

石菖蒲挥发油纤维素酶辅助提取工艺优化及抑制 GABA-T 活性成分研究

Optimization of cellulase-assisted extraction of volatile oil from *Acorus tatarinowii* and study on its inhibitory components on GABA-T activity

方成维 麻秀萍 陈亮 李倩

FANG Chengwei MA Xiuping CHEN Liang LI Qian

(贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025)

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China)

摘要:目的: 打开制约中药中 GABA-T 配体快速筛选方法的瓶颈。方法: 建立中空纤维配体垂钓方法筛选石菖蒲挥发油中 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T)抑制成分。在响应面法优化石菖蒲挥发油酶辅助提取工艺基础上, 将 GABA-T 溶液注射入中空纤维的管腔中, 作为“诱饵”垂钓出石菖蒲挥发油中的潜在活性成分, 并验证其 GABA-T 抑制活性。结果: 石菖蒲挥发油的最佳提取工艺为纤维素酶添加量 3 165 U/g、酶解时间 1.8 h、酶解温度 45 $^{\circ}\text{C}$, 此时石菖蒲挥发油收率可达到 2.56%, 最终鉴定出 51 个化合物, 主要包括烯烃、醇类、醚类、酮类、酚类、酸类等。将 3 mg/mL 的 GABA-T 溶液注射入 U 型中空纤维管的空腔, 共孵育 160 min, 封口后置于石菖蒲挥发油中进行 60 kHz 超声垂钓 20 min, 联合 LCMS-IT-TOF 系统进行分析, 成功筛选出的 α -细辛醚对 GABA-T 活性有浓度依赖性的抑制作用, IC_{50} 为 57.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论: 建立的中空纤维配体垂钓方法稳定可行、操作简便。

关键词: 石菖蒲; 中空纤维; 配体垂钓; γ -氨基丁酸转氨酶

Abstract: Objective: This study aimed to establish a hollow fiber ligand fishing method for screening γ -Aminobutyrate transaminase (GABA-T) inhibitory component from the volatile oil of *Acorus tatarinowii*. **Methods:** Based on optimizing the enzyme assisted extraction process of volatile oil from *A. tatarinowii* using response surface methodology, GABA-T solution was injected into the hollow fiber lumen and used as a "bait" to fish out the potential active components in *A. tatarinowii* volatile oil, and its GABA-T inhibitory activity was

verified. **Results:** The results showed that the optimum extraction conditions of volatile oil from *A. tatarinowii* were as follows: cellulase content 3 165 U/g, enzymolysis time 1.8 h, enzymolysis temperature 45 $^{\circ}\text{C}$, and the yield of volatile oil from *A. tatarinowii* was 2.56%. Finally, 51 compounds were identified, mainly including olefins, alcohols, ethers, ketones, phenols, acids, and other compounds. 3 mg/mL of GABA-T solution was injected into the cavity of the U-shaped hollow fiber tube, incubated for 160 min, sealed, and placed in the volatile oil of *A. tatarinowii* for ultrasonic (60 kHz) fishing for 20 min, and then analyzed with LCMS-IT-TOF system. Successfully filtered out α -Asarone has a concentration-dependent inhibitory effect on GABA-T activity, with an IC_{50} of 57.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **Conclusion:** The established hollow fiber ligand fishing method is stable, feasible, and easy to operate.

Keywords: *Acorus tatarinowii*; hollow fiber; ligand fishing; GABA transaminase

石菖蒲为天南星科植物石菖蒲(*Acorus tatarinowii* Schott)的根茎, 在中国主要分布于长江流域以南各省, 野生资源丰富^[1-2]。石菖蒲具有芳香气味, 是常用的中药材和香料, 也可应用于酒曲添加剂, 以挥发油类成分最具代表性^[3-4]。石菖蒲挥发油具有抗癫痫^[5]、保护神经^[6]、防治老年痴呆^[7]等药理活性, 其作用机制与抑制 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA transaminase, GABA-T)这一神经系统疾病关键靶点有关^[8-9]。

中药中 GABA-T 配体的快速筛选方法一直是 GABA-T 抑制剂开发的瓶颈。传统的天然药物化学的方法可以通过对石菖蒲中的化学成分逐一分离, 再分别进行活性测定来分析其 GABA-T 抑制活性, 该方法耗时长。高通量筛选技术由于大大提高了发现靶点酶的新配体速度而广受欢迎, 但采用该方法从复杂中药体系中筛选活性成分时,

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82160803); 贵州中医药大学博士启动基金(编号: [2019]58 号)

作者简介: 方成维, 女, 贵州中医药大学在读硕士研究生。

通信作者: 陈亮(1983—), 男, 贵州中医药大学讲师, 博士。

E-mail: chenliang8302@126.com

收稿日期: 2023-08-30 **改回日期:** 2024-04-02

易受到干扰而出现假阳性或假阴性的结果^[10]。近年来,带有纳米级侧壁微孔的中空纤维管因其具有简单、比表面积大,渗透路径短,富集率高等优点^[11-16],在样品预处理领域备受关注。基于中空纤维侧壁微孔允许小分子自由通过,而大分子受阻的结构特点,将中空纤维应用于以大分子酶为配体的活性成分筛选具有极大的可能性^[17-18]。

研究拟建立一种基于 GABA-T 的中空纤维配体垂钓技术的新方法,将 GABA-T 溶液注入中空纤维的管腔中,作为“诱饵”垂钓出传统药物提取物中的潜在活性成分,以期为中药中 GABA-T 抑制成分地发现提供新策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

