

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.06.023

赵茜, 邹素兰. HPLC 法测定紫苏不同来源不同部位中迷迭香酸的含量[J]. 广西植物, 2014, 34(6):865—868

Zhao Q, Zou SL. Determination of rosmarinic acid in different populations and parts of *Perilla frutescens* by HPLC[J]. Guihaia, 2014, 34(6):865—868

HPLC 法测定紫苏不同来源不同部位中迷迭香酸的含量

赵茜^{1*}, 邹素兰²

(1. 常州卫生高等职业技术学校, 江苏 常州 213000; 2. 常州市第一人民医院药剂科, 江苏 常州 213003)

摘要: 采用 HPLC 法测定 14 种不同来源紫苏不同部位的迷迭香酸的含量, 并进行统计与聚类分析。结果表明: 14 种来源紫苏间叶、果穗、茎及根中迷迭香酸含量均有显著差异 ($P < 0.05$), 同一来源不同部位间迷迭香酸含量也存在显著差异 ($P < 0.05$)。各种来源紫苏叶中的迷迭香酸含量均最高; 大部分来源紫苏果穗中迷迭香酸的含量较紫苏茎高。14 份材料经聚类分析可分成 4 个类群。研究结果表明紫苏果穗可能是潜在的新药源, 来源于长江中下游紫苏不同部位的迷迭香酸含量要比西南地区的高。

关键词: 紫苏; 迷迭香酸; 不同来源不同部位; HPLC; 聚类分析

中图分类号: Q946; R284.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)06-0865-04

Determination of rosmarinic acid in different populations and parts of *Perilla frutescens* by HPLC

ZHAO Qian^{1*}, ZOU Su-Lan²

(1. Changzhou Health College, Changzhou 213000, China; 2. The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China)

Abstract: Rosmarinic acid of 14 different populations and parts of *Perilla frutescens* was determined by HPLC method, and all data will be analysed and discussed, then cluster analysis were performed too. The results showed that the content of rosmarinic acid in leaves, ears, stems and roots between 14 kinds of *P. frutescens* were significantly different ($P < 0.05$), the rosmarinic acid content in different parts among the same population also had significant differences ($P < 0.05$). The contents of rosmarinic acid in leaves from various sources were the highest. The content of rosmarinic acid in ears were higher than in stems in most of the collected populations. 14 copies of *P. frutescens* materials could be divided into 4 groups by the cluster analysis. The manuscript displayed that the ears of *P. frutescens* would be a potential new drug source. The content of rosmarinic acid in *P. frutescens* materials from the middle and lower reaches of the yangtze river were higher than those from southwest regions.

Key words: *Perilla frutescens*; rosmarinic acid; different populations and parts; HPLC; cluster analysis

紫苏 (*Perilla frutescens*) 是一年生草本植物, 为唇形科紫苏属, 有 1 种 3 变种, 分别为原变种 (*Perilla frutescens* var. *frutescens*); 野生紫苏 (*Perilla frutescens* var. *acuta*); 耳齿变种 (*Perilla frutescens* var. *auriculato-dentata*); 回回苏 (*Perilla frutes-*

cens var. *crispa*) (中国植物志编委会, 1977; Park et al., 2010)。紫苏适应性很强, 对土壤要求不严, 全国均有分布, 其叶片、果实、茎秆等均可入药, 分别称紫苏叶 (folium perillae)、紫苏子 (fructus perillae) 和紫苏梗 (caulis perillae) (国家药典委员会, 2010)。

收稿日期: 2014-01-26 修回日期: 2014-03-05

基金项目: 校药理学项目 (CW201406)

