

# 正交试验结合人工神经网络模型优化蓬莪术炮制工艺

罗妮妮, 程玲, 傅超美, 廖婉\*, 甘彦雄, 傅舒, 李莹

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 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, 成都 611137)

[摘要] 目的:优化川产道地药材蓬莪术的炮制工艺,为该药材炮制前后物质的量效变化和破血行气炮制机制研究提供实验依据。方法:以姜黄素、挥发油提取量及干膏收率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察米醋用量、煎煮时间、加水量、浸润时间对蓬莪术炮制工艺的影响,并通过人工神经网络模型进一步优化炮制工艺参数。结果:最佳醋煮工艺为加20%米醋和6倍量水浸润5 h,煎煮时间1.5 h;姜黄素、挥发油提取量及干膏收率分别为 $0.071 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 0.96 mL, 26.68%。结论:正交设计与人工神经网络模型联用优选的蓬莪术醋煮工艺稳定可行、重复性好,为完善醋莪术的质量标准提供参考。

[关键词] 川产道地药材; 蓬莪术; 炮制工艺; 人工神经网络模型; 姜黄素; 挥发油

[中图分类号] R283.3; R284.1; R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)24-0010-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240010

## Optimization of Processing Technology for *Curcuma phaeocaulis* by Orthogonal Test and Artificial Neural Network Model

LUO Ni-ni, CHENG Ling, FU Chao-mei, LIAO Wan\*, GAN Yan-xiong, FU Shu, LI Ying

(Chinese Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of System Research on Development and Utilization of TCM Resources, Construction of Provincial and Ministry, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of *Curcuma phaeocaulis*, in order to provide experimental basis for dose-response change of components and mechanism research of Poxue Xingqi before and after being processed of this herb. **Method:** Taking extracting amounts of curcumin and volatile oil, dry extract yield as indexes, orthogonal design was adopted to optimize processing technology with boiling time, soaking time, amounts of vinegar and water as factors, then processing parameters were further optimized by artificial neural network model. **Result:** Optimum processing technology was as following: soaked 5 h with 20% vinegar and 6 times the amount of water, boiling time of 1.5 h; extracting amounts of curcumin and volatile oil, dry extract yield were  $0.071 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 0.96 mL and 26.68%, respectively. **Conclusion:** This process is stable and feasible with good repeatability, it can provide a reference for improving quality standard system of *C. phaeocaulis*.

[Key words] Sichuan authentic herb; *Curcuma phaeocaulis*; processing technology; artificial neural network model; curcumin; volatile oil

蓬莪术为川产道地药材,是临床常用的破血消 癥要药<sup>[1]</sup>。莪术生用药性峻猛,具有耗气伤血之

[收稿日期] 20140430(013)

[基金项目] 四川省科技支撑计划项目(2013S20123);四川省中医药管理局科技专项(2012-E-041);四川省科技创新苗子工程项目(20133006);四川省教育厅面上项目(2013SZB0781)

[第一作者] 罗妮妮,在读硕士,从事中药炮制与制剂研究, Tel:15828550772, E-mail:592765198@qq.com

[通讯作者] \*廖婉,在读博士,讲师,从事中药炮制与制剂研究, Tel:13880602527, E-mail:liaoan2011@126.com

弊,素体虚弱者不宜使用,加之质地坚硬,不利于调剂,临床多使用其炮制品<sup>[2]</sup>。自《雷公炮炙论》开始,历代医家非常重视其炮制工艺研究<sup>[2-5]</sup>,由于地方差异和操作人员的不同,莪术一直存在炮制工艺不规范、不统一的问题,而且炮制品无质量标准,致使临床疗效难以控制。2010年版《中国药典》一部规定醋莪术为莪术唯一炮制品种,但仍有醋蒸、醋炒、醋煮、醋浸等方法<sup>[6]</sup>。为达到醋制至透心,前期研究发现蓬莪术醋煮重复性好、方便可行,炮制效果优于其他几种醋制方法,故拟对其醋煮工艺参数进行考察。

随着计算机科学的高速发展,中药有效成分提取分离和中药制剂制备工艺研究开始采用具有高度非线性函数映射功能的人工神经网络模型。在前期研究基础上<sup>[7-9]</sup>,本实验联合正交试验和人工神经网络模型优化蓬莪术醋制工艺,以期得到较常规方法更精确的工艺参数,以利于规范醋莪术的工业化生产,为醋莪术炮制前后物质质量效变化、破血行气炮制机制研究提供实验依据。

