

• 药剂 •

均匀设计与正交设计在金莲花提取 工艺筛选研究中的比较应用

高 英¹, 李卫民¹, 伍淑华¹, 冯毅凡²

(1 广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510405; 2 广东药学院测试中心, 广州 510224)

摘要: 应用均匀设计与正交设计两种方法对金莲花提取工艺进行研究, 考察不同提取条件下的提取率及样品中总黄酮的含量, 并用同一标准评价两种设计方法。结果: 正交设计认为影响金莲花提取率及总黄酮含量的最主要因素均是提取时的乙醇浓度, 两者的最佳乙醇浓度均应是 65%; 均匀设计认为对提取率而言最大的影响因素也是乙醇浓度, 最佳乙醇浓度应是 60%, 对总黄酮含量而言最大的影响因素也是乙醇浓度, 最佳乙醇浓度为 70%。表明: 正交设计与均匀设计试验所得的结果相近, 结论基本一致。

关键词: 均匀设计; 正交设计; 总黄酮

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)01-0001-03

The Comparative Studies on the Extracting Techniques of *Jinlianhua* by Even-design and Orthogonal-design Methods

GAO Ying¹, LI Wei-min¹, WU Shu-hua¹, FENG Yi-fan²

(1. Guangzhou University of TCM, Guangzhou, 510405, China;

2. Test Center, Guangzhou Pharmaceutical College, Guangzhou, 510224, China)

Abstract: Objective: To compare the extracting methods of *Jinlianhua* evaluated by even designed and orthogonal designed methods. Results: The main factors to extract *Jinlianhua* evaluated by extracted yield and total flavones were 65% alcohol with orthogonal design method, and 65% and 70% alcohol with even design method. Conclusion: The similar results were obtained by those two methods.

Key words: Even design method; Orthogonal design method; Total flavone

金莲花为毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 亚洲金莲花 *Trollius asiaticus* L. 的干燥花。具有清热解毒之功效, 有效成分是黄酮类化合物, 为摸索提取有效成分的最佳工艺, 我们采用了均匀设计与正交设计两种方法对影响提取结果的乙醇浓度、乙醇用量、浸泡时间、提取次数等四个主要因素进行比较筛选研究。近年来, 正交设计和均匀设计在中药新药的工艺研究中应用较多, 本实验以金莲花提取工艺为例, 分别用正交设计法和均匀设计两种方法, 以提取率和总黄酮含量为测定指标, 以溶剂浓度、回流时间、溶剂用量、浸泡时间为考察因素进行试验, 比较两种实验设计方法的结果及评价其优缺点, 为工艺筛选研究的试验设计方法提供参考依据。

1 实验材料

1.1 药材 金莲花, 购自河北安国药材市场, 经鉴定为毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 的干燥花。

1.2 仪器 岛津 UV-210 可见-紫外分光光度仪。

2 实验方法

2.1 实验条件 本实验考察影响提取结果的四个因素, 即乙醇浓度(%)、溶剂用量(倍)、回流时间(h)、浸泡时间(h)。

按正交试验要求将各影响因素等分为五个水平: 浓度(%) 35、50、65、80、95; 溶剂用量(倍) 6、6.5、7、7.5、8; 回流时间(h) 1×2、1.5×2、2×2、2.5×2、3×2; 浸泡时间(h) 2、3、4、5、6, 同时按正交试验表的要求做 25 次实验。

按均匀试验要求将各影响因素等分为七个水平: 浓度(%) 35、45、55、65、75、85、95; 溶剂用量(倍) 5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5; 回流时间(h) 0.5×2、1×2、

1.5×2 2×2 2.5×2 3×2 3.5×2; 浸泡时间(h) 1、2 3 4 5 6 7, 同时按均匀设计表的要求做七次实验。

2.2 测定方法 (1) 提取率的测定: 将定量的金莲花药材按实验条件煮提两次, 合并滤液, 浓缩定容至一定体积后, 定量取出置蒸发皿中烘干, 称重, 计算而得。(2) 总黄酮的测定: 总黄酮含量测定参见部颁标准 WS3-75(X-65)-95(Z) 进行。实验结果见表1、表2。

