doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.06.016

响应曲面法优选紫苏叶中迷迭香酸超声提取工艺

刘根才，华　杰

（浙江维康药业股份有限公司，浙江 丽水　323000）

摘要：目的　优选紫苏叶中迷迭香酸的超声提取工艺。**方法**　在单因素试验基础上，以乙醇体积分数、料液比、超声时间为影响因素，以迷迭香酸提取率为考察指标，采用响应曲面法优选紫苏叶中迷迭香酸的最优提取工艺。**结果**　紫苏叶中迷迭香酸的最优提取工艺为，在料液比（g / mL）为 1∶9 时，以 39% 乙醇超声提取 63 min。在此工艺条件下，迷迭香酸提取率为 0.61%，与理论值 0.62% 的 *RSD* 为 1.61%。**结论**　优选的紫苏叶中迷迭香酸最佳提取工艺，所得条件参数准确可靠，具有可行性和实用性。

关键词：响应曲面法；超声提取；紫苏叶；迷迭香酸；提取工艺

中图分类号：R932；TQ460.6　　**文献标志码：A**　　**文章编号：1006 - 4931（2022）06 - 0065 - 04**

Optimization of Extraction Process of Rosmarinic Acid from Perillae Folium by Response Surface Methodology

LIU Gencai, HUA Jie

（Zhejiang Wecome Pharmaceutical Co., Ltd., Lishui, Zhejiang, China　323000）

Abstract: Objective　To optimize the ultrasonic extraction process of rosmarinic acid from Perillae Folium. **Methods**　On the basis of single factor test, the response surface methodology was used to optimize the extraction process of rosmarinic acid from Perillae Folium with the extraction rate of rosmarinic acid as the investigation index and the volume fraction of ethanol, material - to - liquid ratio and ultrasonic time as the influencing factors. **Results**　The optimal extraction process of rosmarinic acid from Perillae Folium was as follows: when the material - to - liquid ratio（g / mL）was 1∶9, the rosmarinic acid was extracted with 39% ethanol for 63 min. Under these conditions, the extraction rate of rosmarinic acid was 0.61%, and *RSD* compared with the theoretical value（0.62%）was 1.61%. **Conclusion**　The optimal extraction process of rosmarinic acid from Perillae Folium is optimized by the response surface methodology, and the condition parameters are accurate and reliable, which are feasible and practical.

Key words: response surface methodology; ultrasonic extraction; Perillae Folium; rosmarinic acid; extraction process

紫苏 *Perilla frutescens*（L.）Britt. 属薄荷属唇形科植物，广泛分布于中国、日本、韩国、印度及部分东南亚国家[1]。我国有 2 000 多年的紫苏栽培历史，是栽种面积和年出口量最大的国家[2]。紫苏的叶、茎和果实均能入药，是卫生部“第一批药食同源的 60 种作物”之一[3]。紫苏叶具有解表散寒、行气和胃功效，可用于治疗风寒感冒、咳嗽呕恶、妊娠呕吐、鱼蟹中毒等症[4]。紫苏叶中含有多种生物活性成分，包括挥发油类、黄酮类、酚酸类等，迷迭香酸在酚酸类成分中含量最高[5 - 6]，具有抗炎、抑菌、抗抑郁、抗肿瘤等作用[7]。迷迭香酸的提取方法较多，包括微波提取、超声提取、热水浸提、有机溶剂提取、回流提取等[8 - 12]。响应曲面法能准确表达考察指标与单因素之间的关系，可快速得出多因素影响的最优工艺条件。本研究中采用响应曲面法优选迷迭香酸的超声提取工艺。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

1200 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；ME303 型电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；KQ - 500DB 型超声清洗机（昆山市超声仪器有限公司）；DFY - 600 型摇摆式高速万能粉碎机（永康式速锋工贸有限公司）；循环水式多用真空泵（巩义市英峪予华仪器厂）；T - 1000 型电子秤（上海浦春计量仪器有限公司）；酒精计（河北省武强县滏阳仪表厂）。

1.2　试药

迷迭香酸对照品（中国食品药品检定研究院，批号为 111871 - 201706，含量 90.5%）；甲醇、磷酸均为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为纯化水。紫苏叶（浙江惠松制药有限公司，批号为 200930）。

2　方法与结果

2.1　含量测定

2.1.1　色谱条件[13 - 14]

色谱柱：Agilent SB - C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液（40∶60，*V* / *V*）；流速：1.0 mL / min；检测波长：330 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.1.2　溶液制备