作者简介: 赵茜 (1962-), 女, 浙江杭州人, 副教授, 主要从事天然药物化学和药理学研究, (E-mail) zq123126@sina.com。

* 通讯作者

迷迭香酸是广泛存在于唇形科植物中的一种酚酸类化合物(Su *et al.*, 2008),具有抗病毒(Kim *et al.*, 1999; William *et al.*, 2001)、抗炎症(Takoo *et al.*, 2003)、抗菌(Sun *et al.*, 2005)、抗氧化(Erkan *et al.*, 2008)、抗血栓和血小板凝集(Zou *et al.*, 1993)等活性。中国药典规定的紫苏子与紫苏梗的指标成分是迷迭香酸, Huang *et al.* (2010)的研究表明不同炮制方法下紫苏子中迷迭香酸的含量差异较大; Aritomi *et al.* (1985)研究表明紫苏叶中含有迷迭香酸, Huang *et al.* (2012)研究表明不同品种、不同采收期对紫苏叶中迷迭香酸的含量影响较大。此外借助电子鼻和电子舌的分析认为,不同栽培类型紫苏间的感官指标也存在较大差异(Laureati *et al.*, 2010)。然而针对不同来源紫苏不同部位中迷迭香酸含量的比较研究尚未见有报道。本文对 14 种来源不同的紫苏中迷迭香酸含量进行研究,以期对紫苏药材质量标准的制定和非传统入药部位的利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

紫苏种质资源 14 份(除白苏的叶片两面全绿外,其余 13 份材料的叶片均为面青背紫或两面皆紫,但在叶片颜色深浅和形状上有较大异),搜集于 2010 年秋冬季节,经鉴定均为唇形科(Lamiaceae)紫苏属(*Perilla*)植物紫苏的原变种(*P. frutescens* var. *frutescens*)。2011 年春季将收集的种子统一播种,夏季采收紫苏的嫩枝叶阴干即为紫苏叶,秋季果实成熟时拔取全株植物,阴干后脱去种子,于暗处干燥保存,临用前粉碎过 100 目筛。

1.2 迷迭香酸的提取与含量测定

参照 Huang *et al.* (2012)的提取方法进行:样品粉末 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 80%甲醇 50 mL,密塞,称重,超声(100 W, 40 kHz, 25 °C)45 min,放冷,再称重,用 80%甲醇补足减少的重量,摇匀,0.2 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

测定条件按照 Huang *et al.* (2010, 2012)的方法,稍有改动,即 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪,采用 ZOBAX SB-C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m),流动相为甲醇-1%磷酸(39 : 61),流速 1.0 mL/min,柱温 25 °C,检测波长 330 nm。以迷迭香酸(批号 111871-201203)标准品来计算各样品中迷

迭香酸含量。

1.3 数据处理

应用 STAT 软件进行方差分析,聚类分析采用软件 SPSS17.0 进行。

2 结果与分 析

2.1 不同来源紫苏迷迭香酸含量比较

14 种不同来源不同部位紫苏中迷迭香酸含量测定结果见表 1。其中,叶中迷迭香酸含量最高的来源于浙江临安,为(4.22 $\pm$ 0.06)mg/g,最低的来源于云南楚雄,为(1.25 $\pm$ 0.04)mg/g;果穗中含量最高的来源于福建武夷,为(2.77 $\pm$ 0.08)mg/g,最低的来源于贵州贵阳,为(0.13 $\pm$ 0.06)mg/g;梗中最高的来源于江苏姜堰,为(1.37 $\pm$ 0.05)mg/g,最低的来源于云南楚雄,为(0.12 $\pm$ 0.04)mg/g;根中最高的来源于浙江临安,为(1.49 $\pm$ 0.06)mg/g,最低的来源于广西南宁,为(0.02 $\pm$ 0.01)mg/g。

由表 1 还可知,不同来源紫苏材料的不同部位迷迭香酸含量均为叶中最高($P < 0.05$),事实上,除迷迭香酸外紫苏叶中还含有一定量的咖啡酸(Park *et al.*, 2010)。譬如常用中药材夏枯草(*Prunella vulgaris*)的入药部位就是其果穗(国家药典委员会, 2010),而规定该药材的指标测定成分也是迷迭香酸。本研究中除江西赣州、浙江临安、贵州贵阳三种来源外,其余包括白苏在内的各紫苏材料果穗中的迷迭香酸含量均比茎要高,说明如果从提高药用植物使用效率的角度考虑,果穗也是提取迷迭香酸很好的材料,有较高的潜在应用价值。中国药典(国家药典委员会, 2010)对紫苏梗中迷迭香酸的最低含量要求为 0.1%,即应大于 1 mg/g,本研究中有 6 种紫苏茎中迷迭香酸含量达到此要求,可以作为紫苏梗药材使用。另来源于浙江临安和江苏泰兴的两种材料,其根中的迷迭香酸含量也比茎中要高,具体原因还有待深入研究。本研究中大部分来源紫苏根中没有检得较高含量的迷迭香酸,但这并不代表紫苏根没有利用价值,或许根中会含有其它一些活性成分,例如有研究者就在同科植物东紫苏根中就分离得到了其它 5 种酚性成分(Hu *et al.*, 2007),至于紫苏根中是否也含有较高含量的其他活性成分还有待进一步研究。

