

# 石菖蒲中 $\beta$ -细辛醚的提取工艺优化及其体外抗氧化活性研究

严莹莹<sup>a</sup>, 王曼莉<sup>a</sup>, 李锦鸿<sup>a</sup>, 李承龙<sup>a</sup>, 洪光博<sup>a</sup>, 黄丽平<sup>a,b\*</sup>(岭南师范学院, a. 红树林研究院, b. 粤西特色生物医药工程技术研究中心, 广东湛江 524048)

**摘要:** 目的 采用乙醇加热回流法研究石菖蒲 $\beta$ -细辛醚的最佳提取工艺, 并考察其不同部位抗氧化活性。方法 以石菖蒲 $\beta$ -细辛醚提取量为评价指标, 优化提取方法, 在单因素试验的基础上, 采用正交设计与响应面法考察乙醇浓度、料液比、提取时间3个因素对石菖蒲 $\beta$ -细辛醚提取量的影响。在确定最佳提取工艺后, 对其不同部位抗氧化活性进行研究。结果 石菖蒲 $\beta$ -细辛醚最佳提取工艺: 乙醇浓度为95%, 料液比为1:20 g·mL<sup>-1</sup>, 提取时间为2.5 h。在此条件下, 石菖蒲 $\beta$ -细辛醚提取量为0.9187 mg·g<sup>-1</sup>。体外抗氧化活性结果表明抗氧化能力强弱顺序依次为乙酸乙酯>石油醚>乙醇>正丁醇。其中, 乙酸乙酯部位抗氧化活性最强, 具有较好清除DPPH、ABTS自由基的能力, 同时具备一定的还原能力。结论 优选工艺方法简单、稳定可靠, 可用于石菖蒲 $\beta$ -细辛醚的提取和抗氧化活性测定, 为石菖蒲的进一步开发提供依据。

**关键词:** 石菖蒲;  $\beta$ -细辛醚; 抗氧化; 正交试验; 响应面

中图分类号: R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)01-0018-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222806

引用本文: 严莹莹, 王曼莉, 李锦鸿, 等. 石菖蒲中 $\beta$ -细辛醚的提取工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(1): 18-26.

## Optimization of Extraction Technology and Antioxidant Activity of $\beta$ -Asarone from *Acori Tatarinowii* Rhizoma *in Vitro*

YAN Yingying<sup>a</sup>, WANG Manli<sup>a</sup>, LI Jinhong<sup>a</sup>, LI Chenglong<sup>a</sup>, HONG Guangbo<sup>a</sup>, HUANG Liping<sup>a,b\*</sup>(Lingnan Normal University, a. Mangrove Institute, Lingnan Normal University, b. Western Guangdong Characteristic Biology and Medicine Engineering and Research Center, Zhanjiang 524048, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the best extraction process of  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii* Rhizoma by ethanol heating reflux method, and to explore the antioxidant activity of different segments. **METHODS** With  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii* Rhizoma as the evaluation index to optimize the extraction method. On the basis of a single factor experiment, the effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio and extraction time on the extraction amount of  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii* Rhizoma were investigated by orthogonal design and response surface methodology. After the optimal extraction process was determined, the antioxidant activities of different segments were studied. **RESULTS** The optimum extraction process of  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii* Rhizoma was as follows: ethanol concentration was 95%, solid-liquid ratio was 1:20 g·mL<sup>-1</sup> and extraction time was 2.5 h. Under these conditions, the extraction amount of  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii* Rhizoma was 0.9187 mg·g<sup>-1</sup>. The results of *in vitro* antioxidant activity showed that the order of antioxidant capacity was ethyl acetate>petroleum ether>ethanol>*n*-butanol. Among them, the ethyl acetate fraction had the strongest antioxidant activity, with good ability to scavenge DPPH and ABTS free radicals, and had certain reduction ability. **CONCLUSION** The optimized method is stable, reliable and simple, which can be used for extraction and antioxidant activity determination of  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii* Rhizoma, and provides a basis for the further development of *Acori Tatarinowii* Rhizoma.

**KEYWORDS:** *Acori Tatarinowii* Rhizoma;  $\beta$ -asarone; antioxidant; orthogonal test; response surface

石菖蒲为天南星科植物, 来源于多年生草本植物石菖蒲的干燥根茎。其性辛、温, 味苦, 归心、胃经, 作为一种开窍醒脑药而被广为人知。石菖蒲具有开窍豁痰、醒神益智、化湿开胃等功效, 现代药理学研究表明石菖蒲对于中枢神经系统、心脑血管系统等方面的疾病有良好的治疗效

果。除此以外, 石菖蒲还具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤等药理作用<sup>[1-3]</sup>。有相关文献报道石菖蒲与相关药物配伍使用具有改善记忆力等功效, 其作用机制可能与石菖蒲抗氧化、清除自由基、降低细胞凋亡率等有关<sup>[4]</sup>。但石菖蒲抗氧化等药理作用方面的研究相对中枢神经系统而言并没有太深入。

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31900297); 燕岭优秀青年教师培养计划项目(YL20200210); 岭南师范学院红树林研究院开放课题资助(YBXM01); 粤西特色生物医药工程技术研究中心开放课题(2022K03)

**作者简介:** 严莹莹, 女 E-mail: 13923212104@163.com \*通信作者: 黄丽平, 女, 博士, 副教授 E-mail: xiaoyinlanlp@126.com

目前,石菖蒲挥发油的提取方法较多,主要有超临界萃取法、乙醇加热回流提取法、超声提取法、水蒸气蒸馏法等<sup>[5-8]</sup>。超临界萃取法需要特定设备且经济成本高,超声提取法需要长时间维持大功率设备的运转,成本稍高,水蒸气蒸馏法提取时间长。而乙醇加热回流提取法具有使用溶剂量小、溶剂可回收、重复利用、提取时间相对水蒸气蒸馏法较短、不需要特定设备等优点,同时为实际生产提供更多的选择。因此,本研究采用乙醇加热回流提取法对石菖蒲进行工艺优化,并对石菖蒲不同部位进行抗氧化活性检测,为石菖蒲进一步研究提供依据。