## 1 材料

1200系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),AE240型1/10万电子分析天平(德国Mettler公司),PTHW型普通恒温电热套(河南爱博特科技有限公司),101A型电热鼓风干燥箱(吴江亚泰烘箱制造厂)。

蓬莪术购于四川省成都市双流、崇洲及温江蓬莪术种植基地,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为姜科植物 *Curcuma phaeocaulis* 的根茎;姜黄素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号201008,纯度 $\geq 98\%$ ),9度米醋[酸度 $0.09\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,广东省佛山市海天(高明)调味食品有限公司],甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 醋制品的制备** 称取蓬莪术根茎200 g,去泥,洗净,加一定量水和醋浸润、煎煮,醋莪术趁热切片,置于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中,烘干,粉碎过二号筛,备用。

**2.2 干膏收率的测定** 取醋制品加水煎煮2次,合并煎煮液后量取100 mL,放入已干燥至恒重的蒸发皿内,水浴挥干,于 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥3 h,取出,放入用凡士林封口的干燥容器中,冷却30 min,称定质量,计算干膏收率。

**2.3 挥发油含量测定** 参照2010年版《中国药典》附录XD挥发油测定法甲法,称取蓬莪术醋制饮片100 g,加8倍量水回流提取6 h,读取挥发油

刻度。

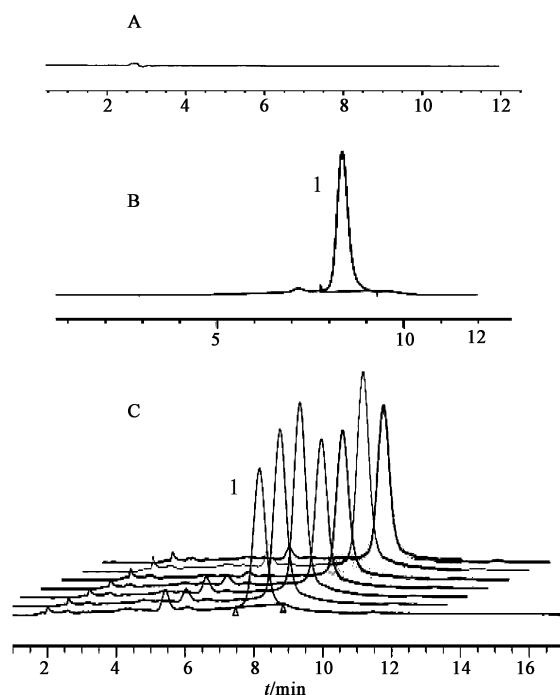
## 2.4 姜黄素的含量测定

**2.4.1 供试品溶液的制备** 精密称取蓬莪术醋制品粉末20 g,加8倍量80%乙醇回流提取2次,每次1 h<sup>[10]</sup>,滤过,合并滤液,用80%乙醇定容至320 mL;精密吸取25 mL,水浴挥干,残渣加甲醇溶解并定容至25 mL,摇匀,滤过,即得。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 精密称取姜黄素对照品适量,置10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,配制成 $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

**2.4.3 阴性样品配制** 精密量取甲醇10 mL置于10 mL量瓶中,超声2 min,待用。

**2.4.4 色谱条件** Agilent Zorbax  $\text{C}_{18}$  色谱柱( $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ ),流动相甲醇-水(含5%冰乙酸)(75:25),检测波长420 nm,柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ ,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。理论板数按姜黄项下姜黄素峰计算不低于4 000,见图1。



A. 阴性样品;B. 对照品;C. 供试品;1. 姜黄素

图1 蓬莪术醋制品 HPLC

**2.4.5 线性关系考察** 精密吸取 $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素对照品溶液2,4,6,8,12  $\mu\text{L}$ ,按2.4.4项下色谱条件测定,以峰面积平均值为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 6.0 \times 10^6 X - 70446$  ( $r = 0.9993$ ),线性范围 $0.02 \sim 0.12\text{ }\mu\text{g}$ 。

**2.4.6 精密度试验** 精密吸取姜黄素对照品溶液适量,按2.4.4项下色谱条件连续进样6次,计算姜黄

素峰面积的 RSD 0.07% ,表明仪器精密度良好。

**2.4.7 重复性试验** 精密称取醋莪术粉末 3 份,每份 1 g,按 2.4.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.4 项下色谱条件测定,计算姜黄素峰面积的 RSD 0.9% ,表明该方法重复性良好。

