

马嘉洁, 赵端端, 全世航, 等. 紫苏叶黄酮、多酚提取工艺优化及不同品种抗氧化活性比较 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 344–352. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080165

MA Jiajie, ZHAO Duanduan, QUAN Shihang, et al. Optimization of Extraction Process of Flavonoids and Polyphenols from *Perilla frutescens* (L.) Britt Leaves and Comparison of Antioxidant Activities of Different Varieties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 344–352. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080165

· 分析检测 ·

紫苏叶黄酮、多酚提取工艺优化及不同品种 抗氧化活性比较

马嘉洁, 赵端端, 全世航, 郇淇童, 郝 帅, 李 坤, 朴春香, 李官浩, 李红梅*, 牟柏德*
(延边大学农学院, 吉林延吉 133002)

摘 要: 紫苏 (*Perilla frutescens* (L.) Britt.) 是食药两用植物之一, 本研究为比较不同品种紫苏叶 (‘韩国绿色 PF1’, ‘中国 PF2’, ‘韩国紫色 PF3’, ‘韩国双色 PF4’, ‘中国双色 PF5’) 中黄酮和多酚提取量, 并探讨其体外抗氧化活性, 利用单因素实验和正交试验法优化紫苏叶黄酮和多酚提取工艺。结果表明: 最佳工艺参数为乙醇浓度 75%、料液比 1:80 g/mL、提取时间 2 h、提取温度 70 °C, 此提取条件下, 黄酮、多酚提取量最高, 分别为 (16.82±0.60) 和 (80.42±2.66) mg/g。不同品种紫苏叶中, PF3 的多酚提取量最高 (17.77±0.29) mg/g, PF5 黄酮提取量最高 (80.42±2.66) mg/g。抗氧化活性结果表明, 不同品种紫苏叶均具有良好的抗氧化活性, 其中 PF5 的 ABTS⁺ 自由基清除率 (IC₅₀ 150.31±2.46 μg/mL)、DPPH 自由基清除能力 (IC₅₀ 88.04±3.61 μg/mL) 及总还原能力最强 ($P<0.05$)。相关性分析表明, 多酚提取量与 ABTS⁺ 自由基清除率、总还原力呈显著相关 ($P<0.05$), 黄酮提取量与 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺ 自由基清除率显著相关 ($P<0.05$), 与总还原力极显著相关 ($P<0.01$)。本研究为不同品种紫苏叶资源的开发利用提供了一定的理论依据。

关键词: 紫苏叶, 不同品种, 多酚, 黄酮, 提取工艺, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)12-0344-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080165



本文网刊:

Optimization of Extraction Process of Flavonoids and Polyphenols from *Perilla frutescens* (L.) Britt Leaves and Comparison of Antioxidant Activities of Different Varieties

MA Jiajie, ZHAO Duanduan, QUAN Shihang, HUAN Qitong, HAO Shuai, LI Kun, PIAO Chunxiang,
LI Guan hao, LI Hongmei*, MU Baide*

(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: *Perilla frutescens* (L.) Britt. is one of the edible and medicinal plants. The purpose of this study was to compare the flavonoids and polyphenols extracted from different varieties of *P. frutescens* leaves ('Korean green PF1', 'Chinese PF2', 'Korean purple PF3', 'Korean bicolor PF4', 'Chinese bicolor PF5'), and to explore their antioxidant activities *in vitro*. Optimization of extraction process of flavonoids and polyphenols from *P. frutescens* leaves was studied by single factor tests and orthogonal test. The results showed that the optimum parameters were ethanol concentration 75%, solid-liquid ratio 1:80 g/mL, extraction time 2 h, extraction temperature 70 °C. Under these conditions, the extraction amount of flavonoids and polyphenols was the highest, which were (16.82±0.60) mg/g and (80.42±2.66) mg/g, respectively. Among different varieties of *P. frutescens* leaves, PF3 had the highest content of polyphenols (17.77±0.29) mg/g, PF5 had the highest content of flavonoids (80.42±2.66) mg/g. The results of antioxidant activity showed that the leaves of different varieties of

收稿日期: 2022-08-18

基金项目: 2020 年度吉林省自然科学基金项目 (20200201152JC)。

作者简介: 马嘉洁 (1999), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工, E-mail: 2909667757@qq.com。

* 通信作者: 李红梅 (1988), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品加工, E-mail: hmli2018@ybu.edu.cn。

牟柏德 (1986), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 畜产品加工, E-mail: 165248122@qq.com。

P. frutescens had good antioxidant activity. Among them, the ABTS⁺ free radical scavenging rate (IC₅₀ 150.31±2.46 μg/mL), DPPH free radical scavenging ability (IC₅₀ 88.04±3.61 μg/mL) and total reducing power of PF5 were the strongest (*P*<0.05). Correlation analysis showed that polyphenol extraction amount was significantly correlated with ABTS⁺ free radical scavenging rate and total reducing power (*P*<0.05), flavonoids extraction amount was significantly correlated with DPPH free radical scavenging rate and ABTS⁺ free radical scavenging rate (*P*<0.05), and was extremely significant with total reducing power (*P*<0.01). This study would provide a theoretical basis for the development and utilization of different varieties of *P. frutescens* leaf resources.

Key words: *Perilla frutescens* (L.) Britt. leaves; different varieties; polyphenols; flavonoids; extraction process; antioxidant activity

紫苏(*Perilla frutescens* (L.) Britt.), 唇形科一年生草本植物, 是我国传统的药食两用的植物, 在我国的种植面积和年出口量位于世界首位^[1-2]。紫苏通常被用作传统药物和功能性食品, 能够治疗哮喘、肿瘤、过敏、心血管等疾病^[3], 还可以用于香料、装饰或食品着色剂等^[4]。已有大量研究表明, 紫苏叶中的多种活性成分具有抑菌、抗糖尿病和抗氧化等功能。张运晖等^[5]研究表明, 紫苏叶中含有芹菜素、木犀草素、野黄芩苷、迷迭香酸和咖啡酸等成分; 刘芳洁^[6]发现紫苏叶中的乙醇提取物对黑腐皮壳属真菌生长抑制最强; 紫苏叶多糖具有抗糖尿病作用, 且能够调节糖尿病小鼠的血脂代谢紊乱^[7]。王月等^[8]研究表明, 紫苏叶中的花色苷对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基和羟基自由基有较高的清除能力。除此之外, 黄酮和多酚含量与抗氧化活性具有较强的正相关性^[9-10], 是当前天然产物抗氧化性能研究的主要活性成分。目前紫苏中黄酮、多酚的提取方法主要为热水浸提法、有机溶剂提取法、超声辅助提取法、微波辅助提取法和酶提取法^[11], 其中超声辅助提取法和微波辅助提取法提取率较高, 但成本高昂, 可能对活性物质结构造成破坏。因此, 以紫苏为提取对象, 开展紫苏中黄酮、多酚的提取工艺研究, 对挖掘紫苏的功能特性和利用价值具有较强的理论和现实意义。

