

• 药材与资源 •

模式识别结合多指标成分定性及定量分析 3 个主产区紫苏叶特征成分

李丹阳, 孙 捷, 居永慧, 张 桥, 郑云枫*, 程建明, 李振岚, 陈俊彦, 张 丽*

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘 要: 目的 对 3 个产地紫苏叶药材特征性成分进行差异性分析。方法 采集了不同主产区 20 批紫苏叶药材, 分别采用指纹图谱、UFLC-Q-TOF-MS 定性鉴别及 HPLC 多指标成分定量结合聚类分析的方法对紫苏叶药材的特征性组分进行差异性分析。结果 3 个产区 20 批次药材叶指纹图谱相似度均在 0.900 以上, 因而无法通过相似度区分不同产地药材; 进一步以 UFLC-Q-TOF-MS 及对对照品对照鉴定了指纹图谱中 21 个特征峰成分; 并对其中 6 个黄酮苷、2 个酚酸及 1 个单萜主要特征组分含量进行了对比分析, 结果显示总黄酮苷含量 3 个产地差异并不明显, 而酚酸及紫苏醛成分产地间差异显著, 其中安徽太和县产区药材中酚酸总含量明显高于广东英德和河北安国产地, 广东英德产紫苏叶中紫苏醛成分含量较高, 结合聚类分析可以将 3 个产地紫苏叶药材进行区分。结论 多指标成分定性定量能较准确地分析不同产地紫苏叶药材的质量状况, 比单一含量测定或指纹图谱相似度评价方法更为客观, 也为紫苏叶药材质量控制及产地优选提供了参考。

关键词: 紫苏叶; 聚类分析; UFLC-Q-TOF-MS; 特征组分; 咖啡酸; 野黄芩素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷; 木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷; 芹菜素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷; 野黄芩苷; 木犀草素-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷; 芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷; 迷迭香酸; 紫苏醛

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)08-2207-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.030

Qualitative and quantitative analysis of characteristic components of *Perillae Folium* from different regions by pattern recognition combined with muti-component analysis

LI Dan-yang, SUN Jie, JU Yong-hui, ZHANG Qiao, ZHENG Yun-feng, CHENG Jian-ming, LI Zhen-lan, CHEN Jun-yan, ZHANG Li

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To comparatively analyze the characteristic components of *Perillae Folium* from different origins. **Methods** Twenty batches of *Perillae Folium* were obtained from three geographical regions. Comparative study on the characteristic components of *Perillae Folium* from three geographical origins was conducted by Cluster analysis combined with UFLC-Q-TOF-MS and muti-component quantification. **Results** The similarity of fingerprints of the 20 batches of herbs was above 0.900, so it was hard to distinguish the different origins of herbs by similarity. Then a total of 21 characteristic peak components were identified by UFLC-Q-TOF-MS analysis coupled with standard compounds information. The content of the main components of six flavonoid glycosides, two phenolic acids and one terpenoid was determined by HPLC. The results showed that there was no significant difference in the content of flavonoid glycosides among the three regions. However, the difference in the content of phenolic acids and perillaldehyde was significant. The content of two phenolic acids which came from Anhui Taihe's samples was significantly higher than those from Guangdong Yingde and Hebei Anguo. In addition, the content of perillaldehyde of Guangdong Yingde was obviously higher than the others. And the cluster analysis could be used to distinguish three geographical regions of *Perillae Folium*. **Conclusion**

收稿日期: 2019-11-03

基金项目: 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心课题 (ZDXM-2-8); 江苏省“六大人才高峰”项目 (2010-YY-009); 江苏高校优势学科建设工程项目 (ysxk-2014); 江苏高校品牌专业建设工程项目 (PPZY2015A070)

作者简介: 李丹阳 (1996—), 硕士研究生, 研究方向为中药检验与质量分析。E-mail: 20181471@njucm.edu.cn

***通信作者** 郑云枫, 副教授, 从事中药活性成分与质量评价研究。Tel: (025)86798186 E-mail: zyunfeng@njucm.edu.cn
张 丽, 教授, 从事中药炮制与质量标准研究。Tel: (025)85811519 E-mail: zhangli@njucm.edu.cn

Qualitative and quantitative analysis of multi-index components could obtain the contents of ingredients and the quality of *Perillae Folium* from different regions, which provides a reference for the quality control and preferred origin of *Perillae Folium*.