**2.4.8 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液分别于 0,2,4,6,8,12,18 h 按 2.4.4 项下色谱条件测定,计算姜黄素峰面积的 RSD 1.37% ,表明供试品溶液在 18 h 内稳定性良好。

**2.4.9 加样回收率试验** 取蓬莪术醋制品粉末 1 g,平行称定 6 份,各精密加入适量 0.01 g·L<sup>-1</sup>姜黄素对照品溶液,按 2.4.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.4 项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 蓬莪术醋制品中姜黄素含量测定的加样回收率试验

称样量 /mg	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.004	0.053	0.102	99.03	99.34	2.45
1.009	0.058	0.111	102.78		
1.010	0.055	0.102	97.14		
1.007	0.053	0.100	97.09		
1.002	0.056	0.104	98.11		
1.020	0.057	0.109	101.87		

注:加入量均为 0.05 mg。

**2.5 正交试验优选** 以姜黄素、挥发油含量及干膏收率为评价指标,选择米醋用量、煎煮时间、加水量、浸润时间为考察因素,称取蓬莪术根茎 9 份,每份 200 g,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表设计试验,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 蓬莪术醋煮工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 米醋用量/%	B 煎煮时间/h	C 加水量/倍	D 浸润时间/h	姜黄素/mg·g <sup>-1</sup>	挥发油/mL	干膏收率/%
1	20	1	3	1	0.053	0.25	10.00
2	20	1.5	6	3	0.059	0.45	21.00
3	20	2	9	5	0.055	0.95	28.80
4	30	1	6	5	0.046	0.80	28.11
5	30	1.5	9	1	0.036	0.97	28.90
6	30	2	3	3	0.054	0.50	21.02
7	40	1	9	3	0.043	0.70	25.40
8	40	1.5	3	5	0.064	0.40	18.21
9	40	2	6	1	0.074	1.00	29.43
姜黄素	K <sub>1</sub>	3.33	2.83	3.41	3.26		
	K <sub>2</sub>	2.70	3.17	3.56	3.10		
	K <sub>3</sub>	3.62	3.65	2.68	3.29		
	R	0.31	0.27	0.29	0.06		
挥发油	K <sub>1</sub>	1.65	1.75	1.15	2.22		
	K <sub>2</sub>	2.27	1.82	2.25	1.65		
	K <sub>3</sub>	2.10	2.45	2.62	2.15		
	R	0.21	0.23	0.49	0.19		
干膏收率	K <sub>1</sub>	59.80	63.51	49.23	68.33		
	K <sub>2</sub>	78.03	68.11	78.54	67.42		
	K <sub>3</sub>	73.04	79.25	83.10	75.12		
	R	6.08	5.25	11.29	2.57		

以姜黄素提取量为指标,优选的炮制工艺组合 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>;以挥发油提取量为指标,选择炮制工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>;以干膏收率为指标优选的炮制工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>。方差分析表明因素 C 对醋煮工艺具有显著性影响,因素 B 仅对挥发油提取量有显著影响。综合分析,确定最佳炮制工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即加 30% 米醋和 9 倍量水浸润 5 h,置容器内煮沸后调至文火,煎煮 2 h,醋液吸尽,取出,切片,晾干。

**2.6 基于正交试验的人工神经网络优化**

**2.6.1 输入节点和输出节点的确立** 以米醋用量、煎煮时间、加水量、浸润时间为 4 个输入节点,姜黄素、挥发油含量及干膏收率分别为输出节点,进行 3 次人工神经网络优化。

**2.6.2 隐含层的确立** 以正交试验数据为训练样本,运用 Matlab 软件(R2010b 版本,美国 MathWorks)编程,采用 Levenberg-Marquardt 算法,最大迭代数 100 次,网络计算精度目标误差 10<sup>-4</sup>(满足精度要求)建立人工神经网络,并训练该网络。

表3 蓬莪术醋煮工艺方差分析

方差来源		SS	MS	F	P
姜黄素	A	168.10	84.05	6.81	>0.05
	B	238.96	119.48	9.68	>0.05
	C	572.53	286.27	23.19	<0.05
	D(误差)	24.68	12.34		
挥发油	A	0.10	0.05	13.73	>0.05
	B	0.45	0.22	62.48	<0.05
	C	0.18	0.09	24.56	<0.05
	D(误差)	0.007	0.004		
干膏收率	A	59.17	29.59	5.01	>0.05
	B	43.67	21.83	3.70	>0.05
	C	225.23	112.61	19.08	<0.05
	D(误差)	11.80	5.90		