紫苏在中国和韩国等亚洲国家广泛种植, 历史悠久, 研究较为广泛, 主要分为单面紫苏、双面紫苏和白紫苏^[2]。本实验将来自中国和韩国的紫苏种子种植于本地, 选取醇提方法优化提取工艺, 旨在提高紫苏叶中黄酮和多酚的提取量, 比较不同品种紫苏叶的抗氧化活性, 并探讨黄酮和多酚含量与其体外抗氧化活性的相关性, 有利于提高紫苏叶的利用率, 为今后开发相关功能性食品提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

不同品种紫苏(*Perilla frutescens* (L.) Britt.) 种子 杭州市农业科学研究院提供鉴定, 种植于吉林省延边朝鲜族自治州图们市长安镇广兴村, 采摘于 2021 年 6 月, 采摘后鲜叶于 55 ℃ 恒温烘干并粉碎过 40 目筛后, 密闭避光保存备用, 具体品种分类见表 1; 没食子酸标准品、芦丁标准品 源叶生物科技有限公司; 抗坏血酸、结晶紫标准品 国药集团化学

试剂有限公司(上海); 硝酸铝、碳酸钠、氢氧化钠、无水乙醇、甲醇、亚硝酸钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA 钠盐)、过氧化氢 科密欧化学试剂有限公司(天津); 福林酚试剂、过硫酸钾 美国阿拉丁工业公司; 2, 2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS⁺) 上海麦克林生化科技有限公司; ferrozine(菲洛嗪) 北京索莱宝科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) Wako 和光纯药; 所用有机溶剂 均为分析纯。

表 1 不同紫苏品种简称
Table 1 Abbreviations of different *P. frutescens* varieties

序号	编号	来源	种植地	叶片颜色	选取部位
1	PF1	韩国	延边	绿色	叶片
2	PF2	中国	延边	绿色	叶片
3	PF3	韩国	延边	紫色	叶片
4	PF4	韩国	延边	双色	叶片
5	PF5	中国	延边	双色	叶片

一斤装高速中药粉碎机 瑞安市永历制药机械有限公司; UPW-N15UV 系列纯水机 上海仪电科学仪器股份有限公司; BSM 220.3 电子天平 上海卓精电子科技有限公司; 101-3AB 型电热鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪; FD-1A 型真空冷冻干燥机 宁波市新芝生物科技股份有限公司; M200PRO 型酶标仪 美国伯腾仪器有限公司北京代表处。

1.2 实验方法

1.2.1 紫苏叶黄酮、多酚提取工艺 具体工艺流程为: 紫苏叶筛选→清洗晾干→干燥→粉碎过筛→醇提→过滤→浓缩→冷冻干燥。

操作要点: 将采摘自本地种植的中国双色紫苏叶粉碎过 40 目筛后, 取 1.00 g 放置于 150 mL 锥形瓶中, 按照设定的乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间等 4 个因素进行提取, 将所得提取液进行抽滤、定容, 摇匀静置。所得的紫苏叶提取液旋转蒸发进行浓缩, 提取物浓缩完成后使用真空冷冻干燥机制成紫苏叶醇提取物冻干粉末, 避光储存备用。

1.2.2 多酚、黄酮提取量测定 多酚提取量的测定根据郑清等^[12]的方法, 稍加修改, 将没食子酸为标准品配制成 250 μg/mL 的标准溶液, 对标准溶液进行梯度稀释, 得到浓度分别为 0、20、30、40、50、60 和 100 μg/mL

的没食子酸标准溶液,用福林酚试剂显色后在 760 nm 波长处检测吸光度,以没食子酸的浓度为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y)的线性回归方程为 $y=0.0071x+0.0639$, $R^2=0.9974$,对照标准曲线计算紫苏提取液中多酚提取量。多酚、黄酮提取量为每克干原料中所含的量。

黄酮提取量的测定参考钟秋平等^[13]的方法略加修改,将芦丁标准品配制成 1500 $\mu\text{g/mL}$ 的芦丁标准溶液。对标准溶液进行梯度稀释,得到浓度分别为 0、300、500、700、1000、1500 $\mu\text{g/mL}$ 的芦丁标准溶液。用亚硝酸盐-硝酸铝显色后在 510 nm 处检测吸光度,以芦丁浓度为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y)的线性回归方程为 $y=0.0006x+0.0337$, $R^2=0.998$,对照标准曲线计算提取液中黄酮的提取量。

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 乙醇浓度的选择 准确称取紫苏叶粉 1.00 g 放入三角瓶中,按料液比 1:40 g/mL 分别加入乙醇浓度为 45%、55%、65%、75%、85% 的乙醇溶液,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h,抽滤,测定提取液的多酚、黄酮提取量,确定最佳乙醇浓度。

1.2.3.2 料液比的选择 准确称取紫苏叶粉 1.00 g 放入三角瓶中,分别按料液比为 1:20、1:40、1:60、1:80、1:100 g/mL 的 65% 乙醇溶液,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h,抽滤,测定提取液的多酚、黄酮提取量,确定最佳料液比。

1.2.3.3 提取温度的选择 准确称取紫苏叶粉 1.00 g 放入三角瓶中,按料液比为 1:60 g/mL 加入 65% 的乙醇溶液,分别在 40、50、60、70、80 $^{\circ}\text{C}$ 提取 2 h,抽滤,测定提取液的多酚、黄酮提取量,确定最佳提取温度。

1.2.3.4 提取时间的选择 准确称取紫苏叶粉 1.00 g 放入三角瓶中,按料液比为 1:60 g/mL 加入 65% 的乙醇溶液,分别提取 1、2、3、4、5 h 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,抽滤,测定提取液的多酚、黄酮提取量,确定最佳提取时间。

1.2.4 正交试验 根据单因素实验基础上,以乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间为影响因素,以多酚和黄酮提取量为考察指标,采用 4 因素 3 水平正交试验设计,对紫苏叶提取工艺进行优化,其因素水平见表 2。

表 2 正交试验因素水平
Table 2 Factors and levels of orthogonal test

因素	水平		
	1	2	3
A 乙醇浓度(%)	55	65	75
B 料液比(g/mL)	1:70	1:80	1:90
C 提取温度($^{\circ}\text{C}$)	50	60	70
D 提取时间(h)	1	2	3