Key words: *Perillae Folium*; cluster analysis; UFLC-Q-TOF-MS; characteristic components; caffeic acid; scutellarein-7-*O*-diglucuronide; luteolin-7-*O*-diglucuronide; apigenin-7-*O*-diglucoside; scutellarin; luteolin-7-*O*- β -*D*-glucuronide; apigenin-7-*O*-glucuronide; rosmarinic acid; perilladehyde

紫苏叶为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶(或带嫩枝),性温,味辛,具有解表散寒、行气和胃的功效^[1]。紫苏叶在我国栽培历史悠久,分布广泛,是一种常见的药食同源的植物^[2]。现代药理学研究表明,紫苏叶含有多种化学成分,其中黄酮类、酚酸类及挥发油类为其主要成分,且具有抗癌、抗氧化、抗过敏、抗炎、镇痛等功效^[3-9]。

目前,紫苏叶在医药、食品、化妆品等领域应用广泛^[10],市场需求量大,但由于各个产地土壤、气候与环境等方面的不同,导致紫苏叶药材各类化学成分含量有一定的差异,这给紫苏叶药材的饮片加工、临床应用及资源开发带来了难题。前期胡惠军等^[11]对紫苏叶中咖啡酸、野黄芩苷、迷迭香酸含量进行了研究,张辰露等^[12]对紫苏叶挥发油成分进行了研究,霍丽娜等^[13]对紫苏叶化学成分进行了研究。为了更全面控制紫苏叶药材的质量,本研究从紫苏叶特征成分的角度,采用 HPLC 指纹图谱、UFLC-Q-TOF-MS 及对照品鉴定其化学组分,多成分指标定量结合聚类分析,对紫苏叶的质量进行分析,比较不同产地紫苏叶药材的品质差异,从而为不同产地紫苏叶药材的质量优选提供理论依据,为紫苏叶种植、饮片加工、临床应用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪,2998 PDA 检测器(美国 Waters 公司);AB SCIEX Triple TOFTM 5600 高分辨质谱仪(美国 AB 公司);SCILOGEX

D3024 台式高速微量离心机(美国赛洛捷公司);梅特勒 MS-105DU 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);智能数显恒温电热套(南通市通州畅通电热器厂);KH-500DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);XFB-200 型高速中药粉碎机(吉首市中诚制药机械厂)。

1.2 材料与试剂

野黄芩苷(批号 111842-201709,质量分数为 91.7%)、咖啡酸(批号 110885-201703,质量分数为 99.7%)、迷迭香酸(批号 111871-201706,质量分数为 90.5%)、紫苏醛(批号 111806-201806,质量分数为 95.7%),以上均购自中国食品药品检定研究院;木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸苷(P18M10F88858),购自南京迈博生物科技有限公司,经 HPLC 分析,质量分数为 98%;芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷(JBZ-0975),购自南京金益柏生物科技有限公司,经 HPLC 分析,质量分数为 98%。野黄芩素 7-*O*-二葡萄糖醛酸苷、芹菜素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷,均由实验室自制,经 HPLC 分析,质量分数为 98%;乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司),甲酸(色谱纯,Merck 公司);超纯水(Milli-Q 超纯水系统制备)。

20 批紫苏叶样品分别采集于广东英德、安徽太和、河北安国,具体产地见表 1,由南京中医药大学中药鉴定教研室刘训红教授鉴定为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶。

