

独活挥发油低共熔溶剂辅助微波水蒸气蒸馏法提取及质量标志物(Q-Marker)研究

李 欠, 尹转霖, 丁小琴, 姜 侃

甘肃农业大学农学院, 省部共建干旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070

摘要: 目的 建立独活 *Angelicae Pubescentis Radix* 挥发油的高效提取方法, 并预测其质量标志物 (quality markers, Q-Marker)。方法 采用水蒸气蒸馏法 (steam distillation, SD)、微波辅助水蒸气蒸馏法 (microwave assisted steam distillation, MASD) 和低共熔溶剂 (deep eutectic solvents, DESs) 辅助微波水蒸气蒸馏法 (DESs assisted microwave steam distillation, DES-A-MSD) 提取独活挥发油, 并通过网络药理学和分子对接分析预测独活挥发油的 Q-Marker。结果 通过对不同体系 DESs 和提取方法的比较, 发现氯化胆碱与乳酸物质的量比为 1:2 的 DESs 体系更有利于提取独活挥发油。通过对 SD 法和 MASD 法的比较, 发现 DES-A-MSD 法的挥发油得率最高, 约为 SD 法的 2 倍。采用单因素法对其提取条件进行优化, 得到最佳提取条件为氯化胆碱与乳酸物质的量比 1:2, 微波功率 500 W, 含水量 10%。采用气相色谱-质谱法对其挥发油的化学成分进行分析, 并将 β -蒎烯、 α -蒎烯、红没药醇、蛇床子素和 2-羟基环十五酮 5 种主要成分作为 Q-Marker 候选物进行网络药理学分析。搭建了组分-靶点网络、蛋白-蛋白相互作用网络、组分-靶点-通路网络和靶点组织分布网络, 从而预测挥发油的 Q-Marker 可能是红没药醇和 α -蒎烯。经过分子对接分析, 从理论上验证了预测的 Q-Marker 的生物活性。结论 建立的 DES-A-MSD 法能够提高独活挥发油的得率, 预测的 Q-Marker 能够用于独活挥发油的质量评价。

关键词: 独活; 挥发油; 低共熔溶剂; 微波; 水蒸气蒸馏法; 质量标志物; 网络药理学; 分子对接; 气相色谱-质谱法; 红没药醇; α -蒎烯; β -蒎烯; 蛇床子素; 2-羟基环十五酮

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1167-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.011

Study on extraction of volatile oils from *Angelicae Pubescentis Radix* by deep eutectic solvents assisted microwave steam distillation and its quality markers

LI Qian, YIN Zhuanlin, DING Xiaoqin, JIANG Kan

State Key Laboratory of Aridland Crop Science, College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To establish an efficient extraction method of volatile oil from Duhuo (*Angelicae Pubescentis Radix*, APR) and predict its quality markers (Q-Marker). **Methods** In this study, steam distillation (SD), microwave assisted steam distillation (MASD) and deep eutectic solvents (DESs) assisted microwave steam distillation (DES-A-MSD) were employed to extract volatile oils from APR. In addition, the Q-Marker for quality control of volatile oils from APR was predicted through network pharmacology and molecular docking analysis. **Results** It was found that a deep eutectic solvent system with a molar ratio of choline chloride to lactic acid of 1:2 was more advantageous for the extraction of volatile oils from APR by comparing DESs of different systems and extracting methods. In addition, the yield of volatile oils by DES-A-MSD method was the highest by comparing SD with MASD methods, and the yield of volatile oils was approximately twice of SD method. Then, the single factor method was used to optimize the extraction conditions of the volatile oils from APR. The optimal conditions were as follow: molar ratio 1:2, microwave power 500 W, and water content 10%. The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was employed to analyze the chemical components of the volatile oils from APR. Five main components, including β -selinene, α -selinene, α -bisabolol, osthole, 2-hydroxycyclopentadecanone, were used as Q-Marker candidates for network pharmacology analysis. The component-target network, protein-protein interaction network, component-target-pathway network, and target tissue distribution network were constructed to predict the Q-Marker. It was

收稿日期: 2023-07-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31860102); 甘肃省委组织部陇原青年创新创业人才 (个人) 项目 (GSRC-2023-1-4); 甘肃省高校教师创新基金项目 (2023A-53)

作者简介: 李 欠 (1984—), 男, 安徽宿州人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为中药分析及质量评价。E-mail: liqian1984@gsau.edu.cn

predicted that α -bisabol and α -selinene with high biological activity would be Q-Marker for the volatile oils of APR. Molecular docking was used to verify the biological activity of predicted Q-Marker. **Conclusion** The established DES-A-MSD method could improve the yield of volatile oils, and the predicted Q-Marker could be used to evaluate the quality of volatile oil.

Key words: *Angelicae Pubescentis Radix*; volatile oils; deep eutectic solvents; microwave; steam distillation; Q-Marker; network pharmacology; molecular docking; gas chromatography mass spectrometry; α -bisabolol; α -selinene; β -selinene; osthole; 2-hydroxycyclopentade-canone

独活 *Angelicae Pubescentis Radix* 是我国重要的传统中药材，有很高的药用价值。而独活挥发油作为独活的主要药理成分，具有抗炎、抗氧化、镇痛、理气、抗菌、抗肿瘤等作用^[1-2]。现阶段对独活挥发油的高效提取与质量控制缺少系统的研究。目前，提取挥发油的传统方法有：水蒸气蒸馏法（steam distillation, SD）、溶剂提取法、索氏提取法、机械萃取法等^[3]。传统的提取工艺有萃取时间长、效率低、耗能大，部分方法采用有毒溶剂等弊端。微波辅助提取技术作为一种新的提取方法，具有能量传递快、提取效率高、耗时短、耗能低、绿色环保等优势，在挥发油提取方面具有较好的应用前景^[4-7]。另一方面，低共熔溶剂（deep eutectic solvents, DESs）作为一种环境友好型溶剂，被广泛用于提取中药活性成分领域，具有提取效率高的优点^[8-13]，目前其在挥发油的提取方面应用较少，具有非常广阔的前景。

中药质量评价方法可以分为化学评价、生物评价和化学-生物相结合的评价方法^[14]。在已有质量评价方法的基础上，刘昌孝院士^[15]于 2016 年提出利用中药质量标志物（quality markers, Q-Marker）评价中药质量的方法，该方法能够更加全面客观的评价中药质量，为中药质量控制提供了新的思路。网络药理学能够揭示中药成分与相关靶点相互作用的机制，系统地、全面地展示了疾病与靶点蛋白、靶点蛋白与药物以及药物与药物之间的相互联系^[16-17]，能够预测潜在生物机制下的有效成分或组分，鉴定 Q-Marker。

分子对接技术可以在理论上研究药物小分子与靶点蛋白的作用，进一步预测小分子的生物活性。将网络药理学的方法与成分分析方法相结合，能够快速、准确地找到 Q-Marker，并利用分子对接的方法，确认了主要活性物质的作用靶点^[18-20]，为中药 Q-Marker 预测提供理论基础，具有良好的应用前景。本研究采用 DESs 辅助微波水蒸气蒸馏法（DESs assisted microwave steam distillation, DES-A-MSD）提取独活挥发油，并与 SD 法和微波辅助水蒸气蒸