取迷迭香酸对照品 10.0 mg，精密称定，置 10 mL 棕

第一作者：刘根才，男，大学本科，高级工程师，研究方向为药学，（电子信箱）327517147@qq.com。

色容量瓶中，用甲醇超声（功率500 W，频率40 kHz，下同）提取30 min，放冷，加甲醇定容，摇匀，即得质量浓度为1.0 mg/mL的对照品溶液。取药材样品粉末（过80目筛）5.00 g，精密称定，置带塞锥形瓶中，用乙醇超声提取，放冷，摇匀，经0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.1.3 *方法学考察*

线性关系考察：分别精密量取对照品溶液，倍比稀释，制成质量浓度分别为0.015 6，0.031 3，0.062 5，0.125，0.25 mg/mL的系列对照品溶液。各精密量取10 μL，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以迷迭香酸质量浓度（X，mg/mL）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y = 95\ 544X + 391.66$（$R^2 = 0.998\ 9$，$n = 5$）。结果表明，迷迭香酸质量浓度在0.015 6～0.25 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限考察：分别精密量取2.1.2项下对照品溶液适量，倍比稀释，并按2.1.1项下色谱条件进样测定，以信噪比10∶1和3∶1时的质量浓度作为检测限和定量限。结果迷迭香酸的检测限和定量限分别为0.001 4 mg/mL和0.004 8 mg/mL。

精密度试验：取2.1.2项下对照品溶液适量，按2.1.1项下色谱条件连续测定3 d（每天连续2次）及1 d内连续进样测定6次，记录峰面积。结果日间和日内精密度试验中迷迭香酸峰面积的*RSD*分别为1.56%（$n = 3$）和0.49%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取供试品溶液适量，分别于室温下放置0，1，2，4，8 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果迷迭香酸峰面积的*RSD*为0.92%（$n = 5$），表明供试品溶液在室温放置8 h内基本稳定。

重复性试验：取药材样品粉末适量，精密称定，共5份，按2.1.2项下方法制备供试品溶液，再按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果迷迭香酸峰面积的*RSD*为1.22%（$n = 5$），表明方法重复性良好。

2.2 提取率计算

按公式[提取率（%）= $c \times n \times V / M \times 100\%$]计算迷迭香酸的提取率[15]。式中，$c$为迷迭香酸质量浓度（mg/mL），$n$为滤液稀释倍数，$V$为滤液体积（mL），$M$为药材样品粉末质量（g）。

2.3 单因素试验

乙醇体积分数：当超声60 min、料液比为1∶10、乙醇体积分数为30%～40%时，迷迭香酸的提取率呈上升趋势，在40%乙醇时出现最大值，其后呈先下降后上升趋势，但均未超过最大值（见图1）。故以40%乙醇进行后续试验。

料液比：以40%乙醇超声60 min、料液比为1∶5～1∶10时，迷迭香酸的提取率呈上升趋势，并在1∶10时出现最大值，其后呈下降趋势（见图2）。故以料液比1∶10进行后续试验。

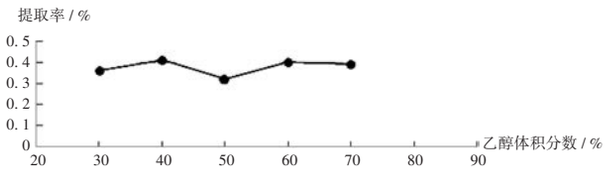


图1 乙醇体积分数对迷迭香酸提取率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol volume fraction on extraction rate of rosmarinic acid

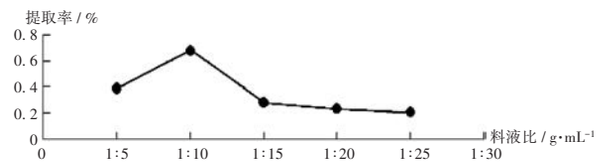


图2 料液比对迷迭香酸提取率的影响

Fig. 2 Effect of material－to－liquid ratio on extraction rate of rosmarinic acid

超声时间：乙醇体积分数为40%、料液比为1∶10、超声时间为15～60 min时，迷迭香酸提取率呈缓慢上升趋势，并在60 min时出现最大值，其后呈下降趋势（见图3）。故以超声时间60 min进行后续试验。