表 1 紫苏叶样品采集信息

Table 1 Specific information of collected *Perillae Folium*

编号	编号	产地	批号	编号	编号	产地	批号
1	zs01	广东英德市	20180801	11	zs11	广东英德市	20180814
2	zs02	广东英德市	20180802	12	zs12	广东英德市	20180815
3	zs03	广东英德市	20180803	13	zs13	广东英德市	20180818
4	zs04	广东英德市	20180804	14	zs14	广东英德市	20180819
5	zs05	安徽太和县	20180807	15	zs15	广东英德市	20180820
6	zs06	安徽太和县	20180808	16	zs16	河北安国市	20180816
7	zs07	安徽太和县	20180809	17	zs17	河北安国市	20180817
8	zs08	河北安国市	20180901	18	zs18	安徽太和县	20181109
9	zs09	河北安国市	20180812	19	zs19	安徽太和县	20181110
10	zs10	河北安国市	20180813	20	zs20	安徽太和县	20181111

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Hedera ODS-2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈 (A) 和 0.2% 甲酸 (B) 为流动相进行梯度洗脱: 0~30 min, 12%~22% A, 30~60 min, 22%~70% A; 检测波长 330 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI); 质谱扫描正、负离子检测模式; 仪器参数为: 毛细管温度 600 °C, 离子喷雾空载电压 5 500 V/-4 500 V; 去簇电压 100 V/-100 V, 碰撞能量 10 eV/-10 eV; 雾化器: 414 kPa; 辅助加热器: 414 kPa; 气帘气为 276 kPa。Auto-MSn 模式采集一级和二级质谱解离碎片, 质量扫描范围为 m/z 50~1 500。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 取咖啡酸 (CA)、野黄芩素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷 (SD)、木犀草素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷 (LD)、芹菜素-7-*O*-二葡萄糖醛酸苷 (AD)、野黄芩苷 (SC)、木犀草素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷 (LG)、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 (AG)、迷迭香酸 (RA)、紫苏醛 (PE) 对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇适量, 超声溶解, 摇匀, 配制质量浓度分别为 0.10~8.80 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取本品粉末 (过二号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 称定质量, 以 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 13 000 r/min 离心 5 min, 0.22 μm 滤膜滤过, 即得。

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 取紫苏叶样品 1 份, 按“2.1”项与“2.3.2”项下方法制备供试品溶液与分析, 连续进样 6 次。以野黄芩苷峰 (S) 为对照峰, 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积, RSD 均小于 0.53%, 表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批号紫苏叶样品 6 份, 依“2.1”项与“2.3.2”项下方法制备与分析, 以野黄芩苷峰 (S) 为对照峰, 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积, RSD 均小于 2.75%, 表明方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一紫苏叶样品 1 份, 依

“2.1”项与“2.3.2”项下方法制备与分析, 在 0、2、4、6、8、10 h 进样分析, 以野黄芩苷峰 (S) 为对照峰, 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积, RSD 均小于 0.72%, 供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.4.4 紫苏叶药材指纹图谱的建立 分别将各批次紫苏叶药材图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”进行分析, 标定了 10 个共有峰, 并生成紫苏叶药材对照指纹图谱 (R) 及各批次药材指纹图谱, 见图 1。计算各批紫苏叶药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度。结果见表 2。

