

## 基于网络药理学和质量源于设计理念的栀子豉汤提取工艺研究

胡钟姣<sup>1,2</sup>, 郑露露<sup>3</sup>, 许光亚<sup>4</sup>, 郭晓恒<sup>4</sup>, 时 政<sup>1,2\*</sup>

1. 成都大学附属医院/临床医学院, 四川 成都 610081

2. 遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563000

3. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106

4. 成都大学基础医学院, 四川 成都 610106

**摘要:** **目的** 采用网络药理学方法探讨栀子豉汤治疗失眠的作用机制; 基于质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念, 构建并验证栀子豉汤提取工艺的设计空间。 **方法** 通过 TCMSP、PharmMapper、Drugbank、GeneCards、Therapeutic Target Database、OMIM 等数据库获取栀子豉汤的成分和对应靶点; 利用 STRING、DAVID 数据库和分子对接技术对栀子豉汤治疗失眠的潜在靶点进行分析。以栀子豉汤提取物中的栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素的提取率及干膏得率作为关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs), Plackett-Burman 设计筛选关键工艺参数 (critical process parameters, CPPs), Box-Behnken 实验对 CPPs 进行优化, 并构建栀子豉汤提取工艺的设计空间。 **结果** 栀子豉汤的主要活性成分栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素等, 通过作用于白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3) 等核心靶点, 参与调节神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、 $\gamma$ -氨基丁酸能突触 (GABAergic synapse)、TNF 因子信号通路 (TNF signaling pathway) 等信号通路发挥治疗失眠的作用。栀子豉汤提取工艺的设计空间范围为溶剂用量 8~11 倍、提取时间为 30~84 min, 提取次数为 1~2 次。 **结论** 栀子豉汤可能通过多成分-多靶点-多通路治疗失眠。基于 QbD 理念建立的栀子豉汤提取工艺设计空间, 稳健可靠, 可为其制剂的工艺开发提供参考。

**关键词:** 栀子豉汤; 网络药理学; 失眠; 分子对接; 质量源于设计; 设计空间; 提取工艺; 栀子苷; 京尼平龙胆双糖苷; 大豆苷元; 染料木素; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 白细胞介素-6; 雌激素受体 1; 一氧化氮合酶 3

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)07-1973-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.006

## Research on extraction process of Zhizichi Decoction based on network pharmacology and quality by design concept

HU Zhong-jiao<sup>1,2</sup>, ZHENG Lu-lu<sup>3</sup>, XU Guang-ya<sup>4</sup>, GUO Xiao-heng<sup>4</sup>, SHI Zheng<sup>1,2</sup>

1. Affiliated Hospital / Clinical Medical College of Chengdu University, Chengdu 610081, China

2. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

3. College of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

4. School of Preclinical Medicine, Chengdu University, Chengdu 610106, China

**Abstract: Objective** In the present study, we applied network pharmacology to explore the molecular mechanism of Zhizichi Decoction (ZD) in insomnia treatment. To establish and validate the design space for the extraction process of ZD based on the concept of quality by design (QbD). **Methods** Firstly, the components and corresponding targets of ZD were obtained from TCMSP, PharmMapper, Drugbank, GeneCards, Therapeutic Target Database and OMIM databases. Then, STRING, DAVID database and molecular docking technology were used to analyze potential targets of ZD in the treatment of insomnia. With the extraction yield of geniposide, genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside, daidzein, genistein and dry extract yield as critical quality attributes (CQAs).

收稿日期: 2021-10-11

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81803561); 四川省科技计划项目 (2020YJ04087); 四川省中医药管理局科研专项课题 (2021MS189); 成都市金牛区医学会科研课题 (JNKY2021-06); 成都大学附属医院院级课题 (Y2021006); 成都市医学科研课题 (2021070); 龙泉驿英才计划 C 类创新人才计划; 四川省科技厅农业科技成果转化资金项目 (22NZZH0031)

**作者简介:** 胡钟姣 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为临床药学。Tel: 15761639978 E-mail: huzhongjiao219@163.com

**\*通信作者:** 时 政, 硕士生导师, 教授, 主要从事中药新药研发及中药质量标准研究。E-mail: drshiz1002@hotmail.com

Subsequently, the Plackett-Burman experiment design was used to select the critical process parameters (CPPs). The Box-Behnken experiment design was used to optimize the extraction process, and the design space of the ZD extraction process was established.

**Results** The main active components of ZD, such as geniposide, genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside, daidzein and genistein, through acting on the core targets of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), estrogen receptor 1 (ESR1), nitric oxide synthase 3 (NOS3), and involved in the regulation of neuroactive ligand-receptor interaction, GABAergic synapse, TNF signaling pathway, thereby treating insomnia. The design space of extraction technology of ZD was as follows: The amount of solvent was 8—11 times, the extraction time was 30—84 min, and the number of extraction was 1—2 times. **Conclusion** ZD may treat insomnia through multiple components, multiple targets and multiple pathways. The design space of extraction process of ZD based on QbD concept was robust and reliable, which would provide reference for the process development of its formulations.

**Key words:** Zhizichi Decoction; network pharmacology; insomnia; molecular docking; quality by design; design space; extraction process; geniposide; genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside; daidzein; genistein; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-6; estrogen receptor 1; nitric oxide synthase 3

栀子豉汤始载于东汉末年医圣张仲景的《伤寒论》太阳、阳明篇，由栀子和淡豆豉 2 味中药组成<sup>[1]</sup>。栀子，味苦性寒，入心、肺、三焦经，具有泻火除烦的功效，尤其善泻心火而除烦<sup>[2]</sup>。《本草正》载：“栀子，若用佐使，治有不同：加茵陈除湿热黄疸，加豆豉除心火烦躁”。淡豆豉，味辛甘微苦性寒，归肺、胃经，具有解表除烦、宣发郁热的功效。其气味轻薄，既能解表宣热，载栀子上行，又能降胃和中，两药合用，共奏清宣胸中郁热，古代用于治疗虚烦不得眠，心中懊恼之症<sup>[3]</sup>。现代临床主要用本方或加味治疗失眠、抑郁、更年期综合征、心血管疾病、胃脘疼痛等<sup>[4-5]</sup>，疗效显著。中药具有多成分、多途径和多靶点协同作用等特点，在预防和治疗疾病方面有其独特的优势，但同时也对深入研究其治疗疾病的作用机制带来困难<sup>[6]</sup>。网络药理学是一门新兴的学科，是在系统生物学与计算机技术高速发展的背景下发展起来的，其通过揭示中药化合物的作用和治疗机制来研究药物、靶点和疾病之间的关系，阐明中药对疾病的作用机制<sup>[7-9]</sup>。网络药理学的系统性质与中医的整体观点相一致，可以为研究中药药效物质基础及作用机制提供新的、有益的技术支持，在一定程度上反映了中药研究的新趋势<sup>[10-12]</sup>。

