

·药学信息学·

阎勤¹, 苏华², 黄玉玲¹, 江蓓¹, 马雪莹³, 罗茜怡⁴

(1. 柳州市妇幼保健院药学部, 广西 柳州 545001;

2. 广西中医药研究院中药药效与安全性评价中心, 广西 南宁 530022;

3. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000;

4. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541000)

摘要:目的 对百眼藤总蒽醌的提取工艺进行研究, 考察百眼藤总蒽醌小鼠单次给药毒性反应, 为后续百眼藤总蒽醌的动物药效实验剂量设计提供理论依据。方法 利用分光光度法测定百眼藤提取物中总蒽醌的含量, 采用响应曲面法对百眼藤提取工艺进行考察。结果 百眼藤总蒽醌的最佳提取条件为提取溶剂 66.26% 乙醇, 料液比 1:7.94, 提取时间 148.74 min。结论 本研究为百眼藤药材中总蒽醌的最佳提取工艺提供了实验依据。

关键词: 百眼藤; 蒽醌; 响应曲面法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2025.02.013

文章编号: 1006-1959(2025)02-0076-06

Study on the Extraction Process of Total Anthraquinones from *Caulis Marsdeniae* by Response Surface Methodology

YAN Qin¹, SU Hua², HUANG Yulin¹, JIANG Bei¹, MA Xueying³, LUO Xiyi⁴

(1. Department of Pharmacy, Liuzhou Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou 545001, Guangxi, China;

2. Department of Evaluation of the Efficacy and Safety of Traditional Chinese Medicine Center, Guangxi Institute
of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, Guangxi, China;

3. College of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

4. College of Pharmacy Guilin Medical University, Guilin 541000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the extraction process of total anthraquinone in *Morinda parvifolia*, and to investigate the single-dose toxicity of total anthraquinone in mice, so as to provide a theoretical basis for the dose design of animal efficacy experiment of total anthraquinone in *Morinda parvifolia*. **Methods** The content of total anthraquinones was determined by spectrophotometry, and the extraction process was investigated by response surface methodology. **Results** The optimum extraction conditions of total anthraquinones were as follows: extraction solvent 66.26% ethanol, solid-liquid ratio 1:7.94, extraction time 148.74 min. **Conclusion** This study provides an experimental basis for the optimal extraction process of total anthraquinones in *Morinda parvifolia*.

Key words: *Morinda parvifolia*; Anthraquinone; Response surface methodology

百眼藤为茜草科巴戟属植物百眼藤 (*Morinda parvifolia* Bartl. ex DC.), 以全草入药。收录于《中药大辞典》《中华本草》《全国中草药汇编》《广西本草选编》等^[1,2], 主要分布于广东、广西、福建、台湾、香港、海南、江西等地。文献报道^[3,4]百眼藤富含蒽醌类成分, 蒽醌类成分的含量易受乙醇浓度、提取物料比、提取时间及提取次数影响^[5-7], 目前尚未有百眼藤总蒽醌提取工艺研究报道。本研究拟采用响应面法对百眼藤中总蒽醌进行提取工艺研究, 为后续的动物

实验提供优质百眼藤总蒽醌, 现报道如下。

1 材料与仪器

1.1 药材与试剂 百眼藤药材: 采自广西贵港市平南县, 经柳州市妇幼保健院谢巍副主任中药师鉴定为茜草科巴戟属植物百眼藤后使用; 1,8-二羟基蒽醌 (批号: B21740, 上海源叶生物科技有限公司); 醋酸镁、乙醇、甲醇等均为分析纯 (广东光华科技股份有限公司)。

1.2 主要仪器 双列数显水浴锅水浴锅 (型号: HH-

基金项目: 广西中医药管理局自筹经费课题 (编号: GXZYB20230790)

