

- carmichaelii*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 323: 117693.
- [12] 宋怡, 周州, 罗舒, 等. 中药经皮给药制剂的研究与应用探讨[J]. *四川农业科技*, 2023(8): 118-122.
- [13] 贾成友, 张传辉, 李微, 等. 抗类风湿关节炎中药经皮给药制剂研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(16): 226-230.
- [14] Punnell L C, Lunter D J. Film-forming systems for dermal drug delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(7): 932.
- [15] Tran T T D, Tran P H L. Controlled release film forming systems in drug delivery: The potential for efficient drug delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(6): 290.
- [16] 李文娜, 欧水平, 王玉和. 皮肤用成膜制剂研究进展[J]. *遵义医科大学学报*, 2021, 44(3): 389-395.
- [17] 瞿灿, 乔继续, 杨亦奇, 等. 乌头茎叶洗液的抗炎镇痛作用及皮肤给药安全性研究[J]. *成都中医药大学学报*, 2025, 48(2): 1-7.
- [18] Shen Y, Fan X T, Qu Y H, et al. Magnoflorine attenuates inflammatory responses in RA by regulating the PI3K/Akt/NF-kappaB and Keap1-Nrf2/HO-1 signalling pathways *in vivo* and *in vitro*[J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154339.
- [19] Ren M, Ma K, Pang X Y, et al. Anti-rheumatoid arthritis effects of total saponins from *Rhizoma Panacis Majoris* on adjuvant-induced arthritis in rats and rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 155021.
- [20] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2022.
- [21] Zhang Y Y, Gao Z J, Chao S S, et al. Transdermal delivery of inflammatory factors regulated drugs for rheumatoid arthritis[J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 1934-1950.
- [22] Guo Q, Wang Y X, Xu D, et al. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies[J]. *Bone Res*, 2018, 6: 15.
- [23] 董孝斌, 肖晓民, 乔宇莹, 等. 碳中和背景下中药产业高质量发展研究[J]. *中国工程科学*, 2024, 26(6): 98-107.
- [24] 明文华, 李晴晴, 黎彩凤, 等. 中药新资源药材实现配伍的方法学探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(12): 248-256.

杜仲叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性评价

董小丽^{1,2}, 谢兴文³, 张家旭^{1,2}, 李婉玉^{1,2}, 马趣环², 石晓峰^{2*}

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省医学科学研究院, 甘肃兰州 730050; 3. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃兰州 730000)

摘要: 目的 优化杜仲叶总黄酮提取工艺, 并评价其抗氧化活性。**方法** 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、液料比、浸泡时间、提取时间为影响因素, 总黄酮、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷、槲皮素、山柰酚含量及浸膏得率的综合评分为评价指标, AHP-熵权 TOPSIS 法结合 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。再测定 DPPH·、ABTS⁺· 自由基清除率。**结果** 最佳条件为乙醇体积分数 60%, 液料比 21:1, 浸泡时间 1.5 h, 提取时间 2.0 h, 提取次数 2 次, 各成分含量及浸膏得率分别为 79.671、0.131、1.127、0.035、2.143、0.855、0.157 mg/g 及 37.534%。总黄酮对 DPPH·、ABTS⁺· 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.028、0.053 mg/mL。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取抗氧化活性较强的杜仲叶总黄酮。

关键词: 杜仲叶; 总黄酮; 提取工艺; AHP-熵权 TOPSIS 法; Box-Behnken 响应面法; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)04-1106-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.04.006

收稿日期: 2025-08-29

基金项目: 甘肃省科技重大专项(22ZD6FA021-4); 第七届兰州市人才创新创业大赛项目(2024-02-07); 甘肃中医药大学研究生“创新创业基金”(2025CXCY-0-038)

作者简介: 董小丽(2001—), 女, 硕士在读, 从事中药药效物质基础及其质量控制研究。E-mail: 2986971822@qq.com

* 通信作者: 石晓峰(1964—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及其质量控制研究。E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

Optimization of extraction process for total flavonoids from *Eucommiae folium* leaves and evaluation of their anti-oxidant activity

DONG Xiao-li^{1,2}, XIE Xing-wen³, ZHANG Jia-xu^{1,2}, LI Wan-yu^{1,2}, MA Qu-huan²,
SHI Xiao-feng^{2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China; 3. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction process for total flavonoids from *Eucommiae folium* Oliv. leaves, and to evaluate their anti-oxidant activity. **METHODS** With ethanol concentration, liquid-solid ratio, soaking time and extraction time as influencing factors, the comprehensive score for total flavonoids, rutin, isoquercitrin, astragaloside, phlorizin, quercetin, kaempferol contents and extract yield as evaluation index, the anti-oxidant activity was optimized by AHP-entropy weight TOPSIS method combined with Box-Behnken response surface method. Subsequently, the scavenging rates of DPPH·, ABTS⁺· free radicals were determined. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 60% for ethanol concentration, 21 : 1 for liquid-solid ratio, 1.5 h for soaking time, 2.0 h for extraction time, and two times for extraction frequency, the various constituent contents and extract yield were 79.671, 0.131, 1.127, 0.035, 2.143, 0.855, 0.157 mg/g and 37.534%. The IC₅₀ values of total flavonoids on DPPH·, ABTS⁺· free radicals were 0.028, 0.053 mg/mL, respectively. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the extraction of total flavonoids from *E. folium* leaves with strong anti-oxidant activity.

