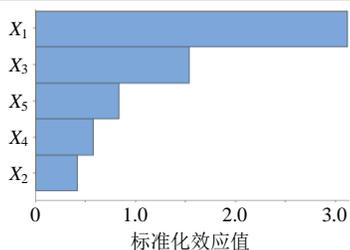


图 6 标准化效应的 pareto 图

Fig. 6 Pareto diagrams of normalization effect

2.3.2 Box-Behnken 设计实验优化乳腺康最佳提取工艺参数 根据 Plackett-Burman 实验结果, 以 X₁、X₃ 和 X₅ 为自变量, 以 Y₁~Y₆ 为响应值, 利用软件 Design-Expert 10, 设计 3 因素 3 水平实验, 共有 17 个试验点, 中心点 5 个, 实验设计与结果见表 6。

2.3.3 设计空间计算和验证 通过 Monte Carlo 法计算获得基于达标概率的设计空间, 将 Box-Behnken 实验的数据, 进行计算机模拟 1 万次, 计

表 6 Box-Behnken 试验设计与结果
Table 6 Box-Behnken test design and results

编号	X ₁ /min	X ₃	X ₅ /%	Y ₁ /%	Y ₂ /(μg·g ⁻¹)	Y ₃ /(μg·g ⁻¹)	Y ₄ /(μg·g ⁻¹)	Y ₅ /(μg·g ⁻¹)	Y ₆ /(μg·g ⁻¹)
1	90 (+1)	2 (0)	80 (+1)	17.38	65.32	16 904.35	1 191.32	639.47	313.92
2	90 (+1)	3 (+1)	65 (0)	20.75	59.81	20 298.99	749.51	4 425.72	373.45
3	60 (0)	2 (0)	65 (0)	19.05	108.87	15 487.87	829.59	3 562.39	299.12
4	60 (0)	1 (-1)	80 (+1)	11.33	53.90	5 501.27	655.66	828.09	203.20
5	60 (0)	3 (+1)	80 (+1)	18.85	61.03	16 826.04	1 174.39	2 108.89	251.23
6	60 (0)	1 (-1)	50 (-1)	14.65	71.07	10 421.77	717.25	1 088.00	93.70
7	60 (0)	3 (+1)	50 (-1)	22.87	49.69	20 083.12	859.25	1 135.30	94.18
8	90 (+1)	2 (0)	50 (-1)	21.20	71.11	17 974.88	807.06	2 498.94	239.19
9	60 (0)	2 (0)	65 (0)	18.74	58.13	16 320.09	811.46	3 826.51	293.93
10	30 (-1)	3 (+1)	65 (0)	20.06	80.50	17 727.77	831.78	4 681.70	341.66
11	60 (0)	2 (0)	65 (0)	17.68	86.72	14 672.84	749.32	2 016.55	233.61
12	30 (-1)	1 (-1)	65 (0)	11.11	41.39	6 852.96	572.29	2 674.12	280.17
13	60 (0)	2 (0)	65 (0)	19.67	74.12	15 894.33	828.91	6 120.06	378.88
14	30 (-1)	2 (0)	80 (+1)	14.20	64.24	10 045.42	819.34	607.86	233.28
15	90 (+1)	1 (-1)	65 (0)	14.66	64.56	8 583.45	570.28	3 412.94	324.61
16	30 (-1)	2 (0)	50 (-1)	18.34	75.12	12 311.65	789.74	2 510.08	186.23
17	60 (0)	2 (0)	65 (0)	21.99	112.12	14 839.04	805.73	6 355.44	525.02

算步长为 0.02，达标概率为 0.9 可以获得较满意结果^[20]，建立设计空间-采用 MatLab (2018b) 软件提供的 Monte Carlo 方法计算获得乳腺康提取工艺参数的设计空间图，见图 7。在最佳提取工艺范围点内 A (-0.26, -0.58, -0.54)、点外 B (-0.38, 0, 0.36) 分别选择 1 个点平行进行 2 组实验，测定，

