

姜黄超临界 CO₂ 萃取工艺和解酒护肝作用研究

龚吕东^{1,2}, 钟承志^{1,2}, 李婷^{1,2}, 汤洋洋^{1,2}, 颜宏^{1,2}, 资志达^{1,2}, 郭琰^{1,2}, 吴德松^{1,2}, 冯莉萍^{1,2*} (1. 云南省药物研究所, 昆明 650111; 2. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111)

摘要:目的 研究姜黄的超临界 CO₂ 萃取工艺及其解酒护肝作用。方法 以萃取物得率、姜黄素和 α -姜黄烯含量为评价指标, 采用单因素试验和正交试验设计对夹带剂加入量、萃取压力、萃取温度、萃取时间、分离釜压力和温度等工艺参数进行优化, 采用小鼠醉酒模型、大鼠醉酒模型和小鼠亚急性酒精性肝损伤模型评价姜黄超临界萃取物的解酒功效、途径和护肝作用。结果 姜黄超临界 CO₂ 萃取的最佳工艺为: 萃取压力 30 MPa, 萃取温度 55 °C, 加入药材重量 1 倍的乙醇作为夹带剂, 萃取时间 2 h, 分离釜压力与储罐压力一致, 分离釜温度 40 °C, 50 °C 减压回收乙醇。此外, 姜黄超临界萃取物可以显著降低小鼠醉酒后的睡眠时间和醒酒实验 ($P < 0.01$), 提高大鼠体内的乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 水平 ($P < 0.01$), 还可以降低亚急性肝损伤模型小鼠的血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 水平 ($P < 0.01$)。结论 本研究制备工艺萃取率高、稳定可行、制备的姜黄超临界萃取物具有较好的解酒功效和降低亚急性酒精性肝损伤作用。

关键词:姜黄; 超临界 CO₂ 萃取; 工艺优化; 解酒功效; 肝损伤

doi:10.11669/cpj.2025.03.008 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)03-0257-09

Supercritical CO₂ Extraction Process of *Curcuma longa* L. and Its Effects on Alleviating Alcohol Intoxication and Protecting the Liver

GONG Lüdong^{1,2}, ZHONG Chengzhi^{1,2}, LI Ting^{1,2}, TANG Panpan^{1,2}, YAN Hong^{1,2}, ZI Zhida^{1,2}, GUO Yan^{1,2}, WU Desong^{1,2}, FENG Liping^{1,2*} (1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 2. Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the supercritical CO₂ extraction process of *Curcuma longa* L. and its effects on alleviating alcohol intoxication and protecting the liver. **METHODS** The extraction yield, curcumin, and α -turmerone contents were used as evaluation indicator. Single-factor experiments and orthogonal experimental designs were employed to optimize process parameters such as the amount of co-solvent, extraction pressure, extraction temperature, extraction time, separation vessel pressure, and temperature. The alcohol alleviating effects, pathways, and liver protection of *Curcuma longa* L. Supercritical CO₂ extract were evaluated using mouse alcohol intoxication models, rat alcohol intoxication models, and mouse subacute alcohol-induced liver injury models. The results indicated that the optimal process for *Curcuma longa* L. **RESULTS** Supercritical CO₂ extraction included: an extraction pressure of 30 MPa, extraction temperature of 55 °C, using ethanol as a co-solvent at a weight equal to that of the medicinal material, an extraction time of 2 hours, maintaining consistent pressure in the separation vessel and storage tank, a separation vessel temperature of 40 °C, and ethanol recovery through depressurization at 50 °C. Furthermore, the supercritical extract significantly reduced the sleep time of mice after alcohol intoxication and improved their wake-up experiment ($P < 0.01$), increased the ADH level in rats ($P < 0.01$), and reduced the levels of TC, LDL-C, and TBIL in the serum of mice in the subacute liver injury model ($P < 0.01$). **CONCLUSION** The preparation process developed in this study has a high extraction rate, is stable and feasible, and the supercritical CO₂ extract produced exhibited good alcohol alleviating effects and reduces subacute alcohol-induced liver injury.

KEY WORDS: *Curcuma longa* L.; supercritical CO₂ extraction; process optimization; alcohol-alleviating effect; liver damage

姜黄是姜科植物姜黄 (*Curcuma longa* L.) 干燥 西藏等省区。《中国药典》2020 年版^[2]记载, 姜黄色根茎^[1], 主产于我国四川、福建、广东、广西、云南、 味辛、苦、温; 归脾、肝经, 具有破血行气、通经止痛的

基金项目: 云南特色植物筛选与研发服务 CXO 平台建设项目资助 (2022YKZY001)

作者简介: 龚吕东, 男, 本科, 主管药师 研究方向: 中药药效活性及机制和新药研究 * 通讯作者: 冯莉萍, 女, 硕士, 高级工程师 研究方向: 中药及天然药物研究 Tel: (0871) 68411027-8301

功效,用于胸胁刺痛、胸痹心痛、痛经经闭、癥瘕、风湿肩臂疼痛、跌扑肿痛等。现代研究发现^[3-4],姜黄具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、调血脂、降血糖和解酒保肝等药理活性^[5-6]。在日本,姜黄作为解酒药被开发利用时间较长,常见产品包括姜黄之力、Pillbox 日本干杯丸解烈酒药姜黄素养肝护肝片等^[7]。在我国,姜黄被列入药食同源目录,亦是目前解酒护肝类保健食品开发的主要原料之一^[8]。

姜黄中的主要活性成分为姜黄素类^[9]与挥发油类,此外,还包括少量黄酮类和酚酸类成分^[10]。据文献^[11]预测,姜黄素类成分姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素以及萜类成分姜黄酮、姜萜、姜烯、姜烯等为姜黄的中药质量标志物(quality marker, Q-marker)。药理研究发现^[12-13],姜黄素可以通过抑制促炎细胞因子、脂质过氧化产物、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)和肝星状细胞活化等细胞和分子机制对各种因素引起的肝损伤发挥显著的保护和治疗作用^[14-16]。而姜黄的挥发油成分亦有对急性酒精性脂肪肝具有保护作用的报道^[17-18]。可见,姜黄的主要成分均有很好的护肝作用。

