DOI:10.12441/spyswjs.20241213001 [文章编号] 1673-1689(2026)01-0130-11

超声辅助双酶法提取紫苏叶花色苷的工艺优化及抗氧化活性研究

朱文婷 王诗云 朱乔林 曹 琦 张一欣 洪天然

(武汉工商学院环境与生物工程学院,湖北 武汉 430065)

摘要:【目的】综合开发紫苏,提高其利用价值。**【方法】**以紫苏叶为原料,采用超声辅助双酶法提取紫苏叶中的花色苷,研究不同料液比、乙醇体积分数、超声时间、酶解时间对紫苏叶中花色苷质量分数的影响,采用响应面法优化超声辅助双酶法提取紫苏叶花色苷的最佳工艺条件。并测定紫苏叶花色苷的抗氧化活性和酚类化合物质量分数,通过色谱法分析主要酚类化合物。**【结果】**紫苏叶花色苷的最佳提取工艺为料液比 1 g∶16 mL、乙醇体积分数 74%、超声时间 23 min、酶解时间 92 min。在此条件下,紫苏叶中花色苷质量分数为 252.87 mg/100 g,其 DPPH 自由基清除率为 48.88%,总抗氧化能力为 51.12%,羟自由基的清除率为 34.99%。紫苏叶酚类化合物质量分数为 4.81 mg/g,含飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷(0.43±0.04) mg/g、矢车菊素(0.86±0.07) mg/g、芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷(1.41±0.03) mg/g,同品种不同批次酚类化合物质量分数差异较小。此外,紫苏叶花色苷清除 DPPH 自由基、羟自由基能力强,芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷等能高亲和力地结合 KEAP1 的 Nrf2 结合口袋,抑制 KEAP1-Nrf2 结合,促进 Nrf2 核转位及血红素氧合酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶 1(NQO1)的表达。**【结论】**双酶联用质量比、双酶联用总酶量、温度、料液比、乙醇体积分数、超声时间和酶解时间等因素会对紫苏叶花色苷的质量分数产生不同的影响,且紫苏叶酚类质量分数与原料、贮藏条件相关;紫苏叶花色苷可通过直接清除自由基与激活 KEAP1-Nrf2/抗氧化反应元件(ARE)通路发挥抗氧化作用,超声辅助双酶法可高效提取高纯度紫苏叶花色苷。该研究为紫苏叶花色苷在食品加工中的应用提供了理论依据。

关键词:双酶法;紫苏叶花色苷;响应面;抗氧化活性

Ultrasound-assisted Dual-enzyme Extraction Condition Optimization and Antioxidant Activity Evaluation of Anthocyanins from Perilla Leaves

ZHU Wenting WANG Shiyun ZHU Qiaolin CAO Qi ZHANG Yixin HONG Tianran

(School of Environmental and Biological Engineering, Wuhan Technology and Business University, Wuhan 430065, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to comprehensively develop perilla and improve its utilization value. [**Method**] Using perilla leaves as raw material, the effects of solid-liquid ratio, ethanol volume fraction, ultrasonic time, and enzymatic hydrolysis time on the mass fraction of anthocyanins in perilla leaves were studied. The ultrasound-assisted dual-enzyme extraction conditions for anthocyanins from perilla leaves were optimized by the response surface method. The antioxidant activity and phenol mass fraction of anthocyanins from perilla leaves were determined, and the main phenols were analyzed by chromatography. [**Result**] The optimal extraction conditions of anthocyanins from perilla leaves were solid-liquid ratio of 1 g∶16 mL, ethanol volume fraction of 74%, ultrasonic time of 23 min, and enzymatic hydrolysis time of 92 min. Under these conditions, the mass fraction of anthocyanins from perilla leaf was 252.87 mg/100 g, with a DPPH radical scavenging rate of 48.88%, a

基金项目:中国民办教育协会 2022 年度规划课题(学校发展类)(课题批准号为 CANFZG22157)。

通信作者:朱文婷(1983—),女,硕士,副教授,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:251558801@qq.com

收稿日期:2024-12-13 **修回日期:**2025-02-15

total antioxidant capacity of 51.12%, and a hydroxyl radical scavenging rate of 34.99%. The phenols in perilla leaf anthocyanins showed the mass fraction of 4.81 mg/g, containing (0.43±0.04) mg/g delphinidin-3-*O*-glucoside, (0.86±0.07) mg/g cyanidin, and (1.41±0.03) mg/g paeoniflorin-3,5-*O*-diglucoside. The mass fraction of phenols in different batches of the same variety had little difference. In addition, perilla leaf anthocyanins had a strong ability to scavenge DPPH and hydroxyl free radicals. Paeoniflorin-3,5-*O*-diglucoside bound to the Nrf2 pocket of KEAP1, inhibited KEAP1-Nrf2 binding, and promoted the nuclear translocation of Nrf2 and the expression of hemeoxygenase-1 (HO-1) and quinone oxidoreductase 1 (NQO1). [**Conclusion**] Factors such as the mass ratio of dual enzymes, total enzyme dosage, temperature, solid-liquid ratio, ethanol volume fraction, ultrasonic time, and enzymatic hydrolysis time have different effects on the mass fraction of anthocyanins in perilla leaves, and the mass fraction of phenols in perilla leaves is related to the raw materials and storage conditions. Perilla leaf anthocyanins can exert antioxidant effects by directly scavenging free radicals and activating the KEAP1-Nrf2/antioxidant response element (ARE) pathway. Ultrasound-assisted dual-enzyme method enables efficient extraction of high-purity anthocyanins from perilla leaves. This study provides a theoretical basis for the application of perilla leaf anthocyanins in food processing.

Keywords: dual enzymatic method; perilla leaf anthocyanin; response surface; antioxidant activity

紫苏叶中含有α-亚麻酸、丁香酚、紫苏醇以及多酚类等多种生物活性物质[1]。其中新鲜紫苏叶含大量花色苷，是优质的天然色素来源[2]。紫苏叶花色苷具有减肥、护眼及改善糖尿病等功效[3-4]，应用前景广阔。紫苏叶种植历史悠久、生长周期短、获取便捷、成本低，具备良好的试验研究基础。

当前紫苏叶花色苷提取多采用单一工艺或单酶法，得率偏低。如茹巧美等[5]用聚乙二醇进行提取时，紫苏叶花色苷得率为6.627 mg/g；于海鑫等[6]采用微波法进行提取时，紫苏叶花色苷质量分数为（56.51±0.55）mg/100 g。Aliaño González等[7]研究证实，紫苏叶花色苷对多种自由基有清除能力。现有提取工艺各有局限，如溶剂提取法操作简单但提取率低、易导致紫苏叶花色苷降解；超声波辅助提取法高效温和[8]，但设备要求高、易破坏花色苷结构；微波辅助法快速节能，但成本高，适用范围有限；酶法温和环保，但成本高、耗时久。