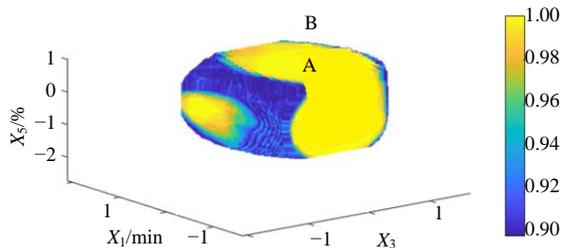


图 7 乳腺康提取工艺设计空间图

Fig. 7 Ruxiankang space diagram of extraction process design

干膏率、甘草查尔酮 A、甘草酸铵和橙皮苷最佳工艺点内 A 高于点外 B，川陈皮素和咖啡酸含量点外 B 高于点内 A，综合评分（综合评分=干膏率/最大干膏率×10+甘草查尔酮 A 质量浓度/最大甘草查尔酮质量浓度 A×30+甘草酸铵质量浓度/最大甘草酸铵质量浓度×10+川陈皮素质量浓度/最大川陈皮素质量浓度×30+橙皮苷质量浓度/最大橙皮苷质量浓度×10+咖啡酸质量浓度/最大咖啡酸质量浓度×10）最佳工艺点内 A 优于点外 B，见表 7。

4 讨论

本研究采用网络药理学对乳腺康组方青皮、蒲公英、甘草的主要活性成分和作用靶点进行网络分析。根据网络药理学研究结果，对原药材中的蒲公英甾醇等成分进行了含量测定，发现其在原药材中的含量远远低于万分之一，甚至有的低于检测限，

表 7 设计空间验证结果
Table 7 Design space verification results

编号	X ₁ /min	X ₃	X ₅ /%	Y ₁ /%	Y ₂ /(μg·g ⁻¹)	Y ₃ /(μg·g ⁻¹)	Y ₄ /(μg·g ⁻¹)	Y ₅ /(μg·g ⁻¹)	Y ₆ /(μg·g ⁻¹)	综合评分
1	51	2	70	20.30	129	21 649	792	21 158	643	98.72
2	51	2	70	20.98	127	20 405	690	20 356	671	94.15
3	60	2	80	17.72	107	13 675	772	15 955	694	86.19
4	60	2	80	18.43	113	19 015	736	14 546	711	88.60

无法对其进行测定,这也是网络药理学筛选方法的局限性^[24],即只考虑成分“有无”,对其“含量高”考虑不多。目前,多数中药工艺研究过程中,多以药材的指标性化学成分作为工艺筛选的指标,但这些化学成分是否与药物临床药效相关尚未可知,本研究以药物、临床适应症为指标,通过网络药理学筛选出乳腺康的潜在活性成分,结合《中国药典》2020年版一部青皮、甘草、蒲公英的指标性成分,活性成分群在提取液中的含量,采用综合评价法作为工艺评价指标对其提取工艺进行筛选,间接地对药物活性进行控制,改进了目前多数工艺以药材中指标性成分为指标而与药物临床相关性不强的不足。

通过研究,最终确定川陈皮素、甘草查尔酮 A、橙皮苷、甘草酸铵及咖啡酸为乳腺康质量控制的活性成分群。并以此为指标通过分析软件进行 DOE 试验设计和设计空间对乳腺康提取工艺进行设计并优化。结果表明,提取次数、乙醇体积分数、加溶媒量、提取时间、浸泡时间均对乳腺康的提取工艺具有影响,其中提取次数、提取时间和乙醇体积分数的影响较为显著。得到乳腺康提取的最佳工艺为浸泡时间为 30 min、溶媒量为 12 倍、提取时间 45~75 min、乙醇体积分数为 65%~80%、提取 2~3 次。

现有的中药复方提取多采用单因素、正交试验,并未完全反映中药复方提取的工艺参数动态化。本研究在掌握 CQA 与 CPP 的基础上,通过实验设计分析各影响因素对最终产品质量的影响^[25]。在 Plackett-Burman 实验的基础上进一步对工艺进行优化,在 Box-Behnken 实验过程中应该严格按照实验设计进行,减少因为组数较多引起的误差^[26],并对 Box-Behnken 实验结果通过 Monte Carlo 法计算获得基于达标概率的设计空间,计算机模拟 1 万次,计算步长为 0.02,达标概率为 0.9 可以获得较满意结果并参照文献^[27]进行验证,验证实验结果与空间预测结果一致,表明该设计空间法运用于乳腺康提取工艺稳定可行,该方法使提取工艺参数更加动态化,为实际大生产中工艺参数筛选提供一种思路。

本研究通过网络药理学与分子对接技术筛选出乳腺康的 CQA,采用设计空间法对乳腺康进行提取工艺研究,用大数据分析和计算机模拟与实验数据相结合,对乳腺康指标性成分筛选到最终提取工艺的初步确定进行研究,避免了提取工艺的临床利