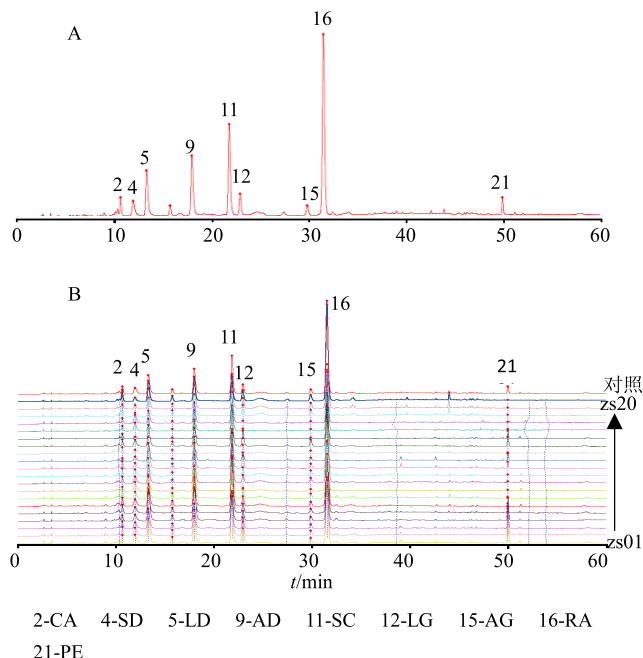


图 1 紫苏叶对照指纹图谱 (A) 及各批次药材指纹图谱 (B)
Fig. 1 Standard fingerprint (A) and different batches of *Perillae Folium* (B)

表 2 紫苏叶指纹图谱相似度

Table 2 Similarity of 20 batches of *Perillae Folium* from different regions

编号	相似度	编号	相似度
zs01	0.966	zs11	0.976
zs02	0.972	zs12	0.869
zs03	0.970	zs13	0.949
zs04	0.953	zs14	0.979
zs05	0.989	zs15	0.958
zs06	0.987	zs16	0.988
zs07	0.992	zs17	0.986
zs08	0.983	zs18	0.962
zs09	0.986	zs19	0.964
zs10	0.986	zs20	0.970

从相似度结果分析, 广东产紫苏叶相似度处于 0.949~0.979, 安徽太和产紫苏叶相似度处于 0.962~0.992, 河北安国产紫苏叶的相似度处于 0.983~0.988, 但这 3 个产区的紫苏叶水溶性成分指纹图谱相似度相差不大; 结果表明, 从相似度角度分析不同产地药材质量的差异性并不显著。

2.5 质谱定性分析

2.5.1 信息采集与数据处理 为了确认不同产地指纹图谱中的特征成分, 按“2.3.1”和“2.3.2”项下方法配制供试品及对照品溶液, 采用 HPLC-MS/MS 结合对照品分析对照, 对紫苏叶样品中的色谱峰进行分析。色谱图见图 2。

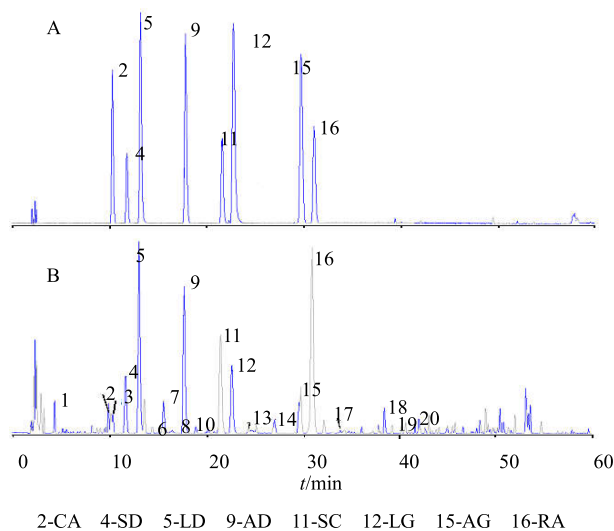


图 2 混合对照品 (A) 及紫苏叶 (B) 的 UFLC-Q-TOF-MS (-) 的 TIC 图

Fig. 2 TIC of UFLC-Q-TOF-MS (-) of mixed standards (A) and extract from *Perillae Folium* (B)

通过 Chemspider、Scifinder 等数据库的检索以及紫苏叶化学成分文献报道, 在 UNIFI™ 软件上建立紫苏叶化学成分数据库, 将采集的数据导入 UNIFI™ 定性分析软件, 对各主要分子离子峰进行识别与校正, 与建立的成分数据库匹配, 确定化合物结构。