本研究以紫苏叶为原料，通过超声辅助双酶法提取紫苏叶花色苷，利用超声波加速破壁，释放出紫苏叶花色苷，再利用双酶协同，实现高效催化富集的优势。作者通过优化双酶质量比与用量，结合单因素及响应面试验确定最佳提取工艺，并分析紫苏叶花色苷体外抗氧化活性，为紫苏叶花色苷的开发应用及工业化发展提供参考与技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

干制紫苏叶（1 000 g）：安徽亳州大西北药业有限公司；纤维素酶（50 000 U/g）、果胶酶（30 000 U/g）：夏盛（北京）生物科技开发有限公司；无水醋酸钠、冰醋酸：分析纯，河北恒航化工科技有限公司；无水乙醇：分析纯，天津中和盛泰化工有限公司。

1.2 仪器与设备

粉碎机：WN-20B型，广州市旭朗机械设备有限公司；超声波清洗机：LSA-E100型，深圳市洁盟清洗设备有限公司；可见分光光度计：722型，上海佑科仪器仪表有限公司；高速冷冻离心机：BB01-GTR16-2型，安徽嘉文仪器装备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 紫苏叶花色苷的提取

将2 g紫苏叶粉末和30 mL体积分数80%的乙醇提取剂混合浸泡，加入质量分数0.5%的纤维素酶和果胶酶（质量比为4∶1），水浴提取1.5 h后，超声20 min，进行分组试验。提取的紫苏叶花色苷过滤后，4 000 r/min离心15 min，取1 mL上清液至比色管，备用。

1.3.2 pH示差法测定紫苏叶花色苷质量分数

根据文献[9]的方法，用pH示差法测定紫苏叶花色苷质量分数（mg/100 g）。

1.3.3 超声双酶法试验条件优化设计

固定以下条件：紫苏叶粉末 2 g、体积分数 80% 乙醇 30 mL、水浴 1.5 h、超声 20 min、4 000 r/min 离心 15 min 及取上清液 1 mL，通过改变酶使用方式（单酶、双酶）及关键参数，考察各因素对紫苏叶花色苷提取的影响。以紫苏叶花色苷质量分数为评价指标，分析各因素的影响。

1）单酶作用：分别以质量分数 0.1%~0.5% 添加纤维素酶、果胶酶。

2）双酶质量比：当双酶联用质量分数为 0.5% 时，纤维素酶与果胶酶质量比分别设为 4∶1、2∶1、1∶1、1∶2、1∶4。

3）双酶联用质量分数：当纤维素酶与果胶酶质量比为 4∶1 时，双酶联用质量分数为 0.1%~0.5%。

4）酶解温度：当双酶联用质量分数为 0.5%、纤维素酶与果胶酶质量比为 4∶1 时，水浴温度设为 20~60 ℃。

1.3.4 单因素试验设计

研究乙醇体积分数（40%、50%、60%、70%、80%）、料液比（1 g∶10 mL、1 g∶15 mL、1 g∶20 mL、1 g∶25 mL、1 g∶30 mL）、超声时间（10、15、20、25、30 min）、酶解时间（30、60、90、120、150 min）对紫苏叶花色苷提取工艺的影响。

固定以下试验条件：紫苏叶粉末 2 g、乙醇 30 mL、双酶联用质量分数 0.5%、纤维素酶与果胶酶质量比 4∶1、双酶联用酶解温度 50 ℃、4 000 r/min 离心 15 min、上清液 1 mL，分别改变乙醇体积分数、料液比、超声时间、酶解时间，然后依据紫苏叶花色苷质量分数判断各因素对紫苏叶花色苷提取工艺的影响。

1.4 紫苏叶花色苷抗氧化活性的研究

根据文献[9]的方法，测定紫苏叶花色苷 DPPH 自由基清除能力；根据文献[10]的方法，测定紫苏叶花色苷总抗氧化能力；根据文献[10]的方法，测定紫苏叶花色苷羟自由基清除能力。

1.5 紫苏叶花色苷质量分数的测定

以去离子水为溶剂[11]，分别配制 0.02 mg/mL 没食子酸对照溶液、0.25 mol/L 福林酚反应液，以及质量分数 15% 的碳酸钠溶液[12]。取 0.5~1.0 mL 没食子酸对照溶液至试管，用去离子水定容至 1 mL；随后向各管加入 0.5 mL 福林酚反应液，静置 3 min，再添加 1 mL 碳酸钠溶液继续静置 30 min。以碳酸钠溶液作空白参比，在 760 nm 波长下测定各管吸光度并拟合标准曲线，再按相同流程处理紫苏叶花色苷，结合其吸光度与标准曲线计算酚类化合物的质量分数。

1.6 高效液相色谱（HPLC）法测定酚类化合物质量分数

以甲醇为溶剂，制备 0.1 mg/mL 的 3-芍药花素-3，5-*O*-二葡萄糖苷、矢车菊素、飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷的对照溶液，各取 1 mL 混匀得到混合对照溶液。移取 0.1~0.5 mL 混合对照溶液分装入试管，用甲醇定容至 1 mL。紫苏叶提取物经相同方式稀释后，于 12 000 r/min 离心 5 min，过 0.22 μm 滤膜，滤液置于液相进样瓶中，于 4 ℃冷藏。采用 HPLC 法[13]分析 3 种化合物对照溶液、5 个质量浓度梯度的混合对照溶液及 3 份提取物样品，通过特征保留时间与峰面积建立质量浓度-响应值关联曲线，据此计算提取物中目标酚类的质量分数。

HPLC 参数：C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm×5 μm），检测波长 280 nm，柱温 30 ℃，进样量 10 μL；流动相 A 为甲醇-乙酸-水（体积比 10∶2∶88）溶液、流动相 B 为甲醇-乙酸-水（体积比 90∶2∶8）溶液，流量 0.7 mL/min；0~45 min 时，流动相 A 体积分数由 0 提升至 50%；45~70 min 时，流动相 A 体积分数进一步提升至 100%。

1.7 酚酸种类测定

采用高效液相色谱-串联质谱联用[14]（HPLC-MS/MS）技术对紫苏叶提取物中的酚酸组分进行定性鉴定。HPLC 条件：BEH C18 色谱柱（2.1 mm×150 mm×1.7 μm），进样量 5 μL，柱温 45 ℃，检测波长 280 nm，流量 0.3 mL/min；流动相 A 为体积分数 0.1% 的甲酸水溶液，流动相 B 为纯乙腈；0~40 min 时，流动相 A 体积分数从 100% 降至 70%；40~45 min 时，流动相 A 体积分数降至 20%；45~50min 时，流动相 A 体积分数降至 0；50~55 min 时，流动相 A 体积分数回升至 100%。质谱条件：电喷雾正离子电离（ESI^+）模式，毛细管电压 3 500 V，锥孔电压 30 V，离子源温度 100 ℃，脱溶剂气温度 400 ℃，脱溶剂气流量 700 L/h，锥孔气流量 50 L/h，碰撞能量 6 eV，探测器电压 1 800 V，质荷比（m/z）扫描区间设为 20~2 000。