## 1 仪器、材料与试剂

L600-1 型高效液相色谱仪(北京普析通用仪器有限责任公司); BDS C<sub>18</sub> 分析柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(大连依利特分析仪器有限公司); DFY-500D 型摇摆式高速中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司); FB124 型内校天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); HH-4 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); SHZ-DⅢ型循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); N-1300 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); DLSB-5/20B 型低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司)。

$\beta$ -细辛醚对照品[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号:SJBJ4351;纯度 $\geq 99\%$ ]; DPPH 标准品(批号 507F022;纯度 $\geq 98\%$ ); ABTS 标准品(批号:20220807;纯度 $\geq 98\%$ )均购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇(色谱纯,天津四友精细化学品有限公司,批号:20220522);过硫酸钾(天津市百世化工有限公司,批号:20210619);维生素 C(广东华南药业集团有限公司,批号:200502);三氯乙酸、铁氰化钾(天津市永大化学试剂有限公司);甲酸(分析纯)、六水合三氯化铁均购自广东光华科技股份有限公司。

## 2 方法

### 2.1 样品预处理

石菖蒲药材经粉碎后过 65 目筛,得石菖蒲粉末。

### 2.2 加热回流法提取石菖蒲浸膏及供试品溶液的制备

称取石菖蒲粉末 10 g,置于圆底烧瓶中,按料液比加入一定量的乙醇溶液。在保持乙醇溶液微沸的条件下,按单因素试验、正交试验以及响应面试验方案进行  $\beta$ -细辛醚提取量的工艺优化,

得到醇提液后经过抽滤、减压浓缩,挥干浓缩液中剩余的乙醇溶液并晾干至恒重,得橙棕色的石菖蒲浸膏。

精密称取石菖蒲浸膏 0.1 g 置于 25 mL 棕色量瓶,加入甲醇定容,超声处理 5 min 后,补足减失的质量,放冷至室温,过 0.22 μm 针孔式滤膜,摇匀,即得供试品溶液。

### 2.3 石菖蒲 $\beta$ -细辛醚体外抗氧化活性评价

选取最优提取工艺条件提取石菖蒲  $\beta$ -细辛醚,将得到的石菖蒲浸膏加入适量蒸馏水后,超声处理至油状物完全冲散,得石菖蒲提取液。该溶液依次用石油醚、乙酸乙酯以及正丁醇萃取,分别得到石油醚、乙酸乙酯及正丁醇 3 种不同部位的提取物,减压浓缩并晾干至恒重后,称定提取物浸膏质量。以无水乙醇为溶剂,配制不同部位的样品溶液并以由无水乙醇配制的维生素 C 溶液为阳性对照品,且浓度均分别配制为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>。每个试验平行 3 组并测定其抗氧化能力。

**2.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定** 精密称定 DPPH 标准品 3.4 mg 装入 25 mL 棕色量瓶中,加入无水乙醇溶解并定容,超声溶解,补足减失质量,得到浓度为 0.136 mg·mL<sup>-1</sup> 的 DPPH 标准品溶液。移取 100 μL “2.3” 项下样品溶液以及阳性对照品溶液至 96 孔板中,加入 100 μL DPPH 标准品溶液,避光反应且静置一段时间后,于 517 nm 波长处测定其吸光度值<sup>[9]</sup>。按以下公式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\% \quad (1)$$

公式中  $A_i$  为 DPPH 与样品的吸光度值;  $A_j$  为无水乙醇和样品的吸光度值;  $A_c$  为 DPPH 与无水乙醇的吸光度值。

**2.3.2 ABTS 自由基清除能力的测定** 精密称定 ABTS 标准品 192 mg 以及 99 mg 的 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 粉末分别装入 50 mL 棕色量瓶中,用蒸馏水定容分别制成浓度为 7.000 mmol·L<sup>-1</sup> 的 ABTS 标准品溶液以及 7.350 mmol·mL<sup>-1</sup> 的 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 溶液,将两者混匀,并在室温条件下避光反应 12 h,得 ABTS 工作液。在使用 ABTS 工作液之前,用 PBS 缓冲液将工作液稀释至在 734 nm 波长处测定的吸光度值为 0.7±0.05。稀释后分别取不同浓度的样品溶液、维生素 C 溶液 40 μL 以及 160 μL 的 ABTS 工作液

于 96 孔板中, 避光反应 10 min, 于 734 nm 波长处测定吸光度值, 平行测定 3 次, 取平均值<sup>[10-11]</sup>。按公式 (2) 计算 ABTS 自由基清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率(\%)} = [1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\% \quad (2)$$

公式中  $A_i$  为 ABTS 与样品的吸光度值;  $A_j$  为无水乙醇和样品的吸光度值;  $A_c$  为 ABTS 与无水乙醇的吸光度值。

**2.3.3  $\text{Fe}^{3+}$ 还原力的测定** 参考文献 [12-13] 并稍作调整, 分别吸取 2 mL 不同浓度的样品溶液加入西林瓶中, 向每个西林瓶中分别加入 2 mL PBS 缓冲液 (浓度为  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 为 7.4) 以及 2 mL 1% 的铁氰化钾溶液, 混匀后置于  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴 20 min, 结束水浴后迅速置于冰水浴中冷却终止反应, 再向每个西林瓶中加入 2 mL 10% 的三氯乙酸溶液, 混合均匀后, 各取 2 mL 混合后溶液置于 5 个西林瓶中, 并向其中各加入 2 mL 蒸馏水及 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁溶液, 室温静置 10 min 后得样品溶液。于 700 nm 处测样品溶液的吸光度值并以维生素 C 溶液作为对照。样品溶液的吸光度值越大, 则其还原力越强。

## 2.4 数据处理

Design-Expert 12 用于响应面模型拟合、数据处理及显著性分析, Origin 2018 用于图表绘制及统计分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 方法学考察

**3.1.1 色谱条件** BDS  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 以甲醇-0.1% 甲酸 (55 : 45) 为流动相等度洗脱; 柱温箱温度为  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 流速为  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 进样量为  $20 \mu\text{L}$ 。此条件下对照品以及供试品色谱图见图 1。