作者简介: 阎勤 (1984.3-), 女, 广西柳州人, 本科, 主管药师, 主要从事临床药学研究

通讯作者: 苏华 (1984.11-), 女, 广西藤县人, 硕士, 副主任药师, 主要从事中药药理学研究

4S,上海科辰实验设备有限公司);干燥箱(型号:DHG-9055A,吴江市永联机械设备厂);全波长全自动多功能酶标仪(型号:MultiskanGo,美国 ThermoFisher)。

2 方法

2.1 百眼藤提取物中总蒽醌的测定

2.1.1 显色剂的配制 醋酸镁-甲醇溶液:称取醋酸镁 2.54 g,加甲醇 500 ml,超声使溶解完全,摇匀,备用(含量为 0.51%)^[8,9]。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 1,8-二羟基蒽醌 12.3 mg,置于 50 ml 容量瓶中,加甲醇至近刻度,超声溶解,放冷,加甲醇补至刻度,为 0.246 mg/ml 的对照品溶液,待用。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取百眼藤提取物干膏细粉 0.1 g,置于 100 ml 烧瓶中,加甲醇 100 ml,称重,水浴回流 1 h,补重,过滤,即得。

2.1.4 方法学考察 线性关系的考察:精密吸取浓度为 0.246 mg/ml 的 1,8-二羟基蒽醌标准溶液 0.10,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 ml,分别置于 10 ml 容量瓶中,加醋酸镁-甲醇溶液(0.51%)至刻度,摇匀,取适量至酶标板中,1 cm 光程,523 nm 测定。浓度(C)为横坐标,吸光度值(A)为纵坐标,绘制标准曲线。

精密度试验:取对照品液(0.246 mg/ml)6 份,每份 0.6 ml/份,制备,测定吸光度。

重现性试验:取提取物样品 6 份,约 0.1 g/份,精密称定,制备,测定,计算。

稳定性考察:取提取物样品 1 份,约 0.1 g/份,精密称定,制备,分别在 0~3.0 h 测定,计算。

加样回收试验:称取百眼藤提取物干膏细粉 6 份(约 0.05 g/份,样品中总蒽醌含量为 16.74%),置于 100 ml 圆底烧瓶中,精密加入 1,8-二羟基蒽醌溶液 10 ml(浓度为 8.1 mg/ml),按供试液制备方法制备,测定,计算加样回收试验样品中蒽醌的含量,计算加样回收率。

2.1.5 样品测定 取供试液 1.0 ml,移至 10 ml 量瓶,加醋酸镁-甲醇溶液稀释至刻度,混匀,测定,计算样品中蒽醌的含量。

2.2 百眼藤总蒽醌提取单因素试验

2.2.1 乙醇浓度考察 取百眼藤药材 6 份,20 g/份,加 8 倍量的 40%~90%乙醇提取 2 次,每次 2 h,取提取干膏 0.2 g,按供试液制备方法制备,测定,计算。

2.2.2 料液比考察 取百眼藤药材 6 份,20 g/份,分别加入 6~16 倍量 60%乙醇提取 2 次,每次 2 h,取提取干膏 0.2 g,制备,测定,计算。

2.2.3 提取时间考察 取百眼藤药材 6 份,20 g/份,8 倍量 60%乙醇提取 2 次,提取时间 30~180 min,取提取干膏 0.2 g,制备,测定,计算。

2.2.4 提取次数考察 取百眼藤药材 4 份,20 g/份,8 倍量 60%乙醇回流提取 1~4 次,每次 2.0 h,取提取干膏 0.2 g,制备,测定,计算。

2.3 响应面设计实验

2.3.1 实验因素与水平设计 根据单因素考察结果,并以 1、0、-1 分别表示自变量的高低水平,设计的实验因素和水平取值,见表 1。

表 1 实验因素与水平编码表

水平	A(溶剂浓度%)	B(液料比)	C(提取时间 min)
-1	50	1:6	90
0	60	1:8	120
1	70	1:10	150

2.3.2 响应曲面分析设计 利用 Design expert 10.0 软件对三因素 3 水平共 17 个试验点进行编码。拟合试验数据,建立二次多元回归方程,对其进行方差分析^[10-12]。