1.8　从分子对接角度阐述紫苏叶花色苷的抗氧化活性

1.8.1　靶点选择

选取KEAP1蛋白质作为研究靶点。KEAP1是细胞内抗氧化反应元件的主要负调控因子，当抗氧化分子与KEAP1的特定口袋结合时，会促使Nrf2解离并进入细胞核，启动一系列抗氧化酶（如SOD、CAT、HO-1）的表达，对接至KEAP1的Kelch结构域是阐明抗氧化机理的黄金标准。

1.8.2　配体准备

1）鉴定主要的紫苏叶花色苷单体：通过HPLC-MS技术分析超声辅助双酶法优化提取的紫苏叶花色苷提取物，确定主要的紫苏叶花色苷单体成分。

2）获取分子结构：从PubChem数据库下载主要的紫苏叶花色苷单体成分的3D化学结构文件。

3）配体预处理：使用AutoDock Tools软件对主要的紫苏叶花色苷单体成分进行加氢、计算Gasteiger电荷、设置可旋转键、能量最小化等操作。

1.8.3　分子对接操作

1）受体准备：对下载的KEAP1蛋白质晶体结构进行预处理，去除水分子、原配体，进行加氢、补充缺失残基、分配电荷等操作。

2）确定活性口袋：KEAP1的活性口袋为其与Nrf2结合的Kelch结构域，通过文献调研确定关键氨基酸残基。

3）执行对接：设置网格框覆盖整个活性口袋，选择AutoDock Vina对接算法进行半柔性对接，计算芍药花素-3，5-*O*-二葡萄糖苷与KEAP1蛋白质的结合模式和作用能。

1.9　数据处理

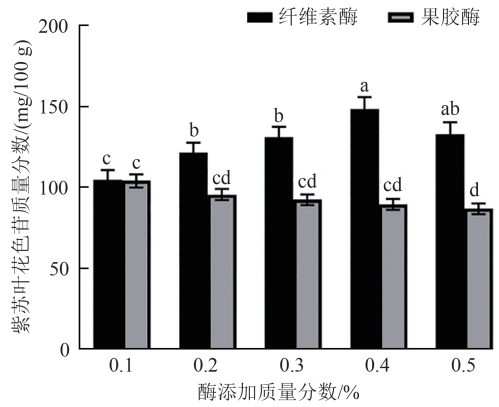
采用Origin对数据进行统计学分析及绘图，Design Expert 10软件进行响应面[15-16]设计并分析。

2　结果与讨论

2.1　超声双酶法试验条件

2.1.1　单酶对紫苏叶花色苷质量分数的影响

由图1可知，单独使用纤维素酶时，紫苏叶花色苷质量分数呈先上升后下降的趋势；单独使用果胶酶时，紫苏叶花色苷质量分数呈下降趋势。表明纤维素酶更有利于通过分解细胞壁促进紫苏叶花色苷的释放和提取；果胶酶在添加质量分数较少时可促进紫苏叶花色苷的释放，但过多的果胶酶可能会酶解紫苏叶花色苷，破坏其结构。结果表明，当纤维素酶添加质量分数为0.4%时，紫苏叶花色苷质量分数最高，达148.19 mg/100 g；当果胶酶添加质量分数为0.1%时，紫苏叶花色苷质量分数最高，达104.04 mg/100 g。



不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图1　单酶对紫苏叶花色苷质量分数的影响

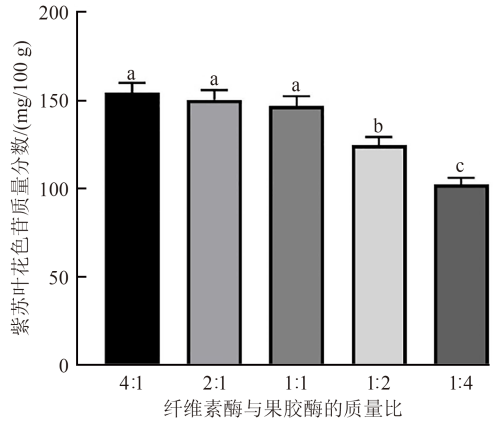
Fig. 1　Effect of single enzyme on the mass fraction of perilla leaf anthocyanins

2.1.2　双酶质量比对紫苏叶花色苷质量分数的影响

由图2可知，当酶添加质量分数为0.5%时，随着纤维素酶质量比降低，紫苏叶花色苷质量分数逐渐下降，这说明纤维素酶对紫苏叶花色苷的提取作用影响明显。当纤维素酶与果胶酶的质量比为4∶1时，紫苏叶花色苷质量分数最高，达154.05 mg/100 g，这可能是因为当纤维素酶与果胶酶的质量比为4∶1时，2种酶的协同作用最强，最大程度地破坏了植物细胞壁。因此，纤维素酶与果胶酶的最佳质量比为4∶1。

2.1.3　双酶联用质量分数对紫苏叶花色苷质量分数的影响

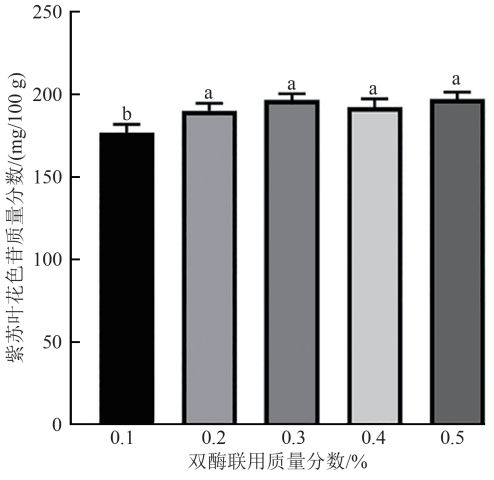
由图3可知，纤维素酶与果胶酶以质量比4∶1混合时，随着双酶联用质量分数的增加，紫苏叶花色苷质量分数缓慢升高，当双酶联用质量分数为0.5%时达到最大，为197.24 mg/100 g。当双酶联用质量分数较低时，酶对植物细胞壁的分解作用有限；随着双酶联用质量分数增加到适中水平，能够与更多的植物细胞壁接触并有效分解细胞壁；当双酶联用质量分数过高时，可能会出现酶的抑制现象或者是底物不足的情况。因此，最佳双酶联用质量分数为0.5%。



不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

图 2　双酶质量比对紫苏叶花色苷质量分数的影响

Fig. 2　Effect of dual-enzyme mass ratio on the mass fraction of perilla leaf anthocyanins