质量源于设计 (quality by design, QbD) 是一种系统性研究方法，是通过实验设计 (design of experiment, DoE) 来评价关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs) 和关键工艺参数 (critical process parameters, CPPs) 间的关系模型<sup>[13-14]</sup>。在多响应变量下，通过构建设计空间来确定最佳工艺参数范围，从而建立稳定可靠的生产工艺，最终保障产品质量<sup>[15]</sup>。本研究通过网络药理学方法预测栀子豉汤治疗失眠的活性成分、潜在作用靶点和作用机制，同时利用分子对接技术来进一步预测重要活

性成分和潜在靶点的结合能力。此外，以 QbD 理念为指导，利用 Plackett-Burman 实验设计，从多个影响因素中筛选影响栀子豉汤有效成分提取的 CPPs，随后用 Box-Behnken 实验设计对筛选出的 CPPs 进行优化，建立栀子豉汤提取工艺的设计空间。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Essentia LC-16 高效液相色谱仪，岛津仪器（苏州）有限公司；CP224C 电子天平，奥豪斯仪器（上海）有限公司；十万分之一天平，天津市德安特传感技术有限公司；SB-5200DTD 超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；JL-UPT-I I-10T 实验室超纯水系统，四川金澜科技有限公司。

### 1.2 试药与试剂

对照品栀子苷（批号 MUST-20102310，质量分数 $\geq 98\%$ ）、大豆苷元（批号 MUST-20101107，质量分数 $\geq 98\%$ ）购自成都曼思特生物科技有限公司；京尼平龙胆双糖苷（批号 P27S10F96112，质量分数 $\geq 98\%$ ）、染料木素（批号 Y19D7C27145，质量分数 $\geq 98\%$ ）购自上海源叶生物科技有限公司；乙腈，色谱纯，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；冰醋酸（色谱纯）、甲醇（分析纯），成都市科隆化学品有限公司；水为超纯水。

栀子（批号 20110206，产地江西）、淡豆豉（批号 20110104，产地四川）均购自四川国强中药饮片有限公司，经成都大学郭晓恒教授鉴定，分别为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实、豆科豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种子（黑豆）的发酵加工品。

## 2 方法与结果

### 2.1 栀子豉汤网络药理学研究

#### 2.1.1 栀子豉汤成分收集 通过中药系统药理学数

据库与分析平台 (TCMSP, <https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>) 和查阅相关文献报道<sup>[16-17]</sup>对栀子豉汤中的成分进行整理、分析, 得到栀子豉汤成分 14 个, 结果如表 1 所示。

表 1 栀子豉汤的成分信息

Table 1 Chemical composition information of ZD

来源	成分	PubChem CID	分子式
栀子	西红花酸	5281232	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>
	绿原酸	1794427	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>
	京尼平	442424	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
	京尼平苷酸	443354	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>
	西红花苷 I	5281233	C <sub>44</sub> H <sub>64</sub> O <sub>24</sub>
	栀子苷	107848	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>
	熊果酸	64945	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>
淡豆豉	京尼平龙胆双糖苷	3082301	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>
	黄豆黄素	5317750	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
	大豆苷元	5281708	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
	染料木苷	5281377	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>
	大豆苷	107971	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>
	染料木素	5280961	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
	黄豆黄苷	187808	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>

**2.1.2 靶点的预测与筛选** 利用 TCMSP 平台、PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 对成分靶点进行预测, 使用 UniProt 网站 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点蛋白进行基因名转换、校正。以失眠 (insomnia、sleeplessness、wakefulness、agrypnia) 为检索词, 分别在数据库 Drugbank (<https://www.drugbank.com/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、Therapeutic Target Database (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、OMIM (<https://omim.org/>) 中进行检索, 合并并去除重复靶点, 得到 582 个失眠相关靶点。利用微生信在线网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制成分靶点与失眠相关靶点韦恩图, 如图 1 所示, 得到 51 个栀子豉汤治疗失眠的潜在作用靶点。

**2.1.3 PPI 网络的构建** 将得到的潜在靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 选择物种为 Homo sapiens, 得到靶点的 PPI 网络信息, 导入 Cytoscape 3.7.1 软件构建网络并进行拓扑分析。如图 2 所示, 该网络涉及 48 个节点和 223 条边, 度值 (degree) 的中位数为 5, 介度中心度 (betweenness centrality) 的中位数为 16.845 9, 紧密中心度 (closeness centrality) 的中位数为 22.725。在此 PPI

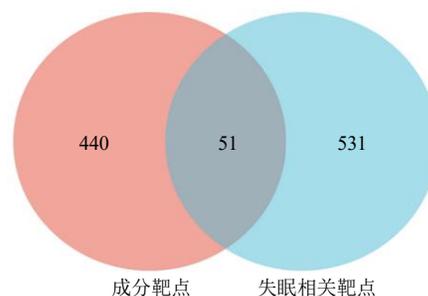


图 1 栀子豉汤靶成分靶点与失眠相关靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of ingredients targets of ZD and insomnia related targets