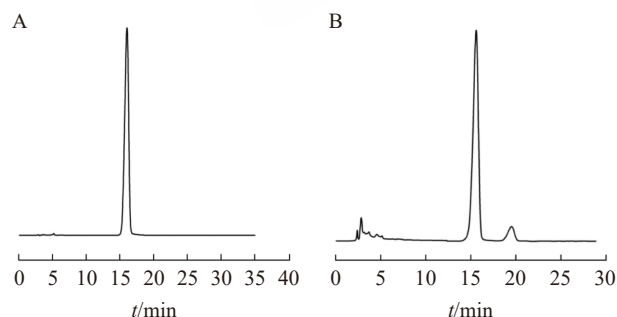


图 1  $\beta$ -细辛醚对照品 (A) 和供试品 (B) 高效液相色谱图  
Fig. 1 HPLC chromatogram of  $\beta$ -asarone control (A) and test sample (B)

**3.1.2  $\beta$ -细辛醚标准曲线的绘制** 依据陈龙梗等<sup>[13]</sup>的方法并进行适当调整, 配制  $\beta$ -细辛醚浓度为  $0.854 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液, 取  $0.1 \text{ mL}$  对照品溶液, 加入甲醇, 依次稀释 0, 5, 10, 15, 20, 25 倍, 于  $250 \text{ nm}$  处测定其峰面积。以峰面积积分值 ( $Y$ ) 为纵坐标,  $\beta$ -细辛醚的质量浓度 ( $X$ ) 为横坐标, 得  $\beta$ -细辛醚回归方程为  $Y=7\times 10^7 X+533\ 729$  ( $r=0.999\ 5$ ), 结果表明  $\beta$ -细辛醚在  $0.0341\ 6\sim 0.854\ 0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性关系良好。

**3.1.3 仪器精密度试验** 精密吸取同一份  $\beta$ -细辛醚对照品溶液  $20 \mu\text{L}$ , 注入 HPLC 中, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 得到  $\beta$ -细辛醚浓度的 RSD 值为 1.17%, 结果表明该仪器精密度良好。

**3.1.4 稳定性试验** 精密吸取同一份  $\beta$ -细辛醚供试品溶液  $20 \mu\text{L}$ , 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 并按 “3.1.1” 项下色谱条件测定峰面积, 得到  $\beta$ -细辛醚浓度的 RSD 值为 1.62%, 结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

**3.1.5 重复性试验** 按 “2.2” 项下的方法制备供试品并精密称取同一份供试品  $0.1 \text{ g}$ , 平行配制供试品溶液 6 份, 测定峰面积, 得到  $\beta$ -细辛醚浓度的 RSD 值为 1.97%, 结果表明该方法重复性良好。

**3.1.6 加样回收率试验** 在已知  $\beta$ -细辛醚含量的条件下, 向 6 份供试品溶液中分别加入低、中、高 (对照品浓度分别为 60%, 80%, 100%) 含量的  $\beta$ -细辛醚对照品溶液后, 按供试品溶液制备的方法制得 6 份加标样品溶液并进行测定, 计算加标样品溶液中  $\beta$ -细辛醚的含量, 结果见表 1。

表 1  $\beta$ -细辛醚加样回收率试验结果

Tab. 1 Result of recovery rate of  $\beta$ -asarone

组别	样品含量/ mg	测得量/ mg	加入量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
高浓度	0.149 2	0.292 2	0.148 6	96.25	99.32	2.17
	0.183 2	0.363 2	0.182 8	98.53		
	0.166 2	0.327 7	0.165 7	97.39		
中浓度	0.232 3	0.464 1	0.232 1	99.86		
	0.183 2	0.366 7	0.182 9	100.33		
	0.207 8	0.415 4	0.207 5	100.10		
低浓度	0.146 3	0.288 7	0.146 0	97.51		
	0.218 1	0.443 6	0.217 9	103.44		
	0.182 2	0.366 2	0.182 0	100.48		

### 3.2 石菖蒲 $\beta$ -细辛醚提取量计算

石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量计算见公式 (3)。

$$\text{石菖蒲}\beta\text{-细辛醚提取量}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = (cV\cdot m_1)/(m_2\times 1\ 000) \quad (3)$$

$c$  表示  $\beta$ -细辛醚浓度, 单位为  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $V$  表示溶液体积, 单位为  $\text{mL}$ ;  $m_1$  表示醇提物浸膏质量, 单位为  $\text{g}$ ;  $m_2$  表示石菖蒲粉末质量, 单位为  $\text{g}$ 。

### 3.3 单因素考察

**3.3.1 乙醇浓度对  $\beta$ -细辛醚提取量的影响** 确定料液比为 1:16, 提取时间为 2 h, 探究乙醇浓度分别为 70%, 80%, 95%, 100% 对石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的影响。结果显示, 乙醇浓度在 70%~100% 可见  $\beta$ -细辛醚提取量呈现上升趋势, 见图 2。可能的原因是随着乙醇浓度的升高,  $\beta$ -细辛醚的溶出速率加快。因此从  $\beta$ -细辛醚提取量、绿色化学、经济等各方面因素考虑, 正交试验以及响应面试验乙醇浓度均选择 70%, 80%, 95%。

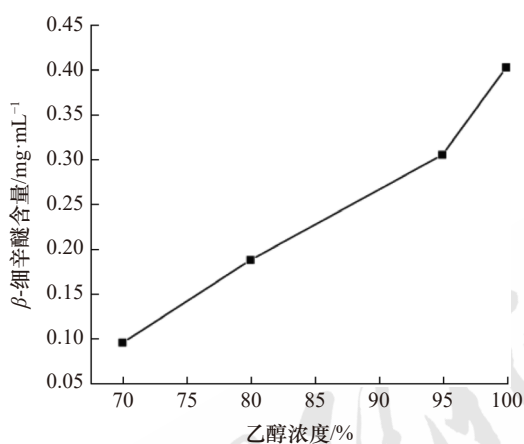


图 2 乙醇浓度对石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的影响

**Fig. 2** Effect of ethanol concentration on the extraction amount of  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii Rhizoma*

**3.3.2 料液比对  $\beta$ -细辛醚提取量的影响** 确定乙醇体积分数为 95%, 提取时间为 2 h, 探究料液比分别为 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:22  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的影响。

当料液比由 1:14  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  增加至 1:18  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,  $\beta$ -细辛醚提取量呈上升的趋势, 并在料液比为 1:18  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时达到峰值 0.488 7  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 当料液比 > 1:18  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时  $\beta$ -细辛醚提取量呈现下降趋势。可能原因是石菖蒲粉末需要一定量的溶剂才能充分提取  $\beta$ -细辛醚, 但当料液比持续增大时, 一方面使得单位体积的  $\beta$ -细辛醚含量降低且易使杂质溶出, 另一方面溶剂使用过多造成浪费的现象, 不符合绿色化学理念且后续处理繁杂。因此, 正交试验以及响应面试验料液比选择 1:16, 1:18, 1:20  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果见图 3。

