

# 构树叶中各成分超声提取工艺优化

宋晓宇<sup>1</sup>, 薛淑娟<sup>1,2</sup>, 张 庆<sup>1,2</sup>, 陈随清<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南省中药资源与中药化学重点实验室, 河南 郑州 450046)

**摘要:** **目的** 优化构树叶中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷超声提取工艺。

**方法** 在单因素试验基础上, 以超声时间、甲醇体积分数、料液比为影响因素, 各成分总得率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化超声提取工艺。**结果** 最佳条件为超声时间 54 min, 甲醇体积分数 69%, 料液比 1:50, 超声温度 30 ℃, 各成分总得率为 18.82 mg/g。**结论** 该方法简便稳定, 可为构树叶成分含量测定及药理活性研究提供参考。

**关键词:** 构树叶; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 木犀草苷; 芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷; 超声提取工艺; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)10-3435-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.042

构树叶又称构叶、褚叶<sup>[1]</sup>、谷黄叶、酱黄叶等<sup>[2]</sup>, 为桑科植物构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) vent. 的干燥叶, 其味甘, 无毒, 具有清热凉血、利湿杀虫的功效, 可用于鼻衄、顽癣、皮炎、虫咬、肠炎、痢疾等症<sup>[3]</sup>, 药用历史悠久<sup>[4]</sup>, 始载于《名医别录》, 列为上品, 《子母秘录》《简便单方》《生草药性备药》等古籍中也均有记载<sup>[5]</sup>, 其主要成分为黄酮类、香豆素类、挥发油类、萜类等<sup>[6]</sup>, 具有抗氧化<sup>[7]</sup>、抗癌<sup>[8]</sup>、抑菌<sup>[9]</sup>、抗病毒<sup>[10]</sup>等多种生物活性, 在河南民间部分地区用其治疗慢性前列腺炎<sup>[11]</sup>, 资源丰富, 分布于河南、安徽、湖南等省<sup>[12]</sup>。但仅贵州省有构树叶标准<sup>[13]</sup>, 并且指标成分较少<sup>[14]</sup>, 未对有机酸类成分进行测定。

目前, 关于构树叶成分提取的常用方法有索式提取、加热回流、超声提取等。本实验采用 Box-Behnken 响应面法优化构树叶中各成分超声提取工艺, 以期为该药材进一步开发利用提供参考。

## 1 材料

1.1 试剂与药物 新绿原酸对照品 (批号 2101021, 纯度 ≥98.0%) 购于北京索莱宝科技有限公司; 绿原酸 (批号 MUST-18030620, 纯度 ≥99.4%)、隐绿原酸 (批号 MUST-18032403, 纯度 ≥99.1%) 对照品均购于成都曼思特生物科技有限公司; 木犀草苷对照品 (批号 Y23S7H21785, 纯度 ≥98.0%) 购于上海源叶生物科技有限公司; 芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷对照品 (批号 wkq22031507, 纯度 ≥98.0%) 购于四川维克奇生物科技有限公司。甲醇为色谱

纯 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 甲酸为色谱纯 (天津市大茂化学试剂厂); 甲醇为分析纯 (天津市富宇精细化工有限公司); 水为超纯水 (实验室自制)。构树叶采自河南省南阳市宛城区, 经河南中医药大学陈随清教授鉴定为桑科植物构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) vent. 的干燥叶。

1.2 仪器 LT3002E 电子天平 (常熟市天量仪器有限公司); BSA124S-CW 电子天平 (十万分之一)、BT25S 电子天平 (万分之一) (德国赛多利斯公司); KQ-500DV 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q IQ7000 超纯水机 (美国 Millipore 公司); Waters e2695 高效液相色谱仪, 配置 e2695 进样系统和 2998PDA 检测器 (美国 Waters 公司)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A) -0.2% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 18%~20% A; 10~15 min, 20%~40% A; 15~30 min, 40%~45% A; 30~32 min, 45%~90%; 32~35 min, 90%~18% A; 35~45 min, 18% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 325 nm; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷对照品适量, 甲醇制成质量浓度分别为 380、510、180、290、500 μg/mL 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备 精密称取构树叶粉末 (过 2 号筛)