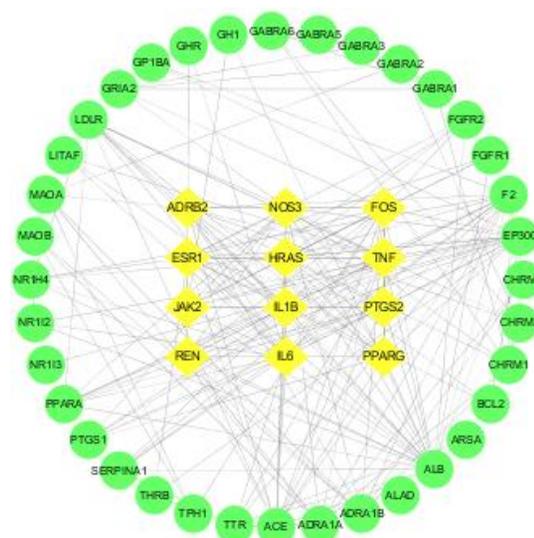


图 2 靶点蛋白相互作用网络图

Fig. 2 Interaction network diagram of target proteins

网络中度值较高的靶点有白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6, 度值 24)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF, 度值 21)、一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3, 度值 18)、白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β, 度值 18)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1, 度值 17)。度值越高, 表明与其他靶点的相互作用越强, 对疾病的影响也就越大。故可推测栀子豉汤中的活性成分可能作用于上述靶点而发挥治疗失眠的作用。

**2.1.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析** 将靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 以  $P < 0.05$  为筛选条件, 得到相关分析结果。利用 Bioinformatics (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 和 Sangerbox (<http://sangerbox.com/index>) 在线网站分别对 GO 和 KEGG 结果进行可视化。GO 分析表明, 栀子豉汤可能通过

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联的正向调节 (positive regulation of MAPK cascade)、 $\gamma$ -氨基丁酸信号通路 ( $\gamma$ -

aminobutyric acid signaling pathway)、信号转导 (signal transduction) 等生物过程发挥治疗作用, 结果见图 3。

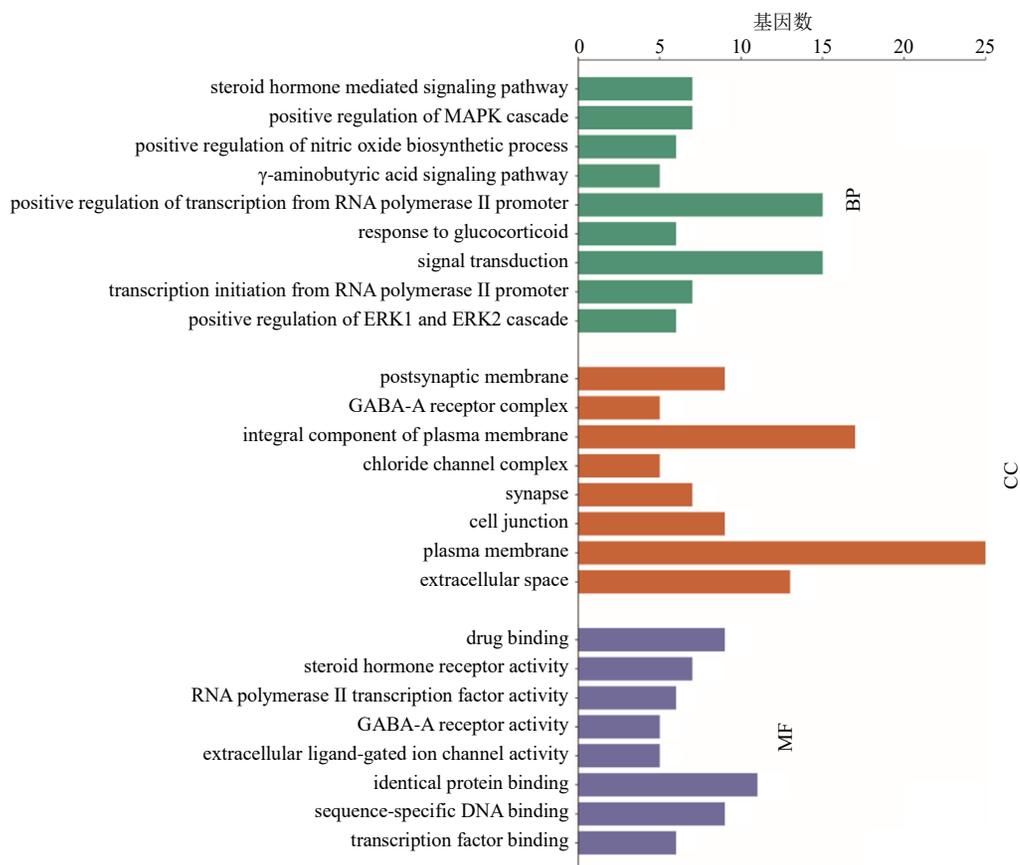


图 3 潜在靶点的 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of potential targets

KEGG 富集通路分析表明, 栀子豉汤中的活性成分可能通过神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、 $\gamma$ -氨基丁酸能突触 (GABAergic synapse)、TNF 因子信号通路 (TNF signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway) 等通路发挥治疗失眠的作用, 见图 4。

**2.1.5 分子对接验证** 靶点蛋白结构通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取, 化合物 3D 结构通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取。利用 Pymol 软件删除蛋白质分子中的无关小分子, 并导入 AutoDock Tools 软件进行删除水分子、加氢及设置原子类型操作。用 ChemBio3D 软件对化合物进行能量最小化, 用 AutoDock Tools 软件删除水分子并添加原子电荷、分配原子类型。将处理后的化合物作为小分子配体, 蛋白靶点作为受体, 通过 AutoDock vina 软件进行对接。如表 2

所示, 栀子豉汤中的活性成分除熊果酸与 ESR1 外, 其余成分与核心靶点的结合能均小于  $-5$  kJ/mol, 表明配体与受体可以自发结合。其中黄豆黄苷、大豆苷、西红花酸、染料木苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、京尼平苷酸与所选核心靶点的结合性均优于阳性对照药。栀子豉汤的主要活性成分与核心靶点的对接情况表明, 栀子豉汤可能通过调节以上靶点发挥治疗作用。