**3.3.3 提取时间对  $\beta$ -细辛醚提取量的影响** 确定

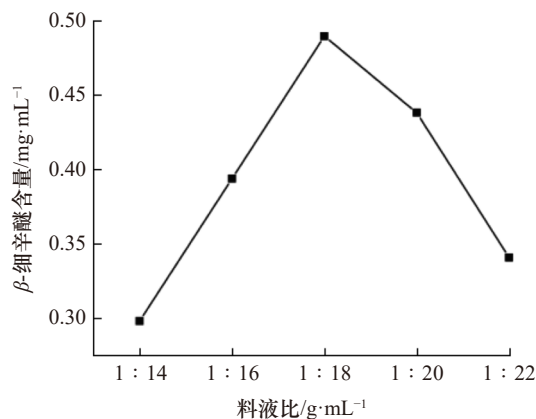


图 3 料液比对石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的影响

**Fig. 3** Effect of solid-liquid ratio on the extraction amount of  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii Rhizoma*

乙醇体积分数为 95%, 料液比为 1:16, 考察提取时间分别为 1, 2, 3, 4 h 对石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的影响。结果见图 4。

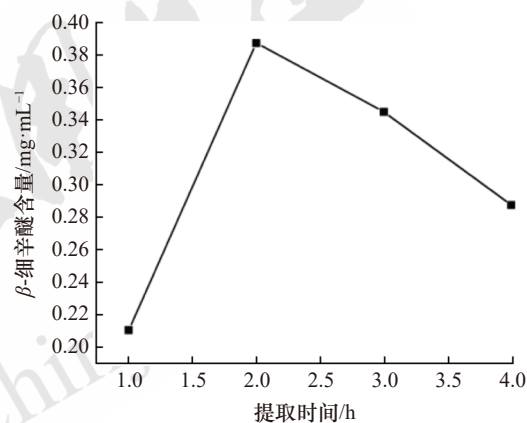


图 4 提取时间对石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的影响

**Fig. 4** Effect of extraction time on the extraction amount of  $\beta$ -asarone from *Acori Tatarinowii Rhizoma*

当提取时间在 1~2 h, 提取量随着提取时间的增加而增加; 当提取时间 > 2 h,  $\beta$ -细辛醚提取量在逐渐减少。这其中可能的原因是适宜的提取时间能加速  $\beta$ -细辛醚的溶出, 当提取时间 > 2 h, 长时间的加热回流可能会使其他溶质溶出而导致  $\beta$ -细辛醚提取量减少。因此正交试验以及响应面试验提取时间选择 1, 2, 3 h。

### 3.4 正交试验优化石菖蒲提取工艺

**3.4.1 正交试验的方案设计** 以乙醇浓度 (A)、料液比 (B) 以及提取时间 (C) 为考察因素, 选择三因素三水平正交表, 因素水平表见表 2。将正交试验所得的供试品溶液按“3.1.1”项下色谱条件测定其峰面积并计算  $\beta$ -细辛醚提取量。试验设计见

表2, 试验结果见表3, 方差分析见表4。

表2 正交试验因素与水平表

Tab. 2 Orthogonal test factors and level table

A乙醇浓度/%	B料液比/g·mL <sup>-1</sup>	C提取时间/h
70	1:16	1
80	1:18	2
95	1:20	3

表3 正交试验结果及极差分析

Tab. 3 Orthogonal test results and range analysis

编号	因素				$\beta$ -细辛醚提取量/mg·g <sup>-1</sup>
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.340 7
2	1	2	2	2	0.398 2
3	1	3	3	3	0.373 9
4	2	1	2	3	0.420 4
5	2	2	3	1	0.465 2
6	2	3	1	2	0.423 9
7	3	1	3	2	0.712 9
8	3	2	1	3	0.740 3
9	3	3	2	1	0.852 4
k <sub>1</sub>	0.371	0.491	0.502	0.553	
k <sub>2</sub>	0.436	0.535	0.557	0.512	
k <sub>3</sub>	0.769	0.550	0.517	0.512	
R	0.398	0.059	0.055	0.041	

表4 正交方差分析表

Tab. 4 Table of orthogonal analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	0.273	2	91.000	19.000	*
B	0.006	2	2.000	19.000	
C	0.005	2	1.667	19.000	
误差	0.000	2			

由表3可知, 在直观分析中各因素对试验结果影响的主次顺序为 A>B>C, 且 A<sub>3</sub>>A<sub>2</sub>>A<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>>B<sub>2</sub>>B<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>>C<sub>1</sub>>C<sub>3</sub>; 由表4中的方差分析可知, 因素A在 $\alpha=0.05$ 时, 对实验结果有显著性影响; 因素B、C则对实验结果无显著性影响, 这其中的原因可能是实验设计的因素水平间距不大, 所得到的结果差异不显著<sup>[14]</sup>。因此, 为了最大限度地提取 $\beta$ -细辛醚, 选取各因素水平组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, 即乙醇体积分数为95%, 料液比为1:20, 提取时间为2 h。

3.4.2 正交试验的验证 在乙醇体积分数为95%, 料液比为1:20 g·mL<sup>-1</sup>, 提取时间为2 h条件下进行正交最佳工艺的验证。取10 g石菖蒲粉末3份, 进行验证。3组验证试验 $\beta$ -细辛醚提取量

的均值为0.851 3 mg·g<sup>-1</sup>(RSD=0.48%), 与预估值(0.852 4 mg·g<sup>-1</sup>)接近, 说明该工艺稳定。

### 3.5 响应面法优化石菖蒲提取工艺

3.5.1 响应面试验 在单因素试验的基础上, 确定以 $\beta$ -细辛醚提取量(mg·g<sup>-1</sup>, Y)为指标, 选取X<sub>1</sub>(乙醇浓度)、X<sub>2</sub>(料液比)、X<sub>3</sub>(提取时间)作为考察因素, 采用Design-Expert 12软件中Box-Behnken设计三因素三水平的响应面试验, 经拟合后确定最优的石菖蒲 $\beta$ -细辛醚提取工艺。试验因素水平表见表5, 试验安排见表6。