馏法（microwave assisted steam distillation, MASD）2 种提取方法进行对比，确定独活挥发油的最佳提取工艺。利用气相色谱-质谱法（gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）分析不同提取方法得到的独活挥发油的化学成分的差异，根据挥发油化学成分，结合网络药理学和分子对接预测独活挥发油 Q-Marker，为其质量控制提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

XH-MC-1 型实验室微波合成反应仪，北京祥鸽科技发展有限公司；INNOTEG-Science One MR1 型磁力搅拌器，德祥科技有限公司；HX203T 型电子天平，1.0 mg，慈溪市天东衡器厂；WK-1000 型小型高速粉碎机，山东精诚医药装备制造有限公司；Agilent 7890B-7000D 型三重四极杆气相色谱质谱联用仪，美国安捷伦公司；PTHW 型电热套，郑州科丰仪器设备有限公司。

1.2 材料

独活药材采自湖北省宜昌市五峰土家族自治县，由甘肃农业大学陈垣教授鉴定并确认，为伞形科当归属植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根。将独活药材清洗干燥后粉碎成粉末，过 40 目筛，于 4 °C 下储存。正己烷为色谱纯，氯化胆碱、尿素、甘油、乙二醇、乳酸、葡萄糖、柠檬酸、1,3-丁二醇为分析纯，均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 DES 的制备

本研究采用加热搅拌法，以氯化胆碱、尿素、甘油、乙二醇、乳酸、葡萄糖、柠檬酸、1,3-丁二醇为原材料制备 DES。按照表 1 将氢键供体（H-bond donor, HBDs）和氢键受体（H-bond acceptor, HBAs）以一定的物质的量比和/或水混合在圆底烧瓶中，使用磁力搅拌器将其加热搅拌，直至形成均匀、透明、稳定的液体。

2.2 独活挥发油不同提取方法的比较

为了获得一种高效、绿色、低耗能的提取工艺

表 1 不同 DESs 的制备

Table 1 Preparation of different DESs				
序号	HBAs	HBDs	HBAs:HBDs:(水)	室温下的状态
DES-1	氯化胆碱	尿素	1:1:(2)	白色透明液体
DES-2	氯化胆碱	甘油	1:2	白色透明液体
DES-3	氯化胆碱	乙二醇	1:2	白色透明液体
DES-4	氯化胆碱	乳酸	1:2	黄色黏性液体
DES-5	氯化胆碱	葡萄糖	1:1:(6)	白色透明液体
DES-6	氯化胆碱	柠檬酸	1:1:(4)	白色透明液体
DES-7	氯化胆碱	1,3-丁二醇	1:3:(4)	白色黏性液体

采用 SD 法和 MASD 法提取独活挥发油,并与 DES-A-MSD 法进行比较。SD 法是将混合物加热至沸腾状态后保持 5 h; MASD 法用蒸馏水作为溶剂进行微波萃取。具体实验参数如下。①SD 法条件:料液比 1:5,蒸馏时间 5 h; ②MASD 法条件:料液比 1:5,微波功率 400 W,温度 100 ℃,蒸馏时间 60 min; ③DES-A-MSD 法条件:料液比(独活粉末-DESs) 1:3,预处理后再加一定量蒸馏水,微波功率 400 W,温度 100 ℃,蒸馏时间 60 min。

SD 法、MASD 法与 DES-A-MSD 法的挥发油得率分别为 0.28%、0.36%和 0.50%。DES-A-MSD 法提取率最高,大约是传统提取工艺 SD 法的 2 倍,且此法显著缩短了提取时间。微波技术会加热独活细胞内部的水分,使细胞壁破裂,加速了细胞内挥发性成分的溶出,DESs 相比于水具有更好的溶解性和穿透力,能够增大独活在溶剂中的溶解度,使细胞内成分不断的扩散出来,进而提高独活挥发油得率^[21-22]。因此,DES-A-MSD 法的独活挥发油得率高,且提取时间短,更利于独活挥发油的提取。

2.3 最佳 DESs 的筛选

DESs 由不同的天然化合物混合制备而成,其中氢键受体和氢键供体的不同组合会影响 DESs 的理化性质。通过尿素、甘油、乙二醇、乳酸、葡萄糖、柠檬酸、1,3-丁二醇与氯化胆碱的混合,制备出 7 种 DESs。其中一些 DESs 需加入一定量的水以降低其黏度。精确称取 100 g 独活粉末,使用磁力搅拌器,将称好的独活粉末与制备好的 DESs,按照 1:3 的料液比进行混合搅拌,后转入微波反应器中,在微波功率 600 W、温度 80 ℃的条件下反应 10 min,对混合物进行微波辐射预处理,然后加入 200 mL 蒸馏水,磁力搅拌将其混匀,后将所有样品溶液转移至三颈烧瓶内并放入微波反应器中,如图 1 所示。将烧瓶与 V 型提取器和回流冷凝管相连,

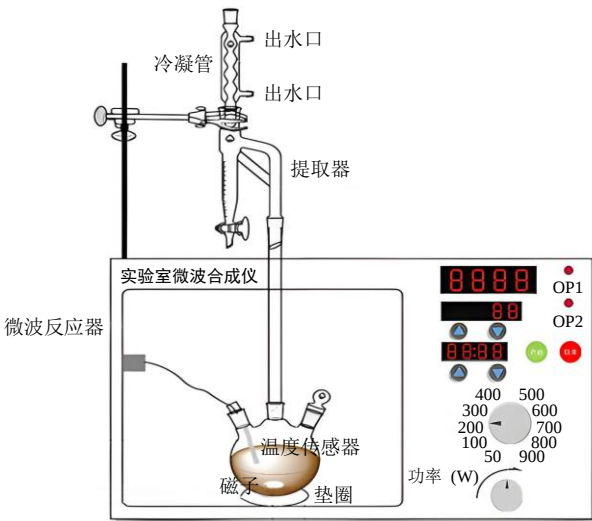


图 1 微波提取挥发油装置示意图

Fig. 1 Diagram of microwave extraction unit for volatile oil

实现独活挥发油的收集和凝结水的回流。先设置微波功率 600 W、温度为 103 ℃、反应时间为 5 min,让混合物的温度迅速升高,使其接近沸点,最后在微波功率 400 W、温度 100 ℃的条件下持续蒸馏 60 min。每次提取均有 3 次重复。将收集的挥发油脱水处理,低温(4 ℃)保存。挥发油得率计算公式如下。结果表明,不同的 DESs 均可以提取出一定量独活挥发油,但是得率有较大差异。其中,DES-4(氯化胆碱-乳酸)所提取的挥发油得率最高,得率达 0.5%; DES-2(氯化胆碱-甘油)和 DES-6(氯化胆碱-柠檬酸)所提取的挥发油得率次之,DES-5(氯化胆碱-葡萄糖)所提取的挥发油得率最低。这可能是由于有机酸类成分能够更好吸收微波辐射,并促进独活细胞大量释放挥发性成分,进而提高挥发油得率^[23]。最终考虑到挥发油得率,选择 DES-4 用于后续优化实验。