## 2.2 栀子豉汤活性成分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栀子苷 12.33 mg、京尼平龙胆双糖苷 10.03 mg、大豆苷元 10.18 mg、染料木素 11.51 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 分别精密移取上述对照品溶液适量, 加甲醇稀释成系列质量浓度的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密吸取栀子豉汤水提液 1 mL, 加甲醇定容至 5 mL, 摇匀, 即得。

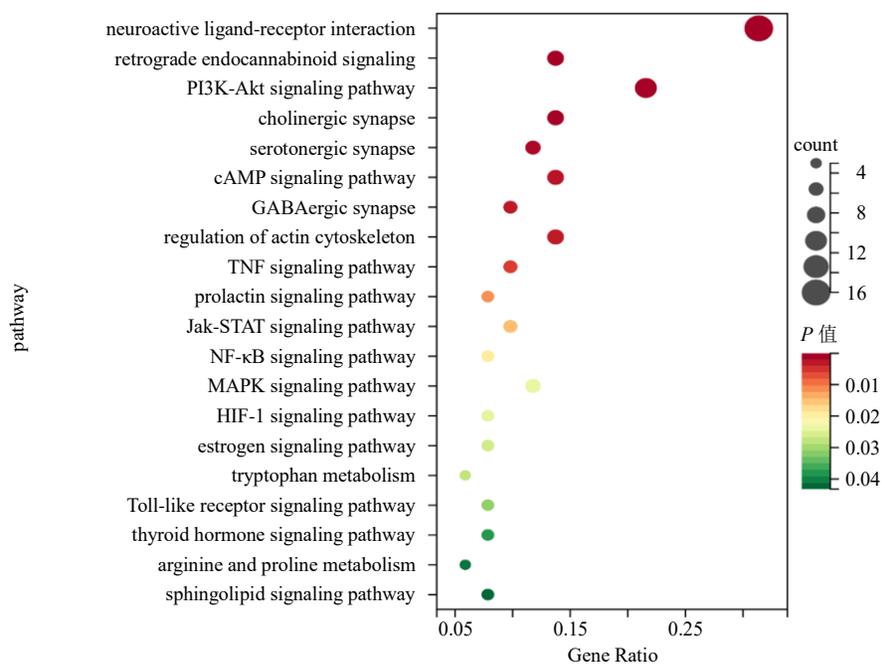


图4 潜在靶点的KEGG通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of potential targets

表2 活性成分与核心靶点的分子对接

Table 2 Molecular docking of the compound with target

成分	结合能/(kJ·mol <sup>-1</sup> )				
	IL-1β	ESR1	IL-6	NOS3	TNF
京尼平苷酸	-26.74	-38.49	-26.65	-36.02	-31.05
绿原酸	-26.40	-40.84	-27.20	-33.68	-29.96
西红花酸	-30.75	-44.10	-26.53	-37.28	-31.71
大豆苷元	-23.64	-30.96	-24.06	-32.38	-25.10
大豆苷	-30.92	-41.05	-31.38	-38.49	-31.84
京尼平龙胆双糖苷	-28.28	-39.71	-30.12	-42.84	-36.61
京尼平	-22.84	-32.05	-24.89	-27.99	-26.74
染料木素	-24.39	-31.59	-27.20	-33.39	-25.82
染料木苷	-28.45	-42.26	-25.65	-37.40	-32.26
大豆黄素	-25.86	-34.98	-25.56	-34.94	-25.61
黄豆黄苷	-31.80	-41.17	-29.62	-38.45	-31.59
熊果酸	-25.65	-	-25.52	-35.44	-31.05
栀子苷	-27.57	-39.12	-26.90	-38.49	-31.71
地西洋	-23.77	-36.32	-24.18	-34.64	-29.04

2.2.3 色谱条件

(1) 栀子苷、京尼平龙胆双糖苷：色谱柱为Ecosil C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水(10:90)；检测波长239 nm；柱温30℃；进样量10 μL；体积流量1 mL/min。

(2) 大豆苷元、染料木素：色谱柱为Ecosil C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-

1%冰醋酸水溶液(25:75)；检测波长260 nm；柱温35℃；进样量10 μL；体积流量1 mL/min。

2.2.4 专属性实验 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液和“2.2.2”项下供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件测定。结果表明，供试品溶液中各组分的色谱峰分离良好，且在对照品溶液相同的保留时间处有相同的色谱峰，见图5。

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取不同质量浓度的系列对照品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件测定峰面积。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，得到栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素的回归方程分别为 $Y=15\ 871 X-6\ 007.6$  ( $r=0.999\ 7$ )、 $Y=12\ 420 X+32\ 753$  ( $r=0.999\ 6$ )、 $Y=65\ 359 X-1\ 396.1$  ( $r=0.999\ 8$ )、 $Y=89\ 274 X-2\ 331.7$  ( $r=0.999\ 6$ )。结果表明，栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素分别在49.32~616.50、6.018~50.150、0.814 4~2.850 4、0.460 4~1.611 4 μg/mL线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，连续进样6次，结果栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素峰面积的RSD分别0.39%、0.35%、0.58%、1.55%，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，按“2.2.2”

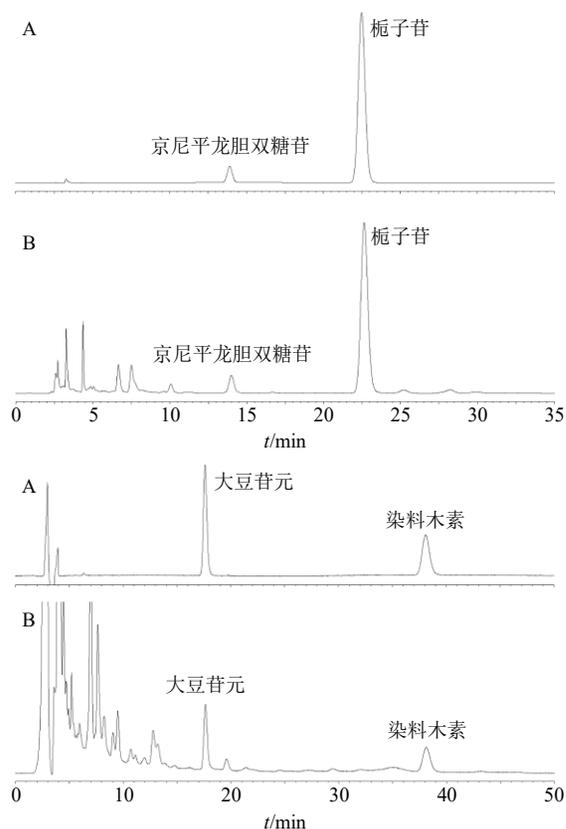


图 5 混合对照品 (A) 和栀子豉汤样品 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 5 HPLC of mixed reference substances (A) and ZD sample (B)