1.2.5 综合评分权重分析 为确定最佳提取工艺,采

用熵权法对多酚和黄酮提取量两个指标进行权重分析^[14]。

1.2.5.1 数据标准化 按式(1)所示。将各个指标的数据进行标准化处理,假设给定了 k 个指标 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_k$, 其中 $X_i = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$, 本文中 $k=16$ 。假设各指标数据标准化后的值为 Y_{ij} , 则求解 Y_{ij} 的表达式为

$$Y_{ij} = \frac{x_{ij} - \min(x_i)}{\max(x_i) - \min(x_i)} \quad \text{式 (1)}$$

式中: Y_{ij} 为各指标数据标准化后的值; X_{ij} 表示第 i 次试验时第 j 个评价指标的取值, 其中 $i=1, 2, \dots, 6$, $j=1, 2, \dots, 16$ 。

1.2.5.2 计算各指标的信息熵 计算各指标的信息熵根据信息论中信息熵的定义, 可知一组数据的信息熵为公式(2), 其中 P_{ij} 如式(3)所示, 其中 $j=1, 2, \dots, 16$, 若 $P_{ij}=0$, 则定义式(4)。

$$E_j = -\ln(n)^{-1} \sum_{i=1}^n P_{ij} \ln P_{ij} \quad \text{式 (2)}$$

$$P_{ij} = Y_{ij} / \sum_{i=1}^n Y_{ij} \quad \text{式 (3)}$$

$$\lim_{P_{ij} \rightarrow 0} P_{ij} \ln P_{ij} = 0 \quad \text{式 (4)}$$

式中: E_j 为第 j 个指标的信息熵。

1.2.5.3 计算各指标的权重系数 根据信息熵的计算公式, 计算出各个指标的信息熵为 $E_1, E_2, E_3, \dots, E_k$, 通过信息熵计算各指标的权重: 公式如(5)所示。由主观模糊综合评价得到的权重集 A, 由客观熵权法得到的权重集 B, 主客观综合指标权重为式 $W_i = \mu_1 A + \mu_2 B$, 其中 $i=1, 2$, 为确保主客观的影响降至最小, 在此赋 $\mu_1 = \mu_2 = 0.5$, 最终得到各个指标的权重。

$$\omega_j = \frac{1 - E_j}{k - \sum_{j=1}^k E_j} \quad \text{式 (5)}$$

式中: ω_j 为第 j 个指标的权重系数, 其中 $k=2$ 。

1.2.6 体外抗氧化能力的测定

1.2.6.1 测定 DPPH 自由基清除能力 参照 Meng 等^[15]的方法并作适当修改, 并按式 1 计算 DPPH 自由基清除率。精确称取 2 mg DPPH 溶于无水乙醇中, 定容至 25 mL, 制得 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 溶液。以样品浓度分别为 62.5、125、250、500、1000 和 2000 $\mu\text{g/mL}$ 的样液进行试验; 取 1 mL 样液于试管, 加入 3 mL DPPH 溶液, 摇匀, 避光静置 30 min, 于 517 nm 处测吸光度为 A_1 样品; 以 1 mL 无水乙醇代替样液, 测得吸光度为 A_0 空白; 以 3 mL 无水乙醇与 1 mL 样液进行试验, 测得吸光度为 A_2 对照。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (6)}$$

式中: A_0 为空白组吸光值; A_1 为样品吸光度值; A_2 为对照组吸光度值。

1.2.6.2 测定 ABTS⁺自由基清除能力 参照曾思漫等^[16]的实验方法并作适当修改,配制过硫酸钾溶液(140 mmol/L)和 ABTS⁺溶液(7 mmol/L), 1:1 混合,避光放置 16 h,得到 ABTS⁺储备液;使用前加入无水乙醇进行稀释,使其在 734 nm 处的吸光度为 0.70±0.02,得到 ABTS⁺工作液。以样品浓度分别为 62.5、125、250、500、1000 和 2000 μg/mL 的样液进行试验;取 0.3 mL 样液,加入 3 mL ABTS⁺工作液,室温下反应 6 min 后立即在波长 734 nm 处测定吸光度为 A₁ 样品;以 0.3 mL 无水乙醇代替样液,测得吸光度为 A₀ 空白;以 3 mL 无水乙醇与 0.3 mL 样液进行试验,测得 A₂ 对照。以 V_C 的清除率为阳性对照,按式 2 计算 ABTS⁺自由基清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100 \quad \text{式(7)}$$

式中: A₀ 为空白组吸光值; A₁ 为样品吸光度值; A₂ 为对照组吸光度值。

1.2.6.3 测定总还原力 采用铁氰化钾还原显色法^[17]进行测定并适当修改。总还原力的测定:配制浓度为 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液: A 溶液为 0.2 mol/L 的 Na₂HPO₄ 溶液, B 溶液为 0.2 mol/L 的 NaH₂PO₄ 溶液。取 A 溶液 37.5 mL, B 溶液 62.5 mL, 互溶后,可得到 pH 为 6.6, 浓度为 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液。以样品浓度分别为 62.5、125、250、500、1000、1200、1600 和 2000 μg/mL 的样液进行试验,取 1 mL 不同浓度的样品,加入 2 mL 磷酸缓冲溶液和 5 mL 1% 铁氰化钾溶液, 50 ℃ 水浴反应 20 min, 冷却后加入 5 mL 10% 三氯乙酸, 摇匀, 取上清液 3 mL, 加入 0.5 mL 1% 三氯化铁, 振荡摇匀, 静置 10 min 后于 700 nm 波长处测定吸光值计为 A₁。同时将铁氰化钾溶液替换成 5 mL 去离子水作为空白对照组计为 A₂, 总还原力按下式计算:

$$\text{还原力} = A_1 - A_2 \quad \text{式(8)}$$

式中: A₁ 为样品吸光度值; A₂ 为去离子水吸光度值。

1.3 数据处理

采用 Excel 2019 和 SPSS 26.0 进行数据处理和分析。相关性分析中,所得数据之间使用标准 Pearson 相关性进行分析, P<0.05 则表示试验组间有显著性差异, P<0.01 则表示试验组间差异极显著, 由 Excel 2019 进行绘制图表。

2 结果与分析

2.1 紫苏叶提取工艺条件单因素实验结果

2.1.1 不同乙醇浓度对紫苏叶黄酮、多酚提取量的影响 由图 1A、图 1B 可知,随着乙醇浓度的增大,多酚提取量呈现先增加后减少的趋势,当乙醇浓度达到 65% 时,多酚提取量最高,为 16.88±0.36 mg/g。