石菖蒲:康美药业股份有限公司;

聚偏(二)氟乙烯中空纤维:壁厚 200 μm ,内径 650 μm ,孔径 0.2 μm ,天津膜天膜科技有限公司;

甲醇、乙腈:色谱纯,天津市康科德科技有限公司;

α -细辛醚:成都埃法生物科技有限公司;

对羟基苯甲醛:含量 $\geq 98\%$,山东科润生物化学有限公司;

α -酮戊二酸、GABA、 NAD^+ :生物纯,北京瑞泰生物技术有限公司;

无水硫酸钠、柠檬酸钠等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

GC/MS 联用仪:HP6890/5975C 型,美国安捷伦公司;

高效液相色谱离子阱飞行时间质谱联用仪:LCMS-IT-TOF 型,日本岛津公司;

分析天平:BT 25S 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

酸度计:pHs-2C 型,上海伟业仪器厂;

高速万能粉碎机:FW100 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

紫外分光光度计:UV 2310 II 型,上海天美科技仪器有限公司;

超声波发生器:CSF-IA 型,上海超声波仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 石菖蒲挥发油提取 取经粉碎、过筛后的石菖蒲粉末,精密称定,置于连有挥发油提取器的圆底烧瓶中,加入 32 倍体积蒸馏水,用柠檬酸缓冲液调节 pH 值,加入适量纤维素酶,在一定反应温度、时间下催化酶解后继续提取 4 h,加入少量无水硫酸钠,所得挥发油呈淡黄色,以比重瓶法测得石菖蒲挥发油密度为 1.072 1 g/mL,密封备用。

1.3.2 单因素试验 以纤维素酶添加量 2 500 U/g,酶解时间 1.5 h,酶解温度 48 $^{\circ}\text{C}$ 为初始条件进行单因素试验,考察纤维素酶添加量、酶解时间、酶解温度 3 个因素对石菖蒲挥发油收率的影响。

1.3.3 响应面试验 选择纤维素酶添加量、酶解时间、酶解温度为变量因素,以石菖蒲挥发油收率为指标,采用 Box-Behnken 设计石菖蒲挥发油提取的响应面试验。

1.3.4 石菖蒲挥发油 GC-MS 分析

(1) 色谱条件:参考文献[19-20]的方法并适当调整。色谱柱为 HP-5MS (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)弹性石英毛细管柱,初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,以 3.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 183 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 310 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,运行时间 72.7 min;汽化室温度 250 $^{\circ}\text{C}$;载气为高纯 He (99.999%);载气流量 1.0 mL/min,分流比 50:1,溶剂延迟时间 6 min。

(2) 质谱条件:离子源为 EI 源;离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$;四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$;电子能量 70 eV;发射电流 34.6 μA ;倍增器电压 1 729 V;接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$;质量范围 29~500 amu。

1.3.5 中空纤维配体垂钓试验 中空纤维配体垂钓的总体策略示意图如图 1 所示。将 20 根聚偏(二)氟乙烯中空纤维剪切成 15 cm 片段,分别用 50 mL 乙腈、甲醇、重蒸水浸泡清洗 15 min,室温晾干。将 3 mg/mL 的 GABA-T 溶液注入 U 型中空纤维管的空腔,共孵育 160 min,备用。将充有 GABA-T 的中空纤维管分别加热封口后,置于石菖蒲挥发油中于 60 kHz 下超声垂钓 20 min,垂钓后的中空纤维用 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液在相同的垂钓条件下超声清洗 5 min。用 45 μL 甲醇分别将中空纤维管内垂钓出的 GABA-T 配体洗脱、解离,合并洗脱液,12 000 r/min 离心 3 min;将上清液注入液相色谱质谱联用系统进行分析。

1.3.6 配体化合物 LCMS-IT-TOF 分析 采用液相色谱离子阱飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)对配体化合物进行分析。离子源为 ESI 离子源,正离子扫描方式,流动相为甲醇(90%)—水(10%),流速 0.3 mL/min,色谱柱为 Diamonil 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.7 α -细辛醚对 GABA-T 的抑制试验 将不同质量浓度的 α -细辛醚与 GABA-T 共同孵育,温孵温度为 37 $^{\circ}\text{C}$,孵育时间为 30 min,以加入底物 GABA 溶液的方式启动反应,冰浴中终止反应。采用紫外分光光度计法测定

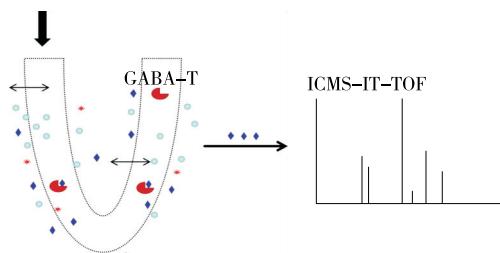


图 1 中空纤维配体垂钓的总体策略示意图

Figure 1 Overall strategy diagram of hollow fiber ligand fishing

340 nm 处烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)吸光度值,以孵育反应产物 NADH 的生成量来反映 GABA-T 的活性^[21]。按式(1)计算抑制率。

$$Y = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品本底}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{空白本底}})] \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y——GABA-T 抑制率, %;

$A_{\text{样品}}$ ——加入 α -细辛醚的吸光度值;

$A_{\text{样品本底}}$ ——加入 α -细辛醚而未加 GABA 溶液的吸光度值;

$A_{\text{空白}}$ ——未加 α -细辛醚的吸光度值;