项下供试品溶液制备方法制备,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,结果栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素提取率的 RSD 分别为 3.18%、3.53%、1.07%、1.81%,表明该方法重复性良好。

**2.2.8 稳定性试验** 精密称取样品,按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法制备,分别在 0、2、4、8、12、24 h 按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,结果栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素峰面积的 RSD 分别为 0.14%、1.96%、0.98%、0.99%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.9 样品测定及提取率计算** 将“2.2.2”项下制备供试品溶液,按照“2.2.3”项下色谱条件进样测定,并参照文献方法计算提取率<sup>[18]</sup>。

提取率 = 各指标成分质量 / 总投药量

### 2.3 干膏得率的测定

按干燥失重法进行测定,精密量取栀子豉汤提取液 25 mL 于干燥至恒定质量的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 电热鼓风干燥箱中干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速称定质量,再于 105 °C 干燥 1 h,冷却称定质量,反复干燥至恒定质量 (即 ±0.3

mg),即得水溶性浸出物的干燥品,计算干膏得率。

干膏得率 =  $mV/(25M)$

$m$  为 25 mL 提取液中干浸膏质量,  $V$  为提取液总体积,  $M$  为药材质量

### 2.4 栀子豉汤提取工艺优化

**2.4.1 CQAs 和 CPPs 的确定** 结合前期网络药理学相关结果、文献研究热度、具有一定药理作用以及《中国药典》2020 年版对各味中药指标性成分的规定,将栀子苷 ( $Y_1$ )、京尼平龙胆双糖苷 ( $Y_2$ )、大豆苷元 ( $Y_3$ )、染料木素 ( $Y_4$ ) 提取率和干膏得率 ( $Y_5$ ) 作为栀子豉汤的 CQAs。

Plackett-Burman 设计法是一种经济而有效的 2 水平实验方法,可以通过较少的实验快速从众多实验中筛选出显著的影响因素,为后续的工艺优化提供支持。以浸泡时间 ( $X_1$ )、溶剂用量 ( $X_2$ )、提取时间 ( $X_3$ )、提取次数 ( $X_4$ ) 作为筛选因素。根据前期预实验结果,利用 Minitab 18 软件进行 Plackett-Burman 实验设计,实验设计安排及结果见表 3。

分别以  $Y_1 \sim Y_5$  对  $X_1 \sim X_5$  进行线性回归,得到回归方程:  $Y_1 = 37.110 - 0.183 X_1 + 1.885 X_2 + 3.094 X_3 + 8.013 X_4$ ,  $Y_2 = 3.1106 - 0.0446 X_1 + 0.1201 X_2 + 0.6817 X_3 + 1.3967 X_4$ ,  $Y_3 = 0.31831 - 0.00414 X_1 + 0.02226 X_2 + 0.03501 X_3 + 0.11022 X_4$ ,  $Y_4 = 0.16833 - 0.00500 X_1 + 0.01333 X_2 + 0.02167 X_3 + 0.06500 X_4$ ,  $Y_5 = 5.47 + 0.00508 X_1 + 0.254 X_2 + 0.05880 X_3 + 4.950 X_4$ 。

对 Plackett-Burman 实验结果进行方差分析,结果见表 4。由表可知,浸泡时间  $X_1$  的  $P$  值均大于 0.05,表明其对  $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$ 、 $Y_4$ 、 $Y_5$  的影响不显著,而溶剂用量  $X_2$  或提取时间  $X_3$ 、提取次数  $X_4$  对  $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$ 、 $Y_4$ 、 $Y_5$  有显著影响。结合标准化效应的 pareto 图,见图 6,最终确定溶剂用量  $X_2$ 、提取时间  $X_3$ 、提取次数  $X_4$  为 CPPs。

**2.4.2 Box-Behnken 优化提取工艺** 根据 Plackett-Burman 实验结果,以溶剂用量 ( $X_2$ )、提取时间 ( $X_3$ )、提取次数 ( $X_4$ ) 为自变量,以栀子苷 ( $Y_1$ )、京尼平龙胆双糖苷 ( $Y_2$ )、大豆苷元 ( $Y_3$ )、染料木素 ( $Y_4$ )、干膏得率 ( $Y_5$ ) 为响应值,对栀子豉汤提取工艺进行优化。利用软件 Design-Expert 12,设计 3 因素 3 水平实验,实验设计安排与结果见表 5。

**2.4.3 设计空间的建立及验证** 采用 Matlab (2018b) 软件提供的 Monte Carlo 方法,其中计算步长为 0.02,达标概率为 0.9,模拟次数为 1 万次<sup>[19]</sup>,

表 3 Plackett-Burman 实验设计与结果

Table 3 Experimental design and results of Plackett-Burman

编号	X <sub>1</sub> /min	X <sub>2</sub> /倍	X <sub>3</sub> /min	X <sub>4</sub>	Y <sub>1</sub> /(mg·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>2</sub> /(mg·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>3</sub> /(mg·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>4</sub> /(mg·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>5</sub> %
1	0	8	90	3	49.63	5.27	0.45	0.24	28.48
2	0	12	30	1	30.11	1.42	0.21	0.10	15.71
3	0	8	30	3	41.53	3.32	0.36	0.20	23.98
4	60	8	30	1	23.85	1.17	0.17	0.08	15.67
5	60	12	90	1	37.49	2.32	0.26	0.13	19.45
6	60	12	30	3	44.48	4.16	0.39	0.21	24.69
7	60	8	90	1	28.31	2.01	0.20	0.10	16.96
8	0	12	90	3	47.68	5.56	0.50	0.29	28.40
9	0	8	30	1	22.37	0.97	0.15	0.07	13.31
10	60	8	90	3	45.66	5.21	0.44	0.24	28.10
11	60	12	30	3	41.77	3.83	0.42	0.22	25.60
12	0	12	90	1	32.45	2.39	0.26	0.14	18.75