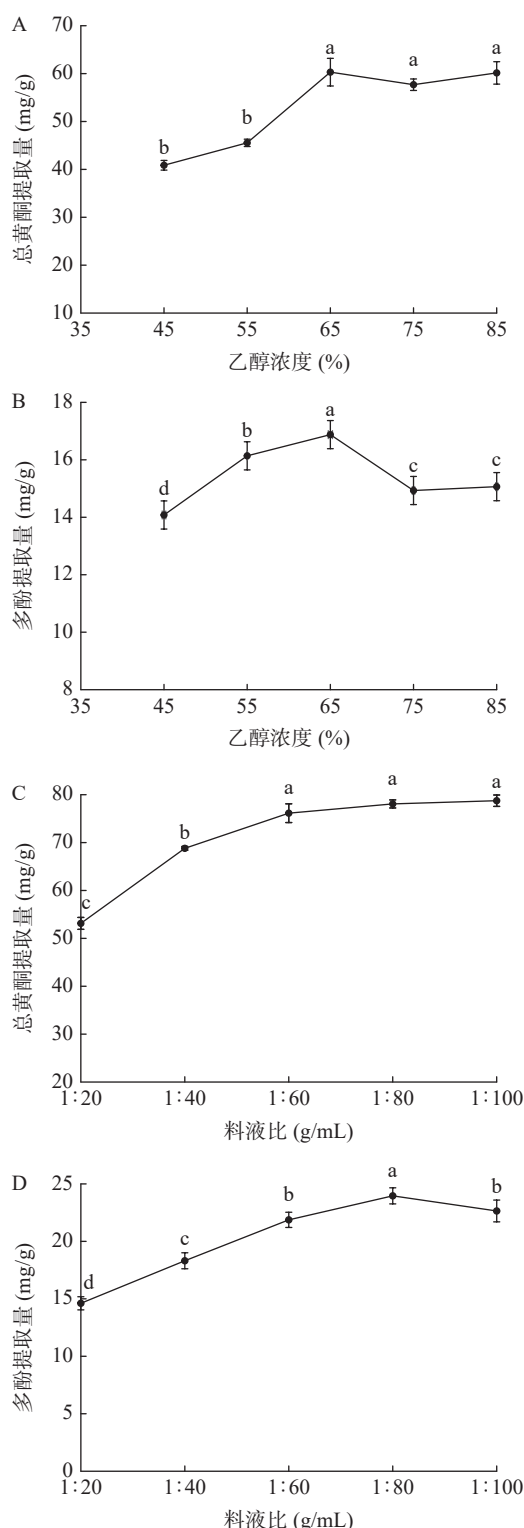


图 1 不同乙醇浓度和料液比对紫苏叶总黄酮、多酚提取量的影响

Fig.1 Effects of different ethanol concentrations and solid-liquid ratio on the extraction amount of flavonoids and polyphenols from *P. frutescens* leaves

注: A: 不同乙醇浓度总黄酮提取量, B: 不同乙醇浓度多酚提取量, C: 不同料液比总黄酮提取量, D: 不同料液比多酚提取量; 同一系列不同小写字母表示具有显著性差异 (P<0.05)。

随后随着乙醇浓度的增加,提取溶剂的极性降低,从而导致多酚提取量降低。随着乙醇浓度的增大,黄酮的提取量先增加后趋于稳定,当乙醇浓度达到 65%

时,黄酮提取量最高,为 60.31 ± 4.08 mg/g。当乙醇浓度继续提高时,黄酮的提取量先增加后趋于稳定,可能是由于黄酮有一定的亲水性,体积分数过高的乙醇溶液反而不利于黄酮物质的溶出^[18]。因此,综合考虑选择55%、65%、75%的乙醇作为正交试验的条件。

2.1.2 不同料液比对紫苏叶黄酮、多酚提取量的影响 图1C、图1D为不同料液比、乙醇浓度65%、提取温度70℃、提取3h时紫苏叶黄酮、多酚提取量的变化趋势,随着料液比逐渐增大,多酚、黄酮的提取量逐渐增加后趋于稳定,在1:80 g/mL时提取量达到最高。这可能是因为在一定范围内,随着料液比的增大紫苏叶多酚、黄酮溶质差增大,有利于多酚和黄酮类物质的溶出,而后过量的提取溶剂对溶质的提取量无促进作用^[19]。因此,综合考虑,选择1:70、1:80、1:90 g/mL的料液比作为正交试验的条件。

2.1.3 不同提取温度对紫苏叶黄酮、多酚提取量的影响 由图2A、图2B可知,不同提取温度、乙醇浓度65%、料液比1:80 g/mL、提取3h时,总黄酮提取量呈现先逐渐升高后降低的趋势,在70℃时达到最高值,80℃时总黄酮提取量显著低于其他各组($P<0.05$)。多酚的提取量先逐渐升高后降低然后趋于平稳,在60℃时达到最高值。这可能是由于温度升高可加剧分子热运动,降低溶剂的黏度,多酚和黄酮类物质在溶剂中的溶解度增大,温度过高则会加快溶剂的挥发和黄酮的氧化分解^[20]。因此,综合考虑,选择50、60、70℃作为正交试验的条件。

2.1.4 不同提取时间对紫苏叶黄酮、多酚提取量的影响 由图2C、图2D可知,随着提取时间增加,多酚和黄酮提取量先上升后有所下降,最后基本稳定,在2h时,黄酮提取量最高为 76.26 ± 1.03 mg/g。但随着时间的延长,多酚和黄酮提取量下降,可能是由于紫苏叶中的多酚和黄酮溶出量增多,在温度和氧气的影响下发生了降解反应,导致提取量下降^[21]。因此,选择提取时间1、2、3h为正交试验的条件。

2.2 正交试验设计结果及验证

在单因素实验基础上,选择乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取温度(D)四个因素,进行四因素三水平正交试验。各因素水平见表2,提取紫苏叶多酚、黄酮的正交试验结果见表3。

不同提取条件对紫苏叶多酚和黄酮提取量的影响程度不同,R值越大表明该因素对提取量的影响越大^[22],由表3可知,因此影响多酚提取量的因素顺序为 $C>A>D>B$,即提取温度对紫苏叶多酚提取量影响最大,其次是乙醇浓度、提取时间、料液比。通过比较k值可知,4个因素的最佳水平为 $A_1B_2C_3D_3$,即乙醇浓度为55%,料液比为1:80、提取时间3h、提取温度70℃;影响黄酮提取量的因素顺序为 $A>B>C>D$,即乙醇浓度对紫苏叶黄酮提取量影响最大,其次是料液比、提取温度、提取时间。通过比较