2.2 紫苏迷迭香酸含量的方差分析

方差分析如表 2 所示,结果表明不同来源紫苏

表 1 不同来源紫苏不同部位中迷迭香酸含量

Table 1 Contents of rosmarinic acid in different populations and parts of *Perilla frutescens*

编号 No.	来源 Population	部位 Part (mg/g)			
		叶 Leaf	果穗 Ear	茎 Stem	根 Root
1	江苏姜堰 Jiangyan,Jiangsu	4.19±0.04Ab	1.81±0.06Bb	1.37±0.05Ca	0.77±0.04Dc
2	四川自贡 Zigong,Sichuan	1.91±0.03Ai	0.43±0.01Cg	0.52±0.04Bd	0.24±0.03Dd
3	湖南常德 Changde,Hunan	3.61±0.03Ad	1.14±0.05Bd	1.04±0.04Cc	0.75±0.04Dc
4	江西赣州 Ganzhou,Jiangxi	3.74±0.05Ac	1.03±0.04Be	1.08±0.06Bc	0.15±0.07Cef
5	浙江临安 Linan,Zhejiang	4.22±0.06Ab	0.70±0.06Df	1.18±0.06Cb	1.49±0.06Bb
6	广西桂林 Guilin,Guangxi	1.69±0.06Aj	0.30±0.06Bh	0.22±0.05Bfg	0.10±0.05Cf
7	江苏泰兴 Taixing,Jiangsu	3.46±0.04Ae	1.32±0.04Cc	1.17±0.05Db	1.75±0.04Ba
8	广西南宁 Nanning,Guangxi	1.02±0.06Al	0.43±0.06Bg	0.37±0.04Be	0.02±0.01Cg
9	安徽霍山 Huoshan,Anhui	3.29±0.07Af	1.20±0.04Bd	0.40±0.05Ce	0.15±0.05Def
10	云南楚雄 Chuxiong,Yunnan	1.25±0.04Ak	0.26±0.05Bh	0.12±0.04Ch	0.12±0.03Cef
11	白苏 Baisu	2.32±0.04Ah	0.25±0.05Bh	0.22±0.05Bfg	0.19±0.05Bde
12	贵州贵阳 Guiyang,Guizhou	2.52±0.07Ag	0.13±0.06Ci	0.25±0.05Bf	0.24±0.05Bd
13	福建武夷 Wuyi,Fujian	4.68±0.06Aa	2.77±0.08Ba	1.31±0.05Ca	0.15±0.04Def
14	广西南宁 Nanning,Guangxi	1.66±0.07Aj	0.32±0.06Bh	0.15±0.05Cgh	0.12±0.05Cef

注：大写字母代表同一行中同一来源不同部位间迷迭香酸含量差异显著($P<0.05$),小写字母代表同一列中不同来源群同一部位间迷迭香酸含量差异显著($P<0.05$)。

Note: Capital letters mean significant differences ($P<0.05$) of content of rosmarinic acid in the same population and different parts of the same row. Small letters mean significant differences ($P<0.05$) of content of rosmarinic acid in the different population and same parts of the same column.

表 2 不同来源紫苏不同部位中迷迭香酸含量的方差分析

Table 2 Analysis of variance of the contents of rosmarinic acid of different populations and parts of *Perilla frutescens*

部位 Part	F 值 F value	平均值 Mean	变异系数 Coefficients of variation (%)	变幅 Range
叶 Leaf	1643.63**	2.81±0.02a	0.71	1.02~4.68
果穗 Ear	625.91**	0.86±0.05b	5.71	0.13~2.77
茎 Stem	350.40**	0.67±0.04c	5.52	0.12~1.37
根 Root	490.80**	0.45±0.04d	8.27	0.02~1.75

注：* * 表示在 $P<0.01$ 水平上的显著性；不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上的显著性。

Note: * * Double asterisks mean extremely significant differences ($P<0.01$); Different letters mean significant differences ($P<0.05$).

