

## 醋制蓬莪术中总姜黄素回流提取工艺的优化

高天慧, 陈雯清, 陈诗韵, 廖婉\*, 傅超美\*

(成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137)

**摘要:** 目的 优化醋制蓬莪术中总姜黄素回流提取工艺。方法 以双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含量为评价指标, 乙醇体积分数、乙醇用量、提取次数、提取时间为影响因素, 正交试验结合人工神经网络优化提取工艺。结果 最佳条件为加入3倍量95%乙醇提取2次, 每次2h, 人工神经网络优化后双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含量分别为1.12、19.83、30.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 均高于正交试验优化后。结论 该方法稳定可行, 重复性好, 可用于回流提取醋制蓬莪术中总姜黄素。

**关键词:** 醋制蓬莪术; 总姜黄素; 回流提取; 正交试验; 人工神经网络

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)05-0975-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.05.003

## Reflux extraction process optimization for total curcumins from vinegar-processed *Curcuma phaeocaulis*

GAO Tian-hui, CHEN Wen-qing, CHEN Shi-yun, LIAO Wan\*, FU Chao-mei\*

(State Key Laboratory Breeding Base for Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Materia Medica Resources, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**KEY WORDS:** vinegar-processed *Curcuma phaeocaulis* Val.; total curcumins; reflux extraction; orthogonal test; artificial neural network

蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val. 为川产道地药材, 是2015年版《中国药典》收录的莪术主要来源之一, 具有行气破血、消积止痛功效, 常用于治疗饮食积滞、痞满呃逆等症<sup>[1]</sup>, 经醋制后行气破血之力更胜, 而且峻猛药性减缓<sup>[2-7]</sup>, 挥发油、总姜黄素为其主要有效成分, 其中前者以吉马酮、莪术烯、莪术酮、莪术醇、 $\beta$ -榄香烯等为代表<sup>[8-9]</sup>, 而后者以双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素等为代表<sup>[10]</sup>。前期研究发现, 蓬莪术对刀豆蛋白A所致免疫性肝损伤具有良好的保护作用, 并且经醋制后利肝抗炎活性增强<sup>[11]</sup>; 姜黄素和双去甲氧基姜黄素是该药材主要药效成分<sup>[12]</sup>, 而且

前者含有酚羟基和烯醇式羟基, 可阻断氧化反应中自由基链式反应, 从而发挥抗氧化自由基作用<sup>[13]</sup>。本实验通过正交试验结合人工神经网络优化醋制蓬莪术中总姜黄素回流提取工艺, 以期为后续该药材炮制机理研究及相关制剂开发奠定基础。

### 1 材料

电子天平 [赛多利斯科学仪器(北京)有限公司, 型号CPA225D]; 纯水机(优普纯水系统上海分公司, 型号UPK-I-10T); 高效液相色谱仪(日本岛津公司, 型号LC-2030C3D); 旋转蒸发仪(上海泉杰仪器有限公司, 型号OSB-2100)。双去甲氧基姜黄素(CAS号33171-05-0, 批号

收稿日期: 2018-08-14

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81403103); 中药资源四川省青年科技创新研究团队项目(2015TD0028)

作者简介: 高天慧(1994—), 女, 硕士, 从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究。Tel: 16678269413, E-mail: gaotianhui1349@163.com

\*通信作者: 廖婉(1983—), 女, 博士, 副教授, 从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究。E-mail: liaowan2011@126.com  
傅超美(1961—), 男, 博士, 教授, 从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究。E-mail: chaomeifu@126.com

140613)、去甲氧基姜黄素 (CAS 号 24939-17-1, 批号 140815)、姜黄素 (CAS 号 458-37-7, 批号 140612) 对照品均购自四川省维克奇生物科技有限公司, 含有量均 $\geq 98\%$ 。蓬莪术采自道地产区四川省, 经成都中医药大学中药标本中心蒋桂华教授鉴定为蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val.。乙腈为色谱纯 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 冰醋酸 (成都市联合化工试剂研究所, 批号 201411041); 9°米醋 (佛山市海天调味食品股份有限公司, 批号 20150210)。