2.5.2 结构分析与鉴定 通过对照品分析, 归属峰 2、4、5、9、11、12、15、16 分别为 CA、SD、LD、AD、SC、LG、AG、RA。其他色谱峰依据在一级质谱图 (正、负离子模式) 中准分子离子峰 $[M-H]^-$ 或 $[M+H]^+$ 确定化合物的分子式, 并进一步依据在二级质谱图中糖基或者苷元结构中羧基、羟基等特征分子量的丢失, 同时结合已经建立的目标数据库, 推测色谱峰可能的化合物结构, 相关的质谱信息及化合物分子式分别见表 3。

以峰 17 为例, 在保留时间为 34.053 min, 负离子模式下该化合物的准分子离子峰为 m/z 719.159 9 $[M-H]^-$, 确定其分子式为 $C_{36}H_{32}O_{16}$; 进一步在负离子二级质谱图中, 低能量质谱中可见 m/z 359.077 4, 高能量质谱中可见 m/z 719.162 2 $[M-H]^-$ 及碎片离子 m/z 197.044 9 $[M-H-\text{caffeoyl}]^-$ 、 m/z 135.045 1 $[M-H-\text{caffeoyl}-H_2O-CO_2]^-$; 而结合咖啡酸的二级质谱中, 均可看到 m/z 197.044 9、 m/z 135.045 1 的碎片离子, 并通过导入咖啡酸四聚体 mol 文件, 相似度较高, 故推测为咖啡酸四聚体。

2.6 多指标定量分析

在指纹图谱中 49 min 左右较大的峰通过与对照品比对, 确定为 PE, 由于 PE 极性与结构较小, 挥发性较强, 因此未能在 LC-MS 中检测到, 但是 PE 属于紫苏叶药材的特征性成分, 同时从指纹图谱及 UFLC-Q-TOF-MS (-) 总离子流图中可以看出, CA、SD、LD、AD、SC、LG、AG、RA 这 8 个成分是紫苏叶样品中色谱峰相对较高的成分, 因此选择对这 9 个成分进行定量测定, 综合含量结果分析不同产地紫苏叶的成分及质量的差异性。

2.6.1 溶液制备及色谱条件 依“2.1”项下及“2.3”项下方法同法处理

2.6.2 标准曲线的绘制 取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量, 采用逐级稀释法制备成系列浓度的混合对照品溶液, 分别吸取 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 各对照品浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得各成分回归方程及线性范围, 结果见表 4。由表 4 可知, 9 种黄酮及酚酸类成分在各自线性范围内与其峰面积均呈良好的线性关系。

2.6.3 精密度、重复性和稳定性试验 按照“2.4.1”“2.4.2”“2.4.3”项方法测定各成分质量分数, RSD 值均小于 2.0%。

2.6.4 加样回收率试验 精密称取紫苏叶药材 (批号 20180819) 共 6 份, 各 0.25 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入一定浓度的 CA、SD、LD、AD、SC、LG、AG、RA、PE 对照品混合溶液 5.0 mL, 再加入 50% 甲醇 45 mL, 超声提取 30 min, 补足减失质量, 摇匀, 滤过, 13 000 r/min 离心 5 min, 0.22 μm 滤膜滤过, 依法测定, 计算溶液中各种物质平均加样回收率分别为 95.6%、97.3%、97.9%、96.8%、98.3%、102.2%、99.7%、95.9%、97.1%, RSD 分别为 0.72%、2.70%、1.67%、1.99%、1.69%、1.15%、

表 3 紫苏叶特征组分的成分鉴定

Table 3 Identification of characteristic components in extract of *Perillae Folium*