姜黄中姜黄素提取方法众多,工艺流程各异,常用的有复合酶提取法、碱液提取法、有机溶剂提取法、超声提取法、超临界 CO₂ 萃取法、微波辅助萃取法等^[19-20]。挥发油成分则多采用水蒸气蒸馏法、超临界 CO₂ 萃取法、有机溶剂提取法等^[21]提取。其中超临界 CO₂ 萃取技术近年来逐渐发展成熟,因具有纯净、安全、保持生物活性,得到的产品稳定性强、色味纯正及提取率高等优点,是一种极具发展潜力的提取分离方法^[22-23]。本研究采用超临界 CO₂ 萃取技术对姜黄中的姜黄素和挥发油成分进行分离提取,以姜黄素作为姜黄素类成分的评价指标,α-姜萜烯作为挥发油类的评价指标,通过单因素试验和正交试验设计对姜黄超临界 CO₂ 萃取工艺的参数进行优化,同时对姜黄超临界 CO₂ 萃取物的解酒功效及作用途径进行研究,并对辅助治疗肝损伤功效进行探索,为其在食品和医药行业的充分开发利用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

健康 SPF 级 KM 小鼠 250 只,6~8 周龄,雄性,体质量 20~24 g;健康 SPF 级 SD 大鼠 50 只,8~10 周龄,雄性,体质量 210~230 g(斯贝福北京生物技

术有限公司),许可证号:SCXK(京)2019-0010;实验动物使用许可证,SYXK(滇)K2022-0002,发证单位:昆明市科技局;实验动物经云南省药物研究所实验动物管理与使用委员会(IACUC)审查同意;动物饲料(北京科澳协力饲料有限公司);实验动物饲养温度为 22~25 °C,湿度 40%~60%,12 h 光照/黑暗循环的条件中。

1.2 药品与试剂

姜黄药材(批号:20170215,云南金发药业有限公司)由云南省药物研究所天然药物化学研究室高级工程师冯莉萍按标准进行检验。

紫苏籽油(批号:20210410,河北家丰植物油有限公司);二锅头(批号:011532,北京红星股份有限公司);乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH,批号:E21017262)、乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH,批号:D21017263) ELISA 检测试剂盒(武汉华美生物);总胆固醇(total cholesterol, TC,批号:20210707)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C,批号:20211028)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);总胆红素(total bilirubin, TBIL,批号:Z512225)检测试剂盒(美国贝克曼库尔特有限公司)。

1.3 仪器

超临界二氧化碳萃取装置(型号:HA220-40-48,南通市华安超临界萃取有限公司);Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(戴安中国有限公司);Agilent 6890N GC 型色谱仪(北京安捷伦科技有限公司);ME 204 型电子分析天平(上海 Mettler Toledo 公司);SK82000HP 型超声波仪(上海科导超声仪器有限公司);JJ-2000 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);Practum224 SQP 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);Multiskan GO 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司);Unicel Dxc600 型全自动生化仪(美国贝克曼库尔特有限公司);3K15 型台式冷冻高速离心机(德国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 姜黄提取物的制备及解酒活性筛选^[24-25]

称取姜黄饮片,粉碎,过 2 号筛,投入超临界萃取装置萃取缸中,设定萃取缸压力 28 MPa,温度 55 °C;分离缸压力 6 MPa,温度 40 °C;当温度压力达到设定值后,开始循环萃取并记取萃取开始时间,萃取时间为 120 min;放出萃取液,石油醚萃取 3 次,合并石油醚层,50 °C 减压回收至无石油醚,即得样品

1, 提取率为 3.2%。

称取姜黄饮片, 粉碎, 过 2 号筛, 投入超临界萃取装置萃取缸中, 萃取条件同上; 当温度压力达到设定值后, 缓慢加入乙醇作为夹带剂; 开始循环萃取并记取萃取开始时间, 萃取时间为 2 h; 放出萃取液, 50 °C 减压回收乙醇, 即得样品 2, 提取率为 5.12%。

称取姜黄饮片, 加入药材量 12 倍量的体积分数 80% 乙醇渗漉提取, 渗滤液 50 °C 减压回收, 真空干燥, 即得样品 3, 提取率为 12.78%。

雄性 KM 种小鼠按体质量随机分为 4 组, 每组 20 只, 分别为空白对照组、姜黄超临界萃取物(样品 1, $0.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、姜黄超临界萃取物(样品 2, $0.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组和姜黄醇提取物(样品 3, $1.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组。各给药组剂量设计均根据其提取率换算为姜黄生粉临床推荐量的 4 倍剂量。各给药组按照相应剂量灌胃给药, 每天 1 次, 连续 7 d, 空白对照组灌胃等量的紫苏籽油。

末次给药后 30 min, 各组小鼠均灌胃给予白酒($17 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 由预实验得出), 以小鼠翻正反射消失作为睡眠(醉酒)指标, 记录给酒时间, 翻正反射消失时间及恢复时间, 计算醉酒潜伏期(翻正反射消失时间-给酒时间)、睡眠时间(翻正反射恢复时间-翻正反射消失时间)和醒酒时间(翻正反射恢复时间-给酒时间)。其中醒酒时间是醉酒潜伏期和睡眠时间的综合体现。翻正反射消失时间超过 2 h 视为未醉, 醉酒潜伏期记录为 120 min, 睡眠时间记录为 0 min。翻正反射恢复时间超过 9 h 以 540 min 记录。