$A_{\text{空白本底}}$ —— α -细辛醚和 GABA 溶液的吸光度值。

1.4 数据处理

采用 Design-Expert V8.0.6 软件进行响应面设计和分析;采用 GraphPad Prism 8 进行相关数据统计分析。

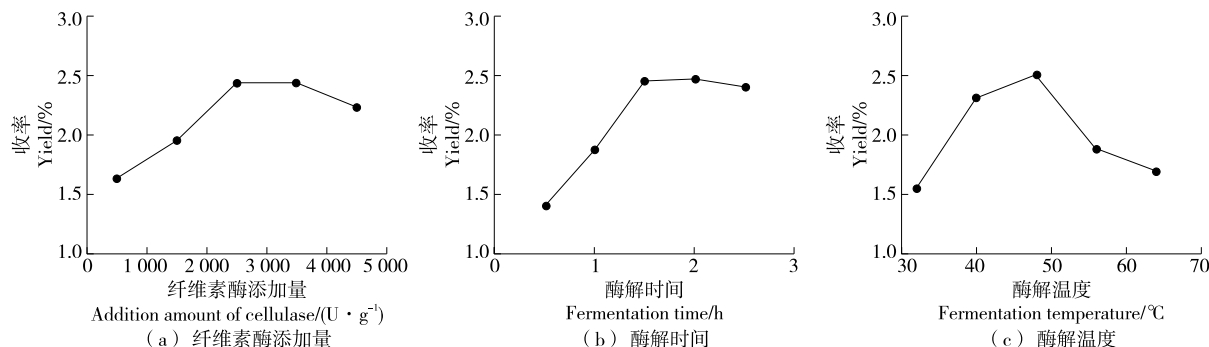


图 2 各因素对石菖蒲挥发油收率的影响

Figure 2 Effects of different factors on the yield of volatile oil from *Acorus tatarinowii*

2.1.2 响应面优化试验 在单因素试验基础上,选取纤维素酶添加量、酶解时间和酶解温度为影响因素,以石菖蒲挥发油收率为响应值,进行三因素三水平响应面优化试验。试验因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

采用 Design-Expert V8.0.6 软件对试验数据进行拟合,得到的二次方程为:

$$Y = 2.48 + 0.26A + 0.15B - 0.15C - 0.16AB - 0.21AC - 0.015BC - 0.15A^2 - 0.14B^2 - 0.65C^2 \quad (2)$$

由表 3 可知,模型 $P = 0.0005 < 0.01$,失拟项 $P > 0.05$,表明回归模型极显著;相关系数 $R^2 = 0.9590$,表明方程拟合程度好,即该模型适用于石菖蒲挥发油提取工艺优化。二次项 C^2 对石菖蒲挥发油收率影响高度显著 ($P < 0.01$);AC 交互项对石菖蒲挥发油收率影响显著 ($P < 0.05$)。分析其原因,纤维素酶添加量较低时,随着纤维素酶添加量的增大,催化效果提高,石菖蒲挥发油收率也提高,当纤维素酶用量超过一定值时,分子与酶之间的结合接近饱和,酶活性趋于稳定,挥发油收率不再继续升高。

由图 3 可知,随着酶解温度的增加,纤维素酶活性增强,石菖蒲挥发油收率也逐渐升高。温度过高可能会破坏纤维素酶的三维结构,使酶变性,导致石菖蒲挥发油收

2 结果与分析

2.1 石菖蒲挥发油提取工艺优化

2.1.1 单因素试验 由图 2 可知,酶用量较低时,随着纤维素酶添加量的增大,催化效果提高,石菖蒲挥发油收率也提高,当纤维素酶用量超过一定值时,分子与酶之间的结合接近饱和,酶活性趋于稳定,挥发油收率不再增加。当纤维素酶添加量为 2 500 U/g 时,石菖蒲挥发油收率达到最大值 2.52%。随着酶解时间的增长,石菖蒲挥发油收率先增加后降低趋势。当酶解时间为 1.5 h 时,石菖蒲挥发油收率达到最大值 2.70%。随着酶解温度的增加,纤维素酶活性增强,石菖蒲挥发油收率也逐渐提高。当酶解温度为 48 °C 时,石菖蒲挥发油收率达到最大 2.50%,温度过高可能会破坏纤维素酶的三维结构,使酶变性,导致石菖蒲挥发油收率大幅度降低。

率大幅度降低^[22]。响应面分析结果与回归模型的显著性分析结果一致,说明结果可靠有效。因此,纤维素酶添加量和酶解温度是影响石菖蒲挥发油收率的重要因素,提取挥发油时应严格控制。

2.1.3 验证实验 通过响应面优化,模型预测得到石菖蒲挥发油最佳提取工艺为纤维素酶添加量 3 166.67 U/g、酶解时间 1.83 h、酶解温度 44.80 °C,此时石菖蒲挥发油收率为 2.58%。结合实际操作将提取工艺条件修正为纤维素酶添加量 3 165 U/g、酶解时间 1.8 h、酶解温度 45 °C,平行 3 次进行验证,获得石菖蒲挥发油平均收率为 2.56%,与回归模型理论预测值接近,比文献[23]的提高了约 2.4 倍。与超临界 CO₂ 萃取法^[24] 和离子液体萃取

表 1 响应面优化试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the resurface experiment

水平	A 酶添加量/ (U · g ⁻¹)	B 酶解时间/ h	C 酶解温度/ °C
-1	500	0.5	32
0	2 500	1.5	48
1	4 500	2.5	64