峰号	t_R/min	$[M-H]^-/[M+H]^+$	分子式	MS/MS 特征离子信息	误差/ $(\times 10^{-6})$	化合物	文献
1	4.6	197.045 6/-	$C_9H_{10}O_5$	179.0, 135.0, 123.0	3.4	丹参素	14
2*	10.4	179.035 0/-	$C_9H_8O_4$	161.0, 135.0	3.2	CA	
3	10.6	593.150 4/-	$C_{27}H_{30}O_{15}$	353.1, 473.1	-1.0	芹菜素-6,8-二葡萄糖苷	15
4*	11.9	637.104 6/-	$C_{27}H_{26}O_{18}$	351.1, 285.0, 193.0	-0.9	SD	
5*	13.3	637.104 6/-	$C_{27}H_{26}O_{18}$	351.1, 285.0, 193.0	-0.9	LD	
6	14.7	195.103 4/-	$C_{11}H_{16}O_3$	59.0, 160.8	3.0	异地茛菪内酯	
7	15.6	-773.192 9	$C_{36}H_{37}O_{19}^+$	287.1, 449.1, 611.1	0	矢车菊素 3-O-咖啡酰葡萄糖-5-O-葡萄糖苷	4
8	16.7	-625.139 9	$C_{27}H_{28}O_{17}$	285.0, 301.1	-1.0	山柰酚-3-葡萄糖醛酸-7-葡萄糖苷	14
9*	18.0	621.109 7/-	$C_{27}H_{26}O_{17}$	351.1, 269.0, 193.0	-0.9	AD	
10	19.4	-757.198	$C_{36}H_{37}O_{18}^+$	287.1, 449.1, 595.1	-0.5	紫苏宁	4
11*	21.8	461.072 6/-	$C_{21}H_{18}O_{12}$	285.0	-1.5	野黄芩苷	
12*	22.9	461.072 6/-	$C_{21}H_{18}O_{12}$	285.0	-1.5	LG	
13	24.7	373.186 1/-	$C_{19}H_{18}O_8$	135.0, 175.0, 197.0	-1.2	迷迭香酸甲酯	16
14	27.3	193.050 6/-	$C_{10}H_{10}O_4$	161.0, 133.0	3.3	阿魏酸	
15*	30.0	445.077 6/-	$C_{21}H_{18}O_{11}$	269.0	-3.2	AG	
16*	31.2	359.077 2/-	$C_{18}H_{16}O_8$	197.0, 161.0, 135.0	-1.6	RA	
17	34.1	719.159 9/-	$C_{36}H_{32}O_{16}$	197.0, 135.0	-1.9	咖啡酸四聚体	14
18	38.7	285.040 5/-	$C_{15}H_{10}O_6$	133.0, 151.0, 175.0	0.2	木犀草素	16
19	39.5	299.055 8/-	$C_{16}H_{12}O_6$	137.0, 199.0, 299.1	-0.2	金圣草黄素	
20	42.3	269.045 6/-	$C_{15}H_{10}O_5$	151.0, 117.0	0.4	芹菜素	16

*与对照品比对

*compared with control

表 4 紫苏叶中 9 种主要特征成分的线性关系

Table 4 Linear relationships of nine characteristic compounds of *Perillae Folium*

成分	标准曲线	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
CA	$Y=53\ 205\ X+95\ 269$	0.999 4	1.6~100.0
SD	$Y=11\ 622\ X+26\ 669$	0.999 0	3.2~205.8
LD	$Y=17\ 063\ X+13\ 240$	0.999 8	2.5~156.8
AD	$Y=21\ 825\ X+90\ 833$	0.999 0	4.6~294.0
SC	$Y=23\ 339\ X+52\ 385$	0.999 7	4.3~275.1
LG	$Y=13\ 264\ X+7\ 977$	0.999 8	2.3~150.0
AG	$Y=29\ 297\ X+15\ 290$	0.999 7	1.6~100.0
RA	$Y=22\ 547\ X+93\ 993$	0.999 3	5.5~353.0
PE	$Y=3\ 590\ X+8\ 447$	0.999 7	13.8~843.7

1.44%、1.04%、2.66%。

2.6.5 不同产地多指标含量测定 取 20 批不同产地紫苏叶药材,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL ,注入液相色谱仪测定,并以标准曲线分别计算不同地区紫苏叶药材中 9 个成分含

量,并运用 GraphPad Prism 7.00 对 3 个不同产地的 3 组样品中 6 个黄酮苷、2 个酚酸及 1 个单萜的含量进行汇总,并对同类成分总含量进行单因素方差分析,显著性以 $P<0.01$ 表示。