收稿日期: 2023-10-31

基金项目: 中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(豫财社[2019]40号); 河南省中药材产业技术体系项目(豫农科教[2018]14号)

作者简介: 宋晓宇 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药资源及其评价研究。Tel: 17337180871, E-mail: 497302382@qq.com

\*通信作者: 陈随清 (1965—), 男, 博士, 教授, 从事中药鉴定、资源及其评价研究。Tel: (0371) 65676686, E-mail: suiqingchen0371@163.com

1 g，置于具塞锥形瓶中，加入 50 mL 50% 甲醇，密塞，称定质量，超声（500 W、40 kHz）提取 1 h，冷却至室温，50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，取续滤液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.4 系统适应性试验 精密吸取对照品、供试品溶液各 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各成分色谱峰分离度良好。

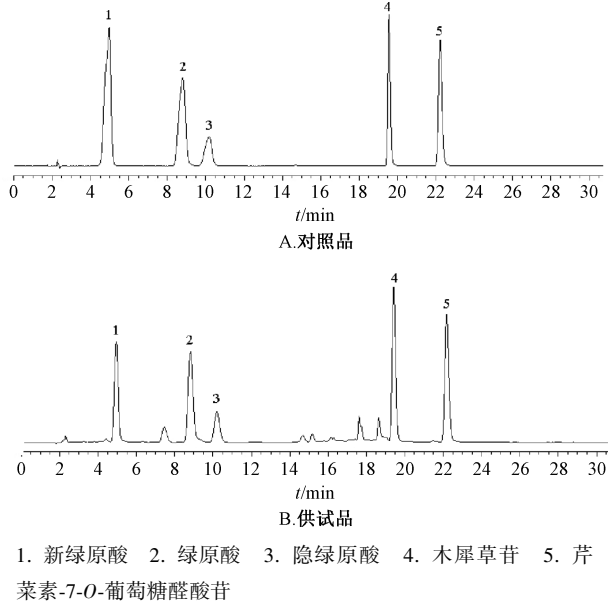


图 1 各成分 HPLC 色谱图

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液适量，依次稀释 1、2、5、10、20、50、100 倍，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
新绿原酸	Y=33 215X-69 948	0.999 7	3.8~380.0
绿原酸	Y=31 223X-124 563	0.999 6	5.1~510.0
隐绿原酸	Y=28 442X-42 520	0.999 6	1.8~180.0
木犀草苷	Y=18 715X-41 322	0.999 6	2.9~290.0
芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷	Y=22 534X-83 185	0.999 6	5.0~500.0

2.5.2 精密度试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷峰面积 RSD 分别为 2.06%、0.34%、1.75%、0.39%、0.71%，表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取同一批构树叶粉末约 1 g，共 6 份，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷峰面积

RSD 分别为 1.49%、1.74%、2.00%、1.25%、1.86%，表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取构树叶粉末约 1 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷峰面积 RSD 分别为 1.19%、1.37%、1.77%、0.99%、1.00%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验 取各成分含量已知的构树叶 6 份，每份约 0.5 g，精密称定，按 1：1 比例加入对照品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷平均加样回收率分别为 101.44%、98.33%、103.23%、98.89%、99.67%，RSD 分别为 1.12%、0.74%、1.56%、1.53%、1.22%。

2.6 单因素试验

2.6.1 提取溶剂 精密称取构树叶粉末（过 2 号筛）1 g，置于具塞锥形瓶中，加入 30%、50%、70%、90%、100% 甲醇各 25 mL，密塞，称定质量，超声处理 1 h，冷却至室温，相应体积分数甲醇补足减失的质量，摇匀，取续滤液，过 0.22 μm 微孔滤膜，考察不同体积分数甲醇的提取效果，结果见图 2。由此可知，70% 甲醇提取时各成分总得率最高，超过 70% 后呈下降趋势，故选择 70% 甲醇作为提取溶剂。