表1 金莲花提取工艺正交试验四因素五水平 25次试验结果

试验号	浓度 (%)	用量 (倍)	回流时间 (h)	浸泡时间 (h)	提取率 (%)	总黄酮量 (%)
1	35	6	1×2	2	15.9	12.00
2	35	6.5	1.5×2	3	18.4	13.81
3	35	7	2×2	4	17.1	13.48
4	35	7.5	2.5×2	5	20.9	13.54
5	35	8	3×2	6	22.2	13.52
6	50	6	1.5×2	4	18.3	13.42
7	50	6.5	2×2	5	19.1	15.96
8	50	7	2.5×2	6	17.1	16.41
9	50	7.5	3×2	2	16.2	15.20
10	50	8	1×2	3	16.4	16.71
11	65	6	2×2	6	17.8	15.23
12	65	6.5	2.5×2	2	19.8	15.75
13	65	7	3×2	3	18.7	18.67
14	65	7.5	1×2	4	19.6	16.69
15	65	8	1.5×2	5	19.9	14.24
16	80	6	2.5×2	3	18.6	15.13
17	80	6.5	3×2	4	14.7	13.53
18	80	7	1×2	5	16.9	14.59
19	80	7.5	1.5×2	6	21.4	14.27
20	80	8	2×2	2	15.3	16.57
21	95	6	3×2	5	13.2	11.64
22	95	6.5	1×2	6	12.9	11.78
23	95	7	1.5×2	2	11.8	12.86
24	95	7.5	2×2	3	12.3	14.18
25	95	8	2.5×2	4	17.1	10.87
I _{ij}	18.9	16.76	16.34	15.8		
II _{ij}	17.42	16.98	17.96	16.88		
III _{ij}	19.16	18.32	16.32	17.36		
IV _{ij}	17.38	18.08	18.7	18.0		
V _{ij}	13.46	18.18	17.0	18.28		

试验号	浓度 (%)	用量 (倍)	回流时间 (h)	浸泡时间 (h)	提取率 (%)	总黄酮量 (%)
R	5.7	1.56	2.38	2.48		
I _{2j}	13.27	13.48	14.35	14.48		
II _{2j}	15.49	14.17	13.72	15.70		
III _{2j}	16.12	15.15	15.08	13.59		
IV _{2j}	14.82	14.78	14.29	13.99		
V _{2j}	12.27	14.38	14.51	14.19		
R	3.85	1.67	1.36	2.11		

表2 金莲花提取工艺均匀设计四因素七水平 7次实验结果

因素水平	浓度 (%)	用量 (倍)	回流时间 (h)	浸泡时间 (h)	提取率 (%)	总黄酮含量 (%)
1	35	60	1.5×2	6	17.9	12.36
2	45	7.0	3×2	5	21.1	14.63
3	55	8.0	1×2	4	22.3	14.80
4	65	5.5	2.5×2	3	20.6	15.95
5	75	6.5	0.5×2	2	19.6	15.17
6	85	7.5	2×2	1	18.3	15.05
7	95	8.5	3.5×2	7	15.3	14.89

3 两种设计方法实验结果的分析

3.1 正交设计实验结果分析 方差分析

	方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
提取率	A	16.62	4	4.16	7.14	< 0.05
	B	2.18	4	0.54	0.94	> 0.05
	C	3.10	4	0.77	1.33	> 0.05
	D	3.10	4	0.77	1.33	> 0.05
	误差 e	4.66	8	0.58		
总黄酮	A	18.23	4	4.56	16.49	< 0.05
	B	2.87	4	0.72	2.60	> 0.05
	C	1.72	4	0.43	1.56	> 0.05
	D	4.59	4	1.14	4.15	> 0.05
	误差 e	2.21	8	0.27		

