

高效液相色谱法同时定量分析紫苏 不同部位的植物代谢物

张红玉¹, 王丹¹, 吴春剑^{2,3}, 侯天宇¹, 赵亚娜¹, 张志军¹, 雷娜娜¹, 李河^{1*}

(1. 中北大学化学与化工学院, 山西太原 030051) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510641)

(3. 香港中文大学化学学院, 中国香港 999077)

摘要: 该研究旨在建立一种同时测定中国紫苏不同部位中代谢物含量的分析方法, 明确紫苏不同部位中代谢物的种类与含量, 为此类物质的高效利用提供一定科学依据。利用溶剂提取结合高效液相色谱技术, 分别对紫苏叶、紫苏壳、紫苏杆中 19 种植物代谢物进行测定分析。结果表明, 19 种物质在 55 min 内完全分离, 峰型和分离度良好, 检出限在 0.05~0.40 mg/L 之间, 标准曲线 R^2 均在 0.997 6 以上, 回收率和精密度分别在 61.65%~111.42% 和 1.02%~17.20% 之间。应用该方法对 12 种紫苏样品进行了检测, 发现 19 种化合物在不同紫苏部位中的含量差异较大, 在 0.04~24.05 mg/g 之间。12 个样品中均检出 2 种酚酸和 5 种黄酮及黄酮苷。紫苏壳和杆中均检出木犀草素, 含量为 0.05~0.18 mg/g; 紫苏叶中化合物含量顺序为迷迭香酸>野黄芩苷>芹菜素-7-O-葡萄糖苷。此外, 在紫苏壳中首次检出 HMF 和糠醛两种呋喃环衍生物。该方法简单高效, 仪器要求低, 适用于紫苏及其他植物型样品中代谢物的定量检测。

关键词: 紫苏; 植物代谢物; 定量分析; 高效液相色谱 (HPLC)

文章编号: 1673-9078(2023)02-303-312

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0296

Simultaneous Quantitative Analysis of Plant Metabolites in Different Parts of Perilla (*Perilla frutescens*) by HPLC

ZHANG Hongyu¹, WANG Dan¹, WU Chunjian^{2,3}, HOU Tianyu¹, ZHAO Yana¹, ZHANG Zhijun¹, LEI Nana¹,
LI He^{1*}

(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China)

(2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(3.Department of Chemistry, The Chinese University of Hong Kong, Hongkong 999077, China)

Abstract: This study aims to establish an analytical method for the simultaneous detection of metabolites in different parts of Chinese *Perilla frutescens*. Identification of the types and concentrations of metabolites will provide a scientific basis for efficient utilization of *P. frutescens* compounds. The 19 plant metabolites in the leaves, seed shells and stems of Chinese perilla (*Perilla frutescens*) were analyzed by solvent extraction combined with high-performance liquid chromatography technique. Results indicated that the 19 compounds were completely separated within 55 minutes with good peak shape and separation, a limit of detection (0.05~0.40 mg/L), correlation coefficients (R^2) over 0.997 6, recoveries of 61.65%~111.42%, and precision of 1.02%~17.20%. This method was used to analyze 12 kinds of perilla samples, and it was found that the contents of 19 compounds in different parts of perilla varied significantly in the range of 0.04~24.05 mg/g. Two phenolic acids and five flavonoids and flavonoid glycosides were detected in the 12 samples. Luteolin was detected in perilla shells and stalks, with the contents

引文格式:

张红玉,王丹,吴春剑,等.高效液相色谱法同时定量分析紫苏不同部位的植物代谢物[J].现代食品科技,2023,39(2):303-312

ZHANG Hongyu, WANG Dan, WU Chunjian, et al. Simultaneous quantitative analysis of plant metabolites in different parts of perilla (*Perilla frutescens*) by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 303-312

收稿日期: 2022-03-16

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32001817); 山西省高校科技创新计划项目 (2020L0298); 晋中市重点研发计划项目 (Y212006); 山西省青年科学基金项目 (201901D211272)

作者简介: 张红玉 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源综合利用, E-mail: 2127143225@qq.com

通讯作者: 李河 (1987-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与天然产物活性, E-mail: 476374112@qq.com

with the contents ranging between 0.05 and 0.18 mg/g; the decreasing order of compound content in perilla leaves was rosmarinic acid > scutellarin > apigenin-7-*O*-glucoside. In addition, two furan ring derivatives, HMF and furfural, were detected for the first time in the perilla shells of this study. The method is simple and efficient, and the instrumental requirement is low, thus, is suitable for quantitative determination of metabolites in Perilla samples and other types of plant samples.

Key words: perilla; plant metabolites; quantitative analysis; high performance liquid chromatography (HPLC)

紫苏 (*Perilla frutescens* L.) 是一种唇形科草本植物, 是国家卫生部首批颁布的药食同源的 60 种中药之一^[1]。在东南亚地区分布广泛, 尤其在中国、日本、韩国种植历史更加悠久^[2]。我国早有利用新鲜紫苏叶处理以避免食用虾蟹中毒的传统, 日本将紫苏当做代表性的风味食品, 韩国利用紫苏制作泡菜和烤肉包装^[3], 因此, 紫苏在食品工业上应用广泛。

紫苏代谢物在其生长和自我防御机制中形成, 主要包括黄酮类、脂肪酸类、酚酸类^[4]、植物甾醇类及精油^[5,6], 具有多种生理功能^[3]。研究表明, 紫苏提取物有极强的抗氧化性^[7-9]。紫苏油可改善糖尿病性小鼠的高甘油三酸酯血症和肠道营养不良^[10]、淀粉样蛋白 β 诱导的认知障碍^[11]和炎症反应^[12]; 紫苏叶提取物对脂肪细胞分化和高脂饮食小鼠有抗肥胖作用^[13], 也有降血糖活性^[14]; 紫苏醛可调节大鼠的 α -抑制蛋白减轻其抑郁行为^[15]; 紫苏籽多糖可抑制小鼠体内肿瘤细胞的生长^[16]。