$Y=V/W$

Y 是挥发油得率, V 是挥发油的体积, W 是独活粉末的质量

2.4 挥发油成分 GC-MS 分析

采用 SH-Rxi-5 MS 色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),对挥发油进行 GC-MS 分析。程序初始温度为 50 ℃,保持 3 min,后以 4 ℃/min 升温,温度升至 250 ℃,保持 1 min。进样口温度为 250 ℃,体积流量为 1 mL/min,氦气为载气。离子源温度设置为 200 ℃,扫描范围 m/z 33~500,质谱采集 3.5~54 min。分别使用数据库(NIST14)比对和峰面积归一化法对检测到的化合物进行定性和定量分析。

GC-MS 分析结果(表 2)表明,SD 法得到挥发

表 2 独活挥发油的主要成分
Table 2 Main components of volatile oils from *Angelica Pubescens Radix*

编号	成分	分子式	CAS	相对含量/%		
				SD	MASD	DES-A-MSD
1	(+)-柠檬烯 [(+)-limonene]	C ₁₀ H ₁₆	5989-27-5	1.71	0.08	0.27
2	2-羟基-5-甲基苯乙酮 (o-acetyl-p-cresol)	C ₉ H ₁₀ O ₂	1450-72-2	1.69	0.56	0.41
3	4-甲基己基-2-甲基丁酸酯 (4-methylhexyl 2-methylbutanoate)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	850309-46-5	0.32	0.12	0.41
4	庚酸-3-甲丁酯 (isoamyl heptanoate)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	109-25-1	0.20	0.10	0.41
5	1,2-二丁基环戊烷 (1,2-dibutylcyclopentane)	C ₁₃ H ₂₆	62199-52-4	2.67	1.84	2.26
6	(+)-环苜蓿烯 [(+)-cyclosativene]	C ₁₅ H ₂₄	22469-52-9	0.18	0.12	0.63
7	β-榄香烯 (β-elemene)	C ₁₅ H ₂₄	515-13-9	0.85	0.34	0.63
8	6-甲基庚基-2-甲基丁酸酯 (6-methylheptyl 2-methylbutanoate)	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	117421-31-5	0.24	0.20	0.12
9	(+)-7- <i>epi</i> -倍半侧柏烯 [(+)-7- <i>epi</i> -sesquithujene]	C ₁₅ H ₂₄	159407-35-9	0.21	0.08	0.09
10	2- <i>epi</i> -α-柏木萜烯 (2- <i>epi</i> -α-funebrene)	C ₁₅ H ₂₄	65354-33-8	0.23	0.29	0.10
11	β-石竹烯 (trans-caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	87-44-5	0.49	0.35	0.10
12	(+)-β-柏木烯 [(+)-β-cedrene]	C ₁₅ H ₂₄	546-28-1	0.19	0.16	0.14
13	2-甲基丁酸辛酯 (octyl 2-methyl butyrate)	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	29811-50-5	1.57	1.39	1.12
14	(+)-β-柏木萜烯 [(+)-β-funebrene]	C ₁₅ H ₂₄	79120-98-2	0.34	0.27	0.21
15	倍半桉烯 (sesquisabinene)	C ₁₅ H ₂₄	58319-04-3	2.88	3.08	2.38
16	(1 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-1,8-dimethyl-4-(prop-1-en-2-yl)spiro[4.5]dec-7-ene	C ₁₅ H ₂₄	729602-94-2	0.22	0.39	0.13
17	4a,8-二甲基-2-(丙-1-烯-2-基)-1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢萘 [4a,8-dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene]	C ₁₅ H ₂₄	103827-22-1	0.84	1.13	0.24
18	1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-基)环己-1,3-二烯 [1-methyl-4-(6-methylhept-5-en-2-yl)cyclohexa-1,3-diene]	C ₁₅ H ₂₄	451-55-8	1.08	2.01	0.29
19	α-姜黄烯 (α-curcumene)	C ₁₅ H ₂₂	644-30-4	0.95	0.99	1.10
20	β-瑟林烯 (β-selinene)	C ₁₅ H ₂₄	17066-67-0	5.01	5.07	4.00
21	α-蛇床烯 (α-selinene)	C ₁₅ H ₂₄	473-13-2	3.89	3.93	3.75
22	6,8a-二甲基-3-(丙-1-烯-2-基)-1,2,3,3a,4,5,8,8a-八氢萘 (isodaucene)	C ₁₅ H ₂₄	142878-08-8	1.26	1.45	0.51
23	(3 <i>R</i>)-2,2,5aβ,9β-四甲基-3β,9aβ-亚甲基十氢-1-苯并噁庚 [(3 <i>R</i>)-2,2,5aβ,9β-tetramethyl-3β,9aβ-methanodecahydro-1-benzoxepin]	C ₁₅ H ₂₆ O	5956-09-2	0.18	0.92	0.31
24	β-红没药烯 (β-bisabolene)	C ₁₅ H ₂₄	495-61-4	1.35	3.08	1.31
25	2- <i>epi</i> -α-柏木萜烯 (2- <i>epi</i> -α-funebrene)	C ₁₅ H ₂₄	65354-33-8	1.48	1.45	0.44
26	(<i>S</i>)-1-乙酰氧基-4-甲基-己烷 [(<i>S</i>)-1-acetoxy-4-methyl-hexane]	C ₉ H ₁₈ O ₂	91367-59-8	1.20	1.31	1.16
27	阔叶缬草醚 (kessane)	C ₁₅ H ₂₆ O	3321-66-2	1.44	1.59	1.05
28	γ-榄香烯 (γ-elemene)	C ₁₅ H ₂₄	29873-99-2	1.23	1.32	0.14
29	巴伦西亚橘烯 (valencene)	C ₁₅ H ₂₄	4630-07-3	0.15	1.00	1.02
30	(<i>E</i>)-α-甜没药烯 [(<i>E</i>)-α-bisabolene]	C ₁₅ H ₂₄	25532-79-0	1.37	1.91	1.32
31	1- <i>epi</i> -库贝醇 (1- <i>epi</i> -cubenol)	C ₁₅ H ₂₆ O	19912-67-5	0.35	0.58	0.53
32	榄香醇 (α-elemol)	C ₁₅ H ₂₆ O	639-99-6	0.45	0.83	0.83
33	反式-橙花叔醇 [(±)-trans-nerolidol]	C ₁₅ H ₂₆ O	40716-66-3	1.30	0.92	1.14
34	T-杜松醇 (T-cadinol)	C ₁₅ H ₂₆ O	5937-11-1	0.29	0.28	0.35
35	石竹素 (caryophyllene oxide)	C ₁₅ H ₂₄ O	1139-30-6	0.51	0.35	0.76
36	(2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2-甲基-5-[(<i>S</i>)-6-甲基庚-5-烯-2-基]二环[3.1.0]己烷-2-醇 (trans-sesquis-abinene hydrate)	C ₁₅ H ₂₆ O	145512-84-1	0.47	0.41	1.90
37	愈创醇 (guaialol)	C ₁₅ H ₂₆ O	489-86-1	1.68	1.51	2.42
38	4-(6-甲氧基-3-甲基苯并呋喃-2-基)-3-丁烯-2-酮 [4-(6-methoxy-3-methyl-2-benzofuranyl)-3-buten-2-one]	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	10444-37-8	1.82	2.15	0.98