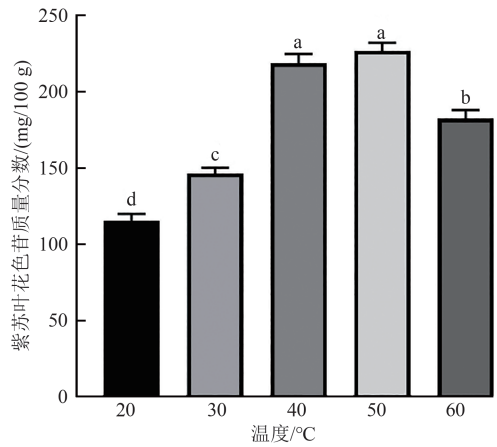
不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

图 3　双酶联用质量分数对紫苏叶花色苷质量分数的影响

Fig. 3　Effect of dual-enzyme mass fraction on the mass fraction of perilla leaf anthocyanins

2.1.4　双酶联用酶解温度对紫苏叶花色苷质量分数的影响

由图 4 可知，紫苏叶花色苷质量分数随着酶解温度的升高，呈先升高后下降的趋势。在较低的温度范围内，随着温度的升高，酶活力增强，紫苏叶花色苷提取效率升高；当温度达到酶的最适温度时，酶活力最强，此时紫苏叶花色苷提取效率最高；当温度继续升高时，酶活力逐渐降低甚至丧失，紫苏叶花色苷质量分数降低。当酶解温度为 50 ℃时，紫苏叶花色苷质量分数最高，达 226.69 mg/100 g；当温度升高到 60 ℃时，紫苏叶花色苷质量分数显著降低。因此，最佳酶解温度为 50 ℃。



不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

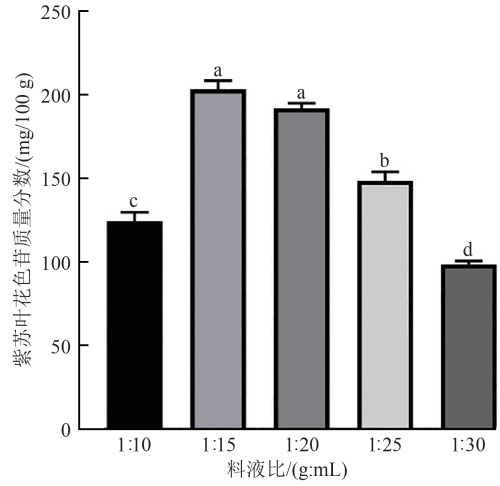
图 4　双酶联用酶解温度对紫苏叶花色苷质量分数的影响

Fig. 4　Effect of dual-enzyme hydrolysis temperature on the mass fraction of perilla leaf anthocyanins

2.2　工艺条件的单因素试验结果

2.2.1　料液比对紫苏叶花色苷质量分数的影响

由图 5 可知，当料液比为 1 g∶10 mL、1 g∶15 mL 时，随着料液比的降低，紫苏叶花色苷质量分数随之增加。在较高的料液比范围内，随着乙醇体积分数的增加，紫苏叶花色苷从植物组织中的溶出机会增加。当料液比为 1 g∶20 mL、1 g∶25 mL、1 g∶30 mL 时，随着料液比的降低，紫苏叶花色苷的质量分数随之减少。这可能是因为乙醇较多可能不利于紫苏叶花色苷的溶解和提取。因此，选



不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

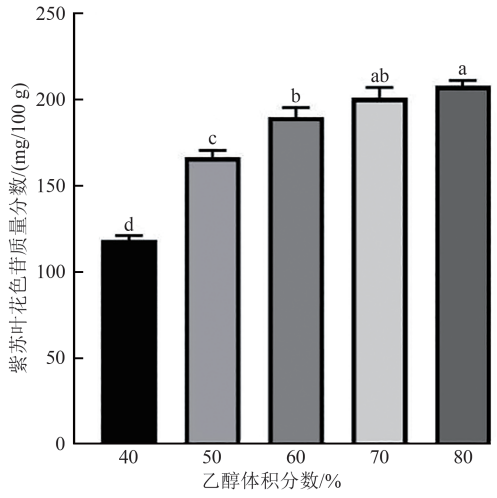
图 5　料液比对紫苏叶花色苷质量分数的影响

Fig. 5　Effect of solid-liquid ratio on the mass fraction of perilla leaf anthocyanins

择料液比1 g∶10 mL、1 g∶15mL、1 g∶20 mL进行响应面优化试验。

2.2.2　乙醇体积分数对紫苏叶花色苷质量分数的影响

由图6可知，当乙醇体积分数为40%~60%时，紫苏叶花色苷质量分数随着乙醇体积分数的增加而增加，乙醇和花色苷的极性相近，使紫苏叶花色苷更易提取。当乙醇体积分数为60%~80%时，随着乙醇体积分数的增加，紫苏叶花色苷质量分数增加幅度较小，且几乎趋于平缓，这可能是因为乙醇体积分数较高会抑制紫苏叶花色苷的亲水性，增强其亲脂性，使紫苏叶花色苷在乙醇中的溶解度增加速率变缓，最终导致其质量分数增加几乎趋于平缓。因此，选择乙醇体积分数60%、70%、80%进行响应面优化试验。



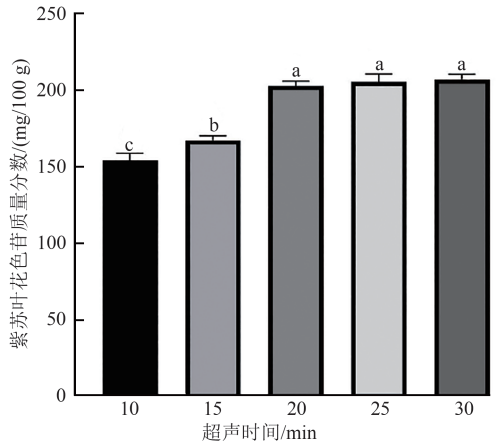
不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

图6　乙醇体积分数对紫苏叶花色苷质量分数的影响

Fig. 6　Effect of ethanol volume fraction on the mass fraction of perilla leaf anthocyanins

2.2.3　超声时间对紫苏叶花色苷质量分数的影响

由图7可知，当超声时间为10~20 min时，随着超声时间的增加，超声波对紫苏叶花色苷细胞壁的破坏作用逐渐增强，有利于紫苏叶花色苷的释放。随着超声时间继续增加，紫苏叶花色苷的溶解度趋于饱和状态，其质量分数增加不明显，且超声时间过长会影响紫苏叶花色苷的稳定性。因此，选择超声时间20、25、30 min进行响应面优化试验。



不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

图7　超声时间对紫苏叶花色苷质量分数的影响

Fig. 7　Effect of ultrasonic time on the mass fraction of perilla leaf anthocyanins

2.2.4　酶解时间对紫苏叶花色苷质量分数的影响

由图8可知，当酶解时间为30~90 min时，随着酶解时间的延长，紫苏叶花色苷质量分数增加，这可能是因为酶与紫苏叶花色苷细胞壁的接触时间增加，酶解作用逐渐显现。当酶解时间为90~150 min时，随着酶解时间的延长，紫苏叶花色苷质量分数减少，这可能是由于长时间的酶解会导致酶活力逐渐降低，甚至失活。因此，选择酶解时间为60、90、120 min进行响应面优化试验。