KEY WORDS: *Eucommiae folium* Oliv. leaves; total flavonoids; extraction process; AHP-entropy weight TOPSIS method; Box-Behnken response surface method; anti-oxidant activity

杜仲叶为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥叶, 其性温, 味微辛, 归肝、肾经, 主产于陕西、甘肃、河南等地^[1], 具有较高的药用、食用价值, 传统上主要用于防治肝肾疾病, 现代应用扩展至畜牧、食品、材料领域^[2]。研究表明, 它主要含黄酮类、环烯醚萜类、木脂素类等成分, 有着抗氧化、抗骨质疏松、免疫调节、神经保护等活性^[3-5], 其中老叶中黄酮含量更高, 抗氧化活性更强^[6], 使该类成分提取成为研究热点^[7-8]。

传统提取方法操作简便, 成本低, 提取率较高, 但易损失某些关键成分, 故需建立科学的评价体系。层次分析法 (AHP) 通过建立层次结构模型, 将专家经验转化为定量权重^[9]; 熵权 TOPSIS 法通过数据离散度来确定权重, 逼近理想解来进行排序, 可有效减少主观干扰^[10], 两者联用实现了主客观权重的科学整合, 显著提高了多指标评价的准确性与适用性。

本研究基于相关文献与预实验, 采用 AHP-熵权 TOPSIS 法结合 Box-Behnken 响应面法优化杜仲叶总黄酮提取工艺, 并评价其抗氧化活性, 旨在建立质量与效应相结合的考察手段, 为该类成分后续

开发利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器 DGZ-76 型电热鼓风干燥箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); JM-B20002 型电子天平 (百分之一, 诸暨市超泽衡器设备有限公司); AE260 型电子天平 (万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); CP225D 型电子天平 (十万分之一, 德国 Sartorius 公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); RE-5299 型旋转蒸发器 (郑州市亚荣仪器有限公司); UV-1800 型紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); HH-4 型电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 试剂与药材 异槲皮苷 (批号 MUST-24070702)、紫云英苷 (批号 MUST-24052407)、芦丁 (批号 MUST-24012304)、槲皮素 (批号 MUST-23112010) 对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 根皮苷对照品 (批号 G22A11L121909) 购自上海源叶生物科技有限公司; 山柰酚对照品 (批号 100081-201610) 购自中国食品药品检定研究院。硫酸亚铁 (批号 20180130)、亚硝酸钠 (批号 20180110) 均购自天津市科密欧化学试剂有限

公司;硝酸铝(批号20180425)购自天津凯信化学工业有限公司;氢氧化钠(批号20180701)、乙醇(批号200230126)均购自天津市百世化工有限公司;抗坏血酸(批号F20181016)购自国药集团化学试剂有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)购自美国Sigma公司;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)(批号C10379058)购自上海麦克林生化科技有限公司。杜仲叶购自浙江珍源堂中药饮片有限公司(批号20230201),经甘肃省医学科学研究所石晓峰主任药师鉴定为正品。其他试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定 采用分光光度法。

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品20.00 mg,置于100 mL量瓶中,60%乙醇溶解定容,即得(该成分质量浓度为0.2 mg/mL)。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取干燥药材2.00 g,置于100 mL圆底烧瓶中,精密加入30 mL 60%乙醇,称定质量,浸泡0.5 h后水浴回流提取0.5 h,共2次,冷却至室温,60%乙醇补足减失的质量,过滤,合并滤液,即得。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.8 mL,置于10 mL比色管中,60%乙醇定容至5 mL,依次加入0.4 mL 5%亚硝酸钠溶液,摇匀并静置6 min;0.4 mL 10%硝酸铝溶液,摇匀并静置6 min;2 mL 4%氢氧化钠溶液,60%乙醇定容至10 mL,摇匀后静置10 min,在510 nm波长处测定吸光度,平行3次。以对照品质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(A)进行回归,得方程为 $A = 15.075X + 0.0123$ ($r = 0.9993$),在0.008~0.056 mg/mL范围内线性关系良好。

2.1.4 测定方法 精密吸取提取液1 mL,60%乙醇定容至50 mL量瓶中,取5 mL,按“2.1.3”项下方法测定吸光度,计算总黄酮含量(Y),公式为 $Y = 50 \times C \times V / m$,其中C为提取液定容后质量浓度,V为提取液总体积,50为稀释倍数,m为药材质量。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液6份,按“2.1.3”项下方法测定吸光度,测得其RSD为1.71%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密吸取供试品溶液0.4 mL,共6份,按“2.1.3”项下方法测定吸光度,测得总黄酮含量RSD为2.80%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液0.4 mL,于2、4、6、8、10、24 h按“2.1.3”项下方法测定吸光度,测得其RSD为2.06%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

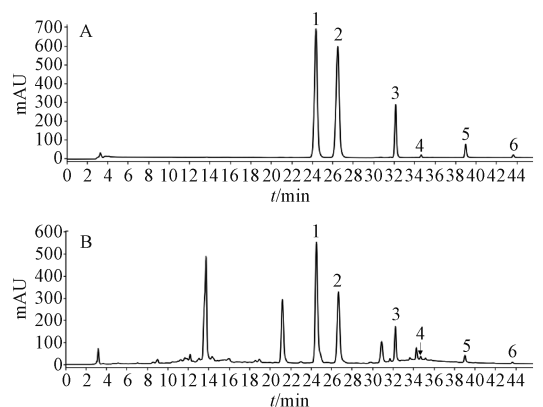
2.1.8 加样回收率试验 取总黄酮含量已知的供试品溶液6份,精密加入适量对照品,按“2.1.3”项下方法测定吸光度,计算回收率。结果,总黄酮平均加样回收率为97.98%,RSD为2.63%。