表5 Box-Behnken设计因素与水平表

Tab. 5 Box-Behnken design factors and level table

水平	因素		
	X <sub>1</sub> 乙醇浓度/%	X <sub>2</sub> 料液比/g·mL <sup>-1</sup>	X <sub>3</sub> 提取时间/h
-1	70	1:16	1
0	82.5	1:18	2
1	95	1:20	3

表6 响应面设计及石菖蒲 $\beta$ -细辛醚的提取量

Tab. 6 Response surface design and extraction volume of  $\beta$ -asaricin from *Acori Tatarinowii* Rhizoma

乙醇浓度/%	料液比/g·mL <sup>-1</sup>	提取时间/h	$\beta$ -细辛醚提取量/mg·g <sup>-1</sup>
-1	-1	0	0.348 1
1	-1	0	0.835 8
-1	1	0	0.305 7
1	1	0	0.950 3
-1	0	-1	0.387 5
1	0	-1	0.868 0
-1	0	1	0.456 9
1	0	1	0.872 4
0	-1	-1	0.317 4
0	1	-1	0.471 0
0	-1	1	0.342 4
0	1	1	0.446 0
0	0	0	0.549 2
0	0	0	0.482 9
0	0	0	0.544 1
0	0	0	0.568 9
0	0	0	0.502 4

3.5.2 响应面试验结果 按照Box-Behnken设计的试验方案以及“2.2”项下的方法进行石菖蒲提取物供试品溶液的制备并以 $\beta$ -细辛醚提取量(mg·g<sup>-1</sup>, Y)为评价指标。将因素X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>(自变量)以及各水平对评价指标Y(因变量)进行二次多项式回归拟合。分析结果显示,  $\beta$ -细辛醚提取量的目标函数为 $Y=0.001\ 069X_1^2-0.086\ 60X_2^2-0.050\ 38X_3^2+0.003\ 138X_1X_2-0.001\ 300X_1X_3-0.014\ 18X_2X_3-0.181\ 8X_1$

+1.370 3X<sub>2</sub>+0.446 4X<sub>3</sub>+0.380 0。

**3.5.3 响应面试验结果分析** 石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的方差结果见表 7。对于石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量, 该模型的  $P < 0.05$ , 说明其具有统计学意义; 失拟差  $P$  值为  $0.145 3 > 0.05$ , 表明失拟项不显著, 说明方程模型与试验拟合良好, 试验误差较小, 能较好地反映于石菖蒲  $\beta$ -细辛醚的提取量。3 个因素并不是呈线性关系, 由方差分析可得出对于石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量影响大小顺序为  $X_1$ (乙醇浓度)  $> X_2$ (料液比)  $> X_3$ (提取时间)。

各因素之间还存在交互作用, 从图 5 可知乙醇浓度与料液比和提取时间之间的交互作用的响应面坡度变化更为陡峭, 对石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的影响较大;  $X_2X_3$  响应面 3D 图的坡度平缓, 趋向球面, 说明两者交互作用较弱<sup>[15-17]</sup>, 对石菖蒲  $\beta$ -细辛醚提取量的影响较小。

**3.5.4 优化工艺的验证** 称取石菖蒲粉末 10 g, 以响应面法得到得的最佳优工艺 (乙醇浓度为 95%、料液比为 1 : 20 g·mL<sup>-1</sup>、提取时间为 2.5 h) 为条件进行 3 次平行试验。得到  $\beta$ -细辛醚