研究表明迷迭香酸是紫苏叶中含量最高的化合物^[3]。薛姣^[17]分离纯化了紫苏迷迭香酸, 并研究了它的抗氧化和抗菌性能; 杨馥茵等^[18]利用高速逆流色谱分离纯化了紫苏叶中的迷迭香酸和咖啡酸。何彦康^[19]利用高效液相色谱-二极管阵列 (HPLC-DAD)、高效液相色谱-质谱法 (HPLC-MS) 以及核磁共振光谱 (NMR) 确认了紫苏中花色苷和主要黄酮类物质的结构; Assefa 等^[9]利用超高效液相色谱-电喷雾电子-飞行时间-质谱技术 (UPLC-ESI-TOF-MS) 定性分析了 73 种紫苏样品中酚类化合物。Yan 等^[7]提取测定了冷榨紫苏子粉中的总多酚含量, 并评估了其中的抗氧化性能; 上述对紫苏代谢物的研究多基于色谱-质谱联用技术, 且以定性为主。在对紫苏代谢物定量分析的研究中, 史月姣等^[20]和艾鑫卫等^[21]利用 LC-MS 分别测定了紫苏水煎液和各生长期紫苏中的酚类物质含量; 代沙等^[22]利用 HPLC 测定了不同品系紫苏中的 8 种酚类物质; 落艳娇等^[23]测定了不同栽培年份和采收期紫苏叶中的 2 种酚酸和 6 种黄酮的成分含量。此外, 5-羟甲基糠醛 (HMF) 和糠醛等呋喃环衍生物也被报道为植物代谢物, 在中药中广泛存在^[24,25], 然而在紫苏中的分布尚未见报道。

综上所述, 目前对紫苏代谢物的研究主要集中在

迷迭香酸、咖啡酸和部分黄酮上, 原料以紫苏叶为主。鲜有报道紫苏杆、壳、叶中代谢物同时定量分析方法的研究。与 HPLC-MS 相比, HPLC 价格相对便宜, 在各高校实验室及公司研发质检部门普遍配备, 因此, 本实验以山西不同品种的紫苏为研究对象, 利用 HPLC 法系统分析紫苏不同部位的 19 种代谢物的含量和分布, 以期对紫苏代谢物的定量分析及相关产品开发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫苏叶、紫苏杆、紫苏壳 (山西省晋中市) 均来源于本课题组实验田种植所得, 品种分别为 1#、3#、4#、27#、28#、混 1#、晋紫苏 2#、晋紫苏 3#、白苏、双面紫。甲醇、乙腈、甲酸、乙酸均为色谱纯, 均购自上海阿拉丁生化技术有限公司。无水乙醇、没食子酸 (GA)、迷迭香酸 (RosA)、芦丁 (RT) 购自北京索莱宝科技有限公司。5-羟甲基糠醛 (HMF)、糠醛 (F)、原儿茶酸 (PCA)、对羟基苯甲酸 (p -HBA)、儿茶素 (C)、咖啡酸 (CA)、对香豆酸 (p -CA)、野黄芩苷 (SG)、阿魏酸 (FA)、杨梅素 (MC)、白藜芦醇 (RVT)、木犀草素 (LTL)、槲皮素 (QC)、芹菜素 (AGN)、山奈酚 (KMF) 均购自上海阿拉丁生化技术有限公司, 芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷 (AG) 购自上海紫霞生物科技有限公司。19 种植物代谢物的详细信息见表 1。

1.2 仪器与设备

Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 美国热电公司; 超高效液相色谱-飞行时间质谱仪, Aacquish 超高效液相系统, TSQ Altis 三重四极杆质谱, 美国热电公司; SB25-12DTD 超声波清洗器, 宁波新芝生物科技股份有限公司; CTL550 低速离心机, 湖南湘立仪器有限公司; XW-80A 涡旋混合器, 上海驰唐电子有限公司; ZYCGF-III-20T 超纯水制备系统, 四川卓越水处理设备有限公司; BCD-576WDPU 冰箱, 海尔公司; RE-52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂。

表 1 19 种植物代谢物的详细信息

Table 1 Detailed information of 19 plant metabolites

序号	中文名称	英文名称	英文缩写	CAS 号	分子量	检测波长/nm
1	没食子酸	Gallic acid	GA	149-91-7	170.120	280
2	5-羟甲基糠醛	5-Hydroxymethylfurfural	HMF	67-47-0	126.11	280
3	糠醛	Furfural	F	98-01-1	96.08	280
4	原儿茶酸	Protocatechuic acid	PCA	99-50-3	154.12	280
5	对羟基苯甲酸	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	<i>p</i> -HBA	99-96-7	138.12	280
6	儿茶素	(+)-Catechin	C	154-23-4	290.27	280
7	咖啡酸	Caffeic acid	CA	331-39-5	180.15	320
8	芦丁	Rutin	RT	153-18-4	610.52	320
9	对香豆酸	<i>p</i> -Coumaric acid	<i>p</i> -CA	501-98-4	164.16	320
10	野黄芩苷	Scutellarin	SG	27740-01-8	462.37	320
11	阿魏酸	Ferulic acid	FA	1135-24-6	194.18	320
12	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronide	AG	29741-09-1	446.36	320
13	迷迭香酸	Rosmarinic acid	RosA	20283-92-5	360.31	320
14	杨梅素	Myricetin	MC	529-44-2	318.24	360
15	白藜芦醇	Resveratrol	RVT	501-36-0	228.24	360
16	木犀草素	Luteolin	LTL	491-70-3	286.24	320
17	槲皮素	Quercetin	QC	117-39-5	302.24	360
18	芹菜素	Apigenin	AGN	520-36-5	270.24	360
19	山奈酚	Kaempferol	KMF	520-18-3	286.24	360