表 2 (续)

编号	成分	分子式	CAS	相对含量/%		
				SD	MASD	DES-A-MSD
39	桉油烯醇 [(-)-spathulenol]	C ₁₅ H ₂₄ O	77171-55-2	0.94	1.51	0.66
40	氧杂环十五烷-2-酮 (oxacyclopentadecan-2-one)	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	3537-83-5	1.42	2.76	3.83
41	7,10,13 顺-十六碳三烯酸 (7,10,13-hexadecatrienoic acid)	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	7561-64-0	0.19	1.51	0.12
42	2-羟基环十五酮 (2-hydroxycyclopentadecanone)	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	4727-18-8	3.83	5.42	3.97
43	(+)-异愈创木醇 (bulnesol)	C ₁₅ H ₂₆ O	22451-73-6	1.29	0.90	1.73
44	1-十四醇 (1-tetradecanol)	C ₁₄ H ₃₀ O	112-72-1	0.78	1.14	1.28
45	红没药醇 (α -bisabolol)	C ₁₅ H ₂₆ O	515-69-5	7.72	10.51	6.85
46	反式-12-十五碳烯-1-醇 (trans-12-pentadecen-1-ol)	C ₁₅ H ₃₀ O	69222-15-7	0.37	0.68	0.49
47	9,10-二甲基-1,2,3,4,5,6,7,8-八氢蒽 (9,10-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroanthracene)	C ₁₆ H ₂₂	42173-25-1	0.50	1.02	0.97
48	γ -亚麻酸甲酯 (methyl γ -linolenate)	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	16326-32-2	0.86	0.72	0.53
49	艾里莫芬酮 (eremophilone)	C ₁₅ H ₂₂ O	562-23-2	0.38	0.35	0.53
50	亚麻醇 [(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ol]	C ₁₈ H ₃₄ O	506-43-4	0.45	0.52	0.51
51	二十一(碳)烯 (heneicosene)	C ₂₁ H ₄₂	1599-68-4	0.97	1.37	1.43
52	(Z)-2-甲基-6-(4-甲基环己-3-烯-1-基)庚-2,6-二烯-1-醇 (cis-lanceol)	C ₁₅ H ₂₄ O	10067-28-4	0.26	0.38	0.34
53	菲 (phenanthrene)	C ₁₄ H ₁₀	85-01-8	0.41	0.59	0.34
54	环十五内酯 (cyclopentadecanolide)	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	106-02-5	0.53	0.70	0.82
55	(1R,3aR,5aR,9aS)-1,4,4,7-四甲基-1,2,3,3a,4,5a,8,9-八氢环戊二烯并[c]苯并呋喃 {(1R,3aR,5aR,9aS)-1,4,4,7-tetramethyl-1,2,3,3a,4,5a,8,9-octahydrocyclopenta[c]benzofuran}	C ₁₅ H ₂₄ O	104188-25-2	0.82	0.70	1.52
56	1-乙酰基 4,6,8-三甲基萸 (1-acetyl-4,6,8-trimethylazulene)	C ₁₅ H ₁₆ O	834-97-9	0.92	2.06	0.75
57	(Z)-氧代环十七碳-8-烯-2-酮 (oxacycloheptadec-8-en-2-one)	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	123-69-3	0.17	0.27	0.25
58	1-十六烷醇 (1-hexadecanol)	C ₁₆ H ₃₄ O	36653-82-4	0.58	0.88	1.00
59	氧杂环十七烷-2-酮 (hexadecanolactone)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	109-29-5	1.05	1.24	1.81
60	(Z)-18-octadec-9-enolide	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	80060-76-0	0.55	0.57	0.90
61	棕榈酸 (palmitic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	57-10-3	1.82	2.47	1.89
62	棕榈酸乙酯 (ethyl palmitate)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	628-97-7	0.16	0.20	0.44
63	(E)-4-(6-甲氧基-3-甲基苯并呋喃-2-基)丁-3-烯-2-酮 [3-buten-2-one,4-(6-methoxy-3-methyl-2-benzofuranyl)]	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	10444-37-8	1.42	3.24	0.22
64	蛇床子素 (osthole)	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	484-12-8	2.84	3.70	3.59
65	异亚油酸 [(9E,11E)-9,11-octadecadienoic acid]	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	544-71-8	0.67	1.60	0.53
66	正五十四烷 (tetrapentacontane)	C ₅₄ H ₁₁₀	5856-66-6	0.53	0.37	0.46
67	丝立尼亭 (selinidin)	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	19427-82-8	0.31	0.92	0.54
68	异丁酸香茅酯 (citronellyl 2-methyl butyrate)	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	85409-36-5	0.29	0.16	0.13
69	2-甲基-5-(6-甲基庚-5-烯-2-基)二环[3.1.0]己烷-2-醇 [(Z)-sesquisabinene hydrate]	C ₁₅ H ₂₆ O	58319-05-4	2.89	2.23	2.53
70	β -没药醇 (β -bisabolol)	C ₁₅ H ₂₆ O	15352-77-9	2.89	2.23	3.54
71	亚油酸甲酯 (methyl linoleate)	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	112-63-0	0.84	0.18	0.17
72	2-甲基丁酸香茅酯 (dihydrojatamansin)	C ₁₉ H ₂₂ O ₅	2221-62-7	0.53	0.13	0.12
73	(1R,3S,4S)-1,3-二甲基-3-(4-甲基戊-3-烯-1-基)-2-氧杂二环[2.2.2]辛-5-烯 {(1R,3S,4S)-1,3-dimethyl-3-(4-methylpent-3-en-1-yl)-2-oxabicyclo[2.2.2]oct-5-ene}	C ₁₅ H ₂₄ O	211237-38-6	1.05	1.13	0.85
合计				83.52	97.92	80.60

油成分占总峰面积的 83.52%，MASD 法占 97.92%，DES-A-MSD 法占 80.6%。由此可见，DES-A-MSD 法的挥发油得率最高，但是纯度较低；而 MASD 法提取的挥发油得率中等，纯度最高。微波提取法加热时间短，会降低挥发油热降解，所以 MASD 法提取出来的挥发油纯度较高。SD 法加热时间长，提取效率低，会导致热降解，所以挥发油纯度较低。另一方面，由于 DESs 的溶解能力强，可能与部分非目标成分有较好的亲和力，导致一些非挥发性成分被萃取出来，虽然提高了得油率，但是降低了挥发油纯度^[24-25]。以上 3 种方法得到的独活挥发油中主要活性成分有 β -蒎烯、 α -蒎烯、红没药醇、蛇床子素、2-羟基环十五酮。