表 4 Plackett-Burman 实验设计方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis of Plackett-Burman experimental design

来源	Y <sub>1</sub>				Y <sub>2</sub>				Y <sub>3</sub>			
	平方和	均方	F	P	平方和	均方	F	P	平方和	均方	F	P
模型	928.499 0	232.125 0	32.540 0	0.000 0	29.184 1	7.296 0	68.470 0	0.000 0	0.166 7	0.041 7	185.660 0	0.000 0
X <sub>1</sub>	0.404 0	0.404 0	0.060 0	0.819 0	0.023 9	0.023 9	0.220 0	0.650 0	0.000 2	0.000 2	0.920 0	0.370 0
X <sub>2</sub>	42.661 0	42.661 0	5.980 0	0.044 0	0.173 1	0.173 1	1.620 0	0.243 0	0.006 0	0.005 9	26.490 0	0.001 0
X <sub>3</sub>	114.855 0	114.855 0	16.100 0	0.005 0	5.577 0	5.577 0	52.340 0	0.000 0	0.014 7	0.014 7	65.540 0	0.000 0
X <sub>4</sub>	770.580 0	770.580 0	108.020 0	0.000 0	23.410 1	23.410 1	219.700 0	0.000 0	0.145 8	0.145 8	649.680 0	0.000 0
误差	49.936 0	7.134 0			0.745 9	0.106 6			0.001 6	0.000 2		
失拟项	46.278 0	7.713 0	2.110 0	0.483 0	0.544 5	0.090 8	0.450 0	0.813 0	0.001 3	0.000 2	0.730 0	0.712 0
合计	978.436 0				29.930 0				0.168 2			

来源	Y <sub>4</sub>				Y <sub>5</sub>			
	平方和	均方	F	P	平方和	均方	F	P
模型	0.058 8	0.014 7	128.550 0	0.000 0	334.793 0	83.698 0	115.240 0	0.000 0
X <sub>1</sub>	0.000 3	0.000 3	2.620 0	0.149 0	0.279 0	0.279 0	0.380 0	0.555 0
X <sub>2</sub>	0.002 1	0.002 1	18.670 0	0.003 0	3.091 0	3.091 0	4.260 0	0.078 0
X <sub>3</sub>	0.005 6	0.005 6	49.290 0	0.000 0	37.343 0	37.343 0	51.410 0	0.000 0
X <sub>4</sub>	0.050 7	0.050 7	443.630 0	0.000 0	294.081 0	294.080 0	404.890 0	0.000 0
误差	0.000 8	0.000 1			5.084 0	0.726 0		
失拟项	0.000 8	0.000 8	0.000 1	1.930 0	4.667 0	0.778 0	1.860 0	0.509 0
合计	0.0596				339.878 0			

计算得到栀子豉汤的设计空间, 见图 7, 随机选取 4 个点进行验证, 每个实验点平行 2 次, 以提取液中栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素的提取率和干膏得率的综合评分为评价指标 (综合评分 = 栀子苷提取率 × 30/最大栀子苷提取率 + 京尼平龙胆双糖苷提取率 × 20/最大京尼平龙胆双糖

苷提取率 + 大豆苷元提取率 × 20/最大大豆苷元提取率 + 染料木素提取率 × 20/最大染料木素提取率 + 干膏得率 × 10/最大干膏得率)。其中 1~4 号为黄色区域内的点, 5~8 号为黄色区域外的点, 实验安排及结果见表 6。由表 6 可知, 黄色区域内工艺点的综合评分优于黄色区域外工艺点的综合评分, 因

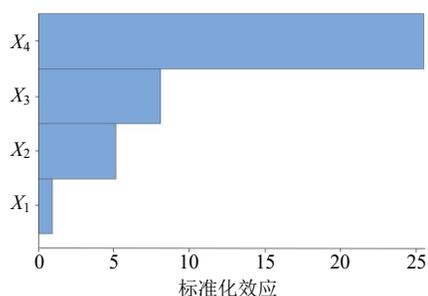


图6 标准化效应的pareto图

Fig. 6 Pareto diagram of standardization effect

此最终确定提取工艺的最优设计空间为溶剂用量8~11倍、提取时间为30~84 min, 提取次数为1~2次。

### 3 讨论

失眠属中医学“不寐”“不得眠”“目不瞑”等范畴, 病因多与情志不遂、饮食不节、久病体虚等有关, 病位主要在心, 但与肝、胆、脾、胃、肾的阴阳气血失调相关。目前临床治疗失眠的药物有苯二氮草类、非苯二氮草类、有镇静作用的抗抑郁类、褪黑素受体激动剂类等, 短期内, 这些药物能显著

表5 实验安排及结果

Table 5 Experimental arrangement and results

编号	$X_2$ /倍	$X_3$ /min	$X_4$	$Y_1$ /(mg·g <sup>-1</sup> )	$Y_2$ /(mg·g <sup>-1</sup> )	$Y_3$ /(mg·g <sup>-1</sup> )	$Y_4$ /(mg·g <sup>-1</sup> )	$Y_5$ %
1	8 (-1)	90 (+1)	2 (0)	45.80	3.81	0.33	0.19	25.22
2	12 (+1)	90 (+1)	2 (0)	45.85	4.39	0.38	0.22	25.85
3	8 (-1)	30 (-1)	2 (0)	35.94	2.15	0.27	0.15	19.81
4	8 (-1)	60 (0)	3 (+1)	47.34	4.95	0.39	0.23	26.48
5	12 (+1)	30 (0)	2 (0)	38.60	2.38	0.29	0.17	21.29
6	10 (0)	30 (-1)	3 (+1)	42.60	3.30	0.37	0.20	24.52
7	10 (0)	90 (+1)	3 (+1)	49.72	5.50	0.43	0.26	28.32
8	10 (0)	60 (0)	2 (0)	42.15	3.50	0.34	0.20	24.16
9	8 (-1)	60 (0)	1 (-1)	27.52	1.65	0.16	0.09	14.74
10	10 (0)	60 (0)	2 (0)	40.56	3.45	0.34	0.19	23.66
11	12 (+1)	60 (0)	3 (+1)	45.43	4.65	0.45	0.27	26.65
12	10 (0)	60 (0)	2 (0)	38.65	3.30	0.34	0.20	23.14
13	10 (0)	60 (0)	2 (0)	37.14	3.43	0.34	0.19	22.74
14	10 (0)	60 (0)	2 (0)	40.13	3.18	0.33	0.20	23.84
15	10 (0)	30 (-1)	1 (-1)	23.21	1.14	0.17	0.09	14.25
16	12 (+1)	60 (0)	1 (-1)	32.75	1.83	0.20	0.11	17.74
17	10 (0)	90 (+1)	1 (-1)	32.51	2.51	0.21	0.11	17.99