1.3 方法

1.3.1 标准品溶液制备

准确称取没食子酸、5-羟甲基糠醛、糠醛、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、儿茶素、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、芦丁、迷迭香酸、杨梅素、白藜芦醇、木犀草素、槲皮素和山奈酚标准品各 20 mg，分别用甲醇溶解并定容到 10 mL 容量瓶中，得到每种标准品浓度为 2 mg/mL 的标准贮备液。利用含 0.1%甲酸的乙腈水溶液（乙腈:水=1:1, *V/V*）对贮备液进行梯度稀释，得到一系列不同浓度梯度混合标准工作液，同时稀释各标准贮备液，得到单独标准品工作液。

1.3.2 色谱分析条件

采用高效液相色谱法对 19 种物质进行测定，其中单独标准品用于定性分析，混合标准品进行定量分析，色谱条件如下：（1）色谱柱：Atlantic C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；（2）柱温，25 ℃；（3）流动相：A，0.1%甲酸乙腈、B，0.1%甲酸水；（4）洗脱程序：0~15 min，95%~90% B；15~30 min，90%~70% B；30~50 min，70%~60% B；50~51 min，60%~0% B；51~54 min，0% B；54~55 min，0~95% B；55~65 min，95% B。（5）进样量，20 μL；（6）流速，1.0 mL/min；（7）检测波长见表 1。

1.4 未知物定性分析

经甲醇水溶液提取之后，样品色谱图中有 2 个色谱峰 i 和 ii（图 2b、2c、2d）与 19 种标品化合物的保留时间均对应不上，但其含量相对较高，为了进一步对这两种化合物进行定性分析，利用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用法（UPLC-TOF-MS）对其质谱碎片离子进行确定，色谱条件同 1.3.2，进入质谱时通过分流将流速设为 0.3 mL/min，质谱条件如下：电喷雾电子（ESI）电离，负离子模式，全扫描，扫描范围：100~1 000 *m/z*，离子传输管温度：300 ℃，雾化室温度：350 ℃，载气 40 arb；辅助气：10 arb。

1.5 样品前处理

分别对不同品种紫苏叶、杆及壳取样，经自然风干后搅碎，然后过 60 目筛，得到各部位的粉末状样品，取样部位及样品见图 1。准确称取 0.50 g 粉末样品至 50 mL 塑料离心管中，加入 10 mL 酸化甲醇水溶液（甲醇:水=60:40，0.1%甲酸），涡旋振荡 1 min，超声萃取 20 min 后，5 000 r/min 离心 15 min，收集上清液。残渣继续用 10 mL 上述甲醇水溶液继续萃取 1 次，重复超声和离心步骤，收集上清液，过 0.22 μm 滤膜后，待 HPLC 分析。对于紫苏叶样品中的迷迭香酸，因其

含量较高（出现平头峰，图 2b），进样前需进行 10

倍稀释。



图 1 紫苏取样部位图

Fig.1 Sampling sites of *Perilla*

1.6 方法学考察

1.6.1 检出限与定量限

紫苏杆样品中加入混合标准溶液后得到信噪比 (S/N) 为 3 时对应的浓度为样品的检出限 (LOD)，以信噪比为 10 时对应的浓度为定量限 (LOQ)。具体方法为：在紫苏杆样品中加入标准溶液，经过前处理之后，浓度为 C ，HPLC 分析得到信噪比为 n ，则此时利用以下公式计算得到理论的 LOD 和 LOQ ：

$$LOD = \frac{3 \times C}{n} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times C}{n} \quad (2)$$

注：

LOD ——样品的检出限；

LOQ ——定量限；

C ——紫苏杆样品中加入标准溶液，经前处理之后的浓度；

n ——信噪比。

以计算得到的 LOD 和 LOQ 为参考，加入浓度越来越低的标准溶液，直到实际测得信噪比为 3 或 10 时，对应的浓度即为实际的 LOD 和 LOQ （实际值一般比理论值偏高）。

1.6.2 线性方程与范围

利用外标法对植物样品中 19 种物质进行定量。分别配置浓度为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 mg/L 的混合标准溶液，在 1.3.2 色谱条件下进样分析。以标准品浓度 (x , mg/L) 为横坐标，以峰面积 (y) 为纵

坐标绘制标准曲线。由于各物质响应有差异，其对应的线性范围见表 2。

1.6.3 回收率和精密度

精确称取紫苏杆样品 0.50 g，加入 19 种混合标准品适量，使其浓度分别达到 2.0、10.0 和 50.0 mg/L，每个浓度平行 6 次，各物质的回收率通过以下公式计算：

$$R = \frac{m_{\text{总}} - m_{\text{样品}}}{m_{\text{加标}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

R ——回收率，%；

$m_{\text{总}}$ ——各物质加标和样品的总含量，mg；

$m_{\text{样品}}$ ——样品本身各物质的含量，mg；

$m_{\text{加标}}$ ——加入各物质的含量，mg。

回收率 6 次平行的相对标准偏差 (RSD) 作为方法的精密度。

1.7 统计分析

除了回收率平行 6 次外，其余结果均为三次检测均值 $\pm$ 标准差表示。数据采用 Excel 2019 进行整理与初步分析，SPSS 21.0 进行方差分析，Origin 2018 进行作图以及拟合处理。置信区间为 95%，即 $P < 0.05$ 视为数据之间有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 HPLC 检测 19 种植物代谢物