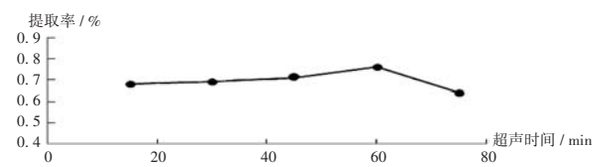


图3 超声时间对迷迭香酸提取率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic time on extraction rate of rosmarinic acid

2.4 响应曲面优化试验

2.4.1 *响应曲面模型的建立和显著性检验*

依据Box－Behnken响应曲面法，在单因素试验基础上，以迷迭香酸提取率为响应值，以乙醇体积分数（因素A）、料液比（因素B）、超声时间（因素C）为考察因素，采用Design Expert 8.0软件设计三因素三水平的响应曲面试验。因素与水平见表1，试验设计见表2。

表1 因素与水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素A（%）	因素B（g/mL）	因素C（min）
－1	30	1∶5	45
0	40	1∶10	60
1	50	1∶15	75

由表2可知，17个试验点中12个为分析原因点，其余5个为中心点，用来估计试验误差。以Design Expert 8.0软件进行回归分析，进行多元回归拟合，得到迷迭香酸提取率（Y）对因素A、因素B、因素C的二次多项回归方程：$Y = 0.62 - 5.625 \times 10^{-3} A - 0.019 B + 0.019 C - 6.5 \times 10^{-3} AB - 0.027 AC + 2.25 \times 10^{-3} BC - 0.062 A^2 -$

表 2 试验设计

Tab. 2 Design of the test

试验号	A	B	C	提取率(%)	试验号	A	B	C	提取率(%)
1	0	1	-1	0.47	10	-1	0	-1	0.48
2	1	-1	0	0.52	11	-1	1	0	0.48
3	1	0	-1	0.51	12	0	0	0	0.62
4	0	1	1	0.51	13	0	0	0	0.62
5	1	1	0	0.47	14	0	-1	-1	0.51
6	-1	-1	0	0.50	15	0	0	0	0.60
7	1	0	1	0.48	16	-1	0	1	0.56
8	0	0	0	0.64	17	0	0	0	0.61
9	0	-1	1	0.55					

表 3 方差分析结果

Tab. 3 ANOVA results

方差来源	离差平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值
模型	0.055 00	9	0.006 26	34.56	< 0.000 1
A	0.000 25	1	0.000 25	1.42	0.272 4
B	0.002 78	1	0.002 78	15.56	0.005 6
C	0.002 74	1	0.002 74	15.35	0.005 8
AB	0.000 29	1	0.000 29	0.95	0.362 8
AC	0.002 86	1	0.002 86	16.05	0.005 2
BC	0.000 02	1	0.000 02	0.11	0.746 0
A^2	0.016 00	1	0.016 00	91.92	< 0.000 1
B^2	0.016 00	1	0.016 00	88.99	< 0.000 1
C^2	0.009 56	1	0.009 56	53.60	0.000 2
残差	0.001 25	7	0.000 18		
失拟项	0.000 55	3	0.000 18	1.05	0.462 5
纯误差	0.000 70	4	0.000 17		
总变异	0.057 00	16			
相关系数	$R^2_{adj} = 0.949\ 7$	0.825 7			

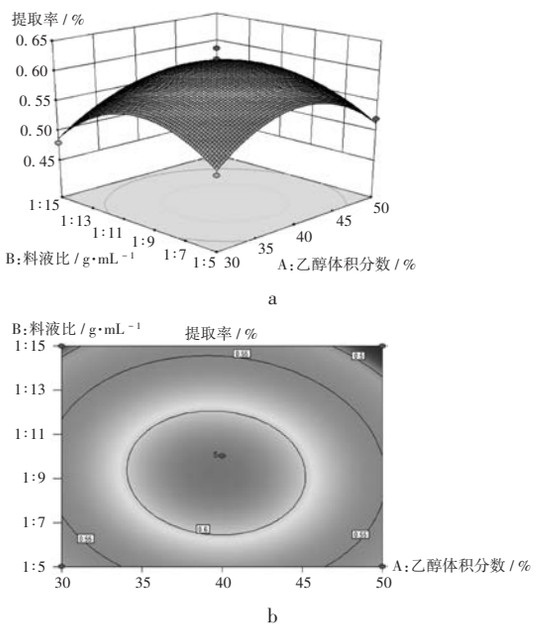
0.061 B^2 - 0.048 C^2。对表 2 所得回归模型进行方差分析，结果见表 3。