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface experimental design and results

试验号	A	B	C	石菖蒲挥发油收率/%
1	-1	0	-1	1.42
2	0	0	0	2.54
3	0	-1	1	1.45
4	1	1	0	2.54
5	0	0	0	2.20
6	0	1	-1	1.96
7	0	1	1	1.63
8	-1	-1	0	1.53
9	0	-1	-1	1.72
10	0	0	0	2.55
11	-1	1	0	2.21
12	1	0	-1	2.24
13	0	0	0	2.53
14	1	0	1	1.52
15	0	0	0	2.56
16	-1	0	1	1.54
17	1	-1	0	2.48

表 3 回归模型的方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance in regression models

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3.21	9	0.36	18.19	0.000 5 **
A	0.54	1	0.54	27.57	0.001 2 **
B	0.17	1	0.17	8.57	0.022 1 *
C	0.18	1	0.18	9.18	0.019 1 *
AB	0.10	1	0.10	4.90	0.062 5
AC	0.18	1	0.18	8.99	0.020 0 *
BC	9.00E-04	1	9.00E-04	0.05	0.836 5
A ²	0.09	1	0.09	4.70	0.066 8
B ²	0.08	1	0.08	4.09	0.082 9
C ²	1.77	1	1.77	90.13	<0.000 1 **
残差	0.14	7	0.02		
失拟项	0.04	3	0.01	0.58	0.658 9
纯误差	0.010	4	0.02		
总和	3.35	16			

[†] * 为显著 ($P < 0.05$); ** 为极显著 ($P < 0.01$); $R^2 = 0.959 0$ 。

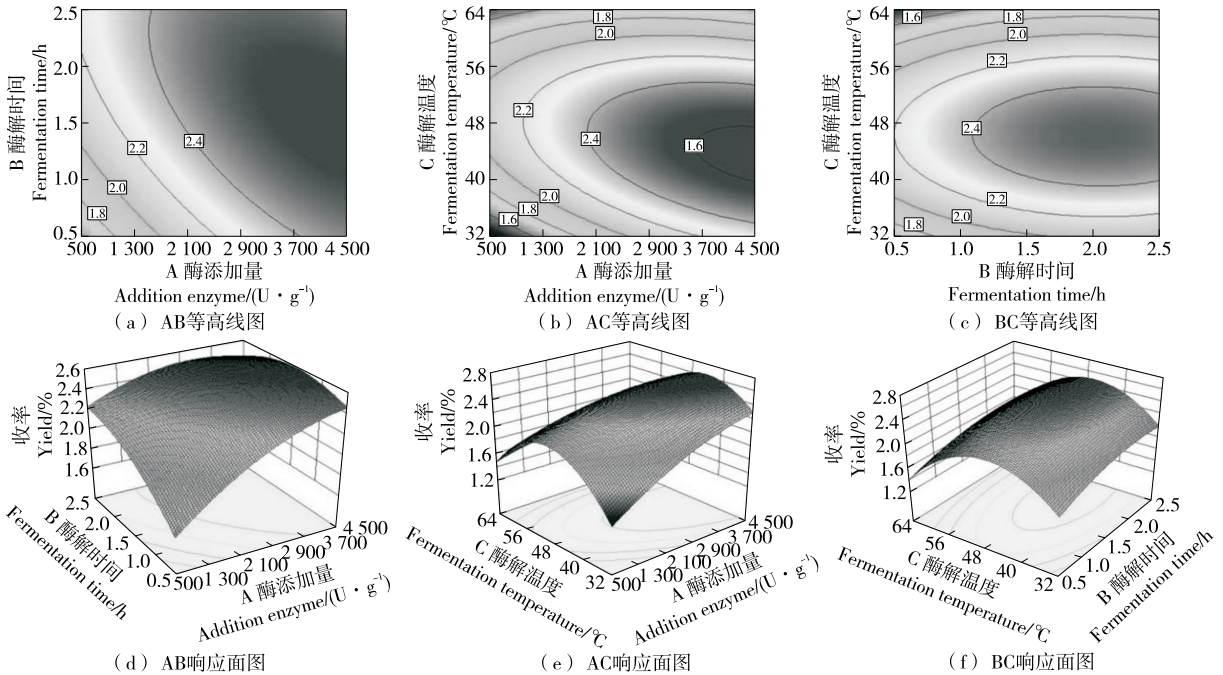


图 3 各因素交互作用对石菖蒲挥发油收率的等高线图和响应面图

Figure 3 Contour plots and response surface plots of the interaction of various factors on the yield of volatile oil from *A. tatarinowii*

法^[25]相比,试验方法使用设备简单,且只用纯水作为提取溶剂,更加环保。因此,采用响应面法优化建立的数学回归模型拟合度高,稳定性好,适用于纤维素酶辅助提取石菖蒲挥发油收率的预测。

2.2 石菖蒲挥发油成分的 GC-MS 分析

由图 4 和表 4 可知,石菖蒲挥发油中共鉴定出 51 种化合物,主要包括烯烃、醇类、醚类、酮类、酚类、酸类等化合物。传统的水蒸馏法^[26]提取出的挥发性成分种类较