采用 HPLC 对紫苏不同部位的 19 种植物代谢物

进行检测,在 1.3.2 的色谱条件下,19 种物质在 55 min 实现完全分离,峰型和分离度均较理想。三种紫苏不同部位的样品中,19 种物质种类与含量的分布差异较

大。图2为19种物质标准品和典型的紫苏叶、紫苏杆、紫苏壳样品液相色谱图。由图可知,在无需净化的过程中,样品中19种化合物的峰型干扰不影响定量积分。

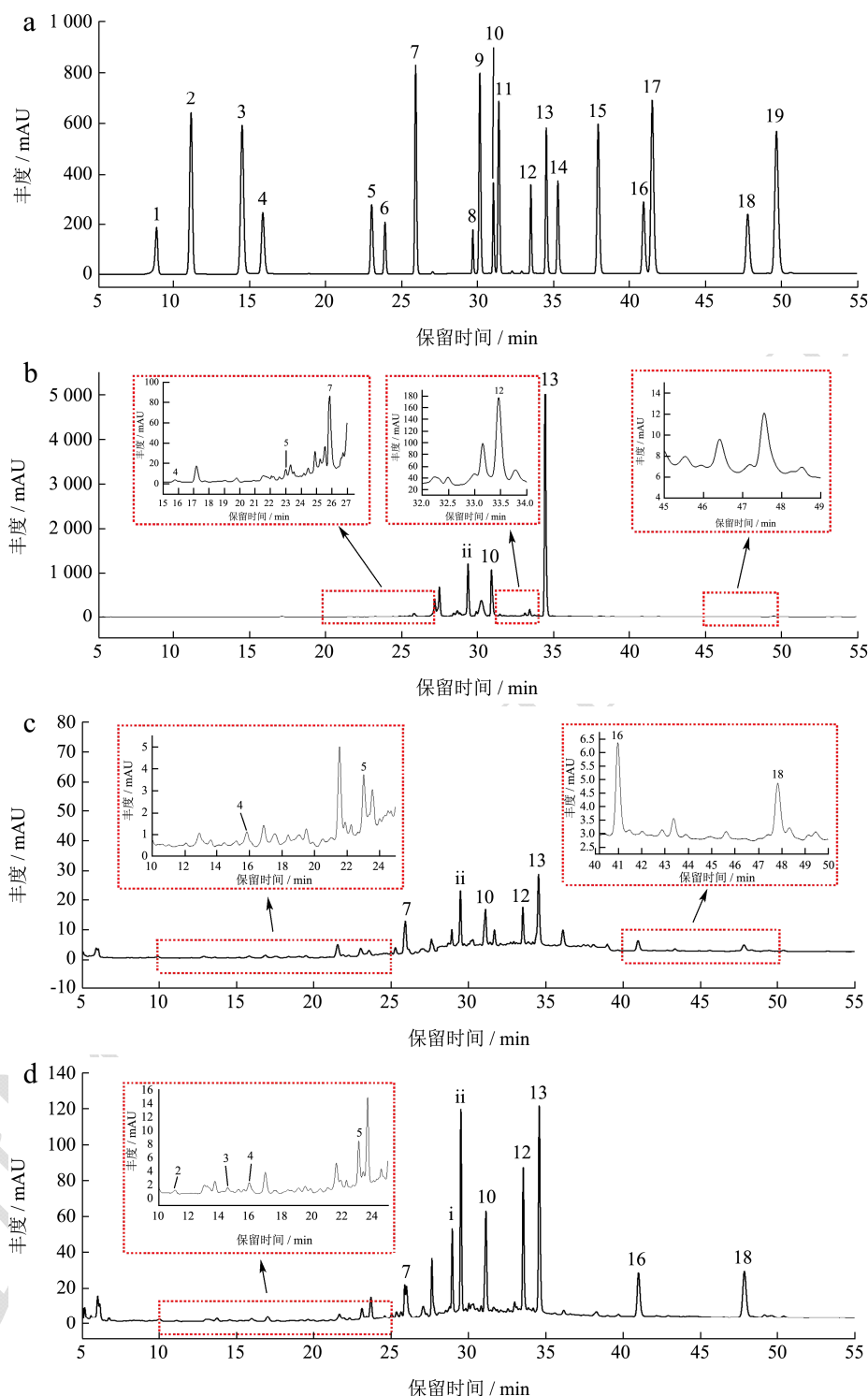


图2 19种物质标准品及典型样品的液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of 19 mixed standard compounds and typical samples

注: a-标准品; b-紫苏叶样品; c-紫苏杆样品; d-紫苏壳样品。1-没食子酸; 2-HMF; 3-糠醛; 4-原儿茶酸; 5-对羟基苯甲酸; 6-儿茶素; 7-咖啡酸; 8-芦丁; 9-对香豆酸; 10-野黄芩苷; 11-阿魏酸; 12-芹菜素-7-O-葡萄糖苷; 13-迷迭香酸; 14-杨梅素; 15-白藜芦醇; 16-木犀草素; 17-槲皮素; 18-芹菜素; 19-山奈酚。

2.2 未知物的定性分析

如图 2b、2c、2d 所示，利用 UPLC-TOF-MS 对色谱峰 i 和 ii 进行定性分析，结果见图 3。对于化合物 i，负离子模式下，脱氢后质荷比为 m/z 637.151 00，未观察到可能的碎片离子，根据质谱信息与文献对照^[9,19]，判断 i 化合物为木犀草素-7-*O*-二葡萄糖苷；对于化合物 ii，负离子模式下，脱氢后质荷比为 m/z 621.121 03，较高的碎片离子为 m/z 351.167 05，应为黄酮骨架上脱去一个葡萄糖苷酸基团（177 u）和一个苯酚基团（93 u），将其质谱信息与已发表的文献对比^[4,9]，可确定化合物 ii 为芹菜素-7-*O*-二葡萄糖苷，由于这两种苷类物质的标准品很难商业购买，本文利用芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷标准品对它们进行定量分析。