## 2 方法与结果

2.1 醋制蓬莪术制备 采用前期专利 (公开号 CN103463567A) 报道的方法<sup>[14]</sup>, 取适量生品, 加入 9°米醋 (用量 30%) 拌匀闷润 2 h, 煮至醋液收干, 120 °C 下干燥 30 min, 取出, 稍冷后干燥, 即得<sup>[15]</sup>。

2.2 总姜黄素制备 取去油醋制品药渣 100 g, 按不同体积分数乙醇、提取时间、提取次数进行试验, 滤弃药渣, 合并滤液, 浓缩成稠浸膏, 即得。

### 2.3 总姜黄素含有量测定

2.3.1 色谱条件<sup>[1]</sup> Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-4% 冰醋酸 (48 : 52); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 430 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL, 色谱图见图 1, 可知上述条件下各成分色谱峰分离度良好。

表 1 各成分线性关系

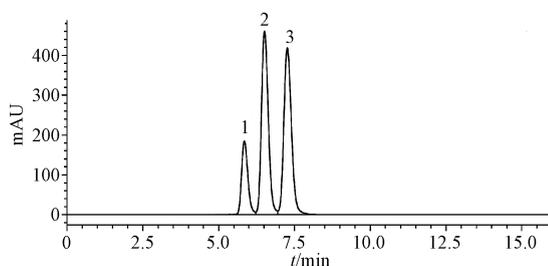
Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/(mg·mL <sup>-1</sup> )
双去甲氧基姜黄素	Y=81 873X-840	0.999 960	0.000 962 50~0.030 800
去甲氧基姜黄素	Y=93 783X-2 159	0.999 974	0.002 337 50~0.074 800
姜黄素	Y=97 206X-4 264	0.999 968	0.002 331 25~0.007 460

2.3.5 精密度试验 取“2.3.2”项下对照品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素峰面积 RSD 分别为 0.09%、0.12%、0.12%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一批稠浸膏, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 测得双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素峰面积 RSD 分别为 1.85%、0.81%、0.46%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取同一批稠浸膏, 同法提取



1. 双去甲氧基姜黄素 2. 去甲氧基姜黄素 3. 姜黄素  
1. bisdemethoxycurcumin 2. demethoxycurcumin 3. curcumin

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素对照品适量, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加入甲醇约 8 mL, 40 kHz 下超声溶解混匀, 定容, 作为贮备液, 各取 2 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 定容, 混匀, 即得。

2.3.3 供试品溶液制备<sup>[16-17]</sup> 取“2.2”项下 9 份稠浸膏, 每份 1 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 50 mL 甲醇, 摇匀, 密塞, 称定质量, 超声 1 h, 放冷, 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 线性关系考察 取“2.3.2”项下贮备液, 倍比稀释成系列质量浓度对照品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 结果见表 1, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

后在“2.3.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素峰面积 RSD 分别为 1.04%、0.17%、0.14%, 表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密量取双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含有量已知的稠浸膏 6 份, 加入对照品溶液, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率, 结果见表 2。

2.4 正交试验 选择乙醇体积分数 (A)、乙醇用量 (B)、提取次数 (C)、提取时间 (D) 作为影响因素, 双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜

表2 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	原有量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
双去甲氧基姜黄素	0.94	0.81	1.76	101.61	100.64	2.73
	0.96	0.81	1.75	98.78		
	0.93	0.81	1.71	97.03		
	0.95	0.81	1.78	103.71		
	0.92	0.81	1.72	99.13		
	0.97	0.81	1.80	103.59		
去甲氧基姜黄素	24.21	17.21	41.20	98.69	100.11	1.81
	23.44	17.21	40.39	98.51		
	23.79	17.21	41.26	101.53		
	22.95	17.21	39.89	98.42		
	24.16	17.21	41.82	102.66		
	23.92	17.21	41.28	100.83		
姜黄素	49.78	44.11	94.01	100.28	100.04	0.56
	49.64	44.11	93.87	100.28		
	48.92	44.11	93.11	100.19		
	50.21	44.11	93.90	99.07		
	48.79	44.11	92.79	99.76		
	50.48	44.11	94.88	100.67		

黄素含有量作为评价指标,设计  $L_9(3^4)$  表,因素水平见表3,结果见表4,方差分析见表5。由此可知,各因素影响程度依次为  $A>C>B>D$ ,因素A对各成分含有量有显著影响 ( $P<0.05$ ),最优工艺是  $A_3B_1C_1D_1$ ,即加入3倍量95%乙醇提取1次,每次1h。

表3 因素水平

Tab. 3 Factors and levels

水平	A 乙醇/%	B 乙醇用量/倍	C 提取次数/次	D 提取时间/h
1	55	3	1	1.0
2	75	6	2	1.5
3	95	9	3	2.0

表4 试验设计及结果

Tab. 4 Design and results of tests

试验号	A 乙醇/%	B 乙醇用量/倍	C 提取次数/次	D 提取时间/h	双去甲氧基姜黄素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	去甲氧基姜黄素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	姜黄素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	55	3	1	1.0	0.57	8.27	12.53
2	55	6	2	1.5	0.22	1.54	2.35
3	55	9	3	2.0	0.21	1.38	2.08
4	75	3	2	2.0	0.51	6.66	10.42
5	75	6	3	1.0	0.26	2.23	3.55
6	75	9	1	1.5	0.39	4.61	7.25
7	95	3	3	1.5	1.02	13.56	20.08
8	95	6	1	2.0	1.14	14.98	21.95
9	95	9	2	1.0	1.46	16.74	23.97
双去甲氧基姜黄素							
$K_1$	1.01	2.09	2.09	2.29			
$K_2$	1.15	1.62	2.19	1.63			
$K_3$	3.62	2.06	1.49	1.85			
R	0.87	0.16	0.23	0.22			
去甲氧基姜黄素							
$K_1$	11.19	28.49	27.86	27.23			
$K_2$	13.49	18.74	24.94	19.71			
$K_3$	45.27	22.73	17.16	23.02			
R	11.36	3.25	3.57	2.51			
姜黄素							
$K_1$	16.96	43.03	41.73	40.05			
$K_2$	13.49	27.85	36.74	29.68			
$K_3$	45.27	33.30	25.71	34.45			
R	10.59	5.06	5.34	3.46			

表5 方差分析  
Tab. 5 Analysis of variance

来源		离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
双去甲氧基姜黄素	A	1.442	2	0.721	18.933	0.050
	B	0.047	2	0.024	0.619	0.618
	C	0.096	2	0.048	1.257	0.443
	D(误差)	0.076	2	0.038	—	—
去甲氧基姜黄素	A	241.909	2	120.955	25.505	0.038
	B	16.013	2	8.007	1.688	0.372
	C	20.372	2	10.186	2.148	0.318
	D(误差)	9.485	2	4.742	—	—
姜黄素	A	492.080	2	246.040	27.396	0.035
	B	39.395	2	19.698	2.193	0.313
	C	44.793	2	22.397	2.494	0.286
	D(误差)	17.962	2	8.981	—	—

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$

2.5 神经网络法 以“2.4”项下数据为训练样本,建立神经网络模型,以乙醇体积分数、乙醇用量、提取次数、提取时间为输入节点,双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含有量为输出节点,建立并训练该网络模型。再以纵坐标为网络数据预测,横坐标为正交试验结果,发现实验数据基本都集中分布在实线与虚线重叠的直线上,理想回归直线与最优回归直线几乎全部重合(相关系数分别为1、0.999 9、1),而且网络期望输出和实际输出的相对误差均小于1%,表明其性能和预测能力良好,最优工艺加入3倍量95%乙醇提取2次,每次2h。