2.3.3 最佳提取工艺及验证试验 求解二次多元回归方程,按百眼藤总蒽醌最佳提取工艺,相关数据调整为便于操作的整数进行试验验证。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,行 ANOVA 方差分析。

3 结果

3.1 方法学考察结果 标准曲线的绘制:以 1,8-二羟基蒽醌浓度(C)为横坐标,吸光度值(A)为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明在线性范围 0.0025~0.0246 mg/ml 内,浓度-吸光度回归方程为 $Y = 28.904X + 0.1739(r = 0.9991)$ 。精密度试验结果表明,6 次测定的 RSD 为 0.45%,表明本法的精密度良好。重现性试验结果表明,6 次测定的 RSD 为 0.85%,表明本法的重现性较好。稳定性考察结果表明,6 次测定的 RSD 为 0.50%,表明供试品在 3.0 h 内稳定性良好。加样回收试验结果表明,总蒽醌的平均回收率为 100.89%,RSD 为 1.20%,见表 3。

3.2 百眼藤总蒽醌提取单因素试验

3.2.1 乙醇浓度考察 乙醇浓度为 50%、60%、70% 时,百眼藤总蒽醌提取得率较高,见图 1。

3.2.2 料液比考察 加入 6~16 倍量 60%乙醇为提取溶剂,百眼藤总蒽醌提取得率无明显区别,从节约成本角度考虑,选择料液比为 1:6、1:8、1:10 进行考察,见图 2。

3.2.3 提取时间考察 提取时间为 0.5、1.0 h 时,百眼藤总蒽醌提取得率较低,提取时间为 90、120、150、180 min 时,百眼藤总蒽醌提取得率较高,且提取得

率无明显区别,从节约成本角度考虑,选择提取时间为 90、120、150、180 min 进行考察,见图 3。

3.2.4 提取次数考察 提取次数为 1 次时,百眼藤总蒽醌提取得率较低,提取次数为 2、3、4 次时,百眼藤总蒽醌提取得率较高,且提取得率无明显区别,从节约成本角度考虑,选择提取次为 2 次,见图 4。

表 3 加样回收试验结果

序号	标准品加入量(mg)	取样量(g)	样品中蒽醌量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	8.1000	0.0503	8.420 22	16.5988	100.97	100.89	1.20
2	8.1000	0.0501	8.386 74	16.5881	101.25		
3	8.1000	0.0508	8.503 92	16.8143	102.59		
4	8.1000	0.0502	8.403 48	16.4246	99.02		
5	8.1000	0.0511	8.554 14	16.7664	101.39		
6	8.1000	0.0507	8.487 18	16.5998	100.16		

