

# 均匀设计与正交设计在钩吻生物总碱提取工艺筛选研究中的应用

张兰兰 黄昌全 张忠义 林敬明 (第一军医大学珠江医院药剂科 广东 广州 510282)

**摘要** 目的 优选简便高效的钩吻生物总碱的提取工艺 考察不同提取条件下的提取率 方法 分别用均匀设计和正交设计两种方法对钩吻生物总碱的提取工艺中溶剂种类 提取系统中固液比例和回流时间 3 个因素进行优选 结果 两种方法的结果均为采用氯仿作为溶剂 固液比例为 1.0 回流时间为 3 h 所得总碱含量最高 结论 正交设计与均匀设计试验所得结果相近 结论基本一致

**关键词** 均匀设计 正交设计 钩吻总碱 提取工艺

中图分类号 R949.776.3; R284.2 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)09-0914-02

## Comparative study of uniform design and orthogonal design in the extraction of Gelsemium alkaloids

ZHANG Lan-lan, HUANG Chang-quan, ZHANG Zhong-yi, LIN Jing-ming

Department of Pharmaceutics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

**Abstract:** Objective To develop a simple and efficient method for extracting Gelsemium alkaloids. Methods Uniform design and orthogonal design were respectively utilized to optimize the 3 factors in the extraction process, namely the type of solvent used, the solid-to-liquid ratio in the extraction system and the reflux time. Results Both of the design methods adopted trichloromethane as the solvent, with the solid-to-liquid ratio of 1:7.5 and reflux time of 3 h with 3 repetitions for the highest yield of alkaloids. Conclusion Similar results are obtained from the two design methods for extracting Gelsemium alkaloids.

**Key words:** uniform-design; orthogonal-design; Gelsemium elegans Benth; alkaloid/extraction

钩吻 *Gelsemium elegans Benth* 为马钱科胡蔓藤属植物 含有有效成分生物碱具有抗肿瘤 镇痛 抗炎 等功效 为摸索提取钩吻有效成分的最佳工艺 我们采用均匀试验设计与正交试验设计两种方法 对影响提取结果的溶剂种类 溶剂用量和提取时间等 3 个主要因素进行比较筛选研究 近年来 正交设计与均匀设计在中药新药的提取工艺研究中应用较多 本研究以钩吻生物总碱提取工艺为例 分别比较 2 种实验设计方法的结果并评价其优缺点 为工艺筛选研究的试验设计方法提供参考依据

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

实验用钩吻原药材采自广东潮汕地区 经鉴定为马钱科胡蔓藤属植物 钩吻 提取所用试剂均为分析

纯

#### 1.2 实验因素与指标

本实验考察影响提取结果的 3 个因素 溶剂种类 固液比例 回流时间 以提取物中钩吻生物总碱含量最高为考察指标

#### 1.3 提取钩吻生物总碱的基本流程

取原料 1 kg 粉碎为约 30~40 目的粗粉 加入 3% NaOH 溶液 1000 ml 拌匀 晾干 于 70 益烘箱烘 4~5 h 在烘干的药粉中加入溶剂 然后放入 10000 ml 提取瓶中进行回流提取 3 次 合并提取液 减压回收溶剂 得流浸膏

#### 1.4 钩吻生物总碱的化学鉴别方法

(1) 沉淀反应 取鞣酸 1 g 加乙醇 1 ml 加水溶解并稀释至 100 ml 本液应临用新制 与钩吻生物碱反应生成棕黄色非晶形沉淀 (2) 显色反应 取 1% 钼酸钠的硫酸试液与钩吻生物碱反应 溶液呈浅黄色

#### 1.5 正交设计试验

按正交试验要求将各影响因素分为 3 个水平 溶剂种类 10% 乙醇 5% 乙醇 氯仿 固液比例 1:5 1:7.5 1:10 回流时间 1 h 3 h 5 h 选用  $L_9(3^4)$  表安排实验 表 1

正交设计实验结果分析表明 从极差来看 溶剂的 R 值极差最大 说明溶剂种类对生物总碱的提取含量影响最大 是主要因素 各因素对生物总碱提取的影

收稿日期 2003-05-12

基金项目 广东省科技攻关项目 2001 年度 C30801 号

Supported by the Key Sci & Tech Research Foundation of Guangdong Province (C30801 of 2001 year)