2.2 芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷、槲皮素、山柰酚含量测定 采用HPLC法。

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷、槲皮素、山柰酚对照品适量,80%甲醇制成质量浓度分别为386.00、263.00、76.00、23.50、7.20、3.85 $\mu\text{g/mL}$ 的母液,过0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2.2 供试品溶液制备 按“2.1.2”项下方法制备,即得。

2.2.3 色谱条件 参照文献[11]报道,依利特TC-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.2%甲酸(B),梯度洗脱(0~11 min,5%~17%A;11~26 min,17%~20%A;26~31 min,20%~30%A;31~50 min,30%~50%A;50~52 min,50%~95%A;52~54 min,95%A;54~55 min,95%~5%A;55~70 min,5%A);体积流量1.0 mL/min;柱温30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长254 nm;进样量20 μL 。色谱图见图1。



注:A为对照品,B为供试品。

1. 芦丁 2. 异槲皮苷 3. 紫云英苷 4. 根皮苷 5. 槲皮素
6. 山柰酚
1. rutin 2. isoquercitrin 3. astragalgin 4. phlorizin 5. quercetin
6. kaempferol

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL，置于1 mL量瓶中，80%甲醇定容至1 mL，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)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

Tab.1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
芦丁	$Y=40\ 726.299\ 1X-138.365\ 9$	0.999 8	19.30~308.80
异槲皮苷	$Y=57\ 885.038\ 6X-131.945\ 3$	0.999 8	13.15~210.40
紫云英苷	$Y=49\ 646.407\ 2X-26.406\ 3$	0.999 7	3.80~60.80
根皮苷	$Y=6\ 672.109\ 6X-1.381\ 6$	0.999 7	1.18~18.80
槲皮素	$Y=71\ 471.566\ 2X-7.248\ 8$	0.999 6	0.36~5.76
山柰酚	$Y=51\ 477.606\ 3X-1.595\ 3$	0.999 7	0.19~3.08

2.2.5 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定6次，测得芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷、槲皮素、山柰酚峰面积RSD分别为2.44%、2.49%、1.64%、2.49%、2.48%、2.95%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批药材，按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，测得芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷、槲皮素、山柰酚含量RSD分别为2.76%、2.50%、0.92%、2.07%、2.36%、2.88%，表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液适量，于0、2、4、8、12、24 h在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，测得芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷、槲皮素、山柰酚含量RSD分别为2.86%、2.89%、2.61%、2.96%、2.65%、2.62%，

表2 各评价指标成对比较判断矩阵

Tab.2 Judgment matrices for pairwise comparison of various evaluation indices

评价指标	总黄酮含量	槲皮素含量	芦丁含量	山柰酚含量	异槲皮苷含量	紫云英苷含量	根皮苷含量	浸膏得率	W_j
总黄酮含量	1	3	3	3	5	5	5	7	0.332
槲皮素含量	1/3	1	1	1	3	3	3	5	0.150
芦丁含量	1/3	1	1	1	3	3	3	5	0.150
山柰酚含量	1/3	1	1	1	3	3	3	5	0.150
异槲皮苷含量	1/5	1/3	1/3	1/3	1	1	1	3	0.047
紫云英苷含量	1/5	1/3	1/3	1/3	1	1	1	3	0.047
根皮苷含量	1/5	1/3	1/3	1/3	1	1	1	3	0.047
浸膏得率	1/7	1/5	1/5	1/5	1/3	1/3	1/3	1	0.078

2.4.2 熵权TOPSIS法

2.4.2.1 评价矩阵建立 假设给定m个方案，每

表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的供试品溶液6份，按100%水平加入对照品，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷、槲皮素、山柰酚平均加样回收率分别为96.52%、99.07%、101.66%、96.97%、95.55%、97.31%，RSD分别为2.41%、2.84%、2.40%、4.33%、3.54%、4.51%。

2.3 浸膏得率测定 精密量取提取液5.00 mL，置于干燥至恒重的蒸发皿中，记录空皿质量 M_1 ，水浴蒸干，转移至105℃烘箱中干燥3 h，取出，转移到干燥器中冷却至室温，迅速称定质量 M_2 ，计算公式为浸膏得率= $\{[(M_2-M_1)\times\text{供试品溶液体积}]/(\text{药材质量}\times\text{提取液体积})\}\times 100\%$ 。

2.4 AHP-熵权TOPSIS评价模型建立

2.4.1 AHP法 总黄酮是多种单体黄酮的集合体，在提取物中含量最高，是发挥药效的主要物质基础，相关研究最广泛；槲皮素、芦丁、山柰酚是含量较高的主要黄酮类成分，涉及抗氧化、抗骨质疏松等药理作用，相关研究较多；异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷含量虽然也较高，但相关研究较少；浸膏得率作为提取工艺常用评价指标，其大小与黄酮含量无直接关联，对工艺影响最小。因此，本实验基于AHP法的主观赋值，将各评价指标分为4个层次，即总黄酮含量>槲皮素含量=芦丁含量=山柰酚含量>异槲皮苷含量=紫云英苷含量=根皮苷含量>浸膏得率，构建成对比较判断矩阵，计算权重系数 W_j ，结果见表2，可知一致性检验参数 $\lambda_{\max}=8.624\ 2$ ，一致性指标 $CI=0.089$ ，随机一致性比率 $CR=0.06<0.1$ ，表明其一致性良好。