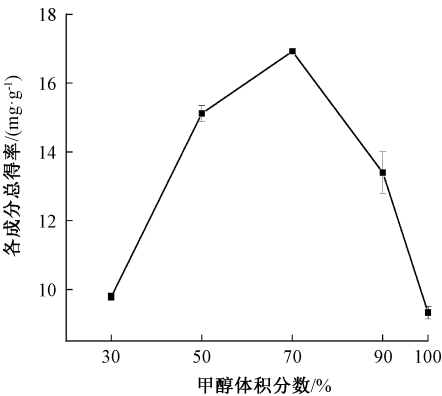


图 2 甲醇体积分数对各成分总得率的影响（n=3）

2.6.2 提取时间 精密称取构树叶粉末（过 2 号筛）1 g，置于具塞锥形瓶中，加入 25 mL 70% 甲醇，密塞，称定质量，超声处理，冷却至室温，70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，取续滤液，过 0.22 μm 微孔滤膜，分别考察超声 15~60 min 的提取效果，结果见图 3。由此可知，超声处理 45 min 时各成分总得率最高，45 min 后呈下降趋势，故选择超声时间为 45 min。

2.6.3 料液比 精密称取构树叶粉末（过 2 号筛）1 g，置于具塞锥形瓶中，加入 70% 甲醇，密塞，称定质量，超声处理 1 h，冷却至室温，70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，取续滤液，过 0.22 μm 微孔滤膜，分别考察料液比 1：10、1：20、1：30、1：40、1：50 的提取效果，结果见

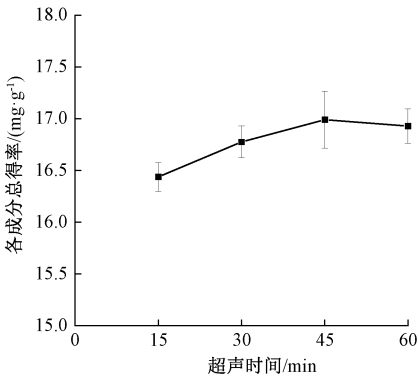


图3 超声时间对各成分总得率的影响 (n=3)

图4。由此可知，料液比为1：40时各成分总得率最高，故选择料液比为1：40。

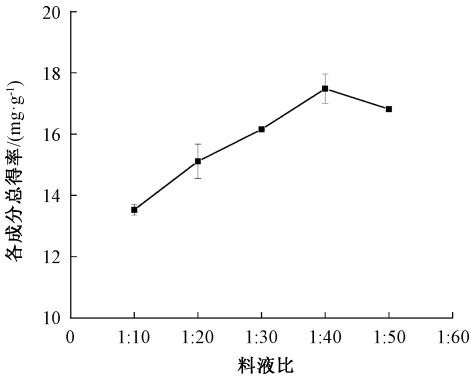


图4 料液比对各成分总得率的影响 (n=3)

2.7 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上，选择甲醇体积分数 (A)、提取时间 (B)、料液比 (C) 作为影响因素，各成分总得率 (Y) 作为评价指标，进行三因素三水平设计，因素水平见表2，结果见表3。

表2 Box-Behnken 响应面法因素水平

水平	因素		
	A 甲醇体积分数/%	B 提取时间/min	C 料液比
-1	50	30	1：30
0	70	45	1：40
1	90	60	1：50

通过 Design-Expert 10.0 软件对表3数据进行回归，得方程为  $Y = -3.411\ 38 + 0.581\ 52A + 0.106\ 22B - 0.041\ 915C + 1.698\ 54 \times 10^{-3}AB + 1.485\ 09 \times 10^{-3}AC - 1.240\ 56 \times 10^{-3}BC - 5.570\ 07 \times 10^{-3}A^2 - 1.558\ 68 \times 10^{-3}B^2 + 3.885\ 08 \times 10^{-4}C^2$  ( $r = 0.971\ 6$ )，方差分析见表4。由此可知，模型  $P < 0.01$ ，具有高度显著性；失拟项  $P > 0.05$ ，无显著性差异<sup>[15]</sup>，表明模型拟合度较好；各因素影响程度依次为  $A > B > C$ ；因素 A、B、C、AB、 $A^2$  有显著或极显著影响 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，其他因素无显著影响 ( $P > 0.05$ )； $CV = 2.43$ ,  $Adj\ R^2 = 0.935\ 0$ ，表明模型线性关系良好<sup>[16]</sup>。