少,尤其是脂溶性成分难以被提取。石油醚提取法^[27]对酮类和烯类提取的选择性较好。而纤维素酶辅助提取法提取出的成分种类更加丰富,能够同时提取烯烃、醚类、酚类等化合物。这可能是由于纤维素酶破坏了细胞壁,促进了不同极性化合物的溶出。其中 α -细辛醚、 β -榄香烯、石竹烯等均是肠内高吸收、血脑屏障高渗透且具有类药性的成分^[28]。这些化合物具有挥发性,容易分布在脑组织,是石菖蒲表现神经系统活性如抗癫痫的物质基础。当 GABA-T 活性被抑制后,脑内 GABA 浓度会升高,并使 GABA 系统的神经抑制作用增强。GABA-T 已被确认为抗癫痫药物的关键靶点^[9]。

2.3 中空纤维吸附 GABA-T 条件优化

GABA-T 可以通过物理吸附作用固定至中空纤维上,GABA-T 吸附量是影响配体垂钧效率的关键因素,可

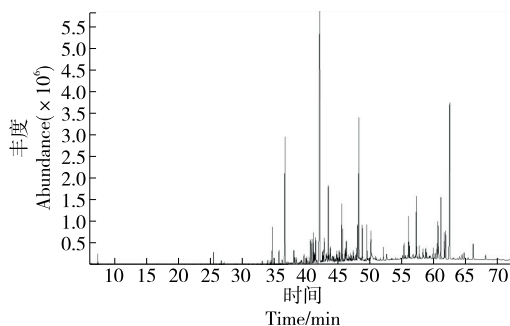


图 4 石菖蒲挥发油 GC-MS 总离子流图

Figure 4 GC-MS total ion flow diagram of volatile oil from *A. tatarinowii*

以通过与中空纤维孵育前后 GABA-T 溶液浓度的变化来测算^[29]。由图 5 可知,GABA-T 质量浓度随共孵育时间

表 4 石菖蒲挥发油化学成分及含量

Table 4 Chemical composition and content of volatile oil from *A. tatarinowii*

化合物	保留时间/min	相对含量/%	化合物	保留时间/min	相对含量/%
己酸	16.646	0.022	榄香素	40.101	0.347
苯甲醇	19.564	0.012	榄香醇	40.203	0.132
芳樟醇	22.370	0.024	γ -细辛醚	40.702	0.858
樟脑	24.638	0.026	菖蒲酮	40.951	1.052
龙脑	25.488	0.548	β -桉叶醇	41.152	1.269
松油烯-4-醇	25.938	0.029	桉油烯醇	41.272	0.397
α -松油醇	26.459	0.034	石竹素	41.495	0.922
草蒿脑	26.734	0.189	β -细辛醚	42.170	26.417
醋酸亚麻酯	28.890	0.016	(Z)-1,2,4-三甲氧基-5-(1-丙烯基)-苯	42.835	0.798
β -长环烯	33.154	0.149	沉香螺醇	42.896	0.776
长环烯	34.021	0.195	α -细辛醚	43.494	2.625
β -广藿香烯	34.388	0.158	α -红没药醇	43.781	0.271
β -榄香烯	34.556	0.194	2,4,5-三甲氧基-苯甲醛	44.349	0.198
甲基丁香酚	34.719	1.562	1-(2,4,5-三甲氧基苯基)丙烷-2-酮	44.900	0.177
长叶烯	35.366	0.040	异水菖蒲二醇	45.200	0.387
石竹烯	35.779	0.598	棕榈酸	48.086	1.645
β -柏木萜烯	35.918	0.034	亚油酸	50.156	1.004
白菖烯	36.271	0.207	(Z,Z)-9,12-亚油酸	50.179	0.477
异丁香酚甲醚	36.707	6.807	去氢二异丁香酚甲醚	55.365	0.453
葎草烯	37.027	0.111	(S)-5-烯丙基-1,3-二甲氧基-2-[[1-(3,4,5-三甲氧基苯基)丙-2-基]氧基]苯	56.079	3.156
香树烯	37.301	0.477	Galgravin	57.768	0.442
3,4-二甲氧基-苯甲醛	37.560	0.069	3,4-二甲基-2,5-二(3,4,5-三甲氧基苯基)氧杂环己烷	61.875	1.436
γ -衣兰油烯	37.715	0.092	(2R,3R,4R,5R)-3,4-二甲基-2,5-二(3,4,5-三甲氧基苯基)四氢呋喃	62.524	12.122
大根香叶烯	37.991	0.099	γ -谷甾醇	66.209	1.135
1,2-二甲氧基-4-(1-丙烯基)-苯	38.098	0.810			
γ -古芸烯	38.275	0.460			
Δ -杜松烯	39.311	0.157			

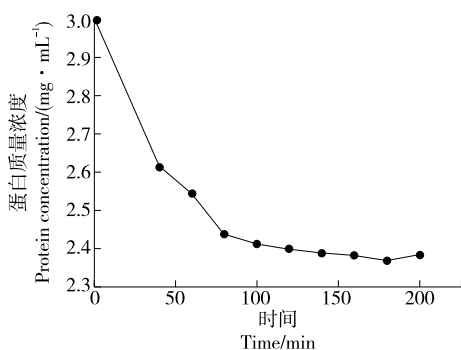


图5 中空纤维与 GABA-T 共孵育时间的优化

Figure 5 Optimization of co-incubation time between hollow fibers and GABA-T

的延长逐渐降低,并在 160 min 达到平衡,此时中空纤维中固定化的 GABA-T 质量浓度约为 0.6 mg/mL。因此,采用 160 min 作为中空纤维与 GABA-T 共孵育的时间,以促使 GABA-T 充分吸附到中空纤维管腔。