个方案设置n个评价指标，形成决策矩阵X， X_{ij} 表示第i个评价指标下第j个评价对象的对应值。

$$Xx = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{21} & \cdots & x_{n1} \\ x_{12} & x_{22} & \cdots & x_{n2} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{1m} & x_{2m} & \cdots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

2.4.2.2 原始矩阵标准化 采用 Min-Max 归一化法将数据缩放到 [0, 1] 区间, 数值较小的值经归一化后接近 0, 公式为 $y_{ij} = (x_{ij} - x_{\min}) / (x_{\max} - x_{\min})$ 。另外, 可视化作图时某些成分比例太小而未显示, 如乙醇体积分数为 40% 时的山柰酚、槲皮素。

2.4.2.3 信息熵值 e_j 计算

①计算第 j 项评价指标下第 i 个样本的占比 P_{ij} , 公式为 $P_{ij} = x_{ij} / \sum_{i=1}^n x_{ij}$ 。

②计算信息熵 e_j , 公式为 $e_j = K \times \sum_{i=1}^n [P_{ij} \times \ln(P_{ij})]$, 其中 $K = 1/\ln(n)$ 。

2.4.2.4 信息效用值 d_j 计算 公式为 $d_j = 1 - e_j$ 。

2.4.2.5 权重系数 W_i 计算 公式为 $W_i = d_j / \sum_{j=1}^m d_j$ 。

2.4.2.6 结果 总黄酮、槲皮素、芦丁、山柰酚、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷含量及浸膏得率 W_i 分别为 0.088 7、0.098 1、0.067 5、0.173 4、0.172 2、0.138 9、0.202 5、0.058 7。

2.4.3 组合权重 $W_{\text{复}}$ 计算 公式为 $W_{\text{复}} = (w_j \times w_i) / \sum (w_j \times w_i)$ 。结果, 总黄酮、槲皮素、芦丁、山柰酚、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷含量及浸膏得率 $W_{\text{复}}$ 分别为 0.263 1、0.130 8、0.090 0、0.231 4、0.090 6、0.073 1、0.106 5、0.014 5。

2.4.4 综合评分 C_i 计算

2.4.4.1 正理想解 R^+ 、负理想解 R^- 确定 指标向量数值越接近 R^+ , 表现越好, 而越接近 R^- , 表现越差, 公式分别为 $R^+ = \max (R_{i1}, R_{i2}, \dots, R_{in})$ 、 $R^- = \min (R_{i1}, R_{i2}, \dots, R_{in})$ 。

2.4.4.2 欧氏空间距离计算 公式分别为 $d_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^m (R_{ij} - R_j^+)^2}$ 、 $d_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^m (R_{ij} - R_j^-)^2}$ 。

2.4.4.3 C_i 计算 公式为 $C_i = d_i^- / (d_i^+ + d_i^-)$, C_i 越高, 方案越优。

2.5 抗氧化活性评价

2.5.1 DPPH·自由基清除率测定 参照文献 [12] 报道, 配制质量浓度分别为 0.010、0.020、0.040、0.060、0.080、0.100 mg/mL 的样品溶液, 精密移取 0.5 mL, 置于 10 mL 离心管中, 再配制质量浓度为 0.076 1 mmol/L 的 DPPH·自由基溶

液, 精密移取 4.5 mL, 置于装有样品溶液的离心管中, 充分混匀, 室温避光反应 30 min, 在 517 nm 波长处测定吸光度, 平行 3 次, 以抗坏血酸为阳性对照, 计算公式为清除率 = $[1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100\%$, 其中 A_1 为 DPPH·自由基溶液+样品溶液吸光度, A_2 为样品溶液+无水乙醇吸光度, A_3 为 DPPH·自由基溶液+无水乙醇吸光度。

2.5.2 ABTS⁺·自由基清除率测定 参照文献 [12] 报道, 将 100 mL ABTS⁺·自由基溶液 (7 mmol/L) 与 100 mL 过硫酸钾溶液 (2.5 mmol/L) 混合, 室温避光静置 12 h, 得到储备液, 再配制质量浓度分别为 0.010、0.020、0.040、0.060、0.080、0.100 mg/mL 的样品溶液, 精密移取 0.15 mL, 置于 10 mL 离心管中, 将储备液稀释至吸光度为 6.0 ± 0.05 , 取 4.5 mL, 置于装有样品溶液的离心管中, 充分混匀, 室温避光反应 6 min, 在 734 nm 波长处测定吸光度, 平行 3 次, 以抗坏血酸为阳性对照, 计算公式为清除率 = $[1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100\%$, 其中 A_1 为储备液+样品溶液吸光度, A_2 为样品溶液+超纯水吸光度, A_3 为储备液+超纯水吸光度。

2.6 单因素试验

2.6.1 乙醇体积分数 精密称取 5 批药材, 每批 2.00 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 以液料比 15 : 1 分别加入 40%、50%、60%、70%、80% 乙醇, 称定质量, 浸泡 0.5 h 后回流提取 0.5 h, 冷却至室温, 相应体积分数乙醇补足缺失的质量, 过滤, 计算 C_i , 重复 3 次。由图 2 可知, C_i 随着乙醇体积分数增加而先升后降, 为 50% 时达到最大值, 大于 60% 后反而明显降低, 可能是因为药材中黄酮苷占比较高, 随着乙醇体积分数增加其溶解性变差, 而黄酮苷元溶解性增强, 即总黄酮、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷含量先升后降, 槲皮素、山柰酚含量升高, 并且脂溶性、多糖类成分会与总黄酮竞争性溶出, 从而导致后者提取率降低^[13], 同时乙醇在加热回流状态下随着其体积分数增加挥发性升高, 导致其实际有效体积分数降低。最终确定, 选择 40%、50%、60% 作为 Box-Behnken 响应面法水平。