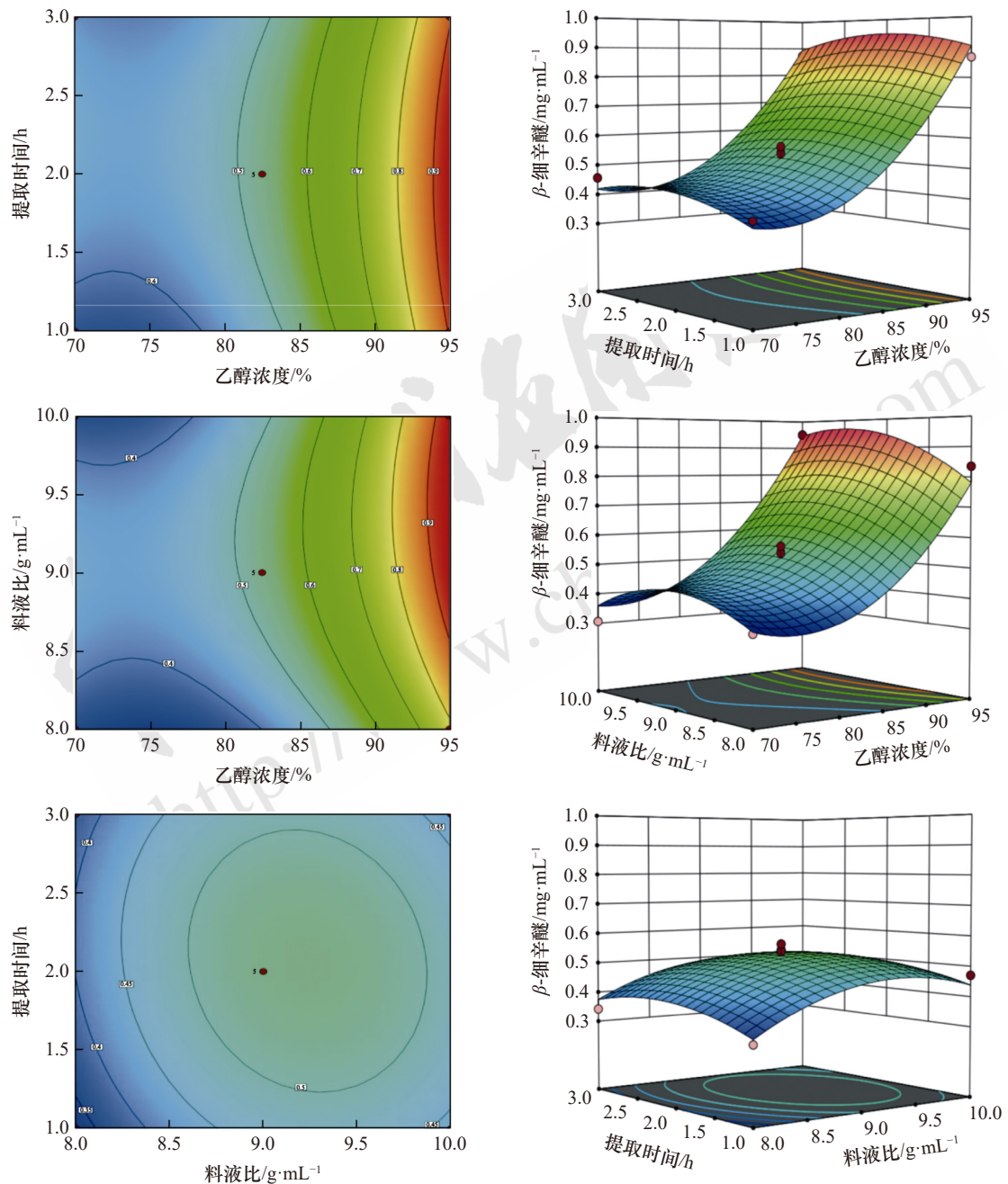


图 5 两因素之间交互对  $\beta$ -细辛醚提取量的影响的等高线图和 3D 图

Fig. 5 Contour plots and 3D plots of the effect of the interaction between the two factors on the amount of  $\beta$ -asarone extraction

表 7  $\beta$ -细辛醚提取量响应面试验结果方差分析

Tab. 7 Variance analysis of response surfaces test results of extraction volumn of  $\beta$ -asarone

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
Model	0.689 2	9	0.076 6	31.11	<0.000 1
$X_1$	0.514 3	1	0.514 3	209.28	<0.000 1
$X_2$	0.014 1	1	0.014 1	5.74	0.047 7
$X_3$	0.000 8	1	0.000 8	0.33	0.583 8
$X_1X_2$	0.006 2	1	0.006 2	2.50	0.157 5
$X_1X_3$	0.001 1	1	0.001 1	0.43	0.533 0
$X_2X_3$	0.000 8	1	0.000 8	0.33	0.585 3
$X_1^2$	0.117 5	1	0.117 5	47.83	0.000 2
$X_2^2$	0.031 6	1	0.031 6	12.85	0.008 9
$X_3^2$	0.010 7	1	0.010 7	4.35	0.075 5
残差	0.017 2	7	0.002 5		
失拟差	0.012 1	3	0.004 0	3.20	0.145 3
纯误差	0.005 1	4	0.001 3		
总离差	0.704 6	16			

提取量为  $0.915 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (RSD=0.72%), 与预测值 ( $0.918 7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 非常接近, 说明此最优工艺稳定。

### 3.6 正交试验与响应面试验的比较

正交试验得到的最佳工艺是乙醇浓度为 95%、料液比  $1:20 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、提取时间 2.0 h,  $\beta$ -细辛醚提取量的预测值为  $0.852 4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 响应面法获得的最佳提取条件为 95% 乙醇浓度、料液比为  $1:20 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、提取时间为 2.5 h, 此时  $\beta$ -细辛醚预测提取量为  $0.915 5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 比正交试验高出  $0.671 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 但差异不显著。

正交试验和响应面分析法是基于 2 种不同的模型来对试验水平进行分析的方法, 正交试验考察各因素不同水平之间的最佳组合, 不能顾及水平组合之外, 范围相对来说较小, 且分析出的数据精度较低, 预测出的结果相对误差较大<sup>[18-19]</sup>。响应面法通过数学模型构建二次回归方程, 该回归方程精确度高, 能够合理预测出最佳的有效结果。与正交试验相比, 响应面分析法不仅能够分析试验设置的水平内的最佳组合, 还能找出除试验设置水平以外的其他最佳组合。因此, 综合比较之下得出响应面法优化出的石菖蒲  $\beta$ -细辛醚最优提取工艺较正交试验得出的结果更优。

正交试验与响应面分析法得出的最优工艺, 除提取时间外, 乙醇浓度以及料液比均一致。正交设计最佳工艺条件中提取时间为 2 h, 而响应面则是 2.5 h。因此在考虑  $\beta$ -细辛醚提取量与经济成本的情况下, 采用响应面法得出的优选工艺, 即乙醇浓度为 95%, 料液比为  $1:20 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 提取

时间为 2.5 h。

## 3.7 石菖蒲提取物不同部位的抗氧化活性分析

### 3.7.1 DPPH 自由基清除能力的测定

**3.7.1.1 DPPH 溶液稳定性试验** 在 DPPH 标准品溶液与石菖蒲提取物制备而得的供试品溶液以 1:1 的比例混合均匀后, 取其中 200  $\mu\text{L}$  加入到 96 孔板中, 测定其吸光度值 (A) 与时间 (t) 的关系, 结果见图 6。

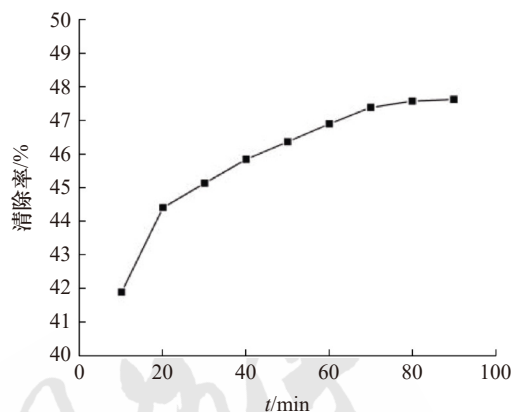


图 6 石菖蒲提取物与 DPPH 反应时间曲线

Fig. 6 Reaction time curve of Acori Tatarinowii Rhizoma extracts and DPPH

由图 6 可知清除率在 20 min 内上升较快, 在 20~80 min 内清除率上升较为缓慢, 当时间在 90 min 时清除率基本保持不变。因此测定时间选择为 90 min。