2.4 石菖蒲挥发油中 GABA-T 配体垂钓

由图 6 可知,利用 LCMS-IT-TOF 自带的化学分子式预测软件并与对照品比对,预测该化合物分子式为 $C_{12}H_{16}O_3$,且为 $[M+H]^+$ 离子模式,表明该化合物可能为 α -细辛醚。 α -细辛醚在石菖蒲挥发油中的含量约为 2.6%,为石菖蒲挥发油的主要活性成分之一。已有动物试验^[30]表明, α -细辛醚能延长戊四氮(PTZ)、电刺激等所致癫痫模型首次癫痫发作的潜伏期,且 α -细辛醚主要通过作用于 γ -氨基丁酸(GABA)发挥抗癫作用。因此,采用中空纤维配体垂钓方法筛选出的 α -细辛醚为极具潜力的 GABA-T 配合物。

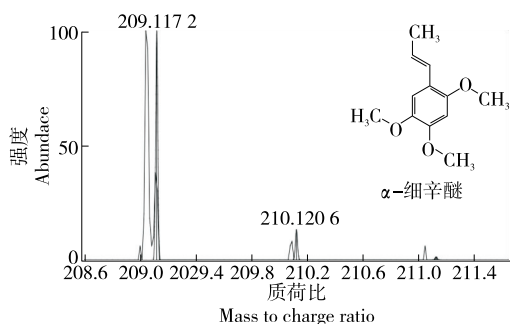


图6 配体化合物质谱图

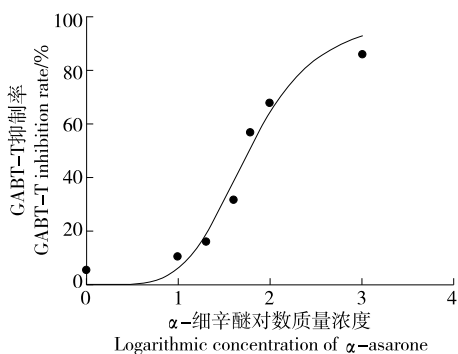
Figure 6 Mass spectrum of ligand compound

2.5 α -细辛醚对 GABA-T 的抑制作用

由图 7 可知, α -细辛醚对 GABA-T 活性有浓度依赖性的抑制作用,其抑制 GABA-T 的 IC_{50} 值为 57.9 μ g/mL。该结果进一步验证了所建立的中空纤维配体垂钓方法高效、可行,适合于石菖蒲挥发油中 GABA-T 抑制成分的筛选。

3 结论

建立了一种中空纤维配体垂钓联合 LCMS-IT-TOF

图7 α -细辛醚对 GABA-T 的抑制作用Figure 7 Inhibitory effect of α -asarone on GABA-T

对中药活性成分进行靶向筛选的新策略,从石菖蒲挥发油中垂钓出 GABA-T 配体化合物 α -细辛醚。该 α -细辛醚抑制 GABA-T 的 IC_{50} 值为 57.9 μ g/mL。该方法避免了传统天然药物化学方法的耗时费力,同时中空纤维纳米级侧壁微孔能够防止中药中大分子杂质的干扰,靶蛋白与配体的紧密结合提高了筛选方法的选择性。中空纤维配体垂钓方法适用于石菖蒲中 GABA-T 配体的快速筛选,结果可靠。中空纤维配体垂钓联合 LCMS-IT-TOF 尚未实现对目标化合物的在线分析,随着在线质谱和样品预处理技术的发展,这一问题有望得到解决^[31]。

参考文献

- [1] 杨鹤年, 吴宿慧, 李寒冰, 等. 石菖蒲的研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(13): 1 213-1 219.
YANG H N, WU S H, LI H B, et al. Research progress of calamus and prediction analysis of quality markers[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2021, 30(13): 1 213-1 219.
- [2] 刘宁, 李鹏辉, 龚年春, 等. 野生石菖蒲药材多指标综合质量评价研究[J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(7): 157-159.
LIU N, LI P H, GONG N C, et al. Multi-index comprehensive quality assessment of wild medicinal material *Acorus tatarinowii*[J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 37(7): 157-159.
- [3] 江威, 李强, 唐洁, 等. 中药材对清香型白酒主要酿造微生物及风味物质的影响[J]. 中国酿造, 2023, 42(2): 89-94.
JIANG W, LI Q, TANG J, et al. Effects of Chinese medicinal materials on main brewing microorganisms and flavor components of light-flavor Baijiu[J]. China Brewing, 2023, 42(2): 89-94.
- [4] 杨梦琳, 张运辉, 伍大华. 淫羊藿和石菖蒲及其有效成分防治阿尔茨海默病研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(15): 129-132.
YANG M L, ZHANG Y H, WU D H. Research progress on *Epimedium* and *Acorus tatarinowii* Schott in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and its active constituents [J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China, 2019, 17(15): 129-132.