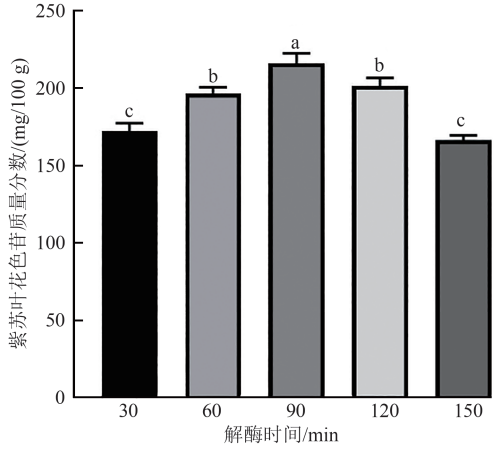
2.3　响应面分析结果

2.3.1　响应面模型的建立及其方差分析

在单因素试验的基础上，选取料液比（A）、乙醇体积分数（B）、超声时间（C）和酶解时间（D）作为自变量，通过使用Design Expert软件设计出四因素三水平中心组合试验方案，考察指标为紫苏叶花色苷质量分数，见表1。

根据Box-Behnken试验设计原理，共设计出29个试验点，通过Design-Expert软件对数据进行多项式回归分析，建立紫苏叶花色苷提取工艺参数回归模型，得到紫苏叶花色苷质量分数（Y）对自变量A、B、C及D的多项式回归方程式为：Y=132.64+33.50A+54.56B−14.51C−1.43D+16.51AB−5.16AC+11.87AD−20.48BC−26.55BD−10.03CD−1.46A^2−13.44B^2+4.76C^2+0.11D^2。

显著性分析及方差分析结果见表2，模型F=79.130，P<0.000 1，表示数据显著，且建立的



不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

图 8　酶解时间对紫苏叶花色苷质量分数的影响

Fig. 8　Effect of enzymatic hydrolysis time on the mass fraction of perilla leaf anthocyanins

表 1　响应面分析因素水平表

Table 1　Factors and levels of the response surface design

水平	料液比/(g∶mL)	超声时间/min	酶解时间/min	乙醇体积分数/%
−1	1∶10	20	60	60
0	1∶15	25	90	70
1	1∶20	30	120	80

表 2　回归模型的方差分析结果

Table 2　Variance analysis results of the regression model

变异来源	平方和	自由度	均方和	F	P	显著性
模型	47 512.38	14	3 393.74	79.130	<0.000 1	极显著
A	1 559.06	1	1 559.06	36.350	<0.000 1	极显著
B	4 276.70	1	4 276.70	99.720	<0.000 1	极显著
C	1.98	1	1.98	0.046	0.833 1	不显著
D	29.74	1	29.74	0.690	0.419 0	不显著
AB	524.41	1	524.41	12.230	0.003 6	极显著
AC	106.71	1	106.71	2.490	0.137 0	不显著
AD	263.41	1	263.41	6.140	0.026 6	显著
BC	226.05	1	226.05	5.270	0.037 6	显著
BD	4.43	1	4.43	0.100	0.752 6	不显著
CD	503.55	1	503.55	11.740	0.004 1	极显著
A^2	1 999.79	1	1 999.79	46.630	<0.000 1	极显著
B^2	37 139.82	1	37 139.82	865.990	<0.000 1	极显著
C^2	3 930.07	1	3 930.07	91.640	<0.000 1	极显著
D^2	7 339.23	1	7 339.23	171.130	<0.000 1	极显著
残差	600.42	14	42.89			
失拟项	451.70	10	45.17	1.210	0.460 6	不显著
净误差	148.72	4	37.18			
总离差	48 112.80	28				

注：P<0.05 表示差异显著；P<0.01 表示差异极显著。

模型具有研究意义；失拟项 F=1.210，表示失拟项相对于净误差来说不显著，意味着模型拟合度良好，可以用于紫苏叶花色苷质量分数的预测。模型失拟项 P=0.460 6（>0.05），说明模型拟合效果良好，其残差大概率源于试验过程中的随机误差。各因素对紫苏叶花色苷质量分数的影响程度可依据 F 大小判断，F 越高表示对应的因素对试验结果的影响越显著。由此可得，4 个因素对紫苏叶花色苷质量分数的影响程度排序为：B>A>D>C。结合 P 分析可知，因素 A 与因素 B 对试验结果的影响达到极显著水平（P<0.01）。