由表 3 可知，模型的 $P < 0.000\ 1$，说明所得二次多项模型有极显著性；失拟项 $P = 0.462\ 5 > 0.05$，说明失拟项无显著性；模型的 $R^2_{adj} = 0.949\ 7$，说明拟合程度好，试验方法可靠，该模型可用于紫苏叶中迷迭香酸提取工艺条件的预测和分析。由回归模型中各项 *P* 值可知，一次项 B 和 C 对迷迭香酸的提取率有极显著影响，A 无显著影响；交互项 AC 对迷迭香酸的提取率影响极显著，AB、BC 无显著影响；二次项 A^2，B^2，C^2 对迷迭香酸的提取率影响极显著。由回归模型单因素 *F* 值可知，对迷迭香酸提取率影响由大至小为 B > C > A。结合回归模型各因素 *P* 值和 *F* 值可知，以迷迭香酸提取率为响应值时，各因素影响大小顺序为 B > C > A。

2.4.2 响应面分析

利用 Design Expert 8.0 软件对表 3 的数据进行二项多次回归拟合，建立响应曲面，比较 2 个因素交互作用对迷迭香酸提取率的影响。

当超声 60 min，乙醇体积分数≤30% 时，迷迭香酸提取率随料液比的增大先增加后减小，在料液比约为 1∶10 和乙醇体积分数约为 40% 时出现最大值，且料液比对提取率的影响大于乙醇体积分数。详见图 4。



a. 响应曲面图 b. 等高线图

图 4 料液比和乙醇体积分数对迷迭香酸提取率的影响

a. Response surface plot b. Contour plot

Fig. 4 Effects of material - to - liquid ratio and ethanol volume fraction on the extraction rate of rosmarinic acid

当料液比为 1∶10 时，随着乙醇体积分数和超声时间的增加，迷迭香酸提取率逐渐增加，在乙醇体积分数约为 40% 和超声约 60 min 时出现最大值，且超声时间对提取率的影响大于乙醇体积分数。详见图 5。

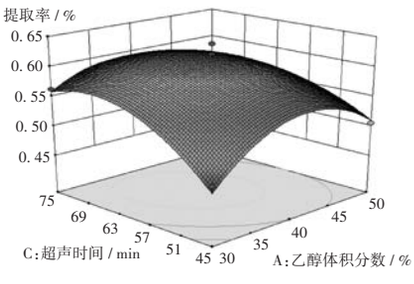
当乙醇体积分数为 40%，料液比较小时，超声时间在 15 ~ 60 min 间增加时，迷迭香酸提取率呈上升趋势，约在 60 min 时出现最大值，且料液比对提取率的影响大于超声时间。详见图 6。

2.4.3 验证试验

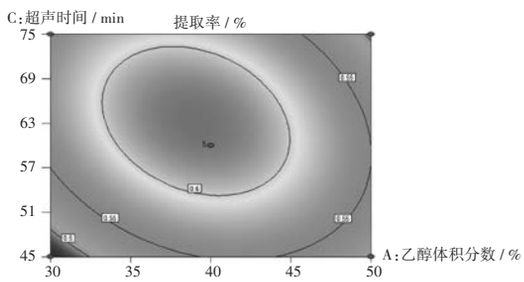
响应面分析得到迷迭香酸提取的最优条件为，39.16% 乙醇超声 63.21 min，料液比为 1∶9.28，迷迭香酸提取率达 0.62%。考虑到试验的可行性，将最优条件修正为 39% 乙醇超声 63 min，料液比为 1∶9。在修正条件下，取药材样品粉末，精密称定，进行 3 次平行试验，得到迷迭香酸的实际平均提取率为 0.61%，*RSD* 为 1.61%，与理论值比较误差为 0.009%。