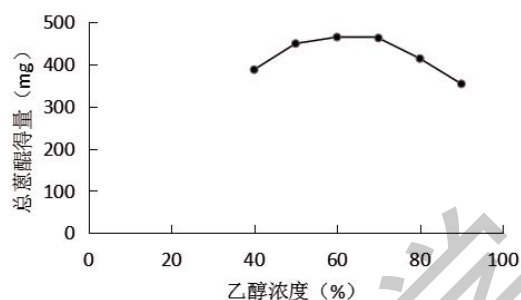


图 1 乙醇浓度单因素考察试验图

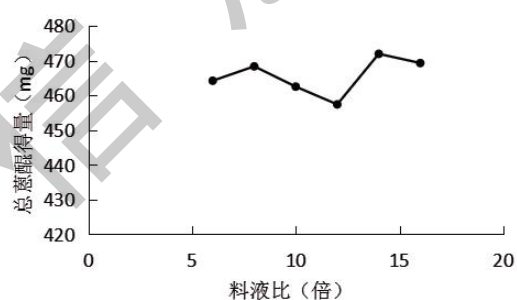


图 2 液料比单因素考察试验图

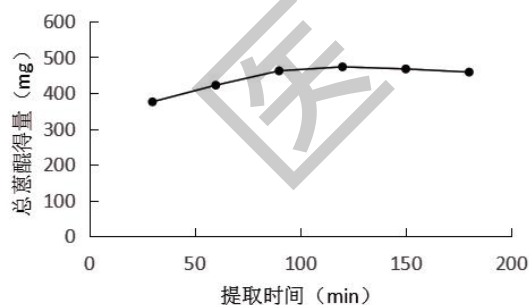


图 3 提取时间单因素考察试验图

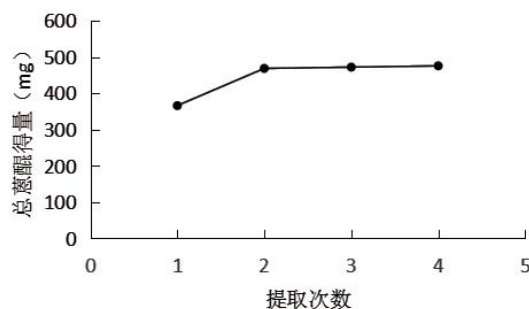


图 4 提取次数单因素考察试验图

3.3 响应面设计实验

3.3.1 响应曲面分析设计 利用 Design expert 10.0 软件对三因素 3 水平共 17 个试验点进行编码,见表 4。

3.3.2 响应曲面结果分析 根据表 4 的结果,对百眼藤总蒽醌提取结果进行多元二次回归分析,二次模型中回归系数的显著性检验见表 5,方差的结果分析,模型 P 值为 0.0002,表示模型高度显著,可充分代表响应值(R)与三个变量 A (溶剂浓度)、 B (料液比)、 C (提取时间)的关。根据 ANOVA 的分析表明百

眼藤总蒽醌提取量的决定系数 R^2 分别为 96.68%,模型 F 值分别为 22.67,说明模型非常显著。从表 4 表 5 可以看出,百眼藤总蒽醌提取量主要溶剂浓度 A 影响($P<0.0001$),其次是提取时间 C 的影响($P=0.0001$),最后是料液比 B 的影响($P=0.0003$),对于交互项,分别绘制响应面图和等高线图(图 5),从图中可以看出,以上响应面形状均较陡,等高线呈明显的椭圆形,说明各交互作用均较为明显,对百眼藤总蒽醌提取量的影响依次为 AC 、 AB 、 BC 。Design

expert 8.0.6 预测得到百眼藤总蒽醌的最佳提取条件是乙醇浓度为 66.26%，料液比为 1:7.94,3 提取时间为 148.74 min，百眼藤总蒽醌提取量为 488.396 mg。

各实验因子对响应值的影响呈显著的线性关系，回归方程为 $R=464.92+8.92A+7.03B+8.17C-3.29AB-5.25AC+1.64BC+5.45A^2+2.78B^2-0.25C^2$ 。

表 4 响应面法实验设计与结果

试验号	A(溶剂浓度)(%)	B(液料比)	C(提取时间)(min)	总蒽醌得量(mg)
1	-1	1	0	471.10
2	1	1	0	486.82
3	-1	0	1	476.33
4	0	0	0	463.27
5	0	-1	1	467.28
6	1	0	-1	475.42
7	0	0	0	465.63
8	0	1	1	487.04
9	-1	0	-1	451.54
10	0	1	-1	465.35
11	1	0	1	479.19
12	-1	-1	0	452.90
13	0	0	0	464.34
14	1	-1	0	481.77
15	0	-1	-1	452.15
16	0	0	0	465.35
17	0	0	0	466.01

表 5 变量与响应值方差分析(总蒽醌得量)

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1898.48	9	210.72	22.67	0.0002	significant
A-A	636.00	1	636.00	68.41	0.000 00	**
B-B	394.95	1	394.95	42.48	0.0003	**
C-C	534.32	1	534.32	57.47	0.0001	**
AB	43.23	1	43.23	4.65	0.0680	
AC	110.46	1	110.46	11.88	0.0107	*
BC	10.76	1	10.76	1.16	0.3177	
A2	124.89	1	124.89	13.43	0.0080	**
B2	32.57	1	32.57	3.50	0.1034	
C2	0.27	1	0.27	0.029	0.8692	
残差	65.08	7	9.30			
失拟项	60.14	3	20.05	16.25	0.0105	significant
误差项	4.94	4	1.23			
总和	1961.56	16				