- [5] 陈灼, 王豆, 李涛, 等. 石菖蒲抗癫痫的药理机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18): 261-268.
CHEN Z, WANG D, LI T, et al. Antiepileptic pharmacological mechanism of *Acori tatarinowii* Rhizoma: A review [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2022, 28(18): 261-268.
- [6] 权洪峰, 杨婷, 彭晓东. 回药石菖蒲挥发油神经保护活性初步研究[J]. 系统医学, 2017, 2(15): 127-129, 132.
QUAN H F, YANG T, PENG X D. Initial research on neuroprotective activity of Hui medicine Rhizoma *Acori Graminei* volatile oil[J]. Systems Medicine, 2017, 2(15): 127-129, 132.
- [7] 程宝仓, 夏昱, 杨会杰, 等. 石菖蒲挥发油对帕金森病模型小鼠黑质多巴胺能神经元自噬的影响及其机制[J]. 卒中与神经疾病, 2022, 29(2): 101-105, 137.
CHENG B C, XIA Y, YANG H J, et al. Mechanisms of *acorus calamus* volatile oil on autophagy of substantia nigra dopaminergic neurons in Parkin-son's disease model mice[J]. Stroke and Nervous Diseases, 2022, 29(2): 101-105, 137.
- [8] VOGEL K R, AINSLIE G R, WALTERS D C, et al. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism: An update on pharmacological and enzyme-replacement therapeutic strategies[J]. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2018, 41(10): 1-10.
- [9] KOURDOUGLI N, PELLEGRINO C, RENKO J M, et al. Depolarizing GABA contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy[J]. Annals of Neurology, 2017, 81(2): 251-265.
- [10] 黄秋颜, 李斌, 林晓蓉, 等. 基于高分辨质谱和网络药理学的可可茶多酚降血糖活性研究[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 4-11.
HUANG Q Y, LI B, LIN X R, et al. Studying on the hypoglycemic activity of green tea polyphenols from *Camellia ptilophylla* Chang using high-resolution mass spectrometry and network pharmacology[J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 4-11.
- [11] NAZARIPOUR A, YAMINI Y, BAGHERI H. Extraction and determination of trace amounts of three anticancer pharmaceuticals in urine by three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents followed by HPLC[J]. Journal of Separation Science, 2018, 15(41): 3 113-3 120.
- [12] WANG P, XIAO Y, LIU W J, et al. Vortex-assisted hollow fibre liquid-phase microextraction technique combined with high performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of oestrogens in milk samples[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 385-390.
- [13] WANG C, HU S, CHEN X, et al. Screening and quantification of anticancer compounds in traditional Chinese medicine by hollow fiber cell fishing and hollow fiber liquid/solid-phase microextraction [J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(10): 1 814-1 824.
- [14] XUE X, LI L H, CHEN X, et al. Hollow fiber cell fishing with high performance liquid chromatography for screening bioactive compounds from traditional Chinese medicines [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1 280: 75-83.
- [15] TAO Y, ZHANG Y F, WANG Y, et al. Hollow fiber based affinity selection combined with high performance liquid chromatography-mass spectroscopy for rapid screening lipase inhibitors from lotus leaf[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 785: 75-81.
- [16] OLASUPO A, MOHD SUAH F B. Trends in hollow fibre liquid phase microextraction for the preconcentration of pharmaceutically active compounds in aqueous solution: A case for polymer inclusion membrane [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 431: 128573.
- [17] CHEN L, WANG X, LIU Y P, et al. Dual-target screening of bioactive components from traditional Chinese medicines by hollow fiber-based ligand fishing combined with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 143: 269-276.
- [18] LI F, SONG Y, WU J, et al. Hollow fibre cell fishing and hollow fibre liquid phase microextraction research on the anticancer coumarins of *Radix Angelicae dahuricae* in vitro and in vivo[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2019, 42: 79-88.
- [19] 刘杰, 郭江涛, 刘耀, 等. 大果木姜子挥发油的提取工艺优化、成分分析及抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 211-219.
LIU J, GUO J T, LIU Y, et al. Extraction optimization, composition analysis of volatile oil from *Litsea lancilimba* Merr. and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(19): 211-219.
- [20] 赖利平, 罗露, 李玲惠, 等. 湘产石菖蒲不同部位挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 中医药导报, 2022, 28(10): 33-36.
LAI L P, LUO L, LI L H, et al. Analysis of volatile components in different parts of *Shichangpu* (*Acorus tatarinowii* Schott) from Hunan Province by GC-MS [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2022, 28(10): 33-36.
- [21] 李碧, 方雄, 龚晏, 等. γ -氨基丁酸转氨酶抑制剂筛选方法的建立及其在天麻成分筛选中的应用[J]. 中草药, 2016, 47(3): 454-458.
LI B, FANG X, GONG Y, et al. Establishment of screening method for γ -aminobutyric acid transaminase inhibitor and its application in screening constituents in *Gastrodiae Rhizoma* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(3): 454-458.
- [22] 杨申明, 宁娜, 杨潇, 等. 响应面法优化七叶莲多酚提取工艺及抗氧化性研究[J]. 北方园艺, 2022(18): 90-98.
YANG S M, NING N, YANG X, et al. Optimization of polyphenols extraction from *Schefflera arboricola* Hayata by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. Northern Horticulture, 2022(18): 90-98.
- [23] 曲迪, 薛傲, 赵晨宇, 等. 基于 GC-MS 技术结合网络药理学探究石菖蒲挥发油抗阿尔兹海默症的作用机制[J]. 中国药事, 2023, 37(10): 1 129-1 139.
QU D, XUE A, ZHAO C Y, et al. Exploring the mechanism of the