响应面分析见图5~7。由此可知，AB 等高线图接近椭圆形，具有显著影响 ( $P < 0.05$ )；AC、BC 响应面较平，无显著影响 ( $P > 0.05$ )，与方差分析一致。

表3 Box-Behnken 响应面法设计与结果

试验号	A 甲醇体积 分数/%	B 提取时 间/min	C 料液比	Y 各成分总 得率/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	70	45	1：40	17.79
2	50	60	1：40	16.88
3	70	45	1：40	18.16
4	90	30	1：40	12.64
5	70	60	1：30	17.64
6	50	45	1：30	16.72
7	70	60	1：50	18.20
8	50	30	1：40	16.56
9	50	45	1：50	16.69
10	70	45	1：40	17.44
11	70	30	1：50	17.80
12	90	60	1：40	15.00
13	90	45	1：30	14.03
14	70	30	1：30	16.50
15	90	45	1：50	15.18
16	70	45	1：40	17.52
17	70	45	1：40	18.32

表4 方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	39.23	9	4.36	26.57	0.000 1
A	12.48	1	12.48	76.09	<0.000 1
B	2.23	1	2.23	13.60	0.007 8
C	1.11	1	1.11	6.78	0.035 2
AB	1.04	1	1.04	6.33	0.040 0
AC	0.35	1	0.35	2.15	0.185 9
BC	0.14	1	0.14	0.84	0.388 7
A <sup>2</sup>	20.90	1	20.90	127.42	<0.000 1
B <sup>2</sup>	0.52	1	0.52	3.16	0.118 8
C <sup>2</sup>	$6.355 \times 10^{-3}$	1	$6.355 \times 10^{-3}$	0.039	0.849 5
残差	1.15	7	0.16	—	—
失拟项	0.55	3	0.18	1.22	0.411 7
纯误差	0.60	4	0.15	—	—
总和	40.38	16	—	—	—

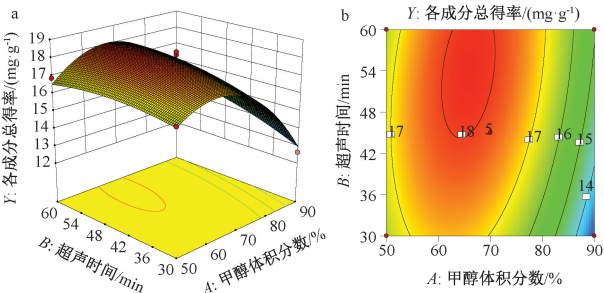


图5 超声时间与甲醇体积分数交互作用的三维曲面图 (a)、等高线图 (b)

最终确定，最优工艺为甲醇体积分数 68.627%，超声时间 54.33 min，料液比 1：49.87，各成分总得率为 18.36 mg/g，根据实际操作可行性，将其修正为甲醇体积分数 69%，超声时间 54 min，料液比 1：50。按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得各成分总得率为 18.82 mg/g，与预

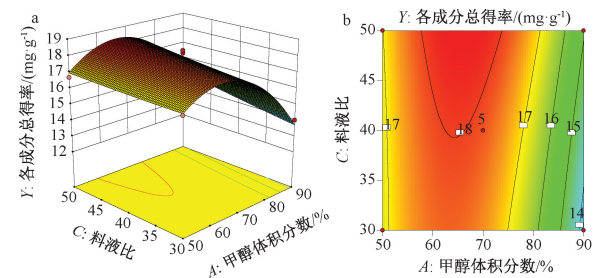


图 6 甲醇体积分数与料液比交互作用的三维曲面图 (a)、等高线图 (b)