R²_{Adj} = 0.9668

注：* 表示对结果影响显著(P<0.05)；** 表示对结果影响极显著(P<0.01)。

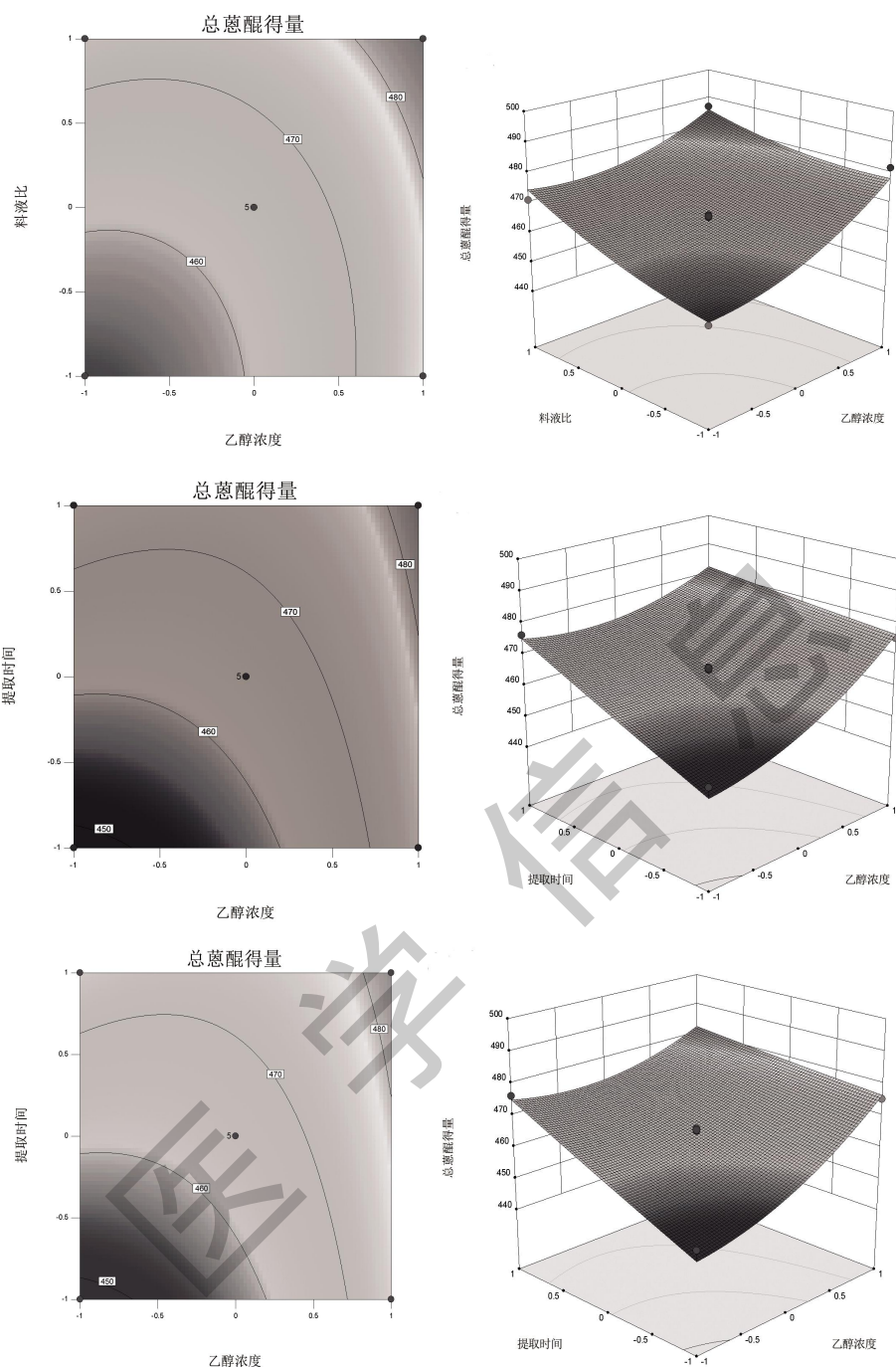


图 5 A、B、C 对百眼藤总黄酮提取率的响应曲面图和等高线图

3.3.3 最佳提取工艺及验证试验 求解二次多元回归方程, 百眼藤总黄酮最佳提取工艺为乙醇浓度为 66.26%, 料液比为 1:7.94, 提取时间为 148.74 min, 百眼藤总黄酮提取得量为 488.396 mg。

按百眼藤总黄酮最佳提取工艺, 相关数据调整为

便于操作的整数进行试验验证, 方法如下: 取百眼藤药材 3 份, 20 g/份, 采用浓度为 66% 的乙醇溶液进行提取, 料液比: 1:8; 提取时间: 149 min; 回流提取 2 次, 取提取得干膏 0.2 g, 制备, 测定并计算, 见表 6。

表 6 最佳提取工艺验证试验结果

序号	药材量(g)	溶剂浓度(%)	液料比	提取时间(min)	百眼藤总黄酮提取得量(mg)	平均值(mg)
1	20	66	1:8	149	485.38	483.27
2	20	66	1:8	149	481.65	
3	20	66	1:8	149	482.77	

结果表明,按获得的百眼藤总蒽醌最佳提取工艺进行验证试验,实际提取结果与理论最佳提取工艺结果相差不大,实际值/理论值 $\times 100\% = 483.27/488.40 \times 100\% = 98.95\%$ 。验证试验结果表明所得的最佳提取工艺可行性较高。

4 讨论

据文献报道^[3,4],百眼藤中含有多种蒽醌类成分,如百眼藤醌 A、百眼藤醌 B、茜草素-1-甲醚、锈色洋地黄醌醇、1-羟基-6-或 7-羟甲基蒽醌、2-羟甲基蒽醌等。多种蒽醌类成分具有较好的抗肿瘤作用并已经作为临床一线用药使用,用于治疗肺癌、胃癌、淋巴瘤等恶性肿瘤,如阿霉素、米托霉素等^[13]。另外,肝毒性是蒽醌类药物较为常见的副作用^[14]。如何获得药效好而毒性低的蒽醌类药物^[15],从天然药物中扩大筛选范围是比较可行的一种解决办法。本实验选择以蒽醌类成分测定作为百眼藤提取工艺研究的监控手段,更有可能获得百眼藤药效活性成分的富集部位。