2.2 姜黄超临界萃取工艺参数优化

2.2.1 夹带剂对萃取的影响 设定萃取压力为 30 MPa, 萃取温度 55 °C, 分离釜温度 40 °C, 分离釜压力与储罐压力一致, 萃取压力达到 30 MPa 时, 分别加入药材质量 0、0.5、1、2 倍的体积分数 95% 乙醇作为夹带剂, 萃取 2 h, 考察夹带剂对萃取物的影响。

2.2.2 正交试验设计 选取萃取压力(MPa)、萃取温度(°C)、萃取时间(h)3 个在萃取时可相互影响的因素, 考察三者交互情况下对萃取物的影响, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行 4 因素 3 水平的正交试验设计, 正交因素水平见表 1。采用气相色谱法(gas chromatography, GC)测定 α -姜黄烯含量, 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定姜黄素含量, 以萃取物得率、 α -姜黄烯和姜黄素含量为评价指标, 采用综合评分进行数据分析, 筛选最佳萃取工艺。

表 1 姜黄超临界萃取正交试验因素水平表

Tab. 1 Factor levels of orthogonal tests for supercritical extraction of *Curcuma longa* L.

Levels	Factor			Blank
	A (Extraction pressure)/MPa	B (Extracting temperature)/°C	C (Extracting time)/h	
1	20	45	1	
2	25	50	1.5	
3	30	55	2	

2.2.3 分离釜压力对萃取效果的影响 采用正交试验得出的最佳萃取条件, 在此条件下考察分离釜压力 4、6 MPa、分离 1(8 MPa)与分离 2(4 MPa)对萃取效果的影响。

2.2.4 分离釜温度对萃取效果的影响 采用正交试验得出的最佳萃取条件, 在此条件下考察分离釜温度 30、35、40 °C 对萃取效果的影响。

2.3 姜黄超临界萃取物的解酒护肝作用研究

2.3.1 姜黄超临界萃取物的解酒作用研究 雄性 KM 种小鼠按体质量随机分为 4 组, 每组 20 只, 分别为空白对照组、姜黄超临界萃取物低剂量($0.22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、姜黄超临界萃取物中剂量($0.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组和姜黄超临界萃取物高剂量($0.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组。各给药组剂量设计均根据其提取率换算为姜黄生粉临床推荐量的 2、4 和 8 倍剂量。各给药组按照相应剂量灌胃给药, 每天 1 次, 连续 7 d, 空白对照组灌胃等量的紫苏籽油。姜黄超临界萃取物的剂量设计依据和指标检测同“2.1”项。

2.3.2 姜黄超临界萃取物对酒精相关代谢酶的影响^[26] 雄性 SD 大鼠按体质量随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为正常对照组、模型对照组、姜黄超临界萃取物低剂量($0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、姜黄超临界萃取物中剂量($0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组和姜黄超临界萃取物高剂量($0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组。各给药组剂量设计均根据其提取率换算为姜黄生粉临床推荐量的 1、2 和 4 倍剂量。各给药组按照相应剂量灌胃给药, 每天 1 次, 连续 6 d, 正常对照组和模型对照组灌胃等量的紫苏籽油。末次给药后 30 min, 除正常对照组外, 其余各组大鼠灌胃给予二锅头($15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 灌酒后 1 h, 各组大鼠麻醉, 并剪取部分肝脏左叶(200 mg)。将各组大鼠剪取的肝脏加入 PBS 溶液, 冰上操作制备质量分数 10% 的匀浆液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 取上清, 将上清液按照试剂盒说明书进行 ADH 和 ALDH 的检测。

2.3.3 姜黄超临界萃取物的护肝作用研究 依据文献[27-28]报道,建立小鼠亚急性酒精性肝损伤模型。雄性 KM 种小鼠按体质量随机分为 6 组,每组 15 只,分别为正常对照组、模型对照组、姜黄超临界萃取物极低剂量组($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、姜黄超临界萃取物低剂量组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、姜黄超临界萃取物中剂量组($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和姜黄超临界萃取物高剂量组($450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。各给药组剂量设计按照保健食品技术指导原则分别为姜黄人体推荐量的 5、10、20 和 30 倍剂量。各给药组按照相应剂量灌胃给药,每天 1 次,连续 30 d,正常对照组和模型对照组灌胃等量的紫苏籽油。模型对照组和各给药组于实验结束前 14 d,每天经口灌胃给予体积分数 40% 的乙醇溶液,小鼠灌胃量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药后间隔 4 h 以上再给予乙醇。实验结束前禁食 4 h,摘眼球取血,进行血清中 TC、LDL-C 和 TBIL 的检测。

2.4 数据处理

各组数据均以“均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)”表示。统计学分析采用 SPSS 22 软件进行处理,多组间比较应用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,并使用 GraphPad Prism8 软件进行绘图。