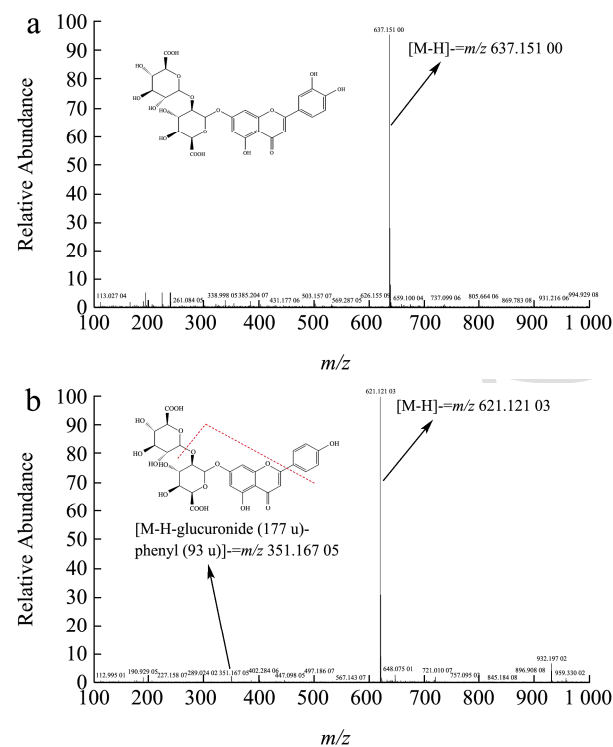


图3 两种未知物 i 和 ii 的 TOF-MS 图

Fig.3 TOF-MS spectrum two unknown compounds: i and ii

2.3 提取溶剂的优化

由于纯有机试剂对待测物的溶解性大于流动相，使用纯有机试剂（如甲醇）对样品进行提取，会导致进入色谱柱的待测物在溶剂和流动相之间分配不均，出现部分物质色谱峰前置拖尾的现象，从而影响分离度。因此在对提取溶剂选择时，本文参照文献及课题组研究经验^[23,26]，比较了甲醇、乙腈、乙醇水溶液（40% 体积水）对 19 种待测物的提取回收率，结果见图 4。如图 4 所示，三种溶剂对糠醛和杨梅素的回收率均较低，相比之下，甲醇水溶液更为理想。乙醇对对羟基

苯甲酸、对香豆酸、迷迭香酸和白藜芦醇的回收率均超过 100%，可能由于乙醇极性较低，提取了较多的杂质；乙腈对没食子酸和芦丁的回收率偏低；综上所述，本研究最终选择甲醇水溶液作为提取溶剂。

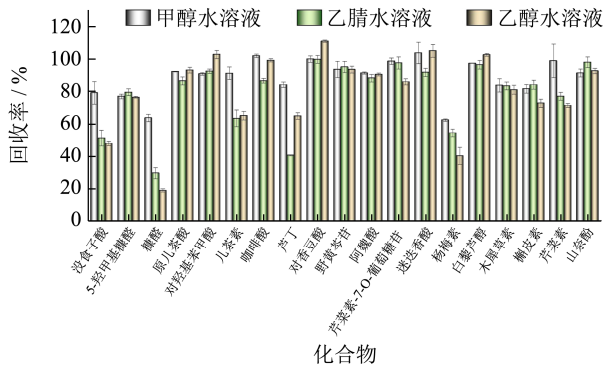


图4 三种溶剂对 19 种化合物回收率的影响 ($n=3$)

Fig.4 Effects of three extract solvents on the recoveries of 19 compounds ($n=3$)

2.4 方法学认证

2.4.1 检出限、定量限与标准曲线

根据 1.6 方法学考察，采用峰面积外标法定量，以质量浓度 1.0、2.0、5.0、10.0、25.0 和 50.0 mg/L 为横坐标，峰面积为纵坐标建立标准曲线，19 种化合物的保留时间、检出限、定量限与标准曲线等信息见表 2。19 种物质在线性范围内呈现较好的线性关系，相关系数在 0.997 6~0.999 9 之间，检出限在 0.10~0.40 mg/L 之间。史月姣等^[20]利用 LC-MS 测定了紫苏水煎液的部分代谢物，但未报道检出限；艾鑫卫等^[21]建立了高灵敏度的 HPLC-MS 测定紫苏不同生长期代谢物的方法，但仅能测定 5 种多酚，且质谱价格昂贵，较难普及。代沙等^[22]建立了 HPLC 测定紫苏中分类的方法，也没有报道方法的检出限。虽然与 LC-MS 相比较，本研究的灵敏度较低，但仅就高效液相色谱而言，本方法具有更广泛的适用范围，能满足紫苏中代谢物定性和定量分析的要求。

2.4.2 回收率和精密度

由表 3 可知，19 种植物代谢物的加标回收率在 61.65%~111.42%之间，RSD 在 1.02%~17.20%之间。由于糠醛类物质粘度较大，且在紫苏中含量极少，在加标量较少时，其回收率较低。由于本文采用的 HPLC 法同时测定多种含紫外吸收基团的化合物，在提取中无法避免共洗脱的干扰，欧盟委员会规定，当加标量较低时，回收率在-50%到+20%之间可以接受^[27]。因此，在没有质谱辅助的情况下，该方法在实验室及工业检测同时定量 19 种化合物时是可行的。

表 2 19 种植物代谢物的保留时间、线性范围、线性方程、相关系数、检出限及定量限

Table 2 Retention time, linear range and equation, correlation coefficient, limit of detection (LOD) and limit of qualification (LOQ) of 19 plant metabolites