蒽醌类成分的含量测定方法有滴定法、分光光度法、荧光分析法、高效液相色谱法、超高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、高效毛细管电泳法等方法^[16-19]。滴定法是药物分析发展前期比较常用的一种含测方法,存在着误差大的缺点。高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等方法灵敏度高,结果准确度高,但是仪器价格高,维护成本大。分光光度法检测仪器价格不高,检测结果也有较好的准确度,适用于活性部位或组分的含量控制,故本实验选择分光光度法对百眼藤提取物中蒽醌的含量进行监控。本实验对百眼藤总蒽醌分光光度含量测定进行了一系列的方法学研究,相应的标准曲线、精密度、准确度、稳定性、加样回收试验都取得了较为满意的结果,证明建立起的含量测定方法可行。

药材常用的提取溶剂有水、乙醇、乙醇-水混合溶剂,蒽醌类成分为含有环状结构及羟基基团的有机化合物,易溶于乙醇-水混合溶剂^[19,20],故本实验选择不同浓度的乙醇-水溶剂进行考察,另选择提取时间、提取次数、料液比等因素先进行单因素考察,确定一定的水平范围后再进行响应面法试验研究,以料液比、提取次数及提取时间为 3 个考察因素,设置 3 水平来对百眼藤中总蒽醌的提取进行研究,结果发现百眼藤总蒽醌的最佳提取条件为:乙醇浓度 66.26%,料液比 1:7.94,提取时间 148.74 min。经验证试验确证,预测值与验证值相近。本实验的研究为今后百眼藤总蒽醌的提取及药效开发提供了参考。

参考文献:

[1] 国家中医药管理局.中华本草(第六卷)[M].上海:上海科学

技术出版社,1999:5805-5806.