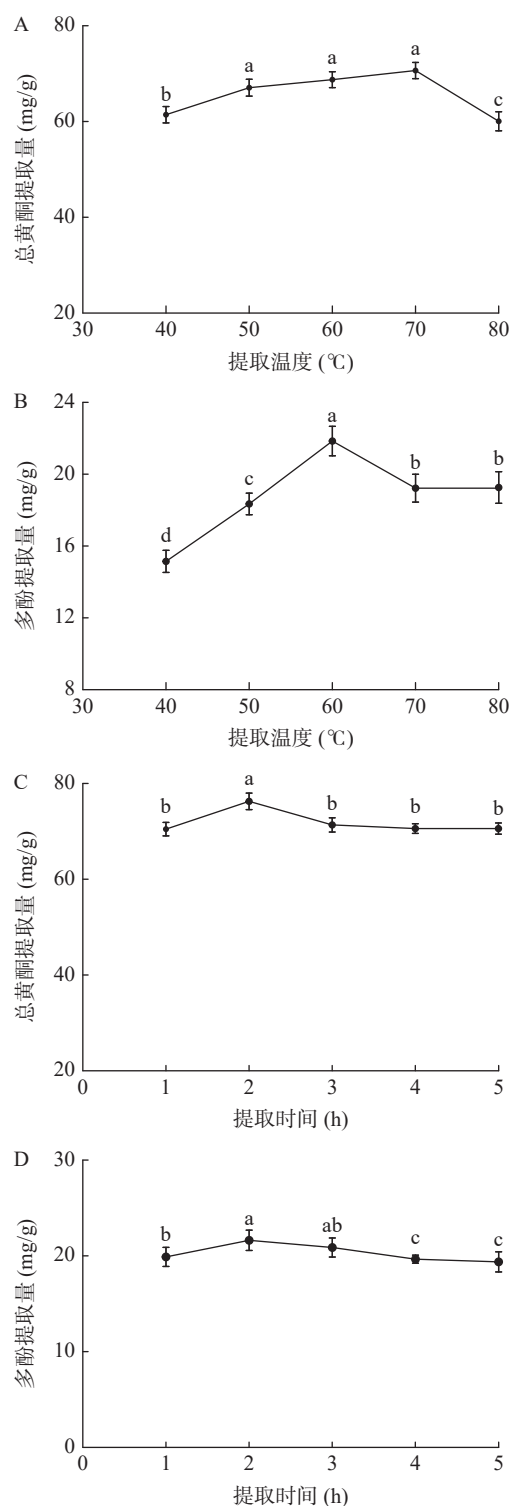


图2 不同提取温度和提取时间对紫苏叶总黄酮提取量、多酚提取量的影响

Fig.2 Effects of different extraction temperatures and extraction time on the extraction amount of flavonoids and polyphenols from *P. frutescens* leaves

注: A: 不同提取温度总黄酮提取量, B: 不同提取温度多酚提取量, C: 不同提取时间总黄酮提取量, D: 不同提取时间总黄酮提取量; 同一系列不同小写字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

k值可知,4个因素的最佳水平为 $A_3B_2C_3D_2$,即乙醇浓度为75%,料液比为1:80、提取时间2h、提取温度70℃。

表 3 紫苏叶多酚、黄酮提取量正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment for polyphenols and flavonoids extraction amount in *P. frutescens* leaves

试验号	因 素				多酚提取量 (mg/g)	黄酮提取量 (mg/g)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	16.31	44.76
2	1	2	2	2	17.62	58.48
3	1	3	3	3	17.80	54.78
4	2	1	2	3	16.61	57.19
5	2	2	3	1	16.64	67.37
6	2	3	1	2	15.51	59.69
7	3	1	3	2	16.87	74.03
8	3	2	2	3	16.22	71.79
9	3	3	1	1	15.35	72.63
k ₁ 多酚	17.24	16.60	15.72	16.10		
k ₂ 多酚	16.25	16.83	16.82	16.67		
k ₃ 多酚	16.15	16.22	17.10	16.88		
R _{多酚}	1.10	0.61	1.38	0.78		
k ₁ 黄酮	52.67	58.66	59.03	61.59		
k ₂ 黄酮	61.42	65.88	62.49	64.07		
k ₃ 黄酮	72.82	62.37	65.39	61.25		
R _{黄酮}	20.14	7.22	6.37	2.81		

表 4 多酚提取量回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of the regression model of polyphenol extraction amount

方差来源	III 类平方和	自由度	均方	F值	P值
A	7.08	2.00	3.54	89.72	<0.001
B	1.57	2.00	0.78	19.89	<0.001
C	8.92	2.00	4.46	113.10	<0.001
D	2.67	2.00	1.34	33.87	<0.001
误差	0.71	18.00	0.04		
总计	16.98	27.00			

注: $P<0.05$ 表示差异性显著, $P<0.01$ 表示差异性极显著。

2.3 方差分析及验证最优工艺试验

正交试验方差分析结果见表 4、表 5, 由表可知, 四个因素对紫苏叶多酚提取量的影响顺序为提取温度>乙醇浓度>提取时间>料液比; 对总黄酮提取量的影响顺序为乙醇浓度>料液比>提取温度>提取时间, 与极差分析结果一致。由 P 值可知, 四个因素对紫苏叶多酚、黄酮提取量均有显著影响。为进一步验证最优工艺可靠性, 在最佳多酚提取条件下, 重复三次, 测得黄酮和多酚提取量平均值分别为 74.96 ± 0.76 ,

表 5 黄酮提取量回归模型方差分析

Table 5 Analysis of variance in regression model of flavonoid extraction amount

方差来源	III 类平方和	自由度	均方	F值	P值
A	1851.37	2.00	925.68	10612.95	<0.001
B	226.20	2.00	113.10	1296.68	<0.001
C	190.09	2.00	95.04	1089.68	<0.001
D	45.64	2.00	22.82	261.61	<0.001
误差	1.57	18.00	0.09		
总计	2335.90	27.00			

注: $P<0.05$ 表示差异性显著, $P<0.01$ 表示差异性极显著。

17.85 ± 0.17 mg/g; 最佳黄酮提取条件下, 重复三次, 测得黄酮和多酚提取量平均值分别为 80.42 ± 2.66 、 16.82 ± 0.60 mg/g, 均高于正交试验结果, 表明该条件稳定可行。