3 结果与讨论

3.1 姜黄提取物的制备及解酒活性筛选

姜黄提取物制备结果显示:从姜黄素含量进行

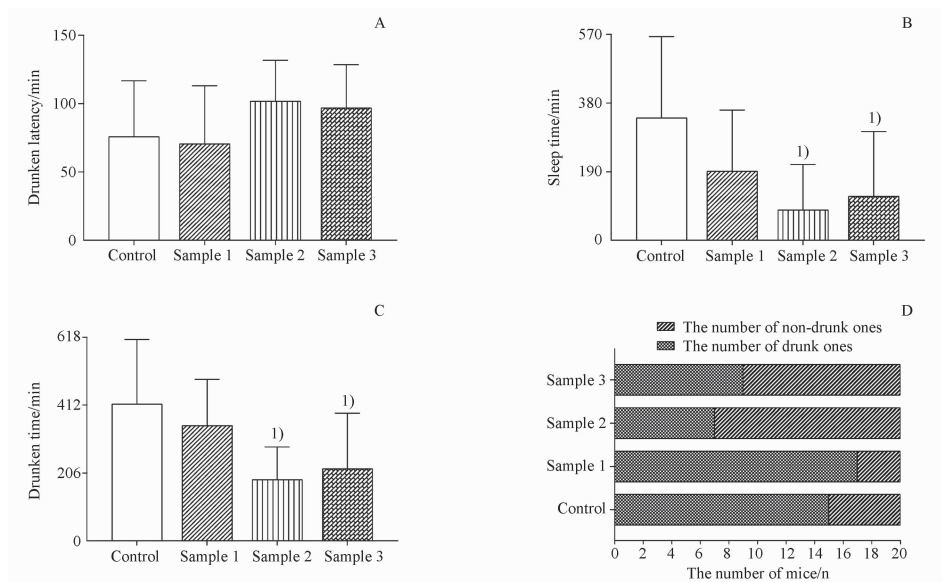
比较后发现,样品 3 > 样品 2 > 样品 1,其中样品 1 和样品 2 均为超临界萃取物,样品 3 为姜黄的乙醇提取物,样品 2 较样品 1 增加了乙醇作为夹带剂,结果发现样品 2 的姜黄素含量明显高于样品 1,说明超临界 CO_2 萃取法不加入乙醇作为夹带剂,萃取的样品中姜黄素仅为 0.1% 左右,不能将姜黄素提取出来,见表 2。

进行姜黄不同提取物对小鼠饮酒后行为学指标(醉酒潜伏期、睡眠时间和醒酒时间)的考察,见图 1。与空白对照组比较,样品 2 和样品 3 可以显著降低小鼠醉酒后的睡眠时间和醒酒时间($P < 0.01$),同时可以降低小鼠的醉倒只数(空白对照组、样品 2 组和样品 3 组的醉倒只数分别为 15、7 和 9 只)。结果表明,样品 2 和样品 3 均具有显著的解酒功效,结合样品制备后分析,姜黄素含量的高低可以影响姜黄提取物的解酒功效,也进一步确定在进行姜黄超临界 CO_2 萃取过程中需要加入乙醇作为夹带剂,以便更好提取姜黄素成分。

表 2 姜黄样品制备结果表

Tab. 2 Table of *Curcuma longa* L. sample preparation results

Sample name	Extract mass/g	Extract yield/%	Curcumin content /%	α -Curcumene content /%
Sample 1	32.0	3.20	0.09	9.11
Sample 2	51.2	5.12	4.62	7.33
Sample 3	63.9	12.78	5.64	3.97



A - 醉酒潜伏期; B - 睡眠时间; C - 醒酒时间; D - 小鼠只数;与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

A - drunken latency; B - sleep time; C - drunken time; D - the number of mice; ¹⁾ $P < 0.01$, compared with the control group.

图 1 姜黄不同提取物的解酒作用。 $n = 20, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Antialcohol effects of different extracts of *Curcuma longa* L. $n = 20, \bar{x} \pm s$

3.2 姜黄超临界 CO₂ 萃取工艺参数优化

3.2.1 夹带剂对萃取效果的影响 从姜黄素、夹带剂的本身性质,二者的匹配性,国家法规及生产安全性方面考虑,乙醇是姜黄素 CO₂ 萃取工艺的最优夹带剂。首先,基于姜黄素类化合物的溶解性,甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂是其适宜的提取溶剂;其次,针对姜黄素而言,其分子结构中两端具有两个羟基,还含有两个邻甲基化的酚以及一个主要是以烯醇式存在的 β -二酮,超临界 CO₂ 的萃取效率较低,使用甲醇、乙醇等极性与之匹配且能形成氢键的夹带剂,可以显著提高姜黄素萃取能力;第三,依据国家对于生产工艺研究的技术指导原则,提取溶剂应尽量避免选择使用毒性较大的一、二类有机溶剂,甲醇属于二类溶剂,乙醇、丙酮、乙酸乙酯均属于三类溶剂,但乙醇是三者中毒性最小的提取溶剂。最后,基于有机试剂的闪点,在工业生产中,乙醇是具有更好

生产安全性和低级别防爆需求的生产助剂。

姜黄超临界萃取物得率、 α -姜黄烯、姜黄素含量均随着夹带剂加入量增大而增大,但增加趋势较为平缓(表 3),结合生产设备和生产设备综合考虑,选择夹带剂加入量为药材质量:夹带剂体积 = 1:1 较为适宜。

此外,萃取液中主要为挥发性成分和姜黄素类,夹带剂回收时温度控制不当可能造成成分的破坏,因此考察了不同温度对萃取液主要成分的影响,由表 4 可见,萃取液在 40 ~ 60 °C 之间稳定性较好,主要成分未发生改变。一般工业生产时,乙醇在减压情况下 50 °C 左右可以顺利回收。因此选择在 (50 ± 2) °C 温度下减压回收乙醇,可顺利回收乙醇,经 GC 检测回收乙醇后的萃取物,其乙醇残留可以达到药典要求,因此选择 (50 ± 2) °C 减压回收作为回收夹带剂的方式。

表 3 夹带剂对姜黄超临界萃取得率和含量的影响

Tab. 3 Effects of entrained agent on the yield and content of supercritical extraction of *Curcuma longa* L.

No.	$m(\text{Curcuma longa L.}):V(\text{entrainment agent})/\text{mg}:\text{mL}$	Extract yield/%	Curcumin content/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	α -Curcumene content/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1:0	3.20	0.03	1.78
2	1:0.5	2.19	0.60	0.95
3	1:1	3.94	0.88	2.62
4	1:2	4.32	1.01	2.67

注:¹⁾姜黄素和 α -姜黄烯含量均折算为相当于每 1 g 药材的含量。

Note:¹⁾Curcumin and α -curcumene contents are converted to the equivalent content per 1 g of medicinal material.

表 4 不同温度对姜黄超临界萃取液的影响

Tab. 4 Effects of different temperature on supercritical extraction of *Curcuma longa* L.