序号	中文名称	保留时间/min	线性范围/(mg/L)	线性方程	相关系数	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)
1	没食子酸	8.88	1~25	$y=0.686\ 4x-0.099\ 7$	0.999 8	0.15	0.50
2	5-羟甲基糠醛	11.17	1~25	$y=2.535\ 9x+0.054\ 8$	0.999 9	0.05	0.20
3	糠醛	14.56	1~25	$y=2.827\ 7x+0.495\ 7$	0.999 2	0.40	1.00
4	原儿茶酸	15.87	2~50	$y=0.976\ 2x-0.247\ 4$	0.999 4	0.35	1.00
5	对羟基苯甲酸	23.03	2~50	$y=0.901\ 3x-0.135\ 2$	0.999 7	0.35	1.00
6	儿茶素	23.90	2~50	$y=0.311\ 1x+0.188\ 4$	0.999 3	0.35	1.00
7	咖啡酸	25.92	1~25	$y=1.194\ 4x-0.005$	0.999 7	0.10	0.50
8	芦丁	29.68	2~50	$y=0.334\ 6x+0.035\ 4$	0.999 9	0.35	1.00
9	对香豆酸	30.15	1~25	$y=2.205\ 7x+0.437\ 2$	0.999 0	0.10	0.50
10	野黄芩苷	31.04	2~50	$y=0.769\ 9x+0.050\ 6$	0.999 2	0.35	1.00
11	阿魏酸	31.43	1~25	$y=1.851\ 3x-0.165\ 9$	0.999 9	0.10	0.50
12	芹菜素-7-O-葡萄糖苷	33.51	2~50	$y=0.778\ 9x+0.034\ 4$	0.999 5	0.25	0.80
13	迷迭香酸	34.55	1~25	$y=1.406\ 8x+0.301\ 9$	0.998 1	0.10	0.50
14	杨梅素	35.32	2~50	$y=0.536\ 1x-0.112\ 5$	0.997 6	0.25	0.80
15	白藜芦醇	37.98	1~25	$y=2.259\ 9x+0.147\ 7$	0.998 8	0.10	0.50
16	木犀草素	40.96	2~50	$y=1.198\ 3x-0.084\ 4$	0.999 9	0.35	1.00
17	槲皮素	41.54	2~50	$y=1.510\ 9x+0.201\ 9$	0.999 7	0.25	0.80
18	芹菜素	47.82	2~50	$y=0.657\ 4x-0.063\ 3$	0.999 0	0.35	1.00
19	山奈酚	49.72	2~50	$y=1.592\ 7x+0.198\ 1$	0.999 5	0.25	0.80

表 3 19 种化合物加标回收率和精密度 (n=6)

Table 3 Recoveries and precision of 19 compounds (n=6)

序号	中文名称	回收率 (RSD) /%		
		2.0 mg/L	10.0 mg/L	50.0 mg/L
1	没食子酸	74.11(7.53)	76.78 (7.21)	86.04 (3.53)
2	5-羟甲基糠醛	78.42(6.04)	87.55 (3.42)	89.62 (4.45)
3	糠醛	61.65(9.53)	73.22 (10.81)	71.17 (1.44)
4	原儿茶酸	79.88(1.02)	92.13 (10.42)	97.86 (1.65)
5	对羟基苯甲酸	87.32(8.28)	97.35 (4.31)	100.57 (3.32)
6	儿茶素	80.24(5.77)	88.01 (7.63)	79.22 (8.42)
7	咖啡酸	82.25(4.03)	103.42 (9.41)	98.51 (6.04)
8	芦丁	85.47(15.20)	87.55 (8.11)	88.22 (4.86)
9	对香豆酸	94.20 (3.62)	95.63 (5.23)	79.28 (2.97)
10	野黄芩苷	73.91 (5.29)	91.72 (4.77)	100.71 (4.65)
11	阿魏酸	96.80(4.82)	91.31(8.02)	90.42(4.32)
12	芹菜素-7-O-葡萄糖苷	89.56(15.01)	88.81(4.72)	94.10(1.73)
13	迷迭香酸	93.62(1.44)	111.42 (14.45)	107.2(12.7)
14	杨梅素	67.88(8.54)	72.12(4.63)	79.42(2.32)
15	白藜芦醇	97.42(2.23)	89.24(2.52)	89.62(5.45)
16	木犀草素	90.45(6.26)	91.32(14.95)	94.67(2.28)
17	槲皮素	75.22(6.82)	88.04(4.63)	84.10(2.87)
18	芹菜素	77.02(12.62)	99.64(17.20)	102.90(11.62)
19	山奈酚	82.72(2.67)	93.45(4.15)	96.96(5.21)

表 4 12 种不同紫苏品种壳、叶、杆中植物代谢物的含量 ($n=3$)Table 4 Contents of 21 studied compounds in seed shell, leaf and stem of 12 different types of *Perilla* ($n=3$)