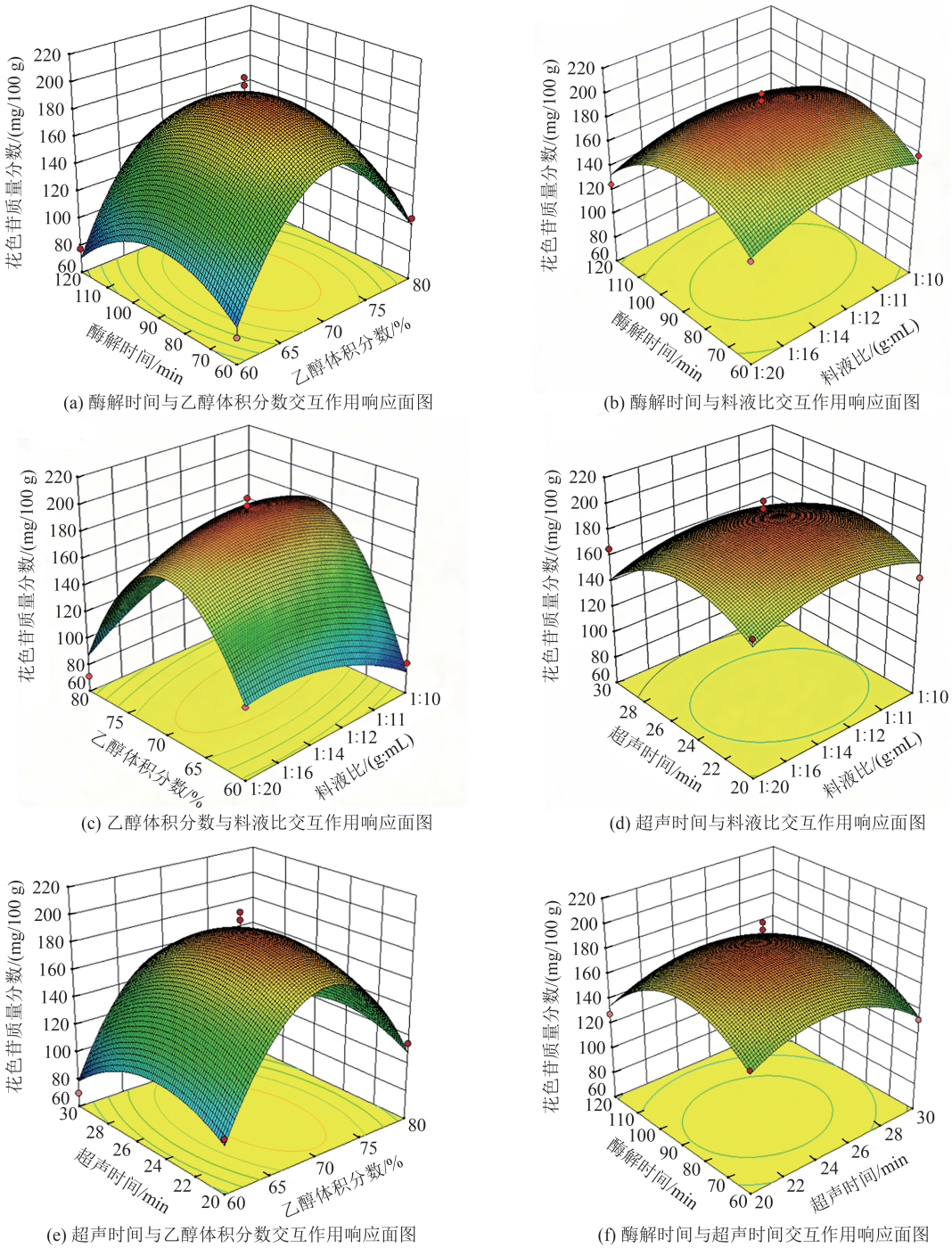
2.3.2　交互效应分析

由图 9 可知，料液比、乙醇体积分数、超声时间、酶解时间均会影响紫苏叶花色苷质量分数，影响程度由大到小排序为：乙醇体积分数>料液比>酶解时间>超声时间。

曲面陡峭程度与等高线密集度可反映因素影响效应，两者数值越高，因素对结果的作用越显著。对任意两因素的交互效应进行分析，结果表明，当超声时间为 25 min、料液比为 1 g∶15 mL 时，紫苏叶花色苷质量分数随乙醇体积分数与酶解时间的增加呈先升高后降低的趋势，且乙醇体积分数的曲面变化幅度更显著；当乙醇体积分数为 70%、超声时间为 25 min 时，料液比的影响高于酶解时间；当超声时间为 25 min、酶解时间为 90 min 时，乙醇体积分数的影响高于料液比；当乙醇体积分数为 70%、酶解时间为 90 min 时，料液比的影响高于超声时间；当料液比为 1 g∶15 mL、酶解时间为 90 min 时，乙醇体积分数的影响高于超声时间；当料液比为 1 g∶15 mL、乙醇体积分数为 70% 时，酶解时间的影响高于超声时间。

2.3.3　最优工艺条件的验证

根据响应面分析结果得到最优工艺条件为：料液比 1 g∶16.54 mL、乙醇体积分数 74.24%、超声时间 23.81 min、酶解时间 92.17 min，在此条件下，紫苏叶花色苷的质量分数为 254.62 mg/100 g。为了便于试验操作，将工艺参数调整为：料液比 1 g∶16 mL、乙醇体积分数 74%、超声时间 23 min、酶解时间 92 min，为了验证在此优化工艺条件下的提取率，分别进行 3 次平行试验，得到紫苏叶花



(a) 酶解时间与乙醇体积分数交互作用响应面图

(b) 酶解时间与料液比交互作用响应面图

(c) 乙醇体积分数与料液比交互作用响应面图

(d) 超声时间与料液比交互作用响应面图

(e) 超声时间与乙醇体积分数交互作用响应面图

(f) 酶解时间与超声时间交互作用响应面图

图 9　紫苏叶花色苷质量分数的三维响应面图

Fig. 9　Three-dimensional response surface plots of the mass fraction of perilla leaf anthocyanins

色苷的实际质量分数为 252.87 mg/100 g，与预测值接近，这验证了数据模型的合理性和可靠性，说明该模型具有良好的预测效果。

2.4　紫苏叶花色苷的抗氧化活性的研究结果

2.4.1　DPPH 自由基清除能力测定结果

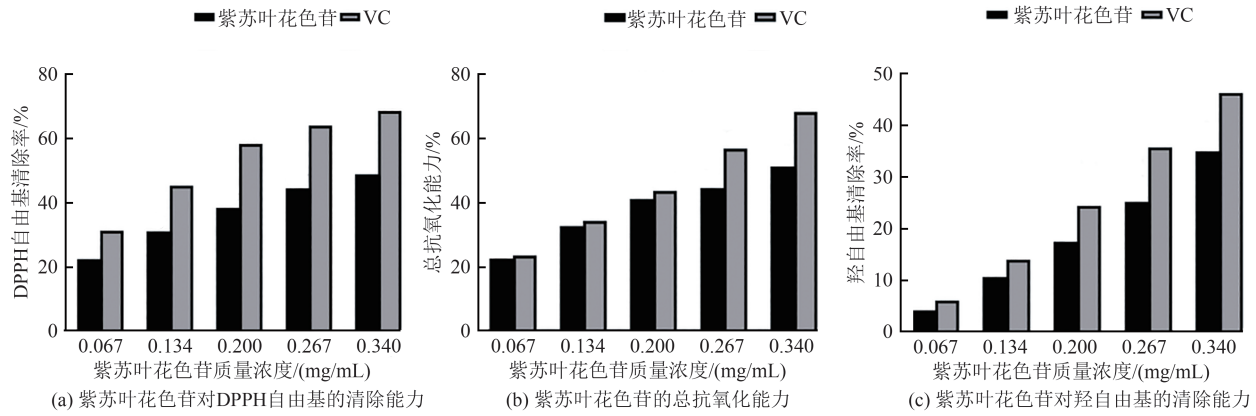
由图 10(a)可知，紫苏叶花色苷提取液和 VC（阳性对照）对 DPPH 自由基都有较好的清除效果，且随着质量浓度的增加，DPPH 自由基清除率也随之增加。当紫苏叶花色苷质量浓度为 0.067~0.340 mg/mL 时，由于紫苏叶花色苷的活性基团与 DPPH 自由基发生了更有效的反应，使其对 DPPH 自由基的清除能力显著增强。当紫苏叶花色苷

和 VC 质量浓度为 0.340 mg/mL 时，由于抗氧化剂与 DPPH 自由基的反应达到了饱和状态，其清除 DPPH 自由基的能力最强，DPPH 自由基清除率分别为 48.88% 和 68.61%。

由图 10（b）可知，当质量浓度为 0.067~0.340 mg/mL 时，紫苏叶花色苷抗氧化能力随质量浓度的增加而增加，但紫苏叶花色苷抗氧化能力低于相同质量浓度的 VC，这是由于紫苏叶花色苷分子虽然具有一定的供电子或供氢原子能力，但弱于 VC，因此两者与自由基等氧化剂发生反应的程度有差异。当紫苏叶花色苷和 VC 的质量浓度为 0.340 mg/mL 时，紫苏叶花色苷的总抗氧化能力最强，分别为 51.12% 和 68.11%。