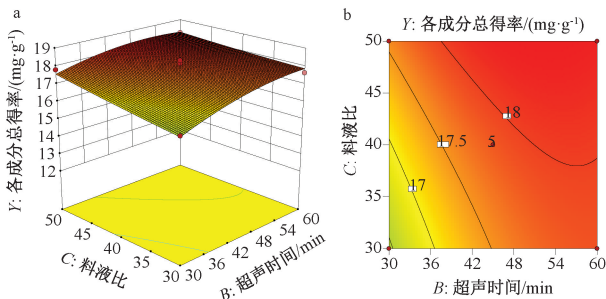


图 7 超声时间与料液比交互作用的三维曲面图 (a)、等高线图 (b)

测值 18.36 mg/g 接近 (相对误差为 2.5%), 表明该工艺稳定可行, 具有良好的应用价值。

3 讨论与结论

本实验采用紫外检测器对 5 种成分进行全波长扫描, 发现新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸最大吸收波长均为 325 nm, 木犀草苷最大吸收波长为 347 nm, 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷最大吸收波长为 337 nm, 通过观察峰形和分离度并查阅相关文献, 最终选择 325 nm 作为检测波长。再分别对甲醇、乙醇进行考察, 发现前者提取得到的色谱峰更多, 峰面积更大, 故选择其作为提取溶剂。然后, 分别对超声、加热回流提取进行考察, 发现 2 种方法均能提取出主要成分, 并且其含量差异不大, 考虑到方法的简便性及可操作性, 选择超声提取。

通过单因素试验发现, 超声时间、甲醇体积分数、料液比这 3 个因素对各成分总得率影响最大。最终, 选择超声时间 45 min、甲醇体积分数 70%、料液比 1 : 40 作为

Box-Behnken 响应面法的中心点。

综上所述, 本实验采用 Box-Behnken 响应面法优化构树叶中各成分超声提取工艺, 避免了单一成分评价造成的局限性, 也为该药材质量控制及资源开发提供了科学的理论依据。

参考文献:

[ 1 ] 黄咏明, 田 瑞, 卢素芳, 等. 构树化学成分及饲用价值研究进展[J]. 湖北林业科技, 2019, 48(2): 36-40.

[ 2 ] 李红伟. 构树叶化学成分研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2008.

[ 3 ] 丛培臣, 门雨梅, 徐道亮, 等. 构树叶质量标准的研究[J]. 中药材, 2022, 45(8): 1839-1842.

[ 4 ] 王文君, 侯志华, 任媛媛, 等. 不同构树品种药用化学成分含量比较和综合评价[J]. 河南林业科技, 2020, 40(4): 1-5.

[ 5 ] 王 丽. 构树叶化学成分及质量标准研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2006.

[ 6 ] 冯卫生, 李红伟, 郑晓珂. 构树化学成分的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(4): 272-278.

[ 7 ] 林 梦, 李梦琳, 毕福广, 等. 构树叶抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2013, 38(4): 270-273.

[ 8 ] 魏攀鹏, 高正龙, 王品胜, 等. 构树医药功效的研究进展[J]. 养殖与饲料, 2021, 20(5): 58-62.

[ 9 ] 刘晓军, 刘 铀, 陈绍红, 等. 构树叶提取物对金黄色葡萄球菌的抑制作用及机理研究[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(4): 159-162.

[ 10 ] 杜柏槐, 刘晓军, 陈绍红. 构树叶提取物体外抗病毒活性研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(29): 144-146.

[ 11 ] 陈随清, 黄显章, 崔 瑛, 等. 构树叶对大鼠前列腺炎症模型的影响[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(Z1): 110-111.

[ 12 ] 任建东, 王晓醒, 王金山, 等. 构树种质资源开发与利用研究进展[J]. 农业科学研究, 2022, 43(3): 55-59.

[ 13 ] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 228.

[ 14 ] 范九梅. 构树叶醇提取物凝胶剂的制备和抗炎作用研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2018.

[ 15 ] 李 杰, 李瑞芳, 张玉宾, 等. 星点设计-响应面法优化枳实中黄酮类化合物的水热法提取工艺[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(8): 1462-1469.

[ 16 ] 杜义龙, 田孟尧, 李艳荣, 等. 山楂叶中 4 种黄酮提取工艺的优化[J]. 中成药, 2022, 44(10): 3283-3286.