作者简介 张兰兰 1972 年生 广东五华人 第一军医大学在读硕士研究生 电话 20-61643550

通讯作者 林敬明 1964 年生 广东陆丰人 主管药师 发表科技文章 60 余篇 获军队科技进步奖二等奖 1 项 军队科技进步三等奖 2 项 参与厅局和省市重点科技攻关科研课题 13 项 参编专著 1 部 电话 20-61643550

表 1 钩吻生物总碱提取工艺正交设计表及结果  
Tab.1 Orthogonal design and results of the extraction of Gelsemium alkaloids

No.	A(Solventype)	B(Solid-to-liquidratio)	C(Refluxtime)	D(Error)	Yield(%)
1	1(70%ethanol)	1(1 颐5)	1(1 h伊)	1	0.90
2	1(70%ethanol)	2(1 颐5)	2(2 h伊)	2	0.98
3	1(70%ethanol)	3(1 颐5)	3(3 h伊)	3	1.05
4	2(95%ethanol)	1(1 颐5)	2(2 h伊)	3	1.17
5	2(95%ethanol)	2(1 颐5)	3(3 h伊)	1	1.24
6	2(95%ethanol)	3(1 颐5)	1(1 h伊)	2	0.99
7	3(chloroform)	1(1 颐5)	3(3 h伊)	2	1.39
8	3(chloroform)	2(1 颐5)	1(1 h伊)	3	1.25
9	3(chloroform)	3(1 颐5)	2(2 h伊)	1	1.30
K1	0.98	1.15	1.05	1.15	
K2	1.13	1.16	1.15	1.12	
K3	1.31	1.11	1.23	1.16	
R	0.33	0.05	0.18	0.04	

响程度依次为 A>C>B遥整个试验结果可得到较佳组合工艺条件为 A3B2C3遥钩吻生物总碱提取的最佳工艺条件为使用氯仿回流提取袁提取体系固液比为 1 颐5袁回流时间 3 h伊遥

### 1.6 均匀设计试验

按均匀试验要求将各因素分为 3 个水平遥溶剂种类渊冤0%乙醇尧5%乙醇尧氯仿遥固液比例渊冤1 颐5尧1 颐5尧5 颐1 颐5尧回流时间渊冤1 h伊尧2 h伊尧3 h伊遥分别循环 3 次拟合成 6 水平袁选择 U<sub>6</sub>\*渊冤袁根据使用表的规定袁选取其中的 1 尧尧尧 三列安排实验渊表 2冤遥

表 2 钩吻生物总碱提取工艺均匀设计表及结果  
Tab.2 Uniform design and results of the extraction of Gelsemium alkaloids

No.	A(Solventype)	B(Solid-to-liquidratio)	C(Refluxtime)	Yield(%)
1	1(70%ethanol)	2(1 颐5)	3(3 h伊)	0.82
2	2(95%ethanol)	4(1 颐5)	6(3 h伊)	1.08
3	3(chloroform)	6(1 颐5)	2(2 h伊)	1.30
4	4(70%ethanol)	1(1 颐5)	5(2 h伊)	0.83
5	5(95%ethanol)	3(1 颐5)	1(1 h伊)	0.97
6	6(chloroform)	5(1 颐5)	4(1 h伊)	1.28

## 2 两种设计方法实验结果的分析

### 2.1 正交设计实验结果分析

对实验结果进行方差分析渊表 3冤遥从方差分析表可见在 0.05 水平下袁溶剂种类和回流时间对钩吻生物总碱得率影响有显著性差异袁而固液比例则无显著性差异遥

### 2.2 均匀设计实验结果分析

利用逐步回归程序在微机上将各水平对得率进

行多元回归处理袁结果得如下回归方程式院

$$Y=0.548+0.226A^2+0.520A^3+1.413B+0.0298C$$

$R^2=0.999$ 袁 $F=413.798$ 袁 $F_{0.05}(3,3)=9.28$ 袁 $F_{0.05}(3,3)=6$ 遥查表得  $F_{0.05}(3,3)=9.28$ 袁 $F_{0.05}(3,3)=6$  检验通过遥从上述结果可见袁尧尧尧 项系数均为正值袁故在取值范围内应取最大值为好遥即以氯仿作为溶剂袁提取体系固液比例 1 颐5袁回流时间 3 h伊 条件最佳遥结合正交设计试验结果袁确定固液比 1 颐5袁可节省成本袁对提取效率不会有太大影响遥