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

**2.6.3 主要影响因素的仿真和优化** 在正交试验基础上,选择改变一个影响因素,其余3个影响因素固定不变,应用人工神经网络进行仿真,得到不同影响因素对蓬莪术醋煮工艺的4条曲线,分别寻找每条曲线上输出节点的最大数值。3个指标分别得到人工神经网络模拟模型运行结果为  $A_3B_2C_2D_3$ ,  $A_1B_2C_2D_1$ ,  $A_1B_3C_3D_2$ , 综合分析,得蓬莪术醋煮工艺人工神经网络优化组合  $A_1B_2C_2D_3$ 。分析3个指标的人工神经网络优化醋煮工艺参数训练结果,得姜黄素、挥发油含量及干膏收率得均方误差分别为  $1.48 \times 10^{-9}$ ,  $3.70 \times 10^{-8}$ ,  $9.89 \times 10^{-11}$ , 相关系数依次为 0.999 8, 1.0, 0.954 1。

**2.7 验证试验** 称取蓬莪术根茎6份,每份200 g,分别按正交试验和人工神经网络模型优化的工艺进行3次验证试验,结果分别为姜黄素提取量 0.069 (RSD 1.8%), 0.071 (RSD 0.7%)  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 挥发油提取量 0.92 (RSD 0.6%), 0.96 (RSD 1.2%) mL, 干膏收率 26.82% (RSD 4.0%), 26.68% (RSD 2.3%)。姜黄素、挥发油提取量及干膏收率的权重系数分别为 35, 35, 30, 计算人工神经网络优化的蓬莪术醋煮工艺综合评分 98.2 高于正交设计的综合得分 95.9。故最终确定蓬莪术醋煮工艺  $A_1B_2C_2D_3$ , 即加 20% 米醋和 6 倍量水浸润 5 h, 置容器内煮沸后调至文火, 煎煮 1.5 h。

### 3 讨论

将人工神经网络模型和正交试验相结合优选蓬莪术的醋煮工艺参数<sup>[11-12]</sup>, 可为蓬莪术炮制品的工业化和质量标准体系制订提供技术支持, 同时为根

茎类中药的炮制工艺研究提供方法学示范。

传统中药炮制工艺的优化常选择单因素试验、均匀设计、正交试验、星点试验等, 但多因素多指标常需要大量反复的验证性工作, 并且优化的工艺参数有一定局限性, 不能反映多因素多水平的复杂非线性关系。多元回归分析-效应面法、方差分析-多指标综合加权评分法、正交设计-人工神经网络法、代谢动态数学模型等多指标数据处理方法能揭示多因素多水平间的规律, 应用越来越广泛。

预试验发现影响蓬莪术醋制效果的因素包括炮制时间、浸润时间、辅料量、火候、器具等, 均可在一定程度上显示炮制作用的趋向或转变。醋煮辅料的种类及规格、蓬莪术和醋用量比等均是确保不同产地、批次、厂家的蓬莪术醋制品质量的重要因素。目前, 蓬莪术炮制品缺乏一套完整的质量标准体系, 醋制后散瘀止痛功效增强的物质基础和体内机制尚不清楚, 还未将体外炮制机制和体内药效学表征有机结合起来, 亟待更深入的科学研究。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 257.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 626.
- [3] 郑占虎, 金毓哲. 中药饮片应用与标准化研究[M]. 北京: 学苑出版社, 2004: 441.
- [4] 张贵君. 现代中药材商品通鉴[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2000: 347.
- [5] 覃欢. 醋温莪术的化学成分及抗氧化活性研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2010: 9.
- [6] 徐焱琛, 朱彩霞, 夏荃. 莪术炮制研究进展[J]. 中国现代中药, 2007, 9(7): 31.
- [7] 廖婉, 傅超美, 章津铭, 等. 醋莪术饮片质量控制方法的研究[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(4): 447.
- [8] 廖婉, 章津铭, 傅舒, 等. 醋莪术饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2012, 35(10): 1582.
- [9] 廖婉, 傅超美, 章津铭, 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.
- [10] 孙静. 莪术药材的质量研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010: 20.
- [11] 张纪兴. 人工神经网络在中药研究领域的应用[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(6): 445.
- [12] 涂颖秋, 朱孟夏, 刘会, 等. 优化药物制剂工艺的多种数据处理方法的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(16): 1333.

[责任编辑 刘德文]