2.4.2 羟自由基清除能力的测定结果

由图 10（c）可知，紫苏叶花色苷提取液和 VC 对羟自由基都有较好的清除效果，且随着质量浓度的增加，其羟自由基清除率也随之增加。当质量浓度为 0.067~0.340 mg/mL 时，随着抗氧化剂分子与自由基碰撞的增加，紫苏叶花色苷对羟自由基的清除能力增强。当紫苏叶花色苷和 VC 质量浓度为 0.340 mg/mL，清除羟自由基的能力都最强，分别为 34.99% 和 46.28%。



(a) 紫苏叶花色苷对DPPH自由基的清除能力　(b) 紫苏叶花色苷的总抗氧化能力　(c) 紫苏叶花色苷对羟自由基的清除能力

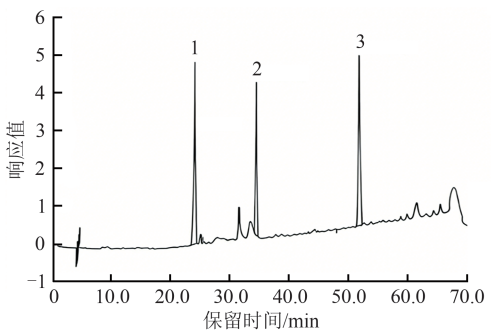
不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图 10 紫苏叶花色苷和 VC 的自由基清除能力

Fig. 10 Free radical scavenging activities of perilla leaf anthocyanins and VC

2.5 紫苏叶花色苷中酚类化合物的质量分数

基于没食子酸标准曲线计算可得，紫苏叶花色苷中酚类化合物的质量分数为 4.81 mg/g。采用 HPLC 技术对混合标准品及紫苏叶花色苷中的酚类化合物进行分离，对应的色谱分离图谱见图 11~12。结果表明，紫苏叶花色苷中含有的主要酚类化合物共 3 种：飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷（0.43±0.04）mg/g、矢车菊素（0.86±0.07）mg/g、芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷（1.41±0.03）mg/g。推测紫苏叶花色苷中酚类化合物质量分数可能与原料、贮存条件等因素有关，且同一品种不同批次紫苏叶花色苷的酚类化合物质量分数差别较小。



1—飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷；2—矢车菊素；3—芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷。

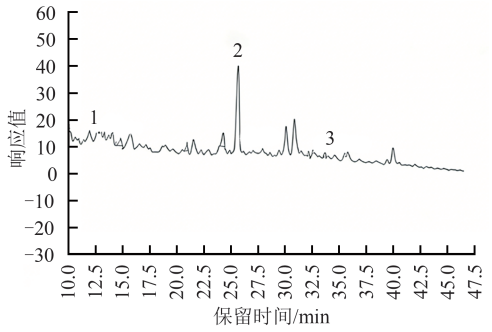
图 11 3 种酚类化合物标准化合物的 HPLC 图

Fig. 11 HPLC chromatogram of three standard phenols

2.6 从分子对接角度阐述紫苏叶花色苷的抗氧化活性

2.6.1 结合能测定结果

AutoDock Vina 对接计算得出，芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷与 KEAP1 蛋白质的结合能为−9.3 kJ/mol，芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷与 KEAP1 蛋白质的结合能也处于较低水平（结合能<−7.0 kJ/mol），表明芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷等主要紫苏叶花色苷单体能够高亲和力地嵌入 KEAP1 蛋白质的 Nrf2 结合口袋。



1—飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷；2—矢车菊素；3—芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷。

图 12　紫苏叶花色苷中酚类化合物的 HPLC 图

Fig. 12　HPLC chromatogram of phenols in perilla leaf anthocyanins

2.6.2　结合模式与关键相互作用

如图 13 所示，芍药花素-3，5-*O*-二葡萄糖苷的酚羟基与 KEAP1 的 Arg415、Arg483 等关键残基形成氢键，且由于其分子结构中部分葡萄糖苷的存在，还与周围氨基酸残基形成了更多的疏水相互作用，进一步稳定了结合构象。

2.6.3　可视化结果

通过 PyMOL 软件对分子对接结果进行可视化分析，芍药花素-3，5-*O*-二葡萄糖苷在 KEAP1 蛋白质活性口袋中的结合位置，以及氢键、π-π 堆积等相互作用的具体情况见图 14。

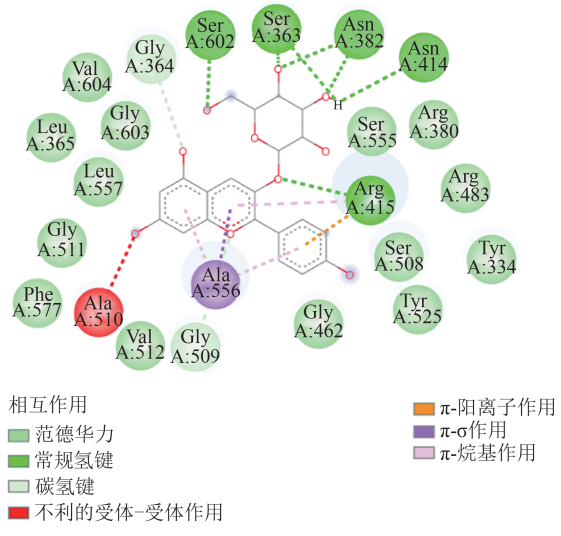


图 13　芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷与 KEAP1 蛋白质的分子相互作用示意图

Fig. 13　Schematic diagram of the molecular interaction between paeoniflorin-3,5-*O*-diglucoside and KEAP1 protein

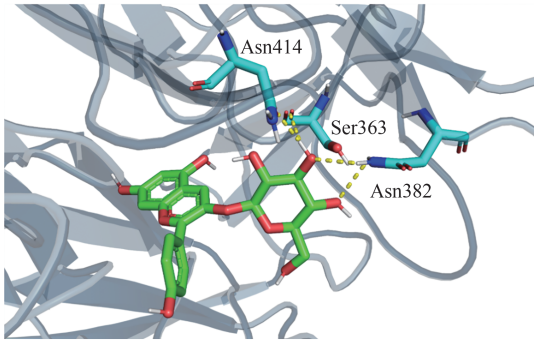


图 14　芍药花素-3,5-*O*-二葡萄糖苷与 KEAP1 蛋白质关键氨基酸残基的氢键相互作用三维示意图

Fig. 14　Three-dimensional schematic diagram of hydrogen bond interactions between paeoniflorin-3,5-*O*-diglucoside and key amino acid residues of KEAP1 protein