$T/^\circ\text{C}$	Curcumin content/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		α -Curcumene content/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	
	0 d	5 d	0 d	5 d
	40	1.02	1.02	2.67
60	1.02	1.01	2.67	2.56

注:¹⁾姜黄素和 α -姜黄烯含量均折算为相当于每 1 g 药材的含量。

Note:¹⁾Curcumin and α -curcumene contents are converted to the equivalent content per 1 g of medicinal material.

3.2.2 正交试验设计结果 选择萃取压力(MPa)、萃取温度(°C)、萃取时间(h)3 个在萃取时可相互影响的因素进行 L₉(3⁴) 正交试验,正交试验和方差分析结果见表 5 ~ 6。3 个因素对姜黄素和 α -姜黄烯含量以及萃取得率的影响顺序为:萃取压力(MPa) > 萃取时间(h) > 萃取温度(°C)。超临界 CO₂ 萃取工艺正交试验的最佳组合为 A₃B₃C₂, 次佳工

艺为 A₂B₂C₃, 考虑夹带剂加入需要的时间,结合实际生产的可行性和能源、人力、消耗成本等方面考虑,优选 A₃B₃C₃ 为姜黄超临界萃取物萃取工艺,即萃取压力为 30 MPa,萃取温度为 55 °C,萃取时间为 2 h。

3.2.3 分离釜压力对萃取效果的影响 当分离釜压力升高时,萃取物得率,姜黄素和 α -姜黄烯含量均呈下降趋势(表 7),说明分离釜压力越大越难形成有效分离,当分离釜压力达到 8 MPa 时,分离釜 I 无法将临界状态 CO₂ 与萃取物分离,到分离釜 II 中才能有效分离,分离釜 I、II 压力与储罐压力(4.3 ~ 5 MPa)一致时,萃取物在分离釜 I 就达到较好分离效果,极少量的萃取物会经过分离釜 II,因此,分离釜压力选择与储罐压力保持一致较为适宜。

3.2.4 分离釜温度对萃取效果的影响 分离釜设定为 40 °C 时,萃取物得率、姜黄素及 α -姜黄烯含量均较高(表 8),考虑到超临界 CO₂ 萃取设备的操作安全,分离釜温度一般不超过 40 °C,因此选择分离釜压力为 40 °C 较为适宜。

表5 姜黄超临界萃取正交试验结果

Tab. 5 Orthogonal test results of supercritical extraction of *Curcuma longa* L.

No.	Factor			Evaluation index			
	A	B	C	Extract yield/%	Curcumin content/mg · g ⁻¹)	α-Curcumene content/mg · g ⁻¹)	Comprehensive score
1	1	1	1	3.20	0.12	1.37	40.93
2	1	2	2	4.47	0.23	2.23	62.97
3	1	3	3	4.13	0.22	2.04	58.39
4	2	1	2	4.91	0.19	2.56	67.58
5	2	2	3	5.07	0.32	2.61	75.16
6	2	3	1	4.04	0.38	2.04	64.80
7	3	1	3	4.43	0.41	2.11	69.61
8	3	2	1	4.38	0.53	2.02	73.99
9	3	3	2	5.97	0.67	2.93	99.95
I	54.097	59.373	59.907				
II	69.180	70.707	76.833				
III	81.188	74.380	67.720				
R	27.086	15.007	16.926				

注:¹⁾姜黄素和 α-姜黄烯含量均折算为相当于每 1 g 药材的含量;综合评分 = 萃取得率/最高得率 × 40 + 姜黄素含量/最高含量 × 30 + α-姜黄烯含量/最高含量 × 30。

Note:¹⁾Curcumin and α-curcumene contents are converted to the equivalent content per 1 g of medicinal material; Comprehensive score = extraction yield/maximum yield × 40 + curcumin content/maximum content × 30 + α-curcumin content/maximum content × 30.

表6 姜黄超临界萃取正交试验方差分析表

Tab. 6 Results of ANOVA for supercritical extraction of *Curcuma longa* L.

Factor	Deviation sum of squares	Degree of freedom	F ratio	F critical value	Significance
A (Extraction pressure)/MPa	1 105.27	2	16.22	19.000	-
B (Extracting temperature)/°C	367.14	2	5.39	19.000	-
C (Extracting time)/h	430.62	2	6.32	19.000	-

表7 分离釜压力对姜黄超临界萃取物得率和含量的影响

Tab. 7 Effects of separator pressure on yield and content of supercritical extraction of *Curcuma longa* L.

No.	Device	Extraction pressure/MPa	Extract yield/%	Curcumin content/mg · g ⁻¹)	α-Curcumene content/mg · g ⁻¹)
1	Separation Kettle	4	4.27	0.92	1.41
2	Separation Kettle	6	3.28	0.57	0.91
3	Separation Kettle I	8	0.08	0.04	0.01
	Separation Kettle II	4	4.69	0.14	2.01

注:¹⁾姜黄素和 α-姜黄烯含量均折算为相当于每 1 g 药材的含量。

Note:¹⁾Curcumin and α-curcumene contents are converted to the equivalent content per 1 g of medicinal material.

表8 分离釜温度对姜黄超临界萃取物得率和含量的影响

Tab. 8 Effects of separator temperature on yield and content of supercritical extraction of *Curcuma longa* L.

No.	Extracting temperature/°C	Extract yield/%	Curcumin content/mg · g ⁻¹)	α-Curcumene content/mg · g ⁻¹)
1	30	4.99	0.36	2.13
2	35	5.02	0.50	2.12
3	40	5.19	0.84	2.25

注:¹⁾姜黄素和 α-姜黄烯含量均折算为相当于每 1 g 药材的含量。

Note:¹⁾Curcumin and α-curcumene contents are converted to the equivalent content per 1 g of medicinal material.