2.5 单因素试验考察不同因素对挥发油得率的影响

根据单因素试验来探究 HBA 与 HBD 不同物质的量、微波功率和 DESs 含水量对独活挥发油得率的影响。每个试验均有 3 次重复。

2.5.1 HBA 与 HBD 不同物质的量比对独活挥发油得率的影响 当合成 DESs 时，氢键受体（HBA）和氢键供体（HBD）的物质的量比会影响 DESs 的极性、黏度和表面张力^[26]。保证其他实验条件不变，本实验考察了 HBA 与 HBD 不同物质的量比（1:1、1:2、1:3、1:4、1:5）合成的 DESs 对独活挥发油提取的影响，独活挥发油得率分别为 0.42%、0.50%、0.45%、0.38%、0.30%，当物质的量比从 1:1 减小到 1:2 时，挥发油得率不断上升，且当物质的量比为 1:2 时，挥发油得率达到最大值，最利于独活挥发油的提取，但当物质的量比小于 1:2 时，挥发油得率开始下降，这可能是因为物质的量比的不同会影响 DESs 的理化性质，在物质的量比为 1:2 时，DESs 与独活之间的氢键相互作用较强，进而促进了独活挥发油的释放^[26]。

2.5.2 不同含水量对独活挥发油得率的影响 保证其他实验条件不变，考察 DESs 不同含水量（0、10%、20%、30%、40%）对挥发油得率的影响。大部分 DESs 与传统有机溶剂相比，黏稠度高，流动性较差，然而添加适量的水会使 DESs 分子间的氢键逐渐断裂，可显著降低 DESs 的黏度^[27-28]。本研究设置 5 个 DESs 含水量梯度，考察 DESs 含水量对独活挥发油得率的影响，结果独活挥发油得率分别为 0.50%、0.53%、0.48%、0.45%、0.42%。发现 DESs 的含水量从 0 增加到 40% 时，DESs 的流动性明显增强，当 DESs 含水量从 10% 增加到 40% 时，挥发

油得率呈下降趋势，且达到最低值；当含水量为 10% 时，挥发油得率达到最大值，这表明加入适量的水有利于挥发油的提取，可提高挥发油得率，而少量或者过量的水会削弱 DESs 的溶解度，进而减弱其与独活的相互作用，导致挥发油得率降低。因此，DESs 含水量为 10% 时，最利于独活挥发油的提取。

2.5.3 不同微波功率对独活挥发油得率的影响 微波作为一种介质加热模式，可以快速升温，促进分子的振动，进而加速植物细胞纤维素的溶解^[29-30]，微波功率是影响挥发油得率至关重要的因素之一。保证其他实验条件不变，考察不同微波功率（300、400、500、600、700 W）对独活挥发油得率的影响。结果独活挥发油得率分别为 0.43%、0.50%、0.52%、0.46%、0.35%，当微波功率从 300 W 增加到 500 W 时，挥发油得率不断上升且达到最大值，但当微波功率超过 500 W 时，挥发油得率开始呈下降趋势。这可能是因为随着微波辐射的增强，会激发 DESs 与独活细胞的相互作用，但当微波功率超过 500 W 时，较高的微波能量会使独活细胞突然破裂，大量的混合物涌出，导致较多挥发性成分难以收集。综上，微波功率为 500 W 时最利于独活挥发油的提取。

2.5.4 独活挥发油的最佳提取工艺 通过单因素试验对独活挥发油的提取工艺进行优化，结果表明，最佳提取工艺为 HBA 和 HBD 的物质的量比为 1:2，微波功率为 500 W，DESs 含水量为 10%，对此提取条件验证后，独活挥发油提取率为 0.54%。与传统的提取方法相比，DES-A-MSD 法具有绿色、环保、低能耗、高产能等优点，这为天然产物中挥发油等活性成分的提取提供了新思路。

2.6 网络药理学分析

选择共有成分作为 Q-Marker 的候选化合物，并通过 TCSP 和 Swiss Target Prediction 数据库来确定这些候选化合物的靶标，然后利用 UniProt 数据库获得了与候选化合物有关的基因信息。将化合物与靶点导入到 Cytoscape 3.2.1 软件中，从而创建每个化合物与靶点作用的网络图。利用 STRING 数据库，成功地建立了蛋白质与蛋白质之间的相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络。结合 DAVID 数据库，进行基因本体（gene ontology, GO）功能富集，并对京都基因和基因组大百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）的通路进行富集分析^[31-33]。

2.6.1 Q-Marker 候选成分的选择 基于独活挥发

油 GC-MS 分析的结果, 将不同提取方法下挥发油相对含量较高的主要共有成分作为候选成分, 结果见表 3。

表 3 挥发油质量标志物候选成分

Table 3 Candidate ingredients of Q-Marker for volatile oils

序号	成分	相对含量/%	CAS
1	β -蒎烯	5.07	17066-67-0
2	α -蛇床烯	3.93	473-13-2
3	红没药醇	10.51	515-69-5
4	蛇床子素	3.70	484-12-8
5	2-羟基环十五酮	5.42	4727-18-8

2.6.2 候选化合物的靶点预测 查找候选化合物作用靶点和靶点基因名, 物种选定为“Human”, 以可能性大于 0 为筛选标准, 得到相应的预测靶点。其中 2-羟基环十五酮预测到了 100 个靶标, 红没药醇预测到了 100 个靶标, α -蛇床烯预测到了 99 个靶标, β -蒎烯预测到了 23 个靶标, 蛇床子素预测到了 100 个靶标。将所有靶点取并集、筛去重复值后得到 268 个靶点。图 2 为成分-靶点网络图 (V 形和圆形节点分别表示化合物和对应的靶点, 节点大小表示度值大小); 从图中可知, α -蛇床烯、红没药醇、蛇床子素、2-羟基环十五酮对应的靶点更多, 影响更大。

2.6.3 PPI 分析 PPI 是细胞发挥功能的基础, 具有调节机体生理病理状态的重要作用^[34-35]。使用

STRING 数据库对 268 个与候选成分相关靶点进行深入分析, 设定了蛋白交互参数的评分值超过 0.9。将结果以 tsv 格式的文件导入到 Cytoscape 3.2.1 中, 从而构建了 PPI 网络 (选取 degree 大于中位数且大于 14 的节点制作 PPI 网络图), 结果见图 3。选取网络中度值 (degree) 前 5 的靶点肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、半胱天冬酶 3 (caspase 3, CASP3) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPARG) 作为关键靶点。