序号	中文名称	含量/(mg/g)											
		28#壳	28#叶	27#叶	混 1#叶	晋紫苏 2#叶	晋紫苏 3#叶	白苏叶	双面紫叶	28#杆	1#杆	3#杆	4#杆
1	没食子酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	5-羟甲基糠醛	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	糠醛	NQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	原儿茶酸	NQ	0.10±0.01	ND	ND	ND	ND	NQ	ND	ND	ND	ND	ND
5	对羟基苯甲酸	ND	0.11±0.05	ND	0.10±0.01	0.05±0.00	0.08±0.01	0.14±0.02	0.05±0.01	0.29±0.04	NQ	NQ	NQ
6	儿茶素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	咖啡酸	0.08±0.01	0.84±0.11	0.39±0.04	0.40±0.05	0.37±0.07	0.36±0.05	0.41±0.09	0.47±0.21	0.39±0.03	NQ	0.07±0.01	0.08±0.00
8	芦丁	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	对香豆酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
i	木犀草素-7- <i>O</i> -二葡萄糖苷	0.20±0.03	0.06±0.01	0.10±0.05	0.04±0.01	0.07±0.01	0.11±0.06	0.05±0.10	0.12±0.06	0.78±0.09	NQ	NQ	0.05±0.00
ii	芹菜素-7- <i>O</i> -二葡萄糖苷	0.57±0.09	8.36±0.45	7.38±0.29	9.65±0.95	7.97±0.67	8.44±0.77	7.34±1.27	6.89±0.79	0.36±0.07	0.10±0.02	0.12±0.05	0.11±0.04
10	野黄芩苷	0.39±0.09	5.97±0.29	8.44±0.66	11.11±1.04	7.64±1.22	8.36±0.74	11.42±1.57	6.86±0.86	1.13±0.32	NQ	0.08±0.01	0.25±0.05
11	阿魏酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	0.45±0.07	0.96±0.13	1.53±0.11	1.53±0.32	0.82±0.18	0.82±0.10	2.14±0.66	0.82±0.23	1.18±0.24	ND	0.10±0.02	0.09±0.01
13	迷迭香酸	0.41±0.06	20.47±1.48	18.48±2.01	24.05±2.94	21.10±2.05	19.15±1.98	20.41±1.14	17.76±2.18	1.45±0.58	NQ	0.04±0.00	0.32±0.05
14	杨梅素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	白藜芦醇	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	木犀草素	0.18±0.03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NQ	NQ	0.05±0.01	0.11±0.03
17	槲皮素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	芹菜素	0.41±0.10	0.07±0.01	0.55±0.08	0.58±0.01	0.11±0.04	0.08±0.02	0.09±0.02	0.08±0.03	0.41±0.19	NQ	0.04±0.01	0.05±0.01
19	山奈酚	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注: ND 为未检出; NQ 为有检出但未达到定量限。

2.5 实际样品的检测

应用所建立的方法对 10 种不同品种紫苏的叶、壳、杆进行定量分析,检测结果见表 4。通过对结果分析(图 5),12 种样品中,含量较大的化合物为咖啡酸、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-二葡萄糖苷、野黄芩苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷、迷迭香酸和芹菜素,在 0.04~24.05 mg/g 之间,含量差异跨度较大,不同紫苏部位的化合物含量分布也不同。结果显示,28#紫苏壳中共检出 11 种物质,含量在 0.08~0.57 mg/g 之间;21 种化合物中,酚酸类如咖啡酸和迷迭香酸;黄酮及黄酮苷类,如木犀草素-7-*O*-二葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-二葡萄糖苷、野黄芩苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷和芹菜素在 12 种样品中均有检出,其中迷迭香酸为紫苏叶中含量最高的物质,这与前人的研究一致^[17,28],其次为

野黄芩苷和芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷。胡惠军等^[26]报道了紫苏叶中咖啡酸、迷迭香酸和野黄芩苷的含量,其含量分别在 0.10~0.49、0.29~9.58 和 0.26~4.38 mg/g 之间;落艳娇等^[23]测定了 51 个紫苏叶样品中咖啡酸、迷迭香酸和 6 种黄酮苷的含量,发现迷迭香酸含量为 2.13~33.97 mg/g;其次是木犀草素-7-*O*-二葡萄糖苷,含量为 1.31~14.80 mg/g;芹菜素-7-*O*-二葡萄糖苷含量为 2.68~7.60 mg/g;芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷含量为 0.56~1.00 mg/g;咖啡酸含量最少,为 0.11~0.68 mg/g。造成含量差异的原因可能与紫苏品种、生成环境、水分含量及提取溶剂等有关。此外,本文中原儿茶酸和对羟基苯甲酸在部分样品中也有检出。木犀草素在紫苏壳和杆中有检出,含量较少,在 0.05~0.18 mg/g 之间,但在紫苏叶中没有检出。值得注意的是,本文在紫苏壳中检出了 HMF 和糠醛两种呋喃环衍生物。

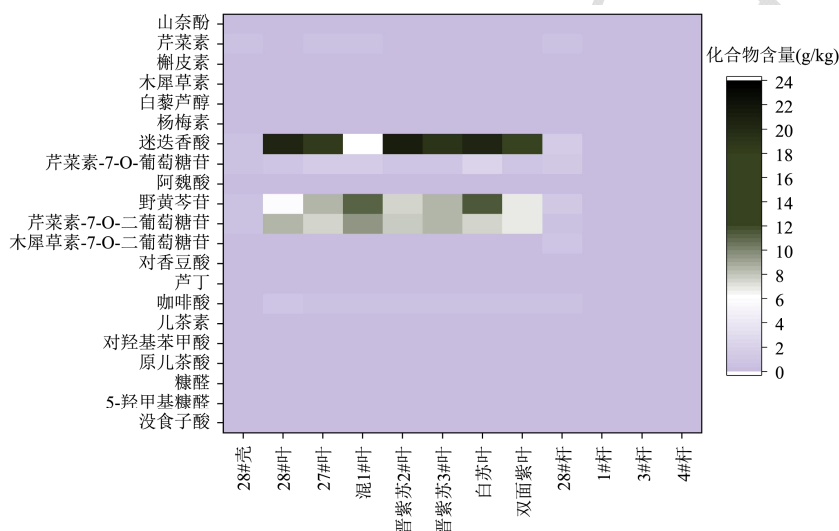


图 5 21 种化合物在不同品种紫苏不同部位的分布图

Fig.5 Distribution of 21 compounds in different parts of different varieties of Perilla