**3.7.1.2 DPPH 自由基清除能力的结果分析** 采用 DPPH 法对石菖蒲由不同极性溶剂得到的不同部位进行测定, 结果显示不同部位的提取物及维生素 C 阳性对照在  $0.2\sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内均呈上升趋势, 且呈现出量效关系。乙酸乙酯部位在  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时清除能力达到最高, 达到维生素 C 的 82.41%, 且乙酸乙酯部位的清除能力优于其他不同部位。由徐飞飞等<sup>[3]</sup>通过研究石菖蒲主要成分  $\beta$ -细辛醚的药理学作用及机制及倪刚等<sup>[20]</sup>对乙酸乙酯部位化学成分的研究, 发现  $\beta$ -细辛醚具有抗氧化活性且乙酸乙酯部位中含有  $\beta$ -细辛醚。表明  $\beta$ -细辛醚可能是其中主要的抗氧化成分之一。由不同极性溶剂萃取得到的石菖蒲提取物的 DPPH 清除率见图 7。

**3.7.2 ABTS 自由基清除能力的测定** 通过 ABTS 法对石菖蒲不同部位进行测定。由图 8 可知, 乙酸乙酯部位在浓度为  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时对 ABTS 的清除率已趋于平缓, 但在浓度为  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时清除能力达到维生素 C 的 86.70%, 石油醚部位、正丁醇部位、乙醇部位依次达到维

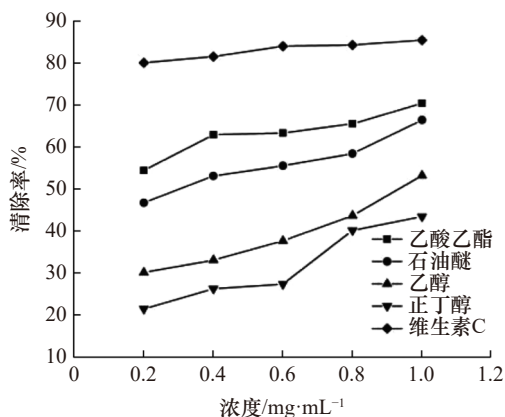


图7 维生素C与石菖蒲不同极性溶剂萃取物DPPH自由基清除率随浓度变化趋势

Fig. 7 DPPH free radical scavenging rate of Vc and different polar solvents of Acori Tatarinowii Rhizoma extracts changes with concentration

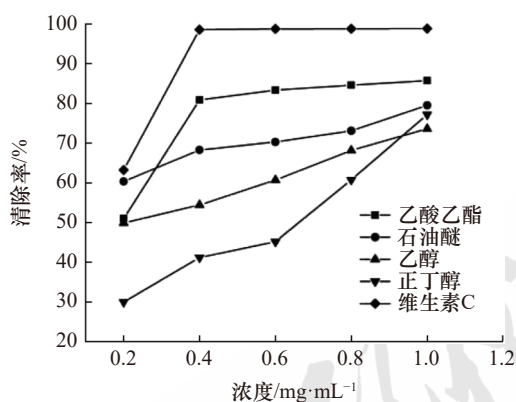


图8 维生素C与石菖蒲不同极性溶剂萃取物ABTS自由基清除率随浓度变化趋势

Fig. 8 ABTS radical scavenging rate of Vc and different polar solvents of Acori Tatarinowii Rhizoma extracts changes with concentration

生素C的80.36%，78.02%，74.40%，表明 $\beta$ -细辛醚可能是主要的抗氧化活性成分之一。

3.7.3  $Fe^{3+}$ 还原能力的测定 不同极性溶剂石菖蒲提取物与 $Fe^{3+}$ 还原能力的关系见图9。

由图9可知随着不同部位提取物浓度的增加，乙酸乙酯部位、石油醚部位、乙醇部位、正丁醇部位及维生素C阳性对照的还原能力都在逐渐增强；在同一浓度下，乙酸乙酯部位的还原能力最高。在 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下，乙酸乙酯部位的吸光值为1.15，达到维生素C的86.08%。这表明乙酸乙酯部位放出的电子更多，具备更强的还原能力。

#### 4 讨论

随着对石菖蒲的深入研究，石菖蒲中细辛醚类的最佳提取工艺及其众多的药理作用受到越来越

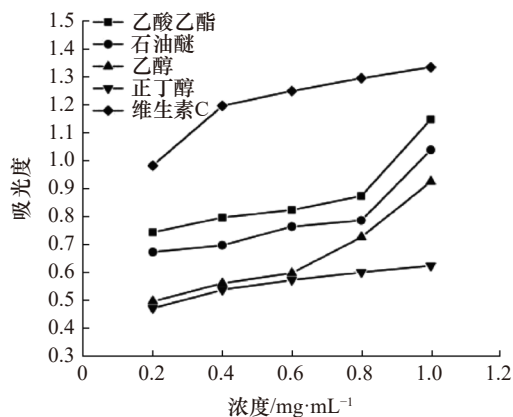


图9 维生素C与石菖蒲不同极性溶剂萃取物 $Fe^{3+}$ 还原能力随浓度变化趋势

Fig. 9  $Fe^{3+}$  reducing ability of Vc and different polar solvents of Acori Tatarinowii Rhizoma extracts changes with concentration

越多人的关注，因此本研究为进一步开发石菖蒲，利用正交设计和响应面法优选石菖蒲最佳提取工艺，并研究石菖蒲不同部位之间的体外抗氧化活性。

有效成分的提取量会受到提取方式、提取所用的溶剂、提取时间、料液比等各种因素的影响。杨丽霞等<sup>[5]</sup>利用超声波辅助提取石菖蒲中的 $\beta$ -细辛醚的工艺表明，采用石油醚提取，且料液比为 $0.08\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、超声时间为36.56 min、超声功率为181.64 W时，挥发油中 $\beta$ -细辛醚平均含量为 $23.44\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。崔清华等<sup>[21]</sup>利用水蒸气蒸馏法提取石菖蒲中的挥发油的工艺表明工艺条件为加7.6倍量蒸馏水浸泡2.7 h，提取10.3 h。在此条件下 $\beta$ -细辛醚提取量约为 $1.55\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。本实验中，石菖蒲 $\beta$ -细辛醚最佳提取工艺为乙醇浓度95%，料液比 $1:20\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，提取时间2.5 h。在此条件下石菖蒲 $\beta$ -细辛醚提取量为 $0.9187\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

采用超声波辅助提取石菖蒲 $\beta$ -细辛醚具有提取时间短、提取效率高、不需要加热等优点，但石油醚易挥发，且在实际生产中需要在一定时间内持续性维持大功率设备的运转，成本较高；相对于超声波辅助提取法，水蒸气蒸馏法提取石菖蒲 $\beta$ -细辛醚具有物料价廉易得、操作简单等优点，但提取时间过长，易增大石菖蒲中杂质的溶出率，影响 $\beta$ -细辛醚的提取量。本实验相较于超声波辅助提取法，石菖蒲 $\beta$ -细辛醚提取时间相对较长，但具有操作简便，成本低等优点，为实际生产提供更多的选择。