3.2.5 最佳提取工艺的确定和验证 依据以上工艺参数优化结果,确定最佳提取工艺路线及参数如下:取姜黄粉碎,过 2 号筛,投入超临界萃取装置萃取缸中,密封后开启装置;设定萃取压力 30 MPa,萃

取温度 55 °C,分离釜压力与储罐压力一致,分离釜温度 40 °C;当温度压力达到设定值后,缓慢加入药材重量 1 倍的乙醇作为夹带剂;开始循环萃取并记录萃取开始时间,萃取时间为 2 h;放出萃取液,

50 °C减压回收乙醇,即得。采用确定的工艺路线,在实验室进行了3批小试规模的验证研究,结果见表9,超临界CO₂萃取姜黄药材最佳工艺平行处理

的3组试验中,其萃取得率、姜黄素和α-姜黄烯含量差别不大。由此可知,所确定的最佳提取工艺稳定,具有可行性。

表9 超临界CO₂萃取最佳工艺验证

Tab.9 Validation of the optimal process of CO₂ supercritical extraction

Name	Delivery quantity/g	Yield/%	Curcumin content/mg · g ⁻¹)	α-Curcumene content/mg · g ⁻¹)
Verification 1	1 000	4.79	0.80	2.11
Verification 2	1 000	5.42	0.77	2.50
Verification 3	1 000	5.35	0.60	2.48
RSD/%		6.66	14.9	9.29

注:¹⁾姜黄素和α-姜黄烯含量均折算为相当于每1g药材的含量。

Note:¹⁾Curcumin and α-curcumene contents are converted to the equivalent content per 1 g of medicinal material.

3.2.6 中试研究 通过对比小试和生产设备的适用性,对小试工艺参数进行了适当调整:粉碎过2号筛是依据药典筛制定,生产上均采用目数进行粒度控制,粉碎粒度控制在10~20目筛即可;在实际生产过程中可能会有±2 MPa的波动,为确保设备安全运行压力一般不超过30 MPa,萃取压力设置为28 MPa即可;小试时因设备原因CO₂的流量是无法控制的,并未对CO₂的流量进行相应的考察,

依据实际中试生产经验,CO₂流量一般控制在2~4 m³ · h⁻¹较为适宜。在调整以上工艺路线及参数后在开平健之源保健食品有限公司进行了中试规模生产研究,相关生产数据见表10。从中试结果看,该工艺能适应现有设备的生产要求,3批中试产品得率在10%范围内,含量指标在30%范围内波动,且质量均符合质量标准草案要求,说明生产工艺稳定、可行。

表10 姜黄超临界萃取物中试生产结果表

Tab.10 Pilot production of supercritical extraction of *Curcuma longa* L. results table

Lot	m(Delivery)/kg	m(Extract)/kg	Yield/%	Curcumin content /mg · g ⁻¹)	α-Curcumene content/mg · g ⁻¹)
1	100.00	10.00	10.00	0.87	3.44
2	100.00	9.21	9.21	1.00	3.73
3	295.10	25.67	8.69	1.06	4.05
RSD/%			7.09	9.94	8.16

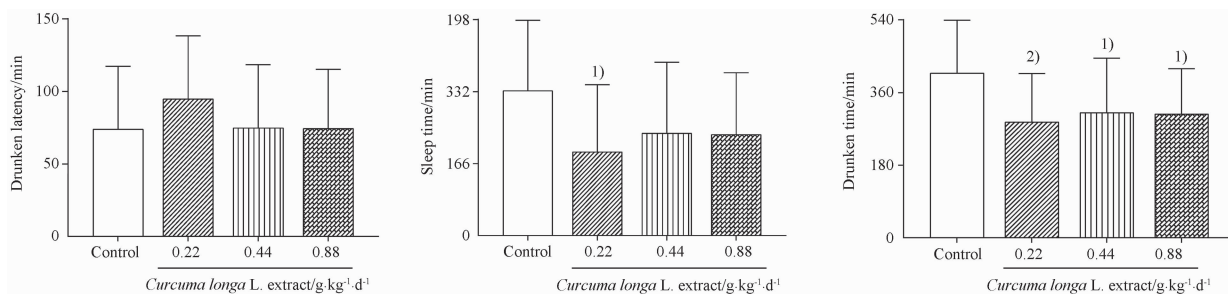
注:¹⁾姜黄素和α-姜黄烯含量均折算为相当于每1g药材的含量。

Note:¹⁾Curcumin and α-curcumene contents are converted to the equivalent content per 1 g of medicinal material.

3.3 姜黄超临界萃取物的解酒作用研究

对姜黄超临界CO₂萃取物的解酒功效进行验证,结果见图2,与空白对照组比较,姜黄超临界

CO₂萃取物可以显著降低小鼠醉酒后的睡眠时间和醒酒时间,提示该姜黄超临界CO₂萃取物具有较好的解酒功效。



与空白对照组比较,¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01, compared with the control group.

图2 姜黄超临界CO₂萃取物的解酒作用。n=20, $\bar{x} \pm s$

Fig.2 Antialcohol effects of CO₂ supercritical extract of *Curcuma longa* L. . n=20, $\bar{x} \pm s$

3.4 姜黄超临界萃取物对酒精代谢酶的影响

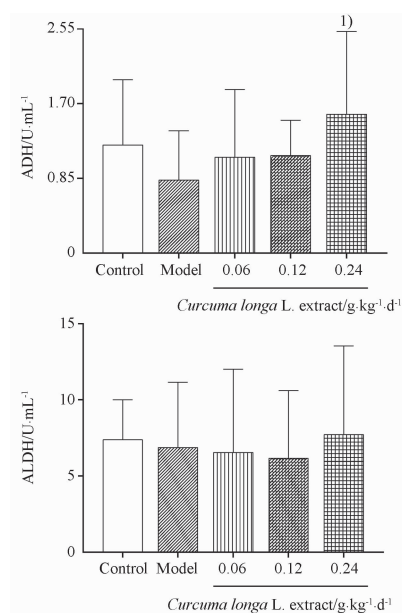
酒精由消化道吸收,主要在肝脏代谢(90%~98%)。酒精在人体内的分解代谢主要依赖于肝脏酶系统中的两种酶:一种是ADH,另一种是ALDH,也是公认的乙醇代谢的主要途径^[29]。醉酒是酒精在体内的吸收率大于氧化代谢率,较多的乙醇经血液循环进入大脑并作用于中枢神经系统。同时,酒精代谢生成的大量乙醛无法得到及时处理而在体内蓄积。因此,解酒原理一方面应降低酒精在消化道内的吸收速度和增加在胃内的代谢,增强肝脏内ADH的活性,加快乙醇在肝脏内的代谢,快速缓解醉酒状态;增强肝脏内的ALDH的活性,减少乙醛在肝脏内的蓄积,减轻乙醛对肝脏的细胞毒作用^[30-31]。