的叶、果穗、茎和根中的迷迭香酸含量在 0.01 的水平上差异均极显著。其中在叶中迷迭香酸含量最高,平均为(2.81±0.02)mg/g,变幅为 1.02~4.68 mg/g,最高值与最低值相差 4.59 倍,变异系数为 0.71;根中含量最低,平均为(0.45±0.04)mg/g,变幅为 0.02~1.75 mg/g,最高值与最低值相差 87.50 倍,变异系数为 8.27;果穗和茎中含量居中,最高值与最低值相差分别为 21.31 和 11.42 倍,变异系数分别为 5.72 和 5.52。

2.3 聚类分析

本研究利用系统聚类法进行了分析(图 1),从图 1 看出,14 个不同来源的紫苏可以分为 4 个类群,类群 1 与其他三个类群相距较远,类群 4 又和类群 2 与类群 3 之间相距较远。从聚类分析结果可

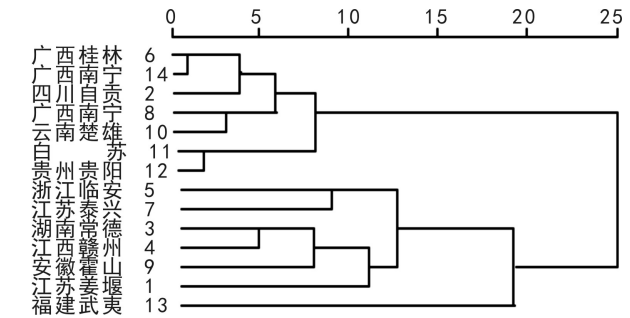


图 1 不同来源紫苏迷迭香酸的聚类分析树状图

Fig. 1 Tree diagram of cluster analysis of different populations and parts of *Perilla frutescens*

知,紫苏不同来源不同部位迷迭香酸含量有较明显的地理分布倾向,大致来源于西南区域(广西、四川、云南、贵州)的被聚为一类,长江中游的(湖南、江西、安徽)聚为一类,长江下游的(江苏和浙江)聚为一类,而福建单独聚为一类。在聚类结果中,来源于江苏姜堰的白苏与西南区域的被聚为一类,分析可能是由实验误差造成的,具体原因有待进一步研究。

聚类后不同类群迷迭香酸的平均值如表 3,各类群在叶、果穗、茎及根中迷迭香酸含量均存在显著差异($P<0.05$)。对各类群不同来源紫苏不同部位的迷迭香酸含量进行最终聚类中心分析表明,类群 1 中,除根外,在其余 3 个各部位中的迷迭香酸含量最低;类群 2 中根中迷迭香酸含量最高,其余较低;

类群 3 中,叶、果穗、茎及根中迷迭香酸含量均较低;类群 4 中,除根外,在其余 3 个各部位中的迷迭香酸含量最高。

表 3 聚类分析后不同来源紫苏不同部位中的迷迭香酸含量
Table 3 Results of different clusters of rosmarinic acid of different populations and parts in *Perilla frutescens*

项目 Item	类群 1 Cluster 1	类群 2 Cluster 2	类群 3 Cluster 3	类群 4 Cluster 4
来源数 No. of opulations	7	2	4	1
叶	1.77±	3.84±	3.71±	4.68±
Leaf (mg/g)	0.02D	0.05B	0.05C	0.06A
果穗	0.30±	1.01±	1.29±	2.77±
Ear (mg/g)	0.05D	0.05C	0.05B	0.08A
茎	0.27±	1.17±	0.97±	1.31±
Stem (mg/g)	0.04D	0.05B	0.05C	0.05A
根	0.15±	1.62±	0.72±	0.15±
Root (mg/g)	0.03C	0.05A	0.08B	0.04C

注:大写字母表示不同类群同一部位在 $P<0.05$ 水平上的显著性差异。
Note: Capital letters mean significant differences ($P<0.05$) of the same part in the different clusters.