2.6.2 液料比 精密称取 5 批药材, 每批 2.00 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 分别以液料比 10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1 加入 50% 乙醇, 称定质量, 浸泡 0.5 h 后回流提取 0.5 h, 冷却至室温, 相应体积分数补足缺失的质量, 过滤, 计算

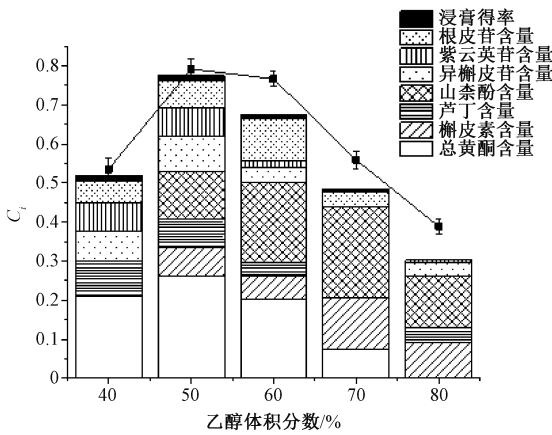


图2 乙醇体积分数对 C_i 的影响 ($n=3$)

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on C_i ($n=3$)

C_i , 重复3次。由图3可知, C_i 随着液料比增加而升高, 为20:1时达到最大值, 大于20:1后反而缓慢降低, 可能是因为液料比较小时黄酮类成分溶出不彻底, 后者含量达到最大值后随着液料比进一步增加, 其他杂质也会不断溶出而影响其含量, 或较高的液料比会改变细胞内外渗透压, 使黄酮类成分扩散变慢^[14]。最终确定, 选择15:1、20:1、25:1作为 Box-Behnken 响应面法水平。

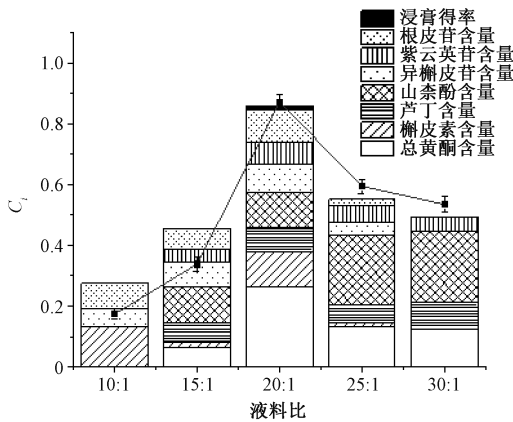


图3 液料比对 C_i 的影响 ($n=3$)

Fig. 3 Effect of liquid-solid ratio on C_i ($n=3$)

2.6.3 浸泡时间 精密称取5批药材, 每批2.00 g, 置于100 mL圆底烧瓶中, 以液料比20:1加入50%乙醇, 称定质量, 分别浸泡0.5、1、1.5、2、2.5 h后回流提取0.5 h, 冷却至室温, 50%乙醇补足减失的质量, 过滤, 计算 C_i , 重复3次。由图4可知, C_i 随着浸泡时间延长而升高, 为1.5 h时达到最大值, 大于1.5 h后反而降低, 可能是因为长时间浸泡导致浸渍液在高质量浓度时会吸附一定量黄酮类成分, 降低后者游离质量浓度, 或长时间浸泡导致微生物分解黄酮类成分, 使

后者提取率降低^[15]。最终确定, 选择1、1.5、2 h作为 Box-Behnken 响应面法水平。

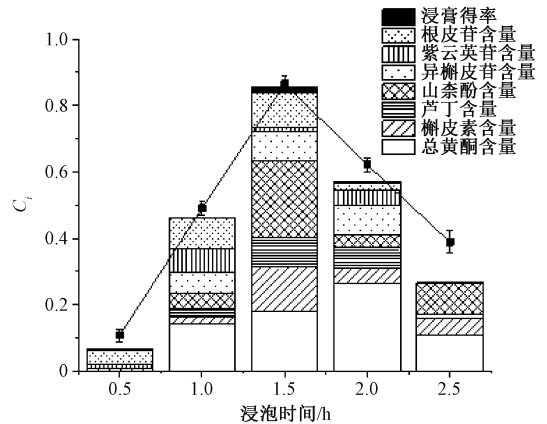


图4 浸泡时间对 C_i 的影响 ($n=3$)

Fig. 4 Effect of soaking time on C_i ($n=3$)

2.6.4 提取时间 精密称取5批药材, 每批2.00 g, 置于100 mL圆底烧瓶中, 以液料比15:1加入50%乙醇, 称定质量, 浸泡1.5 h后分别回流提取0.5、1、1.5、2、2.5 h, 冷却至室温, 50%乙醇补足减失的质量, 过滤, 计算 C_i , 重复3次。由图5可知, C_i 随着提取时间延长而升高, 为1.5 h时达到最大值, 大于1.5 h后反而降低, 可能是因为长时间加热提取时一些热稳定性较差的黄酮类成分(如槲皮素、山柰酚)发生氧化或结构被破坏, 或长时间提取导致其他杂质溶出增加, 使黄酮类成分含量降低。最终确定, 选择1、1.5、2 h作为 Box-Behnken 响应面法水平。