对姜黄超临界CO₂萃取物的解酒途径进行研究,结果见图3,与模型对照组比较,姜黄超临界CO₂萃取物可以显著提高大鼠肝脏中的ADH水平,对ALDH水平无显著影响,提示姜黄超临界CO₂萃取物可能通过提高ADH活性,加快乙醇的代谢而发挥解酒功效。

3.5 姜黄超临界CO₂萃取物的护肝作用研究

采用小鼠亚急性酒精性肝损伤模型对姜黄超临界CO₂萃取物的护肝作用进行研究。结果见图4,小鼠造模前灌胃给药15 d,此后同时灌胃给药及体积分数40%乙醇15 d后,模型对照组与空白对照组比较,血清中TC、LDL-C和TBIL水平均显著升高,提示模型建立

成功。与模型对照组比较,黄超临界CO₂萃取物各剂量组小鼠血清中TC和TBIL水平显著降低,低剂量组和中剂量组小鼠血清中LDL-C水平显著降低,提示姜黄超临界CO₂萃取物具有较好的护肝作用。

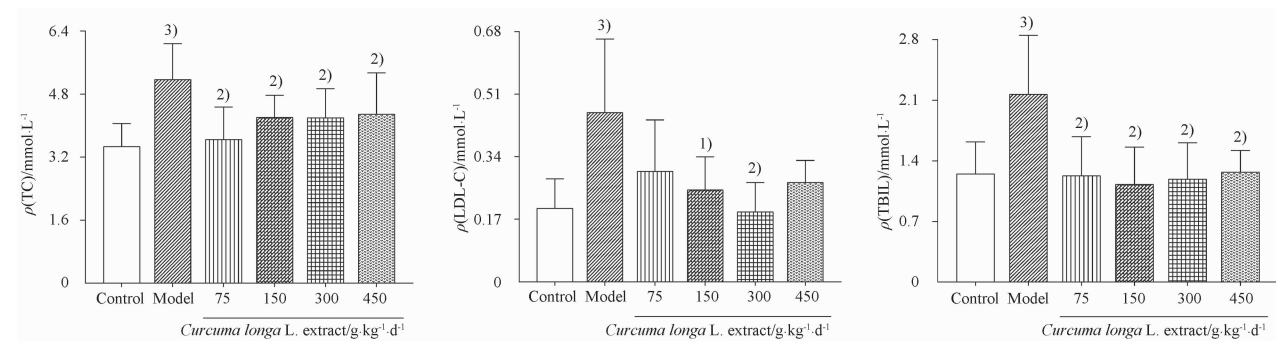


与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.01$, compared with the model group.

图3 姜黄超临界CO₂萃取物对酒精代谢酶的影响。 $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effects of CO₂ supercritical extract from *Curcuma longa* L. on alcohol metabolizing enzymes. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$



与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与空白对照组比较,³⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$, compared with the model group;³⁾ $P < 0.01$, compared with the control group.

图4 姜黄超临界CO₂萃取物对小鼠亚急性肝损伤模型的影响。 $n = 15$, $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 Effect of CO₂ supercritical extract from *Curcuma longa* L. on subacute liver injury model in mice. $n = 15$, $\bar{x} \pm s$

4 结论

本研究通过单因素试验和正交试验设计对姜黄超临界CO₂萃取工艺进行研究,得到最佳工艺路线及参数:萃取压力30 MPa,萃取温度55℃,分离釜压力与储罐压力一致,分离釜温度40℃,当温度压

力达到设定值后,缓慢加入药材重量1倍的乙醇作为夹带剂;开始循环萃取并记取萃取开始时间,萃取时间为2 h,放出萃取液,50℃减压回收乙醇,即得。通过对最佳工艺提取的姜黄超临界萃取物解酒功效验证,解酒途径分析和护肝作用研究发现,该姜黄超

临界萃取物可以显著降低小鼠醉酒后的睡眠时间和醒酒实验,提高大鼠体内的 ADH 水平,具有较好的解酒功效,还可以降低亚急性肝损伤模型小鼠的血清中 TC、LDL-C 和 TBIL 水平,具有很好的护肝功效。本研究为姜黄超临界 CO₂ 萃取物的食品和药品的开发提供了一定的理论依据,且具有较好的应用前景。