3 结论

本研究 14 份材料在叶、果穗、茎和根四个部位中均检测到迷迭香酸的存在,而且都是在叶中迷迭香酸的含量最高,叶、果穗、茎和根中的迷迭香酸含量都存在极显著差异($P<0.01$)。而果穗和根是非传统入药部位,而且大部分果穗中的迷迭香酸含量高于茎,这一结果为紫苏果穗资源的利用提供了一定的理论依据。

本研究采用系统聚类法将 14 种材料进行聚类分析,结果表明可以分成 4 个类群,分别是来源于西南区域(广西、四川、云南、贵州)的被聚为一类,长江中游的(湖南、江西、安徽)聚为一类,长江下游的(江苏和浙江)聚为一类,而福建单独聚为一类,而且不同地域紫苏各部位的迷迭香酸含量均存在显著差异($P<0.05$)。这一结论可为今后紫苏药材质量标准的制定和非传统入药部位的选择利用奠定基础。

致谢 本研究得到常州华生制药有限公司在试剂与仪器上的支持,在此表示衷心感谢。

参考文献:

Aritomi M, Kumori T, Kawasaki T. 1985. Cyanogenic glycosides in leaves of *Perilla frutescens* var. *acuta*[J]. *Phytochemistry*, **24** (10):2 438—2 439
China Pharmacopoeia Committee(国家药典委员会). 2010. Chinese Pharmacopoeia(中国药典): The 2010 Edition(A)(2010 年

版(一部))[S]. Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社):263,318
Editorial Committee of flora of China of Chinese Academy of Sciences(中国植物志编委会).1977. Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing(北京):Science Press(科学出版社),**66**: 282—287
Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, black seed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol [J]. *Food Chem*, (110):76—82
Hu HB(胡浩斌), Zheng XD(郑旭东), Liu FS(刘富顺), *et al.* 2007. Five phenolic constituents from roots of *Elsholtzia bodinieri*(东紫苏根中的 5 种酚性成分)[J]. *Chin Herb Med*(中草药), **38**(3):329—332
Huang LH(黄亮辉), Su Q(苏琪), Zhang XX(张新新), *et al.* 2012. Determination of rosmarinic acid in leaf of *Perilla frutescens* (L.)Britt. var. *typica* (Makino)Makino and *Perilla frutescens* (L.)Britt. var. *acuta* (Thunb.)Kudo at different harvest time points(不同采收期的紫苏叶和白苏叶中迷迭香酸的含量测定)[J]. *J Pharmac Anal*(药物分析杂志), **32** (10):1 753—1 755
Huang LH(黄亮辉), Su Q(苏琪), Zhao TT(赵婷婷), *et al.* 2010. Determination of rosmarinic acid in seeds and its processed products of *Perilla frutescens* var. *typica* and *Perilla frutescens* var. *acuta*(白苏子和紫苏子生品及其炮制品中迷迭香酸的含量测定)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), **33**(12):1 856—1 857
Kim HK, Lee HK, Shin CG, *et al.* 1999. HIV integrase inhibitory activity of *Agastache rugosa* [J]. *Arch Pharmac Res*, (22):520—523
Laureati M, Buratti S, Bassoli A. 2010. Discrimination and characterisation of three cultivars of *Perilla frutescens* by means of sensory descriptors and electronic nose and tongue analysis[J]. *Food Res Int*, (43):959—964
Park HY, Nam MH, Lee HS, *et al.* 2010. Isolation of caffeic acid from *Perilla frutescens* and its role in enhancing γ -glutamylcysteine synthetase activity and glutathione level[J]. *Food Chem*, (119):724—730
Su P(苏平), Wang GN(王根女), Wu D(吴丹), *et al.* 2008. Progress of rosmarinic acid biological activities and its sources(迷迭香酸的生理活性功能及其来源研究进展)[J]. *Food & Ferment Ind*(食品与发酵工业), **34**(12):135—138
Sun X(孙岫), Wang JC(汪靖超), Li HT(李洪涛), *et al.* 2005. A study on antibacterial mechanism of rosmarinic acid(迷迭香酸的抗菌机理研究)[J]. *J Qingdao Univ*(青岛大学学报), **18** (4):41—45
Takoo H, Osakabe N, Sasa N, *et al.* 2003. Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles [J]. *Free Rad Biol Med*, **34**(8):1 060—1 069
William H, William B L. 2001. Inhibitors of human immunodeficiencyvirus type-1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription[J]. *J Virol*, (75):3 095—3 104
Zou ZW(邹正午), Xu LN(徐理纳), Tian JY(田金英), *et al.* 1993. Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from radix salviae miltiorrhizae(Danshen)(迷迭香酸抗血栓和抗血小板聚集作用)[J]. *Acta Pharmac Sin*(药理学学报), **28**(4):241—245