结果显示,对于黄酮苷类成分,广东英德与安徽太和地区紫苏叶的 LD、LG、AG 含量高于河北安国,但整体差距不大;对于酚酸类成分,广东英德与河北安国地区的紫苏叶药材中 CA、RA 成分含量明显低于安徽太和紫苏叶药材,而单萜成分 PE,则安徽太和 PE 含量较低,广东英德的含量反而较高(表 5)。3 个产地紫苏叶药材黄酮苷类成分总含量差异并不明显,呈现出安徽太和>广东英德>河北安国的趋势,而酚酸类成分总含量各个产地差异显著,安徽太和紫苏叶酚酸总含量明显高于广东英德及河北安国的酚酸含量($P<0.01$),对于 PE 成分含量,则具有与酚酸类成分含量相反的结果,广东英德 PE 含量明显高于安徽太和及河北安国($P<0.01$)。如图 3 所示。

2.6.6 聚类分析 采用系统聚类法,以 20 批紫苏

表 5 不同产地紫苏叶药材中 9 种特征成分的含量

Table 5 Content of nine characteristic compounds in *Perillae Folium* from different regions

产地	黄酮苷类/(mg·g ⁻¹)						酚酸类/(mg·g ⁻¹)		单萜类/(mg·g ⁻¹)
	SD	LD	AD	SC	LG	AG	CA	RA	PE
广东英德	0.42±0.21	0.92±0.44	0.79±0.39	0.93±0.37	0.56±0.25	0.09±0.04	0.25±0.07	1.71±0.67	2.44±1.30
河北安国	0.65±0.04	0.69±0.15	0.80±0.15	1.33±0.17	0.11±0.03	0.06±0.05	0.22±0.05	2.33±0.50	0.49±0.12
安徽太和	0.35±0.16	0.95±0.11	0.82±0.10	1.20±0.54	0.53±0.03	0.12±0.02	0.40±0.06	3.77±0.29	0.62±0.16

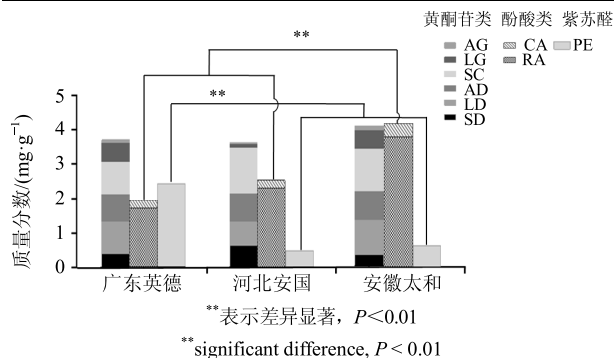


图 3 不同产地紫苏叶药材中不同类型成分总含量

Fig. 3 Total content of different types of components in *Perillae Folium* from different regions

叶药材的 9 个被测物含量为变量, 利用 SPSS 19.0 统计学软件, 采用组间连接, 区间为 Pearson 相关性, 对不同产地紫苏叶药材进行聚类分析, 当类间距大于 12 时, 20 批紫苏叶药材可以较好地分为 2 大类, 第 1 类为广东英德地区紫苏叶, 第 2 类为安徽太和和河北安国地区紫苏叶。当类间距大于 4 时, 安徽太和地区紫苏叶与河北安国地区紫苏叶能够较好地地区分开。聚类分析结果表明, 3 个产地的药材有明显的地域性差异, 可以大致分为 3 类, 广东英德紫苏叶、安徽太和紫苏叶及河北安国紫苏叶, 其中编号为 zs15 的广东英德紫苏叶药材未与其他广东英德产紫苏叶形成聚类, 根据含量测定结果, 与该产地其他紫苏叶相比, 该批次紫苏药材的 SD、LD、LG、AG 这 4 种成分含量较低, 可能与其采收期不同有关, 这可能是造成 zs15 批次紫苏叶未与该产地其他批次紫苏叶形成聚类的原因。