2.4 权重分析

在综合评价中, 常用的评价方法有主观赋值法和客观赋值法。主观赋值法往往主观意识较强, 而客观赋值法主要依据客观数据, 几乎不受主观影响, 可以在很大程度上避免人为干扰因素, 其中熵权法为最主要的客观赋值法, 因此, 本试验采用熵权法进行权重分析^[15], 结果得出多酚和黄酮的权重系数分别为 0.46 和 0.54(表 6), 表明黄酮的权重占比更大, 与方差分析结果一致。结合综合权重分析结果、正交试验结果及方差分析结果分析得出, 两种提取工艺多酚提取量相差结果不大, 但紫苏叶提取物中黄酮提取量显著高于多酚提取量。因此综合考虑, 选择以最佳的黄酮提取工艺对五种紫苏叶进行提取, 进行接下来的理化试验。

表 6 各指标熵值及权重系数

Table 6 Entropy value and weight coefficient of each index

指标	层次分析法A	熵权法B	最终权重
多酚提取量	0.33	0.46	0.40
黄酮提取量	0.67	0.54	0.60

2.5 不同品种紫苏叶多酚、黄酮提取量的结果

在最优工艺下不同品种紫苏叶多酚、黄酮提取量如图 3 所示。由图可知, PF3 多酚提取量最高为 17.77 ± 0.29 mg/g, 其次为 PF5 多酚提取量为 16.82 ± 0.60 mg/g; PF5 黄酮提取量最多为 80.42 ± 2.66 mg/g, 其次为 PF3 黄酮提取量为 74.93 ± 0.89 mg/g。这可能是由于来源于不同地区的紫苏种子活性成分具有不同的积累和调控途径^[23]。

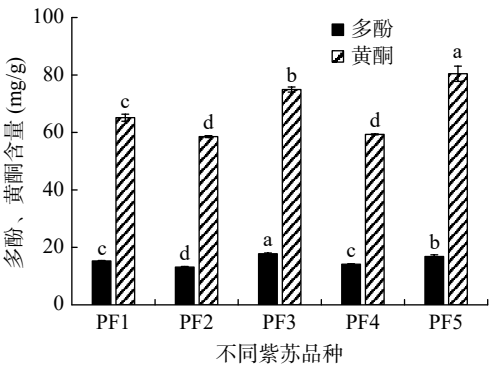


图 3 不同品种紫苏叶多酚、黄酮提取量

Fig.3 Extraction amounts of polyphenols, flavonoids in different varieties of *P. frutescens* leaves

注: 同一系列不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

2.6 不同品种紫苏叶抗氧化活性结果

2.6.1 不同品种紫苏叶对 DPPH 自由基清除能力测定 与其他化学测定法相比, DPPH 自由基十分稳

定, DPPH 自由基清除试验更快速、简单, 因此常用来检测天然植物的抗氧化能力^[24]。不同品种紫苏叶对 DPPH 自由基清除能力见图 4A。由图 4A 可知, 抗坏血酸作为阳性对照, 在 0~2000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 紫苏叶提取物表现出较好的 DPPH 自由基的清除能力, 清除能力随着浓度的增大而增强, 呈现显著量效关系。在浓度范围为 62.5~1000 $\mu\text{g/mL}$ 时, PF5 的 DPPH 自由基清除能力最强, 达到 93.11%, 其次是 PF3, 达到 87.17%; 而 PF4 的清除能力效果最差, 为 87.32%, 产生该结果的原因可能是 PF5 的总黄酮提取量优于其他各组。在浓度为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 除 PF4 外各组提取物清除率均达到 90% 左右, 该结果优于王月等^[8] 在同浓度下测定的紫苏醇提取物对 DPPH 自由基的清除效果。

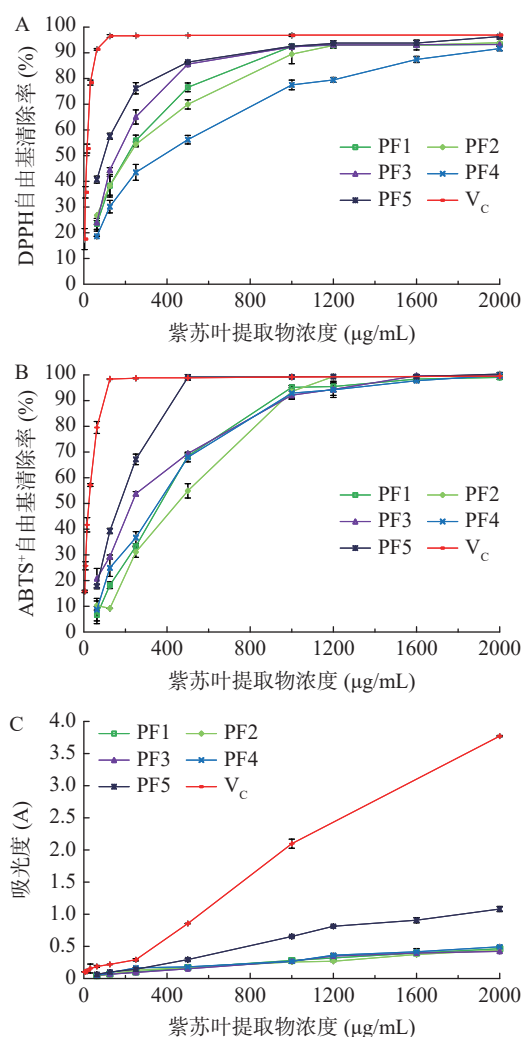


图 4 不同品种紫苏叶对 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺自由基的清除能力及总还原力

Fig.4 Scavenging ability of different varieties of *P. frutescens* leaves on DPPH, ABTS⁺ free radicals and reducing power

采用 IC_{50} 值来评价清除自由基的能力, 5 种品种紫苏叶提取物的 IC_{50} 值如表 7 所示, 从表中可以看出, DPPH 自由基清除能力最强的为 PF5, 最差为 PF4, 这与其含有最高黄酮提取量结果一致。这可能是由于黄酮类化合物中均含有具备供氢能力的酚性

羟基, 当孤对电子与还原态氢进行配对时, DPPH 即被还原形成 DPPH-H, 从而表现出显著的抗氧化能力^[25]。

表 7 不同品种紫苏叶提取物清除 DPPH, ABTS⁺自由基 IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

Table 7 The IC_{50} of extracts from different varieties of *P. frutescens* leaves for scavenging DPPH, ABTS⁺ free radicals ($\mu\text{g/mL}$)

品种	DPPH 自由基	ABTS ⁺ 自由基
PF1	181.48±11.00 ^b	301.07±0.70 ^{ab}
PF2	187.36±25.46 ^b	337.34±10.34 ^a
PF3	149.31±1.40 ^b	209.40±16.49 ^c
PF4	300.43±13.80 ^a	279.27±20.32 ^b
PF5	88.04±3.61 ^c	150.31±2.46 ^d