### 2.3 验证实验

用优选出的工艺条件进行验证实验袁即以氯仿作为溶剂袁提取体系固液比例为 1 颐5袁回流时间 3 h伊袁测得总碱得率为 1.42%遥高于原有试验值袁表明优选工艺是可信的遥

表 3 正交设计实验结果方差分析

Tab.3 Variance analysis of the results of uniform design					
Variencesource	SS	df	MS	F	P
A	0.170	2	8.514伊0 <sup>2</sup>	79.000*	0.013
B	3.489伊0 <sup>3</sup>	2	1.744伊0 <sup>3</sup>	1.619	0.382
C	4.816伊0 <sup>2</sup>	2	2.488伊0 <sup>2</sup>	22.711*	0.042
D(Error)	2.156伊0 <sup>3</sup>	2	1.078伊0 <sup>3</sup>		

\*F<sub>0.05</sub>(2,2)=19.00

## 3 讨论

将正交试验及均匀试验的结果进行分析比较后可知袁在理论最佳提取条件方面袁对溶剂的种类和回流时间正交试验及均匀试验的结论是一致的袁分别为氯仿和 3 h伊遥而对于提取体系的固液比例正交试验及均匀试验二者则有一定的差异遥

用氯仿提取钩吻袁具有操作简便尧快速尧提取周期短等特点袁同时总碱的得率较高遥

均匀设计是方开泰将数论和多元统计相结合创造的一种适用于多因素水平的试验方法遥它具有试验次数少尧均匀分散尧试验数据用计算机处理可方便尧迅速尧准确的特点遥而一般认为正交设计考察的水平数不宜过多袁若在一项试验中有 s 个因素袁每个因素有 q 个水平袁采用正交设计法至少要做 q<sup>2</sup> 次试验遥而在实际操作中要做 q<sup>2</sup> 次试验实属不易遥在希望很快划定考察范围或用于粗略评价时袁可选用这种方法遥如果先利用正交设计对影响因素进行初筛袁再利用均匀

的超微结构的破坏从而影响胰岛细胞的功能

本实验的研究结果表明胰淀素对体外培养的胰岛细胞胰岛素的合成与分泌有一定的影响。不同浓度胰淀素作用 2 h 后对胰岛素的基础分泌量无明显影响。但在葡萄糖诱导的胰岛素释放试验中, 10  $\mu\text{mol/L}$  以上胰淀素可抑制高糖刺激下的胰岛素分泌, 并呈剂量依赖性。而 10  $\mu\text{mol/L}$  以下浓度胰淀素对胰岛素的释放无明显影响。并发现在胰淀素作用后, 胰岛  $\beta$  细胞内 DNA 降解, 胰岛素含量在高浓度组升高而细胞活性显著降低。与正常对照组相比均有显著性差异。提示高浓度胰淀素对胰岛细胞的活力有显著直接抑制作用, 并抑制胰岛素从胰岛  $\beta$  细胞内释放。在 2 型糖尿病患者, 高血糖引起胰岛素及胰淀素分泌增加, 细胞内分泌小泡聚集但释放发生障碍。这种沉淀局限在胰岛的上皮细胞与毛细血管之间, 随着病情发展而加剧, 最终取代整个胰岛, 出现继发性胰岛功能衰竭。对于如何防止胰淀素过量产生和沉积, 延缓胰岛细胞损伤, 以及损伤途径和损伤机制等有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 周琳, 薛耀明, 金春华, 等. 胰淀素对胰岛细胞损伤作用的初步研究. 第一军医大学学报, 2001, 21(2): 96-8.
- Zhou L, Xue YM, Jin CH, et al. Effect of amylin on pancreatic islet cells: a preliminary study. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2001, 21(2): 96-8.
- Lukinins A, Wilander E, Westermark GT, et al. Colocalization of islet amyloid polypeptide and insulin in the  $\beta$  cell secretory granules of the human pancreatic islet. *Diabetologia*, 1998, 32(2): 240-4.
- 朱铁虹, 畅继武, 尹 潍, 等. 大鼠胰岛细胞单层培养模型的建立和

应用. 天津医药(Tianjin Med), 1998, 26(4): 421-2.