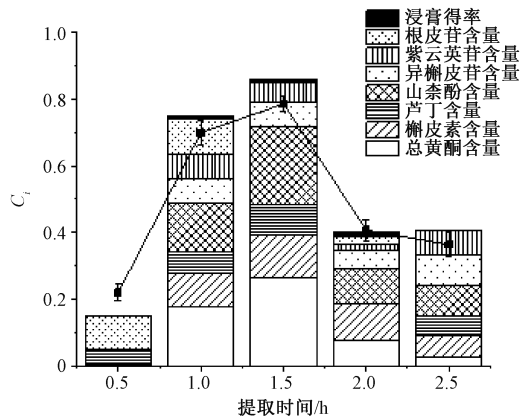


图5 提取时间对 C_i 的影响 ($n=3$)

Fig. 5 Effect of extraction time on C_i ($n=3$)

2.6.5 提取次数 精密称取3批药材, 每批2.00 g, 置于100 mL圆底烧瓶中, 以液料比15:1加入50%乙醇, 称定质量, 浸泡1.5 h后分别回流提取1、2、3次, 每次1.5 h, 冷却至室温, 50%

乙醇补足减失的质量，过滤，计算 C_i ，重复 3 次。由图 6 可知，提取 2、3 次时 C_i 分别为 0.709 7、0.701 2，相差不大，可能是因为提取 2 次时黄酮类成分溶出较彻底，而提取 3 次时其他杂质溶出，溶剂体积增加，导致该类成分质量浓度被稀释。最终确定，选择 2 次作为固定水平，不再纳入 Box-Behnken 响应面法。

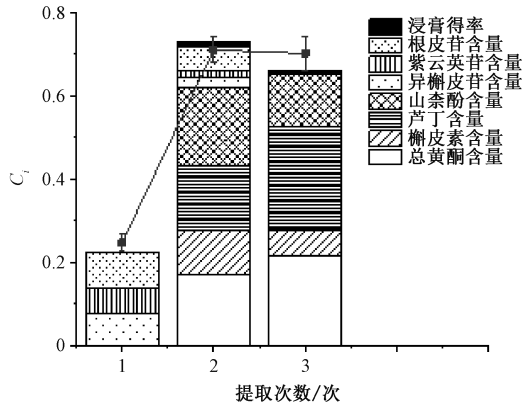


图 6 提取次数对 C_i 的影响 ($n=3$)

Fig. 6 Effect of extraction frequency on C_i ($n=3$)

2.7 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上，选择乙醇体积分数 (A)、液料比 (B)、浸泡时间 (C)、提取时间 (D) 作为影响因素， C_i 作为评价指标，采用 Design-Expert 8.0 软件设计四因素三水平共 29 个试验点，包括 24 个分析点和 5 个重复点，并计算 DPPH·、ABTS· 自由基清除率，重复 3 次，因素水平见表 3，结果见表 4。

表 3 Box-Behnken 响应面法因素水平

Tab. 3 Factors and levels for Box-Behnken response surface method

水平	因素			
	A 乙醇体积分数/%	B 液料比	C 浸泡时间/h	D 提取时间/h
-1	40	15 : 1	1	1
0	50	20 : 1	1.5	1.5
1	60	25 : 1	2	2

对表 4 数据进行回归处理，得方程为 $C_i = 0.86 + 0.22A + 0.051B - 0.036C + 0.040D + 0.028AB - 2.061E - 0.03AC + 0.026AD - 0.025BC - 0.025CD - 0.22A^2 - 0.20B^2 - 0.18C^2 - 0.18D^2$ ，方差分析见表 5。由此可知，模型 $P < 0.01$ ，具有高度显著性；失

表 4 Box-Behnken 响应面法设计与结果 ($n=3$)

Tab. 4 Design and results for Box-Behnken response surface method ($n=3$)

试验号	A	B	C	D	C_i	IC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)	
						DPPH· 自由基	ABTS· 自由基
1	-1	-1	0	0	0.208	0.056	0.071
2	1	-1	0	0	0.570	0.031	0.052
3	-1	1	0	0	0.263	0.052	0.068
4	1	1	0	0	0.737	0.031	0.051
5	0	0	-1	-1	0.446	0.053	0.071
6	0	0	1	-1	0.417	0.055	0.069
7	0	0	-1	1	0.628	0.056	0.068
8	0	0	1	1	0.500	0.053	0.064
9	-1	0	0	-1	0.250	0.055	0.070
10	1	0	0	-1	0.633	0.032	0.054
11	-1	0	0	1	0.215	0.057	0.071
12	1	0	0	1	0.701	0.031	0.052
13	0	-1	-1	0	0.448	0.054	0.064
14	0	1	-1	0	0.619	0.041	0.067
15	0	-1	1	0	0.389	0.058	0.070
16	0	1	1	0	0.465	0.055	0.072
17	-1	0	-1	0	0.259	0.046	0.065
18	1	0	-1	0	0.733	0.031	0.053
19	-1	0	1	0	0.230	0.047	0.064
20	1	0	1	0	0.696	0.032	0.055
21	0	-1	0	-1	0.389	0.056	0.066
22	0	1	0	-1	0.508	0.048	0.063
23	0	-1	0	1	0.530	0.053	0.065
24	0	1	0	1	0.549	0.045	0.062
25	0	0	0	0	0.905	0.031	0.055
26	0	0	0	0	0.885	0.031	0.054
27	0	0	0	0	0.826	0.032	0.055
28	0	0	0	0	0.830	0.032	0.055
29	0	0	0	0	0.863	0.031	0.054