[2] 谢宗万.全国中草药汇编(上册)[M].北京:人民卫生出版社,1975:335.

[3] Chang P, Lee KH, Shingu T, et al. Antitumor Agents 50.1 Morindaparvin-A, a new antileukemic anthraquinone, and alizarin-1-methyl ether from Morinda parvifolia, and the antileukemic activity of the related derivatives [J]. J Nat Prod, 1982, 45(2):206-210.

[4] Chang P, Lee KH. Cytotoxic antileukemic anthraquinones from Morinda parvifolia [J]. Phytochemistry, 1984, 23(8):1733-1736.

[5] 蔡银妮, 孙红梅, 陈亚贤, 等. 响应面法优化双水相提取巴戟天游离蒽醌 [J]. 中药材, 2022, 45(5):1197-1201.

[6] 史友航, 吕青遥, 焦士蓉. 响应面法优化微波辅助提取芦荟蒽醌类物质工艺及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(19):174-181.

[7] 侯敏娜, 侯少平, 刘艳红, 等. 响应面法优化超声辅助提取浙贝母蒽醌工艺及其抑菌活性研究 [J]. 江西农业学报, 2020, 32(10):81-86.

[8] 李钦青, 董虹玲, 张海, 等. 桑椹胶囊中总蒽醌含量测定的研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(24):99-102.

[9] 韦汉燕, 谢恒, 廖迎, 等. 大血藤总蒽醌的含量测定及体外抗氧化活性的研究 [J]. 华夏医学, 2019, 32(4):27-31.

[10] 胡筱希, 朱荣, 唐新, 等. 响应曲面法优化防己中汉防己甲素及汉防己乙素的提取工艺 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(1):25-30.

[11] 胡筱希, 黄周锋, 陆国寿, 等. 响应曲面法优化翼核果中翼核果素及翼核果素-I 的提取工艺 [J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(1):58-62.

[12] 韩扬, 何聪芬, 董银卯, 等. 响应面法优化超声波辅助酶法制备燕麦 ACE 抑制肽的工艺研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(22):44-49.

[13] 温元凯, 孙福革, 林际兵, 等. 关于蒽醌类抗肿瘤新药的设计 [J]. 自然杂志, 1988(9):709.

[14] 丁平平, 易斌, 陈华师, 等. 纹何首乌饮片片蒽醌糖苷类成分变化与减毒效应 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(9):1180-1186.

[15] 张涛. 纹何首乌物质基础、工艺及降低肝毒作用研究 [D]. 南昌:江西中医药大学, 2023.

[16] 陈学艳, 魏文芝, 张敏娟, 等. UPLC 法同时测定复方龙胆碳酸氢钠片中 10 种大黄蒽醌类成分及土大黄苷的含量 [J]. 中国药房, 2023, 34(21):2595-2600.

[17] 陈宗燕, 梁霜. HPLC 法同时测定野菠菜中 4 种蒽醌类成分的含量 [J]. 中国药师, 2022, 25(8):1452-1455.

[18] 王丽丽, 徐东亮, 王诗涵. 一测多评法测定不同产地巴戟天中 5 种蒽醌类成分的含量 [J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2022, 35(2):290-294.

[19] 赵金秀, 贾勇, 安志英, 等. 超高效液相色谱(UHPLC)对大黄饮片炮制前后化学成分定性定量分析 [J]. 化学工程师, 2021, 35(10):30-33.

[20] 陈秋铃. 中药巴戟天的化学成分研究 [D]. 广州:暨南大学, 2022.

收稿日期:2023-12-23;修回日期:2024-01-09

编辑/成森