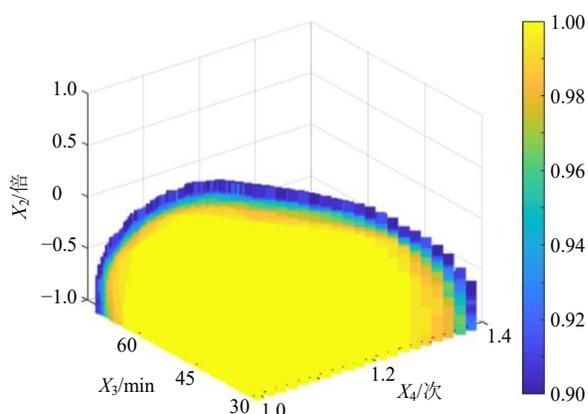


图7 栀子豉汤提取工艺设计空间

Fig. 7 Design space of extraction technology of ZD

改善睡眠, 但长期使用容易对人体产生很多不利的影响, 如地西洋, 长期连续用药可产生依赖性和成

瘾性<sup>[20-21]</sup>。栀子豉汤是临床常用的治疗失眠的经典方剂之一, 由该方剂组成或衍生的多种方剂对治疗各种类型的失眠均表现出较好的疗效, 但其药效物质和作用机制仍不明确。

本实验采用网络药理学方法对栀子豉汤治疗失眠的成分进行了预测, 发现栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、京尼平苷酸、西红花酸、大豆苷元、染料木素等可能是其发挥治疗作用的活性成分。这些活性成分可能作用于 IL-6、TNF、IL-1 $\beta$ 、ESR1 等核心靶标, 继而通过神经活性配体-受体相互作用、MAPK 信号通路、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、 $\gamma$ -氨基丁酸能突触、TNF 因子信号通路等多条通路治疗失眠。现代药理学研究表明栀子苷能显著缩短实验动物入睡

表 6 栀子豉汤提取工艺安排及验证结果

Table 6 Extraction process arrangement and verification results of ZD

编号	X <sub>2</sub> /倍	X <sub>3</sub> /min	X <sub>4</sub>	Y <sub>1</sub> /(mg·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>2</sub> /(mg·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>3</sub> /(mg·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>4</sub> /(mg·g <sup>-1</sup> )	Y <sub>5</sub> %	综合评分
1	9	60	2	40.40	3.61	0.29	0.16	24.08	97.43
2	9	60	2	40.21	3.73	0.30	0.17	24.29	99.86
3	10	61	2	35.41	3.26	0.29	0.17	23.21	92.66
4	10	61	2	37.73	3.48	0.30	0.16	24.17	95.45
5	11	30	2	32.31	2.67	0.26	0.15	20.96	81.92
6	11	30	2	34.03	2.32	0.27	0.15	21.16	82.07
7	11	45	2	34.59	2.79	0.27	0.15	22.51	85.56
8	11	45	2	35.05	2.82	0.28	0.16	22.49	87.90

时间,提高实验动物入睡率<sup>[22]</sup>。但其余成分(如京尼平龙胆双糖苷、京尼平苷酸、西红花酸、大豆苷元、染料木素)在失眠中的作用仍缺少相关报道。失眠与炎症息息相关,常伴随炎症因子 IL-6、TNF、IL-1 $\beta$  表达的升高<sup>[23-24]</sup>,王丹等<sup>[25]</sup>研究发现失眠严重程度与 IL-6 呈正相关,而 TNF- $\alpha$  对睡眠-觉醒行为存在特异性效应。p38 MAPK 是 MAPK 信号通路的重要组成部分,p38 MAPK 信号通路被激活后,促炎因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达显著升高,并伴随明显炎症的反应,抑制 p38 MAPK 通过后炎症因子的表达显著下降<sup>[26-27]</sup>,因此栀子豉汤可能通过调控 MAPK 信号通路,抑制炎症反应,从而治疗失眠。ESR1 通过影响空间记忆和突触可塑性,起到神经保护作用<sup>[28]</sup>。cAMP 被证实可通过蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 参与调节睡眠和昼夜节律,其可使慢波睡眠和总睡眠时间延长,同时缩短入睡潜伏期,具有明显的促睡眠效应<sup>[29]</sup>。 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质,对维持大脑网络功能至关重要<sup>[30]</sup>。研究发现失眠患者中枢 GABA 水平明显降低<sup>[31]</sup>。

此外,本研究基于 QbD 理念,对栀子豉汤提取工艺进行研究,借助网络药理学相关结果、查阅文献以及《中国药典》2020 年版对各味中药指标性成分的规定,确定栀子苷、京尼平龙胆双糖苷、大豆苷元、染料木素为栀子豉汤提取的 CQAs,用 Plackett-Burman 实验设计筛选出溶剂用量、提取时间和提取次数为栀子豉汤提取过程的 CPPs,Box-Behnken 实验设计对提取工艺进行优化,运用 Monte Carlo 法计算栀子豉汤提取工艺的设计空间,最终确定提取工艺最佳范围:溶剂用量 8~11 倍,提取时间 30~84 min,提取次数为 1~2 次。在设