用与指标性不强的问题和提取工艺参数筛选盲目性,具有一定的创新性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Boumendjel A, Sotoing Taiwe G, Ngo Bum E, et al. Occurrence of the synthetic analgesic tramadol in an African medicinal plant [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(45): 11780-11784.
- [2] 李云祥, 梁引库, 高飞雄, 等. 中药治疗乳腺癌疾病研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 211-219.
- [3] 毕四丽, 曹建雄. 靶向药物及中药抗血管治疗乳腺癌研究进展 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(6): 9-12.
- [4] 刘静, 陆德铭. 中医药治疗三阴性乳腺癌的临床研究进展 [J]. 山东中医杂志, 2016, 35(11): 1015-1017.
- [5] 朱红梅, 刘翠, 张倩, 等. 乳腺康注射液质量标准研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(8): 2465-2474.
- [6] 刘涛, 彭晓凤, 刘翠, 等. 乳腺康注射液的药效学研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(9): 2822-2828.
- [7] 徐冰, 史新元, 乔延江, 等. 中药制剂生产工艺设计空间的建立 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 924-929.
- [8] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [9] 黄启和, 周福军, 徐旭, 等. 基于分子对接技术虚拟筛选延胡索抗心肌缺血物质基础研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2355-2361.
- [10] 张新庄, 萧伟, 徐筱杰, 等. 利用网络药理学方法研究热毒宁注射液抗流感病毒的分子作用机制 [J]. 物理化学学报, 2013, 29(7): 1415-1420.
- [11] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [12] 陈璟, 徐贝贝, 徐坠成, 等. 基于网络药理学的防己黄芪汤防治 2 型糖尿病的潜在作用机制研究 [J]. 现代盐化工, 2020, 47(1): 10-13.
- [13] 黄启和, 周福军, 徐旭, 等. 基于分子对接技术虚拟筛选延胡索抗心肌缺血物质基础研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2355-2361.
- [14] 徐文华, 郑景辉, 杨文娜, 等. 基于分子对接和系统药理学小青龙汤治疗哮喘的作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(6): 964-974.
- [15] 甄中锋. 多基源甘草药材 HPLC 指纹图谱及指标性成分研究 [J]. 四川中医, 2018, 36(12): 178-180.
- [16] 崔翠翠, 张学兰, 李慧芬. 炮制对石榴皮中没食子酸、鞣花酸和鞣质含量的影响 [J]. 中成药, 2010, 32(4): 613-615.
- [17] 邓斌, 韦炳华, 黄盛超, 等. HPLC 法同时测定早莲草

- 中木犀草素和芹菜素的含量 [J]. 中国药房, 2014, 25(39): 3685-3687.
- [18] 孔玮, 王艳, 朱源, 等. HPLC 法同时测定知柏地黄丸中 3 种主要成分的含量 [J]. 中国药房, 2012, 23(32): 3055-3057.
- [19] 邱红梅, 杨林, 何丹. HPLC 法同时测定鼻炎灵片中绿原酸、黄芩苷和欧前胡素的含量 [J]. 中国药房, 2018, 29(12): 1605-1608.
- [20] 邵静媛, 瞿海斌, 龚行楚. 2 种设计空间计算方法的比较研究: 达标概率法和多指标叠加法 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 2074-2080.
- [21] 李先端, 马志静, 林生, 等. 高效液相色谱法测定青皮中辛弗林和 *N*-甲基酪胺的含量 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 537-539.
- [22] Lawrence N J, Rennison D, McGown A T, *et al.* Linked parallel synthesis and MTT bioassay screening of substituted chalcones [J]. *J Comb Chem*, 2001, 3(5): 421-426.
- [23] Kelland L R. Farnesyl transferase inhibitors in the treatment of breast cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003, 12(3): 413-421.
- [24] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4789-4797.
- [25] 王娅玲, 陶然, 梁峰源, 等. 响应面法优化中药降脂复方多糖提取工艺及抗氧化研究 [J]. 当代化工, 2020, 49(3): 555-558.
- [26] 姜慧洁, 黄薇, 胡林水, 等. 基于质量源于设计(QbD)理念的延胡索醇提工艺质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 372-380.
- [27] 王超越, 龚行楚, 付泽飞, 等. 确定性筛选设计结合设计空间法优化黄芩提取物的纯化工艺 [J/OL]. 中国中药杂志 :1-7[2021-01-24]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjmm.20201209.301>.
- [28] Shani H, Bernstein-Molho R, Laitman Y, *et al.* Double heterozygosity for TP53 and BRCA1 mutations: Clinical implications in populations with founder mutations [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2021: 1-5.
- [29] 陈向荣. 甘草查尔酮 A 抗氧化及抗癌活性机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [30] 马于然. 川陈皮素增强抗癌药物抗肿瘤效果及机理研究 [D]. 江门: 五邑大学, 2020.

[责任编辑 郑礼胜]