表5 方差分析结果

Tab. 5 Results for analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.29	14	0.092	66.43	<0.000 1
A	0.580	1	0.580	419.67	<0.000 1
B	0.031	1	0.031	22.30	0.000 3
C	0.016	1	0.016	11.33	0.004 6
D	0.019	1	0.019	13.82	0.002 3
AB	3.107×10^{-3}	1	3.107×10^{-3}	2.24	0.156 9
AC	1.698×10^{-5}	1	1.698×10^{-5}	0.012	0.913 5
AD	2.613×10^{-3}	1	2.613×10^{-3}	1.88	0.191 7
BC	2.291×10^{-3}	1	2.291×10^{-3}	1.65	0.219 8
BD	2.491×10^{-3}	1	2.491×10^{-3}	1.79	0.201 8
CD	2.445×10^{-3}	1	2.445×10^{-3}	1.76	0.205 8
A ²	0.31	1	0.31	222.79	<0.000 1
B ²	0.25	1	0.25	179.24	<0.000 1
C ²	0.20	1	0.20	145.57	<0.000 1
D ²	0.22	1	0.22	159.01	<0.000 1
残差	0.019	14	1.389×10^{-3}	—	—
失拟差	0.015	10	1.480×10^{-3}	1.28	0.439 1
纯误差	4.640×10^{-3}	4	1.160×10^{-3}	—	—
总差	1.31	28	—	—	—

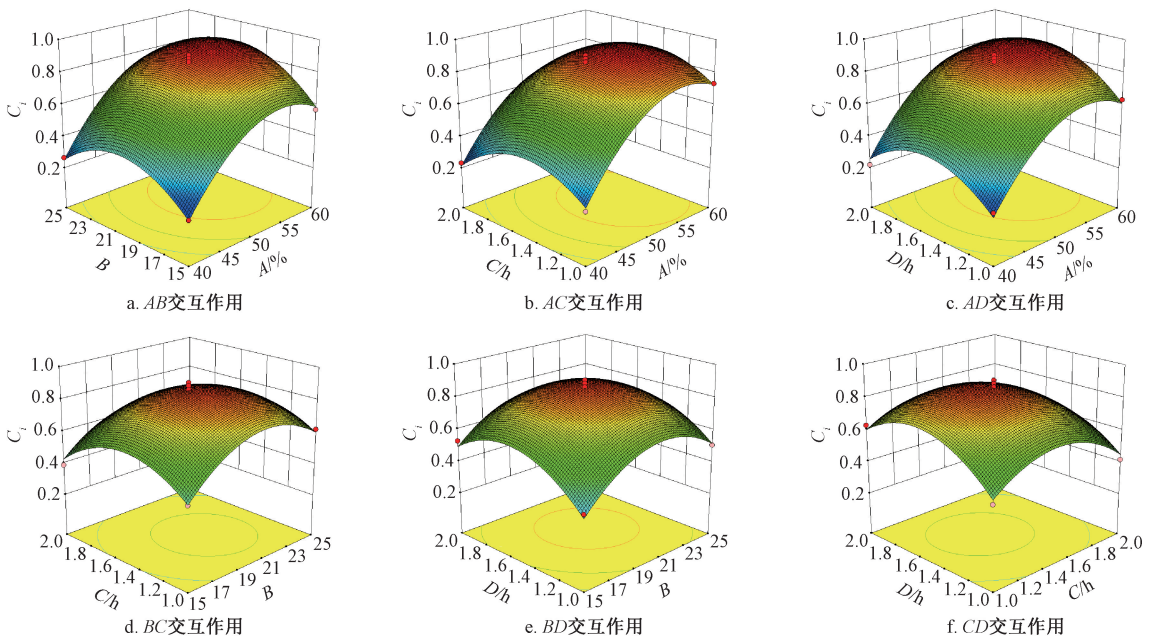
拟项 $P > 0.05$, 表示拟合有效; 复相关系数 R^2 为 0.985 2, R_{adj}^2 为 0.970 3, R_{pred}^2 为 0.929 4, 表明模型有较强的解释能力和预测能力; 各因素影响程度依次为 $A > B > C > D$ 。

响应面分析见图 7。最终确定, 最优工艺为液料比 20.54 : 1, 乙醇体积分数 57.10%, 浸泡时间 1.35 h, 提取时间 1.68 h, 提取次数 2 次, 总黄酮对 DPPH·、ABTS⁺· 自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.026、0.049 mg/mL, 考虑到实际操作的可行性, 将其修正为液料比 21 : 1, 乙醇体积分数 60%, 浸泡时间 1.5 h, 提取时间 2.0 h, 提取次数 2 次。

2.8 验证试验 按“2.7”项下优化工艺进行 3 批验证试验, 并计算 DPPH·、ABTS⁺· 自由基清除率, 结果见表 6。由此可知, 该工艺稳定可行。

3 讨论与结论

杜仲是我国特有中药材, 但传统剥皮取药的方式导致资源再生困难, 可持续发展面临挑战。杜仲叶资源丰富, 可再生性强, 富含多种活性成分, 药



注: A、B、C、D 分别为乙醇体积分数、液料比、浸泡时间、提取时间。

图7 各因素响应面图

Fig. 7 Response surface plots for various factors

表6 验证试验结果 (n=3)

Tab. 6 Results for verification tests (n=3)

试验号	含量/(mg·g ⁻¹)							浸膏得率/%	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	
	总黄酮	槲皮素	芦丁	山柰酚	异槲皮苷	紫云英苷	根皮苷		DPPH·自由基	ABTS ⁺ ·自由基
1	78.340	0.128	1.145	0.036	2.132	0.855	0.158	37.289	0.027	0.051
2	81.822	0.134	1.106	0.035	2.191	0.869	0.152	36.851	0.029	0.054
3	78.850	0.132	1.130	0.034	2.105	0.842	0.160	38.463	0.028	0.053
平均值	79.671	0.131	1.127	0.035	2.143	0.855	0.157	37.534	0.028	0.053
RSD/%	2.36	2.33	1.75	2.86	2.05	1.58	2.66	2.22	3.57	2.90