计空间的建立时,采用了达标概率法,通过设定可接受达标概率,建立确保成功概率的设计空间,工艺参数在设计空间内运行,能够保证工艺评价指标达标<sup>[32]</sup>。本研究运用网络药理学和分子对接技术揭示了栀子豉汤治疗失眠的活性成分、潜在靶点及通路,并通过分子对接技术对筛选出的核心靶点进行验证。可以推测栀子豉汤中的活性成分可能通过作用于 IL-6、TNF、IL-1 $\beta$ 、ESR1 等靶点,调控神经活性配体-受体相互作用、cAMP 信号通路、 $\gamma$ -氨基丁酸能突触、TNF 因子信号通路等发挥治疗失眠的作用,可为研究栀子豉汤治疗失眠的分子机制提供思路。通过网络药理学方法和分子对接技术筛选出栀子豉汤的 CQAs,运用 QbD 理念对栀子豉汤的提取工艺参数进行研究,建立设计空间,为该方的进一步开发提供了数据支持。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chai C, Jin B, Yan Y Y, *et al.* Anti-depressant effect of Zhi-zi-chi Decoction on CUMS mice and elucidation of its signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113283.
- [2] 滕俊,张永生,唐卓然.《伤寒论》栀子豉汤治湿热证议 [J]. *河南中医*, 2020, 40(3): 325-328.
- [3] 康璐,刘倩,刘玉晔,等.栀子豉汤镇静催眠作用机制研究 [J]. *中国民间疗法*, 2020, 28(6): 82-84.
- [4] 王绍政,张欣怡.《伤寒论》中栀子豉汤的作用及现代临床意义 [J]. *养生保健指南*, 2019(9): 232.
- [5] Feng W, Dong Q J, Liu M Y, *et al.* Screening and identification of multiple constituents and their metabolites of Zhi-zi-chi decoction in rat urine and bile by ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 31(10): e3978.

- [6] 庞会婷, 罗朵生, 郭姣. 三七化学成分分析及其抗炎机制的网络药理学探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5538-5547.
- [7] Wang K P, Miao X Y, Kong F H, *et al.* Integrating network pharmacology and experimental verification to explore the mechanism of effect of Zuojin Pills in pancreatic cancer treatment [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3749-3764.
- [8] 刘涛, 赵灵丽, 钟林江, 等. 基于网络药理学的复方当归注射液作用机制研究 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2020, 39(3): 225-229.
- [9] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [10] Huang S, Chen Y, Pan L Y, *et al.* Exploration of the potential mechanism of Tao Hong Si Wu Decoction for the treatment of breast cancer based on network pharmacology and *in vitro* experimental verification [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 731522.
- [11] Ding Z C, Xu F F, Sun Q D, *et al.* Exploring the mechanism of action of herbal medicine (*Gan-Mai-Da-Zao* Zecocotion) for poststroke depression based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 2126967.
- [12] 王哲义, 孙悒泽, 刘碧原, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨丹参治疗缺血性脑卒中的作用机制 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(2): 344-355.
- [13] 丁瑞雪, 何雁, 田香, 等. 基于质量源于设计理念的格达-4 味汤提取工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2799-2805.
- [14] 戴胜云, 徐冰, 张毅, 等. 质量源于设计(QbD)在药物分析方法开发中的应用研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 950-960.
- [15] 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.
- [16] 吴丹, 高耀, 向欢, 等. 基于网络药理学的栀子豉汤抗抑郁作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1594-1602.
- [17] Zhang Y, Luo Y S, Zhang D Q, *et al.* Predicting a potential link to antidepressant effect: Neuroprotection of Zhi-zi-chi Decoction on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 625108.
- [18] 杨艳玲, 李花花, 黄嘉怡, 等. 基于质量源于设计(QbD)理念的经典名方桃红四物汤的提取工艺研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 403-412.
- [19] 刘博文, 戴静, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和设计空间的乳腺康提取工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1634-1644.
- [20] Yamato K, Inada K, Enomoto M, *et al.* Patterns of hypnotic prescribing for residual insomnia and recurrence of major depressive disorder: a retrospective cohort study using a Japanese health insurance claims database [J]. *BMC Psychiatry*, 2021, 21(1): 40.
- [21] Riemann D, Nissen C, Palagini L, *et al.* The neurobiology, investigation, and treatment of chronic insomnia [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(5): 547-558.
- [22] 李智欣, 肖韦华, 何计国, 等. 栀子中改善睡眠成分的研究 [J]. 农产品加工: 学刊, 2006(8): 79-80.
- [23] Xia L, Zhang P, Niu J W, *et al.* Relationships between a range of inflammatory biomarkers and subjective sleep quality in chronic insomnia patients: A clinical study [J]. *Nat Sci Sleep*, 2021, 13: 1419-1428.
- [24] Ren X J, Wang Q Q, Zhang X P, *et al.* Establishment of a rat model with ageing insomnia induced by *D*-galactosef and para-chlorophenylalanine [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4): 3228-3236.
- [25] 王丹, 钟建国. 基于“多感官刺激”理论的中医综合康复方案对老年缺血性脑卒中后失眠患者睡眠功能的影响 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(12): 1619-1625.
- [26] 盛蕾, 刘元月, 胡丹, 等. 柴胡疏肝散治疗卒中后抑郁的网络药理学研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3509-3515.
- [27] 姚晶晶, 陈岚, 刘东戈. 炎症因子与阿尔茨海默病发病关系 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2008, 15(3): 218-220.
- [28] 李建民, 陈长香, 赵雅宁, 等. 大鼠睡眠剥夺与 p38MAPK 信号通路的相关性研究 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(16): 3270-3272.
- [29] 李璟怡, 黄俊山, 陈沁, 等. 松郁安神方对失眠大鼠海马 cAMP/PKA 信号通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(3): 212-217.
- [30] Zhang X, Liu Y, Hong X Q, *et al.* NG2 *glia*-derived GABA release tunes inhibitory synapses and contributes to stress-induced anxiety [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5740.
- [31] 周扬, 郭冷秋, 刘逊, 等. 基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨朱茯苓用于失眠的作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(1): 114-126.
- [32] 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.

[责任编辑 郑礼胜]