综合直观分析和方差分析两种分析方法, 对提取率而言, 影响提取率的最显著因素是提取的醇浓度, 最佳提取浓度是 65%; 其余因素基本无影响。对总黄酮而言, 影响黄酮总量的最显著因素也是提取的醇浓度, 最佳提取浓度是 65%, 其次影响显著的因素是浸泡时间, 最佳浸泡时间是 3h, 其余因素基本无影响。以提取率占 40%, 总黄酮含量占 60% 计算综合评分, 其主要影响因素是提取的醇浓度, 最佳提取醇浓度是 65%, 其余因素几乎无影响。

正交设计试验结果分析表明: 金莲花提取的最

佳工艺条件为 65% 的乙醇, 浸泡 3h, 由于其余两个条件几乎无影响, 可按实际实验时的需要取值。

3.2 均匀设计实验结果分析 将实验结果输入计算机, 用沈阳药科大学编写的均匀设计程序处理, 得出总黄酮量及提取率的两个回归方程, 并进行显著性检验。

类别	剩余平方差	标准离差	复相关系数	回归方程的显著性检验	回归的显著性检验	N
总黄酮量的回归方程检验	$Q = 0.0007 \quad S = 0.0269 \quad R^2 = 1.0000 \quad F = 2050.8450 \quad ALFA = 0.0167 \quad 7$					
	$R = 0.9832$; 带平方项的逐步回归方程为					
	$Y = 3.8207 + 0.3691X_1 - 0.3931X_2 - 0.0027X_1^2 - 0.0273X_2^2 + 0.1106X_3^2$, $F = 2050.8450 > F_4^7 = 7.85 (\alpha = 0.01)$, 回归方程式有显著意义。					
提取率的回归方程检验	$Q = 0.0004 \quad S = 0.0189 \quad R^2 = 1.0000 \quad F = 1848.600 \quad ALFA = 0.0055 \quad 7$					
	$R = 0.9944286$; 带平方项的逐步回归方程为					
	$Y = -2.2174 + 0.6450X_1 + 0.7571X_2 + 0.2429X_3 - 0.0857X_4 - 0.0056X_1^2$, $F = 18468.600 > F_4^7 = 7.85 (\alpha = 0.01)$, 回归方程式有显著意义。					

从计算机给出的信息可知: 对提取率而言, 影响提取率的最大因素是提取时乙醇的浓度, 最佳的提取浓度是 60%, 其理论最佳提取条件是 A 浓度为 60% B 用量为 8 倍量; 对总黄酮量而言, 影响总黄酮量的最大因素是提取时乙醇的浓度, 最佳的提取浓度是 70%, 其理论最佳提取条件是 A 浓度为 70% B 用量为 5.5 倍量。可以得出这样一个结论:

对于提取率及黄酮总量两个不同的观察指标, 有不同的提取条件。

4 讨论

将正交试验及均匀试验的实验结果进行分析比较后可知: 在理论最佳提取条件上对于最重要的影响因素乙醇浓度, 正交试验及均匀试验二者的结论是十分相近, 基本一致的; 对于浸泡时间、溶剂用量等次要因素正交试验及均匀试验二者则有一定的差异。对于不同的观察指标(提取率及黄酮总量), 正交试验的结果是一致的, 而均匀设计的结果是不同的(这是否水平数分的越多, 越能体现出差异, 还有待今后的实验验证)。

通常认为正交设计具有容易掌握的优点, 但考察的水平数不宜过多, 否则实验次数将急剧增加; 希望很快划定考察范围或用于粗略评价时, 可选用这种方法。如果能利用正交设计对影响因素进行初筛, 再利用均匀设计进行较为仔细的研究, 则可达到较好的效果(两种方法结合在一起使用是较好的选择)。

参考文献:

- [1] 李卫民, 高英, 刘东辉, 等. 均匀设计方法在厚朴丸中筛选最佳配比的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, (2): 18-20.