注: 同一列不同字母表示具有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.6.2 不同品种紫苏叶对 ABTS⁺自由基清除能力测定

ABTS⁺是一种氧化物酶底物, 当其发生氧化反应时, 会生成蓝绿色等液体, 在抗氧化剂的作用下, ABTS⁺会被清除, 从而颜色变浅, 吸光度降低, 因此通过对吸光度的测定能很好地评价样品的抗氧化效果^[26]。不同品种紫苏叶对 ABTS⁺自由基清除能力见图 4B。由图 4B 可知, 不同紫苏叶品种 ABTS⁺自由基的清除能力表现与 DPPH 自由基清除能力相似, 最强同样为 PF5, 这可能是因为 ABTS⁺自由基被抗氧化剂清除的过程是电子转移过程, 而黄酮类化合物具备较强电子供应能力^[25]。

2.6.3 不同品种紫苏叶总还原力测定 还原力强的物质供应的电子既可以还原氧化性物质, 也可与自由基反应, 使自由基成为稳定的物质。吸光度越大还原能力越强。不同品种紫苏提取物还原能力见图 4C, 以 Vc 作为阳性对照。随着浓度的提升, 各组提取物还原力呈上升趋势, 其中 PF5 还原力优于其他各组, 但均低于 Vc 组, 与 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺自由基的清除效果一致。

2.6.4 活性成分与抗氧化活性的相关性分析 为了进一步研究紫苏叶化学成分与其抗氧化活性的关系, 对五种紫苏叶中多酚、黄酮提取量与其对 DPPH 自由基、ABTS⁺自由基的清除能力和总还原力进行相关性分析(表 8)。从结果来看, 各指标之间存在一定相关性, 均与多酚和黄酮呈现正相关关系。ABTS⁺自由基清除率和总还原力与多酚显著相关 ($P<0.05$), R^2 均在 0.70 以上。DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自

表 8 紫苏叶提取物活性成分与抗氧化活性的相关性

Table 8 Correlation between active constituents and antioxidant activity of *P. frutescens* leaf extracts

	多酚	黄酮
DPPH 自由基清除率	0.05	0.51 [*]
ABTS ⁺ 自由基清除率	0.70 [*]	0.60 [*]
总还原力	0.75 [*]	0.82 ^{**}

注: *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

由基的清除能力与黄酮显著相关($P<0.05$), R^2 均在 0.50 以上,总还原力与黄酮提取量极显著相关($P<0.01$), R^2 达到 0.82。结果表明,发挥紫苏叶抗氧化能力的主要活性成分为多酚和黄酮,与陈金祥等^[27]对植物抗氧化与总酚、黄酮相关性的分析相符合。

3 结论

通过单因素与正交试验,确定紫苏叶最佳黄酮提取工艺为:乙醇浓度 75%、料液比 1:80 g/mL、提取时间 2 h、提取温度 70 ℃。此条件下,5 种紫苏叶中 PF3 多酚提取量最高,为 17.77 ± 0.29 mg/g; PF5 的黄酮提取量最高,为 80.42 ± 2.66 mg/g。与此同时,PF5 的 ABTS⁺、DPPH 自由基清除能力、总还原能力最强,且在一定浓度范围内呈现剂量依赖性。与此同时,各指标之间存在一定相关性,多酚提取量与 ABTS⁺ 自由基清除率、总还原力呈显著相关($P<0.05$),黄酮提取量与 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺ 自由基的清除能力显著相关($P<0.05$),与总还原力极显著相关($P<0.01$),发挥紫苏叶抗氧化能力的主要活性成分为多酚和黄酮。由此可知,不同品种紫苏叶提取物均具有良好的抗氧化性能,黄酮及多酚提取量与不同品种紫苏等抗氧化活性有较好的相关性。本研究筛选了抗氧化活性高的紫苏品种,为开发相关功能性产品提供了理论依据。