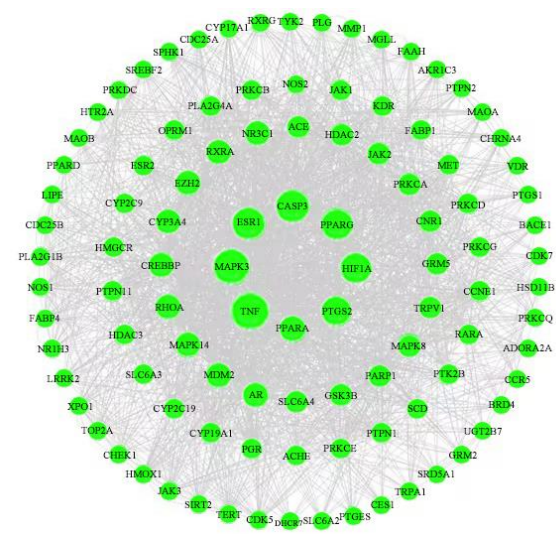


图 3 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network

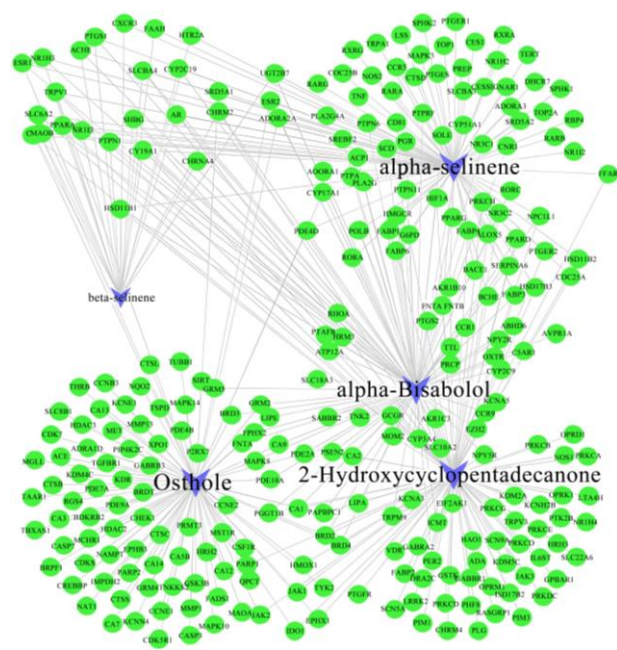


图 2 成分-靶点网络图

Fig. 2 Component-target network

2.6.4 GO 与 KEGG 富集分析 GO, 即基因和蛋白质功能的注释体系, 涵盖了 3 个独立的本体类别: 分子功能 (molecular function, MF)、细胞组成 (cellular component, CC) 以及生物过程 (biological process, BP), GO 提升了对基因功能进行预测的准确度。KEGG 将基因、酶、化合物以及代谢和信号通路网络整合在一起, 是一个综合性数据库^[36]。通过 DAVID 数据库, 对 268 个关键目标靶点执行了 GO 功能的富集分析, 共获得 858 个条目, 其中 BP 570 个、MF 201 个、CC 87 个, 图 4 为 $P < 0.05$ 的前 5 的 GO 富集分析条形图。生物过程有胞浆钙离子浓度的正调控、药物反应、疼痛感知等, 分子功能有核受体活性、配体激活转录因子活性、锌离子结合等, 细胞组成为质膜的组成部分、胞质溶胶等。KEGG 分析获得 126 条通路, 图 5 展示了 P 值小于 0.05 的前 9 个重要的 KEGG 通路富集分析条形图。

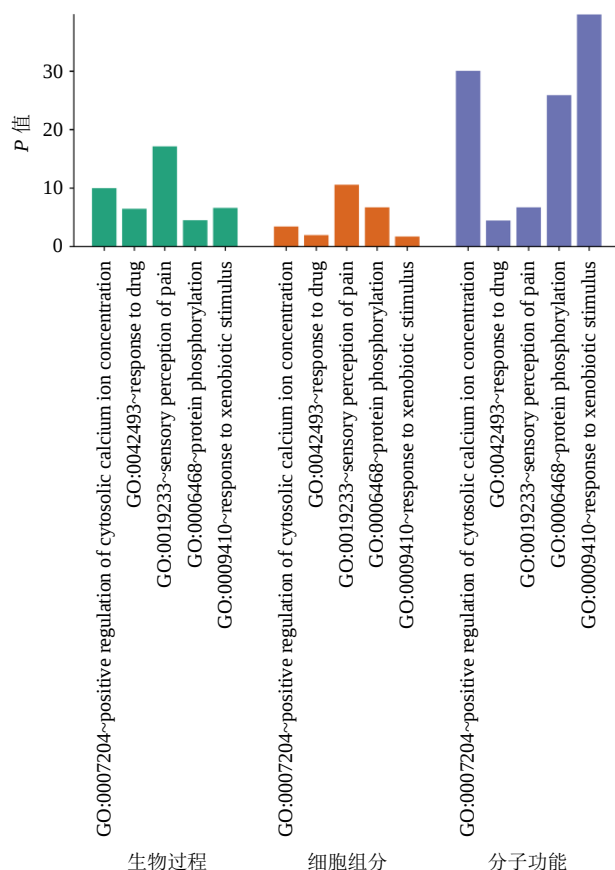


图 4 GO 富集分析条形图

Fig. 4 Bar chart of GO enrichment analysis

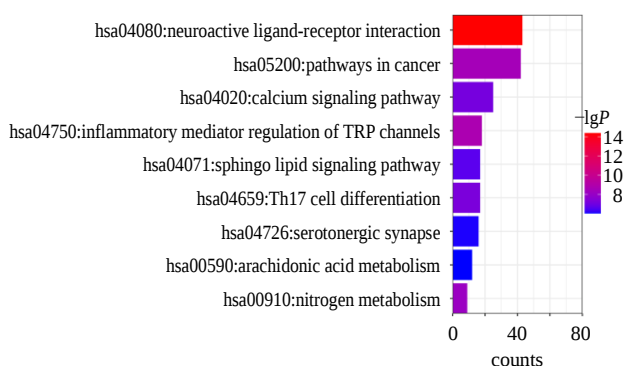


图 5 KEGG 富集分析条形图

Fig. 5 Bar diagram of KEGG enrichment analysis

这些通路包括了神经活性配体与受体之间的交互作用、癌症途径和钙信号等。

2.6.5 成分-靶点-通路网络的构建 图 6 为成分-靶点-通路的网络图。参照连接的度值 (degree), 分析得出红没药醇 (连接度为 2) 和 α -蛇床烯 (连接度为 4) 在网络中显示出较高的连接度。因此, 红没药醇和 α -蛇床烯可以作为挥发油的 Q-Marker。5 个关键靶点 TNF、MAPK3、ESR1、CASP3 和 PPARG 的连接度分别是 98、73、65、64 和 63, 连接度较高,

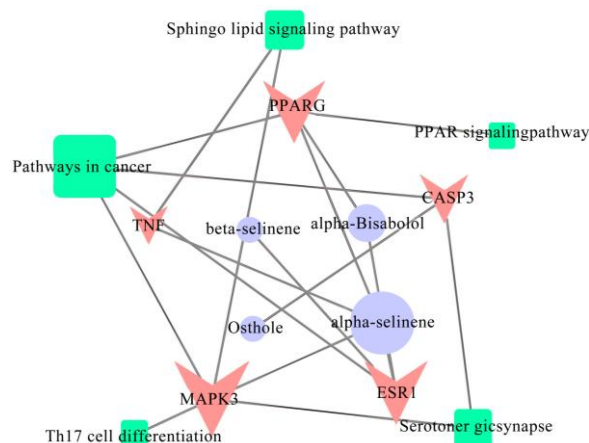


图 6 成分-靶点-通路网络图

Fig. 6 Network of component-target-pathway

表明这 5 个靶点的作用尤为重要; 9 条通路中癌症通路的度值是 4 为最大值, 是最为重要的一条通路。

2.6.6 关键靶点的组织分布 运用 The Human Protein Atlas 数据库查找 TNF、MAPK3、ESR1、CASP3 和 PPARG 5 个核心靶点的组织分布数据, 图 7 展示了运用 Cytoscape 3.2.1 软件构建的靶点-组织网络图。结果显示, MAPK3 与 45 个组织相连接、PPARG 与 32 个组织相连接、CASP3 与 25 个组织相连接、ESR1 与 6 个组织相连接、TNF 与 5 个组织相连接。度值前 8 的组织分别是脾 (spleen, 4)、肺 (lung, 4)、骨髓 (bone marrow, 4)、扁桃体 (tonsil, 4)、甲状腺 (thyroid gland, 3)、阑尾 (appendix, 3)、乳房 (breast, 3) 和子宫颈 (cervix, 3)。关键靶点及其分布的组织与文献所报道的独活挥发油抗炎、抗肿瘤、理气等药理作用相对应。