REFERENCES

- [1] PANKNIN T M, HOWE C L, HAUER M, *et al.* Curcumin supplementation and human disease: a scoping review of clinical trials[J]. *Int J Mol Sci*, 2023,24(5):4476. DOI: 10.3390/ijms24054476.
- [2] *Ch. P*(2020) Vol I (中国药典 2020 年版. 一部) [S]. 2020: 276-277.
- [3] ABD EL-HACK M E, EL-SAADONY M T, SWELUM A A, *et al.* Curcumin, the active substance of turmeric: its effects on health and ways to improve its bioavailability[J]. *J Sci Food Agric*, 2021,101(14):5747-5762.
- [4] YANG Z J, HUANG S Y, ZHOU D D, *et al.* Effects and mechanisms of curcumin for the prevention and management of cancers: an updated review [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022,11(8):1481. DOI: 10.3390/antiox11081481.
- [5] LIN Y, LIU H, BU L, *et al.* Review of the effects and mechanism of curcumin in the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Front Pharmacol*, 2022,13:908077. DOI: 10.3389/fphar.2022.908077.
- [6] HAO M, CHU Y, LEI J, *et al.* Pharmacological mechanisms and clinical applications of curcumin: update[J]. *Aging Dis*, 2023,14(3):716-749.
- [7] MORIMOTO T, SUNAGAWA Y, KATANASAKA Y, *et al.* Drinkable preparation of theracurmin exhibits high absorption efficiency--a single-dose, double-blind, 4-way crossover study[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013,36(11):1708-1714.
- [8] CHEN J M, JIAO C W, LIANG H J, *et al.* Antialcoholism effects of curcuma botanical beverage in km mice [J]. *Mod Food Sci Technol (现代食品科技)*, 2022,38(7):40-47.
- [9] SHI N Q, ZHANG Y, FENG B, *et al.* Comparison of the properties of curcumin solid dispersions prepared by different technologies[J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2016,51(10):821-826.
- [10] XIAO C K. Progress in chemical composition of curcuma [J]. *Chin J Exp Tradit Form (中国实验方剂学杂志)*, 2012,18(21):339-347.
- [11] ZHANG Y, ZHANG H B, GUO H, *et al.* Research progress on curcuma longae rhizoma and predictive analysis of its quality markers [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2021,52(15):4700-4710.
- [12] FARZAEI M H, ZOBEIRI M, PARVIZI F, *et al.* Curcumin in liver diseases: a systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective [J]. *Nutrients*, 2018,10(7):855. DOI: 10.3390/nu10070855.
- [13] SUBRAMANIYAN V, LUBAU N, MUKERJEE N, *et al.* Alcohol-induced liver injury in signalling pathways and curcumin's therapeutic potential [J]. *Toxicol Rep*, 2023,11:355-367.
- [14] SUN Y K, ZHANG Y F, XIE L, *et al.* Progress in the treatment of drug-induced liver injury with natural products [J]. *Pharmacol Res*, 2022,183:106361. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106361.
- [15] AL-DOSSARI M H, FADDA L M, ATTIA H A, *et al.* Curcumin and selenium prevent lipopolysaccharide/diclofenac-induced liver injury by suppressing inflammation and oxidative stress [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2020,196(1):173-183.
- [16] LI S, WANG X, XIAO Y, *et al.* Curcumin ameliorates mercuric chloride-induced liver injury via modulating cytochrome p450 signaling and nrf2/ho-1 pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021,208:111426. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111426.
- [17] LIJU V B, JEENA K, KUTTAN R. An evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of essential oil from curcuma longa. L [J]. *Indian J Pharmacol*, 2011,43(5):526-531.
- [18] NWOZO S O, OSUNMADEWA D A, OYINLOYE B E. Anti-fatty liver effects of oils from Zingiber officinale and curcuma longa on ethanol-induced fatty liver in rats [J]. *J Integr Med*, 2014,12(1):59-65.
- [19] KOTHA R R, LUTHRIA D L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects [J]. *Molecules*, 2019,24(16):2930. DOI: 10.3390/molecules24162930.
- [20] PRIYADARSINI K I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent [J]. *Molecules*, 2014,19(12):20091-20112.
- [21] LV G P, HU D J, ZHOU Y Q, *et al.* Preparation and application of standardized typical volatile components fraction from turmeric (*Curcuma longa* L.) by supercritical fluid Extraction and step molecular distillation [J]. *Molecules*, 2018,23(7):1831. DOI: 10.3390/molecules23071831.
- [22] HUANG M, SU L Y, ZHANG L H, *et al.* Optimization of supercritical co₂ extraction process and analysis of physicochemical properties of coffee essential oil [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2022,43(3):145-154.
- [23] LI W Y, WU H S, YU H Z. Comparison of different extraction methods of akebia trifoliata oil and optimization of supercritical co₂ extraction process [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2021,42(10):203-208.
- [24] YU P. Effects of pueraria lobata, semen hoveniae and hibiscus sabdariffa herbal jiaosu on anti-alcohol and liver protection [J]. *China Brew (中国酿造)*, 2023,42(7):154-159.
- [25] ZHOU Q F, KANG J, MA K, *et al.* Anti-alcoholism effects of rhizoma dioscoreae polysaccharide on acute alcohol intoxic mice [J]. *Food Res Dev (食品研究与开发)*, 2019,40(19):113-117.
- [26] QI L M G, YANG Z H, WEI Z Q, *et al.* Anti-alcohol and liver-protecting effects of four ancient prescriptions and the potential mechanisms [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2024,59(2):161-171.
- [27] GAN Y, PENG J, ZHANG Y, *et al.* Protective effect of lactiplantibacillus pentosus cqzc 01 in kunming mice of subacute alcoholic liver injury [J]. *J Food Sci*, 2023,88(6):2642-2654.
- [28] QIAN M X, LI S L, LI F, *et al.* Effects of polysaccharides from six different dendrobium species against alcohol-induced subacute liver injury in mice [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2015,50(24):2117-2123.
- [29] WANG S C, CHEN Y C, CHEN S J, *et al.* Alcohol addiction, gut microbiota, and alcoholism treatment: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(17):6413. DOI: 10.3390/ijms21176413.
- [30] ZHUO X X, DENG L P, HE B H, *et al.* Research progress of anti-alcoholic mechanism and anti-alcoholic products [J]. *China Brew (中国酿造)*, 2024,43(2):22-28.
- [31] LI Q, LU Y, SHANG J, *et al.* Ganshuang granule plays a pharmacological role in anti-alcoholic and anti-hangover via regulating alcohol metabolism and affecting neurotransmitters [J]. *Int J Neurosci*, 2024; 1-13. DOI: 10.1080/00207454.2023.2300734.

(收稿日期:2024-08-12)