效显著,在药食同源领域应用前景广阔。本实验选择总黄酮、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、根皮苷、槲皮素、山柰酚含量及浸膏得率作为杜仲叶总黄酮提取工艺优化的评价指标,其中芦丁、槲皮素、山柰酚均为黄酮醇类,具有抗氧化、骨保护^[16]、抗炎等作用;紫云英苷、异槲皮苷、根皮苷均具有抗氧化活性,还分别表现出抗炎^[17]、神经保护^[18-19]、骨保护、降脂^[20]等作用;浸膏得率作为反映提取效率的关键参数^[21],与活性成分含量共同成为工艺优化的核心指标。

针对传统工艺仅考察总黄酮得率,忽视单体成分,以及现有方法提取率低、工艺复杂、成本高昂的问题^[22],本实验采用AHP-熵权TOPSIS法建立综合评价模型,通过指标赋权来平衡多指标影响,结合单因素试验与Box-Behnken响应面法进行杜仲叶总黄酮提取工艺的全局优化,发现在最优工艺下总黄酮提取率为7.97%,并且提取物对DPPH·、ABTS⁺·自由基的清除能力良好,同时呈剂量依赖关系,表明该方法准确可行,为该类成分的深度开发利用提供了可靠依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] Ren N, Gong W W, Zhao Y C, et al. Innovation in sweet rice wine with high anti-oxidant activity: *Eucommia ulmoides* leaf sweet rice wine[J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 1108843.

[3] Gong P, Wang X F, Han Y W, et al. Hypoglycemic activity of enzymatically extracted *Eucommia ulmoides* polysaccharide (EUL-w1) on IR-HepG2 cell via the AMPK/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 283(P1): 137596.

[4] 李婉玉, 张家旭, 谢兴文, 等. 杜仲叶化学成分、药理活性及现代应用研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 36(5): 900-917.

[5] Wang C Y, Tang L, He J W, et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacological properties of *Eucommia ulmoides*: A review[J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(2): 259-300.

[6] 王俊朋, 张立攀, 王春杰, 等. 杜仲叶黄酮类化合物的提取

纯化及功能活性分析[J]. *河南化工*, 2021, 38(4): 5-9.

[7] 刘淑琴. 杜仲皮和杜仲叶酚类成分的抗氧化机制及产物的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.

[8] 张秀峰, 李小菲, 刘明, 等. 杜仲叶总黄酮通过RhoA/ROCK信号通路参与脑出血大鼠神经功能修复[J]. *天津医药*, 2023, 51(3): 252-258.

[9] 吴杨倩, 周彤, 谢颖, 等. 基于AHP-熵权TOPSIS法优选磁石炮制工艺及所含重金属元素的风险评估[J]. *中草药*, 2024, 55(14): 4679-4687.

[10] 朱文超, 崔琳琳, 关永霞, 等. 基于AHP-熵权TOPSIS混合加权法评价不同灭菌工艺对红花药材原粉质量的影响[J]. *药学研究*, 2024, 43(10): 962-967.

[11] Yang J, Wang A Q, Li X J, et al. A chemical profiling strategy for semi-quantitative analysis of flavonoids in *Ginkgo extracts*[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 123: 147-154.

[12] 雷嘉昕, 李政, 莫嘉玮, 等. 管萼山豆根总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *林产化学与工业*, 2024, 44(3): 87-96.

[13] 王倩, 常丽新, 贾长虹, 等. 超声波法提取狗枣猕猴桃叶黄酮的工艺[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(2): 43-47.

[14] 赵超. 超声强化亚临界水提取枸杞多糖的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.

[15] 赵惠茹, 雷妍, 孙婷婷, 等. 槐米配方颗粒的提取工艺和成型工艺[J]. *化工科技*, 2025, 33(1): 29-34.

[16] 袁真, 闵珺, 王恺, 等. 杜仲黄酮类3种药物成分治疗大鼠骨质疏松的比较研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(2): 244-248.

[17] 张维珊, 林佳泓, 王灿, 等. 紫云英苷调控炎症痛模型小鼠L_{4,5}脊髓背角星形胶质细胞自噬与凋亡[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2025, 46(2): 186-196.

[18] 王姝涵, 杨翠珠, 张润恒, 等. 紫云英苷抑制APP/PS1小鼠大脑皮质神经元凋亡[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2023, 44(6): 983-990.

[19] 石理冉, 吴晓琴, 薛璟, 等. 异槲皮苷对gp120+ddC诱发神经病理痛的影响[J]. *生物技术*, 2025, 35(4): 476-482; 426.

[20] 阮柳丁, 谷奇, 付玉杰. 根皮苷对秀丽隐杆线虫的抗氧化和降脂作用[J]. *吉林农业大学学报*, 2025, 47(3): 454-464.

[21] 李子安, 刘德文, 李新健, 等. 基于AHP-CRITIC混合加权法、灰色关联度分析法和反向传播神经网络优选参芎黄连解毒颗粒的提取工艺[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(10): 2674-2683.

[22] 赵瑞红, 王梦迪, 张康敏, 等. 超声波辅助乙醇法提取杜仲叶总黄酮的工艺优化[J]. *饲料工业*, 2025, 46(6): 151-158.