2.6 验证试验 称取6份去油醋制品药渣,每份100g,分别按正交试验、神经网络优化工艺平行3次验证试验,测得双去甲氧基姜黄素含有量分别为1.00 μg/mL (RSD=0.42%)、1.12 μg/mL (RSD=0.14%),去甲氧基姜黄素含有量分别为17.52 μg/mL (RSD=0.43%)、19.83 μg/mL (RSD=1.06%),姜黄素含有量分别为28.29 μg/mL (RSD=0.43%)、30.00 μg/mL (RSD=1.04%)。由此可知,神经网络优化后各成分含有量较高,重复性较好。

### 3 讨论与结论

神经网络是模拟生物学中大脑和神经系统的一种算法模型,广泛用于信息处理与分析,由接受信息的输入层、输出信息的输出层以及中间隐含层构成,见图2。该方法在处理非线性问题上独具优势,能很好地反映对象输入、输出之间复杂的非线性关系<sup>[18]</sup>,很多学者将传统方法(如正交试验)与其相结合来模拟试验过程,可减少大量反复的验证性工作,更方便快捷地获得多因素连续区

域中的最优组合<sup>[15,19-20]</sup>。

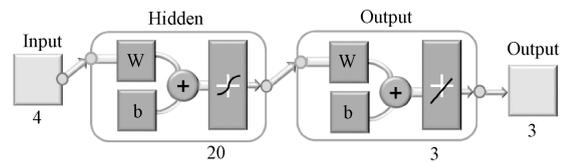


图2 神经网络模型结构

Fig. 2 Model structure of artificial neural network

本实验结合神经网络与正交试验,得到醋制蓬莪术中总姜黄素最优回流提取工艺为加入3倍量95%乙醇提取2次,每次2h,神经网络优化后双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含有量分别为1.12、19.83、30.00 μg/mL,均高于正交试验优化后,而且该方法稳定可行,重复性好。但目前对醋制蓬莪术中提取得到的总姜黄素缺乏一套完整的质量标准控制体系,仍未将体外提取工艺和体内药效学表征有机结合起来,醋制后破血消癥功效增强的物质基础和体内具体的作用机制尚不清楚,亟待更深入考察。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 264, 274-275.  
 [2] 廖婉, 傅舒, 刘芳, 等. 星点设计-效应面法优选蓬莪术醋制工艺[J]. 中药与临床, 2011, 2(6): 22-24.  
 [3] Liao W, Gan Y X, Zhao S L, et al. Comparative analysis of trace elements contained in *Rhizoma Curcumae* from different origins and their vinegar products by ICP-MS[J]. *Anal Methods*, 2014, 6(20): 8187-8192.  
 [4] 廖婉, 章津铭, 傅舒, 等. 醋莪术对气滞血瘀证血液流变学影响的表征及谱效相关性研究[J]. 中成药, 2013, 35(2): 330-334.  
 [5] 罗妮妮, 傅超美, 甘彦雄, 等. 川产道地药材蓬莪术醋制前