- effect of volatile oil of *Acorus tatarinowii* on anti-Alzheimer's disease based on GC-MS combined with network pharmacology[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2023, 37(10): 1 129-1 139.
- [24] 钱一帆, 朱韵韵, 姬珊珊, 等. 石菖蒲挥发油超临界 CO₂ 萃取及胶体磨法包合工艺的研究[J]. *药学服务与研究*, 2016, 16(2): 121-125.
- QIAN Y F, ZHU Y Y, JI S S, et al. Supercritical CO₂ fluid extraction and colloid mill inclusion methodology of essential oil from *Acorus tatarinowii* Schott [J]. *Pharmaceutical Care and Research*, 2016, 16(2): 121-125.
- [25] 唐一梅, 张博, 房海娜, 等. 离子液体辅助提取石菖蒲挥发油的工艺研究[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(3): 393-398.
- TANG Y M, ZHANG B, FANG H N, et al. Study of ionic liquids-assisted extraction process of *Acorus tatarinowii* Schott. volatile oil[J]. *Journal of Northwest University (Natural Science Edition)*, 2018, 48(3): 393-398.
- [26] 罗球珠, 杨隼华, 巫资舜, 等. 石菖蒲挥发油成分的气相色谱—质谱分析[J]. *中国药物经济学*, 2021, 16(8): 116-120.
- LUO Q Z, YANG D H, WU Z L, et al. Analysis of the constituents of volatile oil in *Rhizoma Acorus tatarinowii* by using GC-MS[J]. *China Journal of Pharmaceutical Economics*, 2021, 16(8): 116-120.
- [27] 张莉, 纪娟, 刘艺, 等. 不同方法提取石菖蒲挥发油气质联用成分分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(1): 53-55.
- ZHANG L, JI J, LIU Y, et al. GC-MS analysis the constituents of volatile oils from *Acorus tatarinowii* Schott extracted by different methods[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 18(1): 53-55.
- [28] 韩沅沅, 方洪, 谷丽华, 等. 基于网络药理学石菖蒲挥发油干预中枢神经系统疾病共性物质基础和作用机制探讨[J]. *上海中医药大学学报*, 2022, 36(3): 52-60, 88.
- HAN Y Y, FANG H, GU L H, et al. Exploring common material basis and mechanism of volatile oil from *Acori tatarinowii* *Rhizoma* in intervening central nervous system diseases based on network pharmacology [J]. *Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 36(3): 52-60, 88.
- [29] 侯宇, 郑娇, 屠鹏飞, 等. 基于中空纤维吸附靶酶的流体灌注系统用于苦丁茶总皂苷活性成分筛选[J]. *药科学报*, 2020, 55(3): 495-500.
- HOU Y, ZHENG J, TU P F, et al. Perfusion enzyme affinity selection system based on hollow fiber for screening active compounds from total saponins of *Kudingcha* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2020, 55(3): 495-500.
- [30] 苗静琨, 陈启雄, 吴小玫, 等. 石菖蒲 α -细辛醚对 Lithium-Pilocarpine 癫痫模型 GABA 系统的调控作用[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(8): 1 067-1 071.
- MIAO J K, CHEN Q X, WU X M, et al. Effect of alpha-asarone on regulation of GABA system in the Lithium-Pilocarpine model of epilepsy[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2011, 27(8): 1 067-1 071.
- [31] 邢倩倩, 刘振民, 洪青, 等. 气相色谱—质谱联用技术在食品分析方面的应用进展[J]. *食品与机械*, 2023, 39(6): 234-240.
- XING Q Q, LIU Z M, HONG Q, et al. Application progress of gaschromatography-mass spectrometry in food analysis[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(6): 234-240.
- (上接第 66 页)
- [14] KAUR M, AHN Y H, CHOI K, et al. A bifunctional colorimetric fluorescent probe for Hg²⁺ and Cu²⁺ based on a carbazole-pyrimidine conjugate: Chromogenic and fluorogenic recognition on TLC, silica-gel and filter paper[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2015, 13(26): 7 149-7 153.
- [15] HE T, LIN C L, GU Z Y, et al. Sensing behavior and logic operation of a colorimetric fluorescence sensor for Hg²⁺ /Cu²⁺ ions[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 167: 66-71.
- [16] JOLLIFFE I T, CADIMA J. Principal component analysis: A review and recent developments[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2016, 374(2 065): 20150202.
- [17] DONG J, YAO Z J, ZHANG L, et al. PyBioMed: A python library for various molecular representations of chemicals, proteins and DNAs and their interactions[J]. *Journal of Cheminformatics*, 2018, 10: 1-11.
- [18] QUINLAN J R. Induction of decision trees[J]. *Machine Learning*, 1986, 1(1): 81-106.
- [19] PETERSON L. K-nearest neighbor[J]. *Scholarpedia*, 2009, 4(2): 1 883.
- [20] HESS A S, HESS J R. Logistic regression[J]. *Transfusion*, 2019, 59(7): 2 197-2 198.
- [21] BREIMAN L. Random forests[J]. *Machine Learning*, 2001, 45: 5-32.
- [22] MAMMONE A, TURCHI M, CRISTIANINI N. Support vector machines[J]. *WIREs Computational Statistics*, 2009, 1(3): 283-289.
- [23] SHERIDAN R P, WANG W M, LIAW A, et al. Extreme gradient boosting as a method for quantitative structure-activity relationships[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2016, 56(12): 2 353-2 360.
- [24] GARDNER M, DORLING S. Artificial neural networks (the multilayer perceptron): A review of applications in the atmospheric sciences[J]. *Atmospheric Environment*, 1998, 32(14/15): 2 627-2 636.
- [25] CHICCO D, JURMAN G. The advantages of the Matthews correlation coefficient (MCC) over F₁ score and accuracy in binary classification evaluation[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21: 1-13.
- [26] NARKHEDE S. Understanding auc-roc curve[J]. *Towards data science*, 2018, 26(1): 220-227.