本实验是根据正交试验所得的最佳条件进一步进行响应面优化设计,通过分析3个因素所引起数据的变化与误差引起的偏差,推断各因素的显著性,从响应面3D图的弯曲程度和方差分析可知,乙醇浓度对提取量有很显著的影响,料液比影响较为显著,提取时间有影响,最终石菖蒲 $\beta$ -细辛醚的提取量为 $0.9187\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,低于杨丽霞等<sup>[5]</sup>利用响应面法基于超声波辅助提取 $\beta$ -细辛醚得率( $23.44\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )。主要原因有提取方式的差异,其次推测可能是由于选择的石菖蒲材料生长年限的不同。生长年份的不同对于有效成分在药材中的积累有很大的差异,因此最终优化的提取方式及提取条件与实际生产过程需求需要进一步相结合。

抗氧化作用是石菖蒲一种重要的药理活性,本实验通过测定石菖蒲不同部位清除DPPH自由基、ABTS自由基的能力以及还原能力来评价其体外抗氧化能力,结果表明石菖蒲不同部位提取物的抗氧化能力均较强,其中乙酸乙酯部位的抗氧化活性最强。

## REFERENCES

- [1] YANG H N, WU S H, LI H B, et al. Research progress of calamus and prediction analysis of quality markers[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(13): 1213-1219.
- [2] MEI T T, YAN J, CHEN J. Overview of active ingredients and pharmacological effects of *Acorus tatarinowii*[J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息), 2022, 39(4): 77-80,89.
- [3] XU F F, LI Q Q, CHU S F, et al. Research progress on the neuropharmacological effects and mechanisms about the main components  $\alpha$ - and  $\beta$ -asarone in volatile oils of *Acorus tatarinowii* Schott[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32(11): 1969-1979.
- [4] LI X Q, ZHAO J Q, TIAN Y J, et al. Memory-improving substances basis and mechanism of Polygalae Radix, Acori Tatarinowii Rhizoma and its couplet medicines[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(3): 190-199.
- [5] YANG L X, WANG Y L. Optimization of ultrasonic extraction of volatile oil from *Acorus Tatarinowii* Rhizoma by central composite design-response surface method[J]. Chem Reag(化学试剂), 2020, 42(6): 704-708.
- [6] TAI J, ZOU J B, SHI Y J, et al. GC-MS analysis of extraction kinetics of volatile oil from Acori Tatarinowii Rhizoma by steam distillation[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(1): 59-66.
- [7] CHENG L, LIU S, SONG X L, et al. Study on extraction technology of volatile oil from *Acorus tatarinowii-Liquidambar orientalis* by supercritical carbon dioxide extraction[J]. Asia Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2018, 14(4): 28-31.
- [8] YANG Y F, ZHU Y P, XIAO M Y, et al. Scavenging effect of different extracts of the leaf of *Siraitia grosvenorii* on free radical DPPH[J]. China Pharm(中国药房), 2012, 23(19): 1729-1730.
- [9] LI H Q, CAO Y X, HUANG F J. Comparative study of DPPH and ABTS+ methods on the antioxidant synergistic effects of polyphenols, flavonoids and polysaccharides of *Dracocephalum rupestre* hance[J]. J Shanxi Agric Univ(山西农业大学学报:自然科学版), 2022, 42(3): 98-105.
- [10] LIANG W N, LI H C, ZHONG C, et al. Optimization of high-pressure crushing extraction process of *Astragalus* polysaccharides and study of its *in vitro* antioxidant activity[J]. China Pharm(中国药业), 2022, 31(11): 28-32.
- [11] YANG H W, PENG F R. Optimization of extraction process of chlorogenic acid from *Lonicera japonica* with cellulase and its antioxidative activity[J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2022, 43(4): 64-69.
- [12] PU Y W, WANG J Q. Study on antioxidative activities of maca polysaccharides[J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2009, 37(28): 13803-13805.
- [13] CHEN L G, YANG Q S, YANG S, et al. Content determination of  $\alpha$ -asarone and  $\beta$ -asarone in *Acorus tatarinowii* Schott grown in Anhui Province by HPLC[J]. J Gansu Univ Chin Med(甘肃中医药大学学报), 2017(5): 15-18.
- [14] JI B, LI L, RUAN J H, et al. Contrast optimization of water extracting technology parameters of Shuage Tongfeng Granules based on BP neural network and orthogonal test combined with G1-entropy weight method[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2022, 53(4): 1051-1058.
- [15] PAN P C, CHEN X F, CHEN W, et al. Optimization of the compound herba lysimachiae extraction process based on orthogonal experiment and response surface method[J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2020, 38(1): 27-34.
- [16] KE C M, LI S H, HU J P, et al. Optimization of the extraction technology of total flavone from *Bidens bipinnata* L. by response surface analysis[J]. Continuing Med Educ(继续医学教育), 2022, 36(3): 109-112.
- [17] YANG J L, CHEN J D, HUA L P, et al. Optimization of preparation process of Xiaoyao Powder by orthogonal design and Box-Behnken response surface[J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2022, 37(3): 285-291.
- [18] CHEN Q, WANG J F, CAO R, et al. Sterol extracting from *Taraxacum mongolicum* root by the optimal orthogonal test and response surface methodology[J]. J Shandong Agric Univ Nat Sci Ed(山东农业大学学报:自然科学版), 2022, 53(6): 913-917.
- [19] DENG X Y, LIU M X, SHENG Y C, et al. Comparison of orthogonal test and response surface methodology for optimization of extraction conditions of flavonoids from ginkgo callus[J]. Appl Chem Ind(应用化工), 2015, 44(11): 2148-2151.
- [20] NI G, YU D Q. Chemical constituents from rhizomes of *Acorus tatarinowii*[J]. China J Chin Meter Med(中国中药杂志), 2013, 38(4): 569-573.
- [21] 崔清华, 王莹, 侯林, 等. 响应面分析法优选石菖蒲挥发油提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 62-65.

收稿日期: 2022-09-28

(本文责编: 陈怡心)