- 后 GC-MS 指纹图谱对比研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 1995-2000.
- [6] 甘彦雄, 赵思蕾, 罗妮妮, 等. 蓬莪术醋制前后“行气破血”功效变化对比研究[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(2): 29-32.
- [7] 甘彦雄, 郑勇凤, 汪 蕾, 等. 基于 ICP-MS 分析蓬莪术醋制前后煎液及沉淀物重金属转移率变化[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 65-69.
- [8] 甘彦雄, 罗妮妮, 蒋燕萍, 等. 基于 GC-MS 同时测定蓬莪术及其醋制品挥发油中  $\beta$ -榄香烯、莪术醇、吉马酮、新莪术二酮的含量[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1311-1315.
- [9] Nuriza Rahmadini, 甘彦雄, 郑勇凤, 等. 基于 GC-MS 对比分析印尼姜黄、姜黄、蓬莪术挥发油中的化学成分[J]. 中药与临床, 2016, 7(2): 20-22.
- [10] Li R, Wang Q, Fan J R, et al. Metabolites identification of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in rats after oral administration of nanoparticle formulations by liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2016, 2(4): 29-37.
- [11] 汪 蕾, Nuriza Rahmadini, 高天慧, 等. 印尼姜黄对刀豆球蛋白 A 所致小鼠肝损伤的保护作用及其影响 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 127-133.
- [12] Gan Y X, Zheng S C, Zhao J Q, et al. Protein network module-based identification of key pharmacological pathways of *Curcuma phaeocaulis* Val. acting on hepatitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 221: 10-19.
- [13] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 18-附 21.
- [14] 廖 婉, 傅超美, 傅 舒, 等. 醋莪术饮片及其炮制方法: 中国, CN103463567A [P]. 2013-12-25.
- [15] 罗妮妮, 程 玲, 傅超美, 等. 正交试验结合人工神经网络模型优化蓬莪术炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 10-13.
- [16] 谢 辉, 陆免林, 毛春芹. 正交法优化莪术中姜黄素提取工艺研究[J]. 中成药, 2004, 26(7): 593-595.
- [17] 许政旭, 罗 俊, 潘年松, 等. 黔产莪术中挥发油和姜黄素最佳提取工艺研究[J]. 中医研究, 2015, 28(7): 55-58.
- [18] 张东方, 沙 明, 杨松松, 等. 人工神经网络在中药领域中的应用现状及前景[J]. 中草药, 2003, 34(1): 89-91.
- [19] 聂英军, 傅超美, 李 莹, 等. 人工神经网络法优化醋莪术挥发油的提取与包合工艺[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(3): 248-250.
- [20] 张 超, 韩 丽, 杨秀梅, 等. BP 神经网络结合正交试验优化苦参方中荆芥挥发油的提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(1): 70-74.

## 黄芪配方颗粒提取过程中 3 种指标成分的传质规律

莫平莉<sup>1,2</sup>, 王洛临<sup>2\*</sup>, 卢 泳<sup>1,2</sup>, 陈雪婷<sup>2</sup>, 冯健英<sup>2</sup>, 徐文杰<sup>2</sup>, 李智勇<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东 广州 510095; 2. 广东省中医药工程技术研究院/广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095)

**摘要:** 目的 研究黄芪配方颗粒提取过程中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、黄芪多糖的传质规律。方法 电导率测定法表征 3 种指标成分的提取规律及终点, 考察电导率与其含有量之间的关系。结果 黄芪提取液电导率与黄芪甲苷、毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、黄芪多糖含有量的相关性较好 ( $r$  分别为 0.991 9、0.985 4、0.986 8)。结论 电导率测定法可及时、快速、直观地反馈黄芪提取液中指标成分含有量, 易于实现黄芪配方颗粒中该类成分提取过程中的快速分析及终点指示, 并为研究其传质规律奠定基础。

**关键词:** 黄芪配方颗粒; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 黄芪多糖; 传质规律; 电导率测定法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)05-0979-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.05.004

## Mass transfer rules of three index components in Huangqi Formula Granules during the extraction

收稿日期: 2018-09-05

基金项目: 广东省科技计划项目 (2015B070701010, 2017A070701017); 佛山市科技创新专项资金 (2013GQ100032)

作者简介: 莫平莉 (1992—), 女, 硕士生, 从事中药新药研发。Tel: (020) 83501292, E-mail: M\_Pingli@163.com

\* 通信作者: 王洛临 (1958—), 男, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药新药研发。Tel: (020) 83501292, E-mail: luolin\_w@

163.com