3 讨论

紫苏叶的使用历史悠久, 具有较高的营养价值和药用价值^[17]。不同产地的药材, 其中主要化学成分的含量也具有一定的差异, 由于化学成分与其功效息息相关, 所以对紫苏叶主要化学成分进行全面系统分析, 可为紫苏叶药材控制质量提供重要的参考, 同时也对紫苏叶的饮片加工、临床应用、资源

开发等方面也具有重要的意义。

尽管指纹图谱是目前药材质量控制的常用方法, 但从本研究中可以看出, 单一指纹图谱相似度分析并不能明显区分不同产地紫苏叶的质量差异, 而采用多成分含量为指标的聚类分析法则能够较好地地区分不同产地紫苏叶药材质量。从不同产地药材各类型成分含量对比分析来看, 3 个产地黄酮苷类成分总含量区别不大; 酚酸类成分与 PE 成分差异较为明显。文献表明, 药材中次生代谢产物不仅与药材产地、环境、气候等因素相关^[18], 同时也会受到药材产地加工及储存条件的影响^[19], 由于紫苏叶中酚酸类成分 (RA 等) 及挥发性成分 PE 的稳定性较差^[20], 导致不同产区药材中这 2 类成分含量差异明显, 后续还需要作进一步深入的研究。

本研究通过考察不同体积分数甲醇及水回流提取方式, 发现其不同浓度甲醇及水回流提取对色谱峰数目无显著影响, 但从主要色谱峰的峰面积来分析, 50% 甲醇提取时指纹图谱中主要色谱峰的峰面积相对较大, 能够较好地全面反映药材中各成分信息, 并且超声提取的条件更易控制, 指纹图谱的均一性更好, 因此选择以 50% 甲醇水溶剂进行提取。

紫苏叶野生资源丰富, 栽培历史和栽培类型多样, 且在临床、食品工业等领域应用广泛, 具有很高的市场价值和经济价值。但由于不同产地药材受不同地理环境、生物学因素及人为因素^[21], 导致不同产地的紫苏叶质量参差不齐, 阻碍了对紫苏叶的开发利用。因此对不同产地紫苏叶多成分进行考察分析, 对于把控紫苏叶药材质量, 促进紫苏叶的产业化发展至关重要。本实验通过对不同产地紫苏叶中多成分定性、定量分析, 得到各产地紫苏叶药材的成分含量及质量状况, 为紫苏叶药材优选产地提供了参考依据, 促进了紫苏叶资源的进一步开发和利用。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

- [2] Yu H, Qiu J F, Ma L J, *et al.* Phytochemical and phytopharmacological review of *Perilla frutescens* L. (Labiatae), a traditional edible-medicinal herb in China [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 108: 375-391.
- [3] Banno N, Akihisa T, Tokuda H, *et al.* Triterpene acids from the leave of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effect [J]. *Biosci Biotechnol Biol*, 2004, 68(1): 85-90.
- [4] Yan K H, You Y Y, Ya N C. Characterization of anthocyanins in *Perilla frutescens* var. *acuta* extract by advanced UPLC-ESI-IT-TOF-MSⁿ method and their anticancer bioactivity [J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 9155-9169.
- [5] 祝一叶. 紫苏叶水提物对阿霉素诱导 HK-2 细胞氧化损伤的保护及机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [6] Makino T, Furuta Y, Wakushima H, *et al.* Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(3): 240-243.
- [7] Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(9): 1197-1202.
- [8] Ahmed H. Ethnomedicinal, Phytochemical and pharmacological investigations of *Perilla frutescens* (L.) Britt. [J]. *Molecules*, 2018, 24(1): 102-109.
- [9] Chen C Y, Leu Y L, Fang Y, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Perilla frutescens* in activated human neutrophils through two independent pathways: Src family kinases and calcium [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18204.
- [10] Sato-Masumoto N, Ito M. Two types of alcohol dehydrogenase from *Perilla* can form citral and perillaldehyde [J]. *Phytochemistry*, 2014, 104: 