3　结论

本研究通过工艺优化确定了超声辅助双酶法提取紫苏叶花色苷的最佳条件，即料液比 1 g∶16 mL、乙醇体积分数 74%、超声时间 23 min、酶解时间 92 min。在此条件下，紫苏叶花色苷提取量可达 252.87 mg/100 g，较传统乙醇回流提取法（料液比 1 g∶20 mL、乙醇体积分数 60%，70 ℃提取 2 h）的提取量（213.05 mg/100 g）提升了约 18.7%，且该工艺具有环保低毒的优势，溶剂用量减少了 20%，符合绿色化学的应用原则。

抗氧化活性与作用机制研究结果表明，超声辅助双酶法提取的紫苏叶花色苷具备良好的 DPPH 自由基、羟自由基清除能力及总抗氧化能力。经检测分析，紫苏叶花色苷中酚类化合物总质量分数为 4.81 mg/g，主要包含 3 种单体成分，包括飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷（0.43±0.04）mg/g、矢车菊素（0.86±0.07）mg/g、芍药花素-3，5-*O*-二葡萄糖苷（1.41±0.03）mg/g，同一品种不同批次紫苏叶花色苷的酚类化合物水平差异较小，其水平波动可能与原料来源及贮存条件等相关。

分子对接结果进一步证实，芍药花素-3，5-*O*-二葡萄糖苷等主要紫苏叶花色苷单体可与 KEAP1 蛋白质的 Nrf2 结合口袋进行高亲和力结合，通过氢键与 π-π 堆积作用竞争性抑制 KEAP1 与 Nrf2 的结合，进而激活 Nrf2/ARE 通路，启动下游抗氧化酶基因转录表达。这揭示了紫苏叶花色苷的抗氧化活性源于直接清除自由基与激活内源性抗氧化通路的双重作用，为其在功能食品与医药领域的

开发应用提供了关键理论依据。

相较于传统提取技术，本研究将超声空化效应与双酶解技术协同应用，突破了单一提取方法效率低、溶剂消耗大的局限，实现了紫苏叶花色苷的高效绿色提取。但本研究仍存在不足：未对紫苏叶花色苷分子结构在不同pH、温度条件下的稳定性进行系统探究；酶解过程中细胞壁成分的降解机制及具体产物尚未明确；工艺的工业化放大生产参数仍需进一步验证。后续研究可围绕上述方向展开，重点优化紫苏叶花色苷的稳定化保存技术，解析酶解的分子作用路径，并通过中试试验验证工艺规模化的可行性，为紫苏叶花色苷的产业化应用提供更全面的技术支撑。

参考文献

[1] 孙江怡. 新疆紫苏叶花色苷的提取、生物活性及其在酸奶中的应用[D]. 阿拉尔：塔里木大学，2023.

[2] 龙勇益，卢全，邓世日，等. 紫苏叶花色苷的抗氧化活性及其模拟消化稳定性[J]. 食品研究与开发，2025，46(22)：24-29，43.
LONG Y Y，LU Q，DENG S R，et al. Determination of antioxidant activity and simulated digestive stability of anthocyanins from *Perilla frutescens* leaves [J]. Food Research and Development，2025，46(22)：24-29，43.（in Chinese）

[3] NITTA M，KOBAYASHI H，OHNISHI-KAMEYAMA M，et al. Essential oil variation of cultivated and wild perilla analyzed by GC/MS [J]. Biochemical Systematics and Ecology，2006，34(1)：25-37.

[4] GHAREAGHAJLOU N，HALLAJ-NEZHADI S，GHASEMPOUR Z. Nano-liposomal system based on lyophilization of monophase solution technique for encapsulating anthocyanin-rich extract from red cabbage [J]. Dyes and Pigments，2022，202：110263.

[5] 茹巧美，任国平，胡琼. 聚乙二醇提取紫苏叶花色苷工艺优化及抗氧化活性[J]. 食品科技，2020，45(10)：220-228.
RU Q M，REN G P，HU Q. Optimization of extraction for anthocyanins from perilla leaves by polyethylene glycol and its antioxidant activity [J]. Food Science and Technology，2020，45(10)：220-228.（in Chinese）

[6] 于海鑫，张秀玲，高诗涵，等. 紫苏叶花色苷微波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业，2019，40(10)：51-55.
YU H X，ZHANG X L，GAO S H，et al. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanin from peril a leaves and its antioxidant activity[J]. The Food Industry，2019，40(10)：51-55.（in Chinese）

[7] ALIAÑO GONZÁLEZ M J，CARRERA C，BARBERO G F，et al. A comparison study between ultrasound-assisted and enzyme-assisted extraction of anthocyanins from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.)[J]. Food Chemistry：X，2022，13：100192.

[8] 孙建霞，梅洲雄，白卫滨，等. 超声空化效应对食品品质影响研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(4)：337-342.
SUN J X，MEI Z X，BAI W B，et al. Research progress on the effects of ultrasonic cavitation on food quality [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2017，36(4)：337-342.（in Chinese）

[9] 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.（in Chinese）

[10] 唐鹏程，王雪亭，尚文文，等. 双酶法辅助提取百香果原花青素及其抗氧化性研究[J]. 农产品加工，2023(21)：22-26，30.
TANG P C，WANG X T，SHANG W W，et al. Dual enzyme assisted extraction of proanthocyanidins from passion fruit and their antioxidant properties [J]. Farm Products Processing，2023(21)：22-26，30.（in Chinese）

[11] 邱卫华，于晓慧. 响应面法优化紫苏叶中花色苷与多酚的同步高效提取工艺[J]. 现代食品，2024，30(21)：155-162.
QIU W H，YU X H. Optimization of synchronous and high-efficient extraction process of anthocyanins and polyphenols from perilla leaves using response surface methodology[J]. Modern Food，2024，30(21)：155-162.（in Chinese）

[12] 于海鑫. 紫苏主要成分分析及紫苏粉的研制[D]. 哈尔滨：东北农业大学，2019.

[13] 曹娅，张金龙，王强. 紫苏活性成分及其生物功能的研究进展[J]. 中国食物与营养，2021，27(8)：42-49.
CAO Y，ZHANG J L，WANG Q. Research advancement on bioactive constituents and physiological function of *Perilla frutescens* [J]. Food and Nutrition in China，2021，27(8)：42-49.（in Chinese）

[14] 崔丽霞. 紫苏花色苷提取纯化及其微胶囊化研究[D]. 太原：中北大学，2018.

[15] CAO L，PARK Y，LEE S. Extraction，identification，and health benefits of anthocyanins in blackcurrants[J]. Applied Sciences，2021，11(4)：1863-1863.

[16] 李楠，曾永明，王国振，等. 超声辅助酶法提取薰衣草花色苷及其热降解动力学[J]. 食品工业科技，2020，41(1)：150-157.
LI N，ZENG Y M，WANG G Z，et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and thermal degradation kinetics of anthocyanins from lavender[J]. Science and Technology of Food Industry，2020，41(1)：150-157.（in Chinese）