3 讨论

紫苏叶的药食用价值均较高，所含迷迭香酸生物活性广泛，其药理作用和来源的天然性在保障人体健康方面潜力较大，是天然的抗氧化剂。且迷迭香酸性质



a



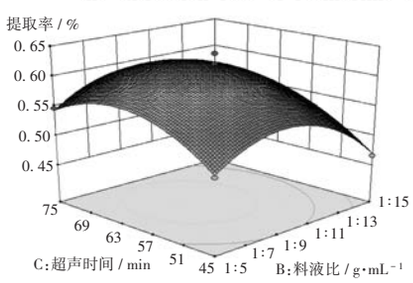
b

a. 响应曲面图　b. 等高线图

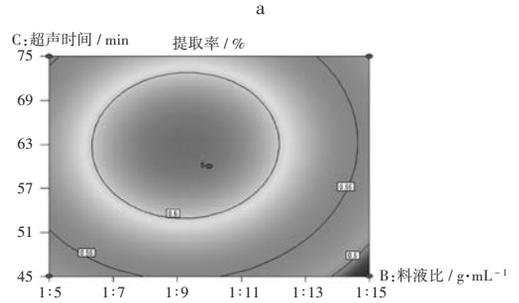
图 5　乙醇体积分数和超声时间对迷迭香酸提取率的影响

a. Response surface plot　b. Contour plot

Fig. 5　Effects of ethanol volume fraction and ultrasonic time on the extraction rate of rosmarinic acid



a



b

a. 响应曲面图　b. 等高线图

图 6　料液比和超声时间对迷迭香酸提取率的影响

a. Response surface plot　b. Contour plot

Fig. 6　Effects of material - to - liquid ratio and ultrasonic time on the extraction rate of rosmarinic acid

稳定，不易分解，克服了目前市面上许多抗氧化剂性质不稳定的问题，在抗氧化领域应用前景良好。响应曲面法是目前活性成分提取、分离运用较多的方法，操作简便，所得数据准确，具有代表性。本试验中在单因素试验基础上，采用响应曲面法对紫苏叶中迷迭香酸的超声提取工艺进行了优化，得到最优条件为乙醇体积分数 39%，超声时间 63 min，料液比 1∶9。在此条件下，迷迭香酸的提取率理论值为 0. 62%，实际值为 0. 61%，两者相对误差较小，证明采用响应曲面法得到的超声提取紫苏叶中迷迭香酸的最优工艺条件较准确，有实用价值。

参考文献

[1] 周勤梅，朱德伟，罗孟兰，等. 紫苏属植物的化学成分及其生物活性研究进展[J]. 中华中医药学刊，2019，37(8)：1826 - 1831.

[2] 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.

[3] 沈　奇，张　栋，孙　伟，等. 药用植物 DNA 标记辅助育种(Ⅱ)丰产紫苏新品种 SNP 辅助鉴定及育种研究[J]. 中国中药杂志，2017，42(9)：1668 - 1672.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：354.

[5] 艾鑫卫，胡思平，龚姮姮，等. HPLC - MS / MS 法测定紫苏中酚类物质在各生长期的含量[J]. 食品科学，2016，37(18)：126 - 132.

[6] ASSEFA AD，JEONG YJ，KIM DJ，et al. Characterization，identification，and quantification of phenolic compounds using UPLC - Q - TOF - MS and evaluation of antioxidant activity of 73 Perilla frutescens accessions[J]. Food Research International，2018，111(9)：153 - 167.

[7] 曹　雯，张文娟，潘金凤，等. 迷迭香酸药理作用的研究进展[J]. 广西中医药，2019，42(1)：54 - 58.

[8] 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.

[9] 薛　姣. 紫苏迷迭香酸提取工艺及其应用研究[D]. 太原：中北大学，2016.

[10] 丁丽敏，刘茜茜，苏超男，等. 不同药材中迷迭香酸甲酯及迷迭香酸的含量测定[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版)，2019，32(2)：124 - 128.

[11] 屈亮亮，段凯莉，吴延妮，等. 迷迭香中迷迭香酸、鼠尾草酸和熊果酸的联合提取[J]. 食品工业科技，2019，40(9)：208 - 212.

[12] LIU YS，XU XP，TANG H，et al. Rosmarinic acid inhibits cell proliferation，migration，and invasion and induces apoptosis in human glioma cells [J]. International Journal of Molecular Medicine，2021，47(5)：67.

[13] 蓝伦礼，范庆红，曹　骋，等. 傣药肾茶的迷迭香酸和咖啡酸含量测定及指纹图谱研究[J]. 中华中医药杂志，2017，32(6)：2740 - 2745.

[14] 王胜升，刘佳陇，李　虹. 不同采收期紫苏梗中迷迭香酸的含量测定[J]. 现代农业科技，2019(7)：196 - 197.

[15] 龙　添，楼一层，张　浩. 响应曲面法优化夏枯草中迷迭香酸的超声提取工艺[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2016，44(7)：209 - 214.

(收稿日期：2021 - 04 - 26；修回日期：2021 - 08 - 07)