3 结论

本实验基于高效液相色谱-紫外检测仪建立了不同品种紫苏不同部位中 19 种植物代谢物同时检测的方法,19 种化合物保留时间稳定,峰型和分离度良好。方法的检出限在 0.05~0.40 mg/L 之间,回收率和精密度分别在 61.65%~111.42%和 1.02%~17.20%之间。在此基础上,应用该方法对不同品种分不同部位的紫苏进行了检测。19 种化合物在不同紫苏部位中的含量差异极大,其中咖啡酸、迷迭香酸、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-二葡萄糖苷、野黄芩苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷和芹菜素等含量较大,在 12 个样品中均有检出,含量在 0.05~24.05 mg/g 之间。28#紫苏壳中共检出 11 种物质,含量在 0.08~0.57 mg/g 之间;紫苏壳和杆中均有木犀草素检出,含量在 0.05~0.18 mg/g

之间;紫苏叶中化合物含量顺序为迷迭香酸>野黄芩苷>芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷。此外,本实验在紫苏壳中检出 HMF 和糠醛两种呋喃环衍生物。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020:354
- [2] 谭永兰.紫苏籽壳多酚的提取及应用研究[D].太原:中北大学,2019
- [3] Yu H, Qiu J, Ma L, et al. Phytochemical and phytopharmacological review of *Perilla frutescens* L. (Labiatae), a traditional edible-medicinal herb in China [J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 108(SIB): 375-391
- [4] Lee Y H, Kim B, Kim S, et al. Characterization of metabolite profiles from the leaves of green perilla (*Perilla frutescens*)

- by ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry and screening for their antioxidant properties [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2017, 25(4): 776-788
- [5] Tian J, Zeng X, Zhang S, et al. Regional variation in components and antioxidant and antifungal activities of *Perilla frutescens* essential oils in China [J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 59: 69-79
- [6] Chen F, Liu S, Zhao Z, 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)
- [7] Yan L, Zheng G. Comparing profiles and antioxidant properties of soluble and insoluble phenolics in *Perilla frutescens* seed flour extracts obtained by different extraction/hydrolysis methods [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2017, 52(11): 2497-2504
- [8] Noh S, Sung J, Lee H, et al. Protective effects of methanol extract of perilla seed meal against oxidative stress in HepG2 cells [J]. *Food Science and Technology Research*, 2018, 24(4): 583-590
- [9] Assefa A D, Jeong Y, Kim D, 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: 153-167
- [10] Wang F, Zhu H, Hu M, et al. Perilla oil supplementation improves hypertriglyceridemia and gut dysbiosis in diabetic KKAY mice [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(180029924)
- [11] Lee A Y, Lee M H, Lee S, et al. Alpha-linolenic acid from *Perilla frutescens* var. *japonica* oil protects a beta-induced cognitive impairment through regulation of app processing and a beta degradation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(49): 10719-10729
- [12] Lee A Y, Lee M H, Lee S, et al. Neuroprotective effect of alpha-linolenic acid against a beta-mediated inflammatory responses in C6 glial cell [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(19): 4853-4861
- [13] Thomas S S, Kim M, Lee S J, et al. Antiobesity effects of Purple Perilla (*Perilla frutescens* var. *acuta*) on adipocyte differentiation and mice fed a high-fat diet [J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(9): 2384-2393
- [14] 李项辉.紫苏叶提取物的降血糖活性研究[D].杭州:浙江大学,2017
- [15] Song Y, Sun R, Ji Z, et al. Perilla aldehyde attenuates CUMS-induced depressive-like behaviors via regulating TXNIP/TRX/NLRP3 pathway in rats [J]. *Life Sciences*, 2018, 206: 117-124
- [16] 刘子坤,尹贺,杨安皓,等.紫苏籽多糖分离纯化及抗肿瘤活性[J].*食品科学*,2022,43(15):158-165
- [17] 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
- [18] 杨馥菡,张志军,李会珍,等.高速逆流色谱法分离纯化紫苏叶中迷迭香酸和咖啡酸[J].*食品科技*,2020,45(9):196-202
- [19] 何彦康.紫苏中多酚类天然活性成分的结构解析与功能研究[D].上海:华东理工大学,2015
- [20] 史月姣,王瑛,朱惠照,等.LC-MS 快速分析紫苏水煎液中的主要化学成分[J].*药物分析杂志*,2015,35(8):1417
- [21] 艾鑫卫,胡思平,龚姮姮,等.高效液相色谱-串联质谱法测定各生长期紫苏中酚类物质的含量[J].*食品科学*,2016,37(18): 126-132
- [22] 代沙,吴卫,李钰.HPLC 法测定不同品系紫苏酚类物质的含量[J].*核农学报*,2014,28(1):108-115
- [23] 落艳娇,郭佳琪,李卫萍,等.紫苏叶不同栽培年份和采收期 8 种酚类成分含量研究[J].*中国中药杂志*,2021,46(3):567-574
- [24] Gao H, Wen X, Xian C J. Hydroxymethyl furfural in Chinese herbal medicines: Its formation, presence, metabolism, bioactivities and implications [J]. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, 2015, 12(2): 43-54
- [25] Li H, Li L, Zhang Z, et al. Sensory evaluation, chemical structures, and threshold concentrations of bitter-tasting compounds in common foodstuffs derived from plants and maillard reaction: A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021: 1-41
- [26] 胡惠军,谷丽华,俞桂新.HPLC 法测定紫苏叶中咖啡酸、野黄芩苷和迷迭香酸的含量[J].*上海中医药大学学报*,2016, 30(4):80-84
- [27] European Commission. 2002-657-EC, Commission Decision of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and Interpretation of Results [S]
- [28] 姚慧.紫苏中迷迭香酸的提取及其在肉制品中的应用[D].天津:天津科技大学,2010