参考文献

- [1] 孙子文. 紫苏叶有效成分的提取及生物活性研究[D]. 太原: 中北大学, 2014. [SUN Z W. Study on extraction technology and bioactivities of effective components from *Perilla* leaves[D]. Taiyuan: North University of China, 2014.]
- [2] 张运晖, 赵瑛, 欧巧明. 紫苏籽化学成分及生物活性研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2020(9): 63–71. [ZHANG Y H, ZHAO Y, OU Q M. Research progress on chemical constituents and biological activities of Fructus Perillae[J]. Gansu Academy of Agricultural Sciences, 2020(9): 63–71.]
- [3] 何育佩, 郝二伟, 谢金玲, 等. 紫苏药理作用及其化学物质基础研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3957–3968. [HE Y P, HAO E W, XIE J L, et al. Research process on pharmacological effect and substance basis of *Perilla frutescens*[J]. Chinese Herbal Medicines, 2018, 49(16): 3957–3968.]
- [4] 王海霞, 冯雪影, 张培源. 紫苏叶饮片与其免煎颗粒治疗风寒感冒初起的临床效果对比分析[J]. 中国现代医生, 2019, 57(9): 128–130. [WANG H X, FENG X Y, ZHANG P Y. Comparison of the clinical effects of *Perilla* leaf decoction and its free fried granules in treating common cold due to wind-cold[J]. Modern Chinese Doctor, 2019, 57(9): 128–130.]
- [5] 张运晖, 赵瑛, 欧巧明. 紫苏叶化学成分及生物活性研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2020(12): 69–76. [ZHANG Y H, ZHAO Y, OU Q M. Research progress on chemical constituents and biological activities of Folium Perillae[J]. Gansu Academy of Agricultural Sciences, 2020(12): 69–76.]
- [6] 刘芳洁. 紫苏不同部位乙醇提取物对苹果树腐烂病的影响及机制[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(17): 97–101. [LIU F J. Effect and mechanism of ethanol extracts from different parts of *Perilla frutescens* on apple tree canker[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(17): 97–101.]
- [7] 孙广平, 袁丽, 方晓琳, 等. 紫苏叶多糖对糖尿病模型小鼠胰腺组织氧化应激及信号通路的影响[J]. 中国药房, 2020, 31(15): 1874–1879. [SUN G P, YUAN L, FANG X L, et al. Effects of *Purple frutescens* leaves polysaccharides on oxidative stress and PI3K/AKT/GLUT4 signaling pathway of pancreatic tissues in diabetes mellitus model[J]. China Pharmacy, 2020, 31(15): 1874–1879.]
- [8] 王月, 赵彦巧, 李建颖. 超声辅助提取紫苏叶花色苷及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(4): 128–135. [WANG Y, ZHAO Y Q, LI J Y. Ultrasonic-Assisted extraction of anthocyanins from *Perilla* leaves and antioxidant activity analysis[J]. Food Research and Development, 2022, 43(4): 128–135.]
- [9] 廖霞, 吴振, 杨勇, 等. 乌天麻不同溶剂提取物的多酚、黄酮含量及其抗氧化能力评价[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 157–164. [LIAO X, WU Z, YANG Y, et al. The differentiation of total polyphenols and total flavonoids contents in *Gastrodia elata* Bl. f. *glauca* S. Chow extracts using different solvents and their antioxidant capacities[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(5): 157–164.]
- [10] 康超, 刘凤听, 刘云芬, 等. 不同品种芒果核多酚和黄酮含量及抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2021, 42(20): 100–105. [KANG C, LIU F T, LIU Y F, et al. Contents of polyphenols and flavonoids and its antioxidant activity evaluation in different kinds of mango kernel seeds[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(20): 100–105.]
- [11] 白静, 王会. 洋葱中黄酮类化合物的提取方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(4): 945–948. [BAI J, WANG H. Study on extraction methods of flavonoids from onion[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(4): 945–948.]
- [12] 郑清, 陈宝印, 杨磊, 等. 响应面法优化同步提取黑蒜中多酚与黄酮的工艺及抗氧化活性的测定[J]. 中国调味品, 2021, 46(5): 69–76. [ZHENG Q, CHEN B Y, YANG L, et al. Optimization of simultaneous extraction of polyphenols and flavonoids from black garlic by response surface methodology and determination of antioxidant activity[J]. China Condiment, 2021, 46(5): 69–76.]
- [13] 钟秋平, 林美芳. 黄皮果中黄酮含量的测定及其黄酮种类的鉴别[J]. 食品科学, 2007(8): 411–413. [ZHONG Q P, LIN M F. Determination of contents of flavones and identification of flavones species in fructus clausenae lanii[J]. Food Science, 2007(8): 411–413.]
- [14] 韩云凤, 唐茜, 石懿, 等. 基于嫡权法-层次分析法结合响应面法优化养阴润目颗粒的提取工艺[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(7): 896–903. [HAN Y F, TANG Q, SHI Y, et al. Optimization of extraction process for Yangyin Runmu granules by Box-Behnken design based on entropy weight method-analytic hierarchy process method[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2022, 39(7): 896–903.]
- [15] MENG L H, LOZANO Y, GAYDOU E, et al. Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties[J]. Molecules, 2008, 31;14(1): 133–140.
- [16] 曾思漫, 崔珏. 银杏叶黄酮的闪式提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 农产品加工, 2021(17): 36–38, 42. [ZENG S M, CUI Y. Optimization of flash extraction and antioxidant activities analysis of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves[J]. The processing of agricultural products, 2021(17): 36–38, 42.]
- [17] 裴斐, 陶虹伶, 蔡丽娟, 等. 响应面法优化辣木叶多酚超声辅助提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(20): 24–30. [PEI F, TAO H L, CAI L J, et al. optimization of polyphenols from *Moringa oleifera* Lam. leaves by ultrasound-assisted ex-

traction using response surface methodology and their antioxidant activities[J]. Food Science, 2016, 37(20): 24-30.]

[18] 孙威, 陈轩. 葛根重组米的蒸煮特性和黄酮提取研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(7): 57-62. [SUN W, CHEN X. Study on cooking characteristics and flavonoids extraction of Radix Puerariae reconstituted rice[J]. Cereals & Oils, 2022, 35(7): 57-62.]

[19] 王方杰. 胡柚黄酮和益生菌发酵胡柚汁的降脂及调节肠道菌群作用研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2020. [WANG F J. The regulation effect of flavonoids from Huyou and probioticfermented Huyou juice on lipid-lowering and intestinal microbiota[D]. Ningbo: Ningbo University, 2020.]

[20] 桂利利, 吴正坤, 余惠凡, 等. 黄药叶黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 100-108. [GUI L L, WU Z K, SHE H F, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves[J]. Food Research and Development, 2021, 42(19): 100-108.]

[21] 张锦华, 徐蔓, 白宝清, 等. 响应面法优化提取无花果干果中多酚和总黄酮物质及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(16): 183-190, 212. [ZHANG J H, XU M, BAI B Q, et al. Optimization of extraction of polyphenols and total flavonoids from dried figs by response surface methodology and antioxidant activity analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(16): 183-190, 212.]

[22] 杨静, 李博, 张延妮. 拐枣多糖的反复冻融回流工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 273-279.

[YANG J, LI B, ZHANG Q Q. Optimization of repeated freezing-thawing reflux for extraction of polysaccharide from *Hovenia dulcis* and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food In-

dustry, 2022, 43(19): 273-279.]

[23] 李锐, 李皎皎, 张聪聪, 等. 不同地区的紫苏种子中总黄酮的提取方法及其含量研究[J]. 激光生物学报, 2021, 30(1): 91-96.

[LI R, LI J J, ZHANG Q Q, et al. A study on extraction method and content of total flavonoids in *Perilla frutescens* seeds from different regions[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2021, 30(1): 91-96.]

[24] CHEN F L, LIU S S, ZHAO Z Y, et al. Ultrasound pre-treatment combined with microwave-assisted hydrodistillation of essential oils from *Perilla frutescens* (L.) Britt. leaves and its chemical composition and biological activity[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 143: 111908.

[25] 陈惠卿, 陈惠婷, 张颖, 等. 乙醇法制备葛花醇提物的工艺优化及其抗氧化活性[J]. 福建轻纺, 2021(10): 2-8, 11. [CHEN H Q, CHEN H T, ZHANG Y, et al. Optimization of the process and its antioxidant activity in the preparation of kudzu alcohol extract by ethanol method[J]. The Light & Textile Industries of Fujian, 2021(10): 2-8, 11.]

[26] 张娜娜, 刘建林, 郭欣欣, 等. 不同品种马铃薯花色苷提取物的种类鉴定及其抗氧化作用[J]. 食品科技, 2022, 47(2): 232-238. [ZHANG N N, LIU J L, GUO X X, et al. Identification of anthocyanins extract from a variety of potato and their antioxidant activities[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(2): 232-238.]

[27] 陈金祥, 杨静, 刘淑珍, 等. 多种植物总酚含量和抗氧化能力的测定和比较分析[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2020, 43(1): 150-157. [CHEN J X, YANG J, LIU S Z, et al. Determination and comparison of total phenolic content and antioxidant capacity of various plant materials[J]. Journal of Shanxi University(Natural Science Edition), 2020, 43(1): 150-157.]