

# 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 °C, 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责任公司); 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 °C; 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

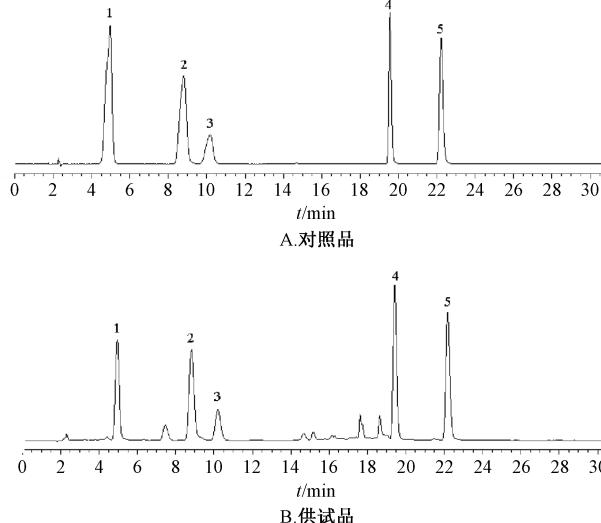
基金项目: 中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(豫财社〔2019〕40 号); 河南省中药材产业技术体系项目(豫农科教〔2018〕14 号)

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, 摆匀, 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。



1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 隐绿原酸 4. 木犀草苷 5. 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷

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⁻¹)
新绿原酸	$Y = 33.215X - 69.948$	0.9997	3.8~380.0
绿原酸	$Y = 31.223X - 124.563$	0.9996	5.1~510.0
隐绿原酸	$Y = 28.442X - 42.520$	0.9996	1.8~180.0
木犀草苷	$Y = 18.715X - 41.322$	0.9996	2.9~290.0
芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷	$Y = 22.534X - 83.185$	0.9996	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, 摆匀, 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。

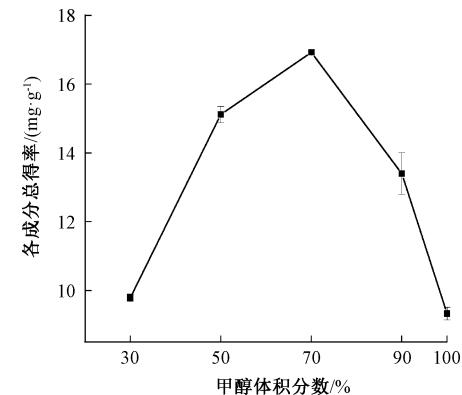


图 2 甲醇体积分数对各成分总得率的影响 ( $n=3$ )

**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, 摆匀, 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, 摆匀, 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

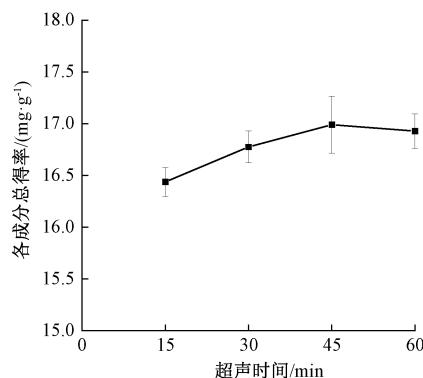
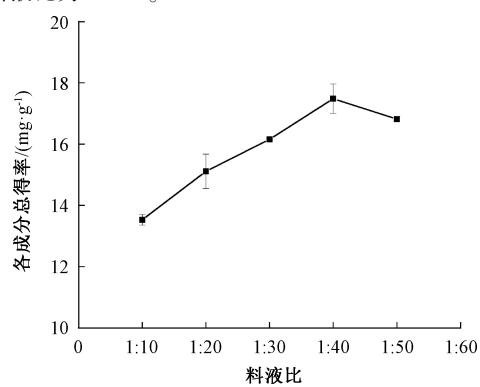
图3 超声时间对各成分总得率的影响 ( $n=3$ )

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 $Y=-3.41138+0.58152A+0.10622B-0.041915C+1.69854\times10^{-3}AB+1.48509\times10^{-3}AC-1.24056\times10^{-3}BC-5.57007\times10^{-3}A^2-1.55868\times10^{-3}B^2+3.88508\times10^{-4}C^2$  ( $r=0.9716$ ), 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( $P>0.05$ );  $CV=2.43$ ,  $Adj R^2=0.9350$ , 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⁻¹)
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
$A^2$	20.90	1	20.90	127.42	<0.000 1
$B^2$	0.52	1	0.52	3.16	0.118 8
$C^2$	$6.355\times10^{-3}$	1	$6.355\times10^{-3}$	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	—	—	—

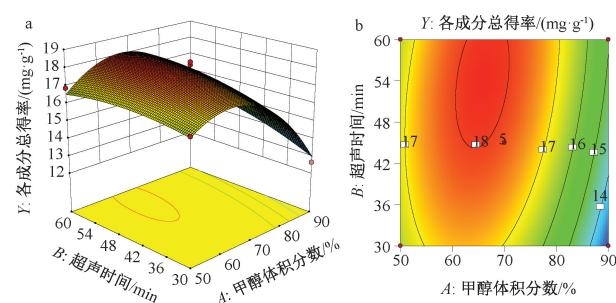


图5 超声时间与甲醇体积分数交互作用的三维曲面图(a)、等高线图(b)

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

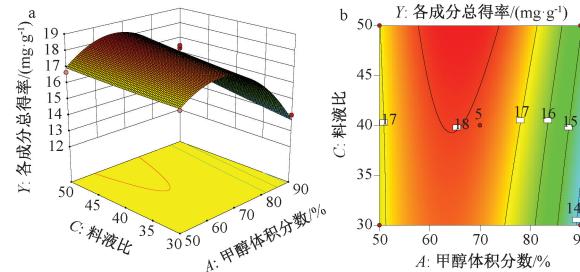


图6 甲醇体积分数与料液比交互作用的三维曲面图  
(a)、等高线图 (b)

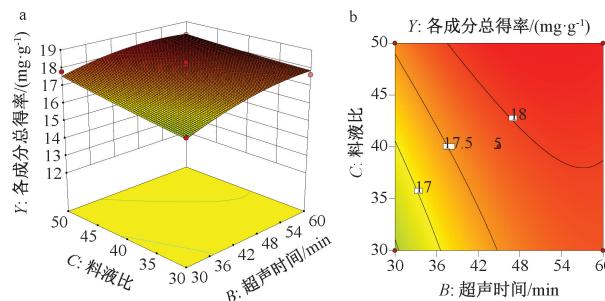


图7 超声时间与料液比交互作用的三维曲面图 (a)、  
等高线图 (b)

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]. 农业科学学报, 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.