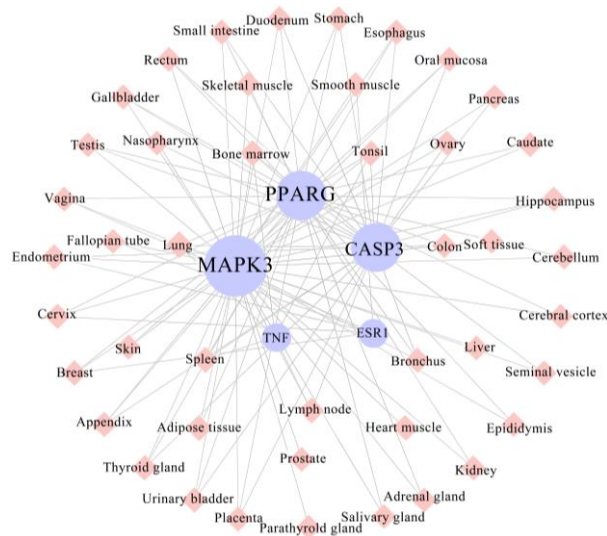


图 7 靶点-组织网络图

Fig. 7 Network of target-tissue

2.7 分子对接分析

通过 Auto Dock Vina 进行分子对接后用 PyMOL 软件和 Discovery Studio 进行可视化分析。

2.7.1 受体与配体结构获取 根据成分-靶点-通路中节点的连接度, 选取红没药醇和 α -蛇床烯 2 个小分子作为配体, 选取 α -蛇床烯的作用靶点雌激素受体 (estrogen receptor 1, ESR1)、过氧化物酶体增生激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARG)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和红没药醇可作用的靶点 ESR1、PPARG 作为受体。从 RCSB 数据库下载 PDBID 分别为 6kn5、5gtn、2zoq 和 4y6o 的 ESR1、PPARG、MAPK3 和 TNF 蛋白^[37]。从 Pubchem 数据库下载小分子红没药醇和 α -蛇床烯的 3D 结构

用来对接。

2.7.2 分子对接与可视化 在 PyMOL (4.3.0) 软件中分离原始配体和蛋白质结构, 在 AutodockTools 中对其进行加氢、检查电荷等处理, 构建对接网格盒等。使用 Auto Dock Vina 进行分子对接, 计算 ESR1、PPARG、MAPK3 和 TNF 与 α -蛇床烯组合, 以及 ESR1、PPARG 与红没药醇对接组合的得分。Q-Marker 与靶点蛋白结合位置见图 8。小分子 α -蛇床烯与 ESR1、PPARG、MAPK3 和 TNF 蛋白之间的结合能分别为 -26.8、-30.1、-31.8、-25.1 kJ/mol。小分子红没药醇与 ESR1 和 PPARG 蛋白之间的结合能分别为 -24.3 和 -27.6 kJ/mol。如果小分子与蛋白之间的结合能是负值, 且数值越小 (< -20.9 kJ/mol), 则表明小分子与靶蛋白之间亲和活性越强^[38], 因此, 6 对对接小分子和蛋白之间均结合稳定。

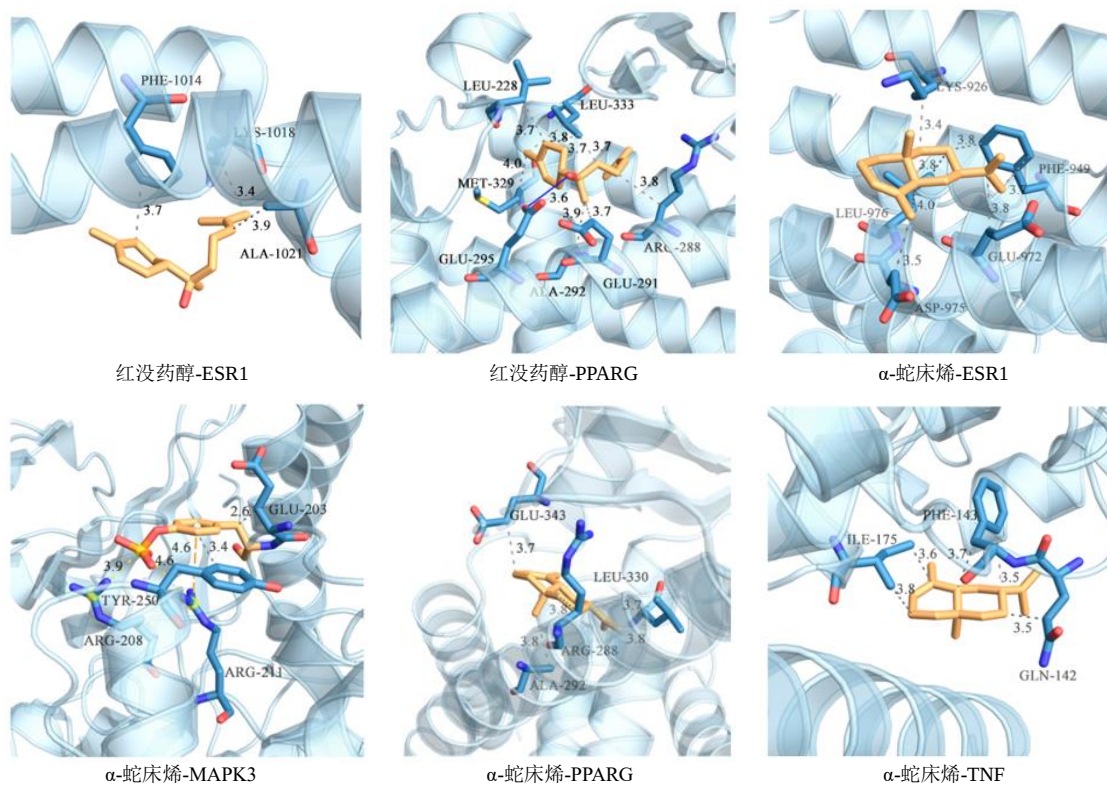


图 8 分子对接图

Fig. 8 Molecular docking diagram

3 讨论

本实验采用 SD 法、MASD 法和 DES-A-MSD 法提取中药独活中的挥发油, 分析其化学成分的差异。通过网络药理学预测分析了挥发油的 Q-Marker。结果表明, DES-A-MSD 法的得油率最高, 而 MASD 法提取的挥发油含量最高。MASD 法能够更加有效的提取挥发油的 Q-Marker, 而进一步筛

选出更加优异的 DESs 用于挥发油的提取, 是值得深入研究的课题。

核心靶点 TNF、MAPK3、ESR1、CASP3 和 PPARG 与独活挥发油 Q-Marker 神经保护、抑制相关酶活性、抗肿瘤、理气作用等相关。TNF 能影响胰岛素诱导的机体对葡萄糖的摄取进而控制血糖的迅速升高, 还可以在脂肪细胞中诱导 GKAP42 蛋白