- 姜一真, 薛耀明, 邓 燕, 等. 软脂酸对体外原代培养大鼠胰岛细胞凋亡作用的实验研究. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 449-51.
- Jiang YZ, Xue YM, Deng Y, et al. Apoptosis-inducing effect of palmitic acid on rat pancreatic islet cells in primary culture: a preliminary study. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(5): 449-51.
- Sellins K, John CJ. Gene induction by irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *Immunol*, 1987, 139(54): 3199-206.
- 李晨钟, 张素华, 舒昌达, 等. 胰岛素抵抗细胞模型的胰岛素降解酶活性与胰岛素敏感性的关系. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 151-4.
- Li CZ, Zhang SH, Shu CD, et al. Relationship between insulin-degrading enzyme activity and insulin sensitivity in cell model of insulin-resistance. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(2): 151-4.
- Pettersson M, Ahren B. Failure of islet amyloid polypeptide to inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion in model experiments in mice and rats. *Acta Physiol Scand*, 1990, 138(3): 389-94.
- Nyhol B, Fineman MS, Koda JE, et al. Plasma amylin immunoreactivity and insulin resistance in insulin resistance relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, 1998, 30(2): 206-12.
- 赵德明, 张 桦, 陈 宏, 等. 三种不同免疫抑制剂对胰岛细胞功能的影响. 第一军医大学学报, 2003, 23(2): 151-2.
- Zhao DM, Zhang H, Chen H, et al. Effects of three different immunosuppressive drugs on SD rat islet cell viability. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(2): 151-2.
- Tokuyama T, Yagui K, Yamaguchi T, et al. Expression of human islet amyloid polypeptide/amylin impairs insulin secretion in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *Metabolism*, 1997, 46(10): 1044-51.
- Bennet WM, Beis CS, Ghatei MA, et al. Amylin tonally regulates stimulated insulin secretion in rats. *Diabetologia*, 1994, 37(4): 436-8.

上接915页

设计进行较为仔细的研究, 则可达到较好的效果。选用不同的设计方法可相互取长补短, 从而优选出最佳工艺。

#### 参考文献

- 陈忠良. 钩吻生物碱的提取与分离. 中药通报(Chin Med Rep), 1987, 12(5): 297-8.
- 周杰, 张忠义, 石 勇, 等. 超临界  $\text{CO}_2$  流体萃取与分子蒸馏联用技术提取分离川芎挥发性成分及其 GC/MS 分析. 第一军医大学学报, 2002, 22(7): 652-3.
- Zhou BJ, Zhang ZY, Shi Y, et al. Analysis with gas chromatography and mass spectrography of volatile components of *Ligusticum sinense*

*Franch* extracted by  $\text{CO}_2$  supercritical fluid extraction in combination with molecular distillation. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(7): 652-3.

- 夏之宁, 谌其亭, 穆小静, 等. 正交设计与均匀设计的初步比较. 重庆大学学报(J Chongqing Univ), 1999, 22(5): 112-7.
- 游文玮, 吴 昭, 佟 丽, 等. 喂饲补阳还五汤大鼠血清中黄芪甲甙的固相萃取 - 化学衍生化 - 荧光分光光度法测定. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 335-6.
- You WW, Wu HH, Tong L, et al. Determination of serum astragaloside in rats fed with Buyanghuanwu decoction using solid-phase extraction, chemical derivatization and fluorospectrophotometry. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(4): 335-6.
- 覃仁安, 潘 玲, 沈映君, 等. 用均匀设计法优选紫草膏制备工艺. 中药(Chin Med), 2000, 23(3): 168-9.