降解进而诱导对胰岛素的抵抗,减缓脂代谢生物过程^[39]。MAPK3 主要与癌症和炎症类疾病有关,可以显著降低血管内皮细胞的炎症反应、氧化应激、细胞凋亡^[40]。ESR1 对性发育和生殖功能至关重要^[41]。CASP3 是重要的抑癌基因,具有重要的生物学功能^[42]。PPARG 与 PPARGA 相似,是结合降血脂药物和脂肪酸的受体,一旦被激活,就可控制脂肪酸的过氧化 β 途径,是血糖、血脂稳态的关键调节因子^[43]。分子对接分析进一步强化了 Q-Marker 与其主要靶点间的紧密结合能力,理论上确立了 Q-Marker 的显著生物活性。该研究基于独活挥发油提取及其成分含量的测定,探讨了成分与靶点、靶点与组织的联系,并通过分子对接等手段,揭示了独活挥发油潜在 Q-Marker 的特性。这为独活挥发油的高效提取和质量控制提供了更全面的参考,也为后期深入研究独活作用机制提供基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 274.
- [2] Lu Y Q, Wu H W, Yu X K, et al. Traditional Chinese medicine of *Angelicae Pubescentis Radix*: A review of phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 335.
- [3] Aziz Z A A, Ahmad A, Setapar S H M, et al. Essential oils: Extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - A review [J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(13): 1100-1110.
- [4] Liu T T, Sui X Y, Zhang R R, et al. Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis* [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(47): 8480-8489.
- [5] Sahraoui N, Vian M A, El Maataoui M, et al. Valorization of citrus by-products using microwave steam distillation (MSD) [J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2011, 12(2): 163-170.
- [6] Jeyaratnam N, Nour A H, Kanthasamy R, et al. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation [J]. *Ind Crops Prod*, 2016, 92: 57-66.
- [7] Martínez-Abad A, Ramos M, Hamzaoui M, et al. Optimisation of sequential microwave-assisted extraction of essential oil and pigment from lemon peels waste [J]. *Foods*, 2020, 9(10): 1493.
- [8] Abbott A P, Capper G, Davies D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. *Chem Commun*, 2003(1): 70-71.
- [9] Abbott A P, Harris R C, Ryder K S, et al. Glycerol eutectics as sustainable solvent systems [J]. *Green Chem*, 2011, 13(1): 82-90.
- [10] Shang X C, Dou Y Q, Zhang Y J, et al. Tailor-made natural deep eutectic solvents for green extraction of isoflavones from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 140: 111724.
- [11] Usmani Z, Sharma M, Tripathi M, et al. Biobased natural deep eutectic system as versatile solvents: Structure, interaction and advanced applications [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 881: 163002.
- [12] Zhang M Y, Zhang Z, Gul Z, et al. Advances of responsive deep eutectic solvents and application in extraction and separation of bioactive compounds [J]. *J Sep Sci*, 2023, 46(15): e2300098.
- [13] Xu D P, Zheng J, Zhou Y, et al. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods [J]. *Food Chem*, 2017, 217: 552-559.
- [14] 李天娇, 包永睿, 王帅, 等. 中药质量控制与评价创新方法研究进展及应用 [J]. *中草药*, 2022, 53(20): 6319-6327.
- [15] 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.
- [16] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [17] Li X R, Wen Z S, Si M D, et al. Exploration of Hanshi Zufei prescription for treatment of COVID-19 based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(2): 294-302.
- [18] 柳小莉, 黄小英, 张小飞, 等. 基于 GC-MS 成分分析结合网络药理学预测当归挥发油质量标志物 (Q-Marker) [J]. *中草药*, 2021, 52(9): 2696-2706.
- [19] Wang W, Jiang Y Y, Song B H, et al. Discovery of quality markers in the rhizome of *Atractylodes chinensis* using GC-MS fingerprint and network pharmacology [J]. *Arab J Chem*, 2023, 16(10): 105114.
- [20] 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.
- [21] Akhtar I, Javad S, Yousaf Z, et al. Review: Microwave assisted extraction of phytochemicals an efficient and modern approach for botanicals and pharmaceuticals [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2019, 32(1): 223-230.

- [22] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [23] Dai Y T, van Spronsen J, Witkamp G J, *et al.* Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 766: 61-68.
- [24] Bagade S B, Patil M. Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: A review [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2021, 51(2): 138-149.
- [25] 邹小兵, 陶进转, 夏之宁, 等. 微波辅助提取挥发油的研究进展 [J]. *中成药*, 2010, 32(6): 1014-1020.
- [26] Kumar A K, Parikh B S, Pravakar M. Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: Bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23(10): 9265-9275.
- [27] Yang G Y, Song J N, Chang Y Q, *et al.* Natural deep eutectic solvents for the extraction of bioactive steroidal saponins from *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* [J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 2079.
- [28] Yang Z. Natural deep eutectic solvents and their applications in biotechnology [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2019, 168: 31-59.
- [29] Dai Y T, Witkamp G J, Verpoorte R, *et al.* Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications [J]. *Food Chem*, 2015, 187: 14-19.
- [30] Zhao Y P, Wang P, Zheng W, *et al.* Three-stage microwave extraction of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil with natural deep eutectic solvents [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 140: 111660.
- [31] Ru J L, Li P, Wang J N, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [32] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [33] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, *et al.* SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Web Server issue): W32-W38.
- [34] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [35] Sherman B T, Hao M, Qiu J, *et al.* DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-W221.
- [36] 刘志强, 王博龙. 中药网络药理学研究: 蛋白互作网络构建与功能注释 [J]. *湖北民族学院学报: 医学版*, 2018, 35(3): 49-52.
- [37] 王梁凤, 柳小莉, 李慧婷, 等. 基于网络药理学的枳实挥发油治疗慢性传输型便秘的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(8): 1909-1917.
- [38] 陈佳, 李伟, 刘征, 等. 基于 GEO 数据库的 DPN 相关靶点挖掘及与芍药苷分子对接研究 [J]. *广东药科大学学报*, 2020, 36(4): 514-518.
- [39] Grunfeld C, Feingold K R. Tumor necrosis factor, cytokines, and the hyperlipidemia of infection [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 1991, 2(6): 213-219.
- [40] Zhou T, Li S N, Yang L H, *et al.* MicroRNA-363-3p reduces endothelial cell inflammatory responses in coronary heart disease via inactivation of the NOX4-dependent p38 MAPK axis [J]. *Aging*, 2021, 13(8): 11061-11082.
- [41] 杨睿, 张伟. 基于网络药理学与分子对接探讨川楝子治疗痛经的作用机制 [J]. *河南中医*, 2022, 42(1): 82-87.
- [42] Mukai M, Kusama T, Hamanaka Y, *et al.* Cross talk between apoptosis and invasion signaling in cancer cells through caspase-3 activation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9121-9125.
- [43] Yin Y, Yuan H, Wang C, *et al.* 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activates the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and promotes adipocyte differentiation [J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(2): 268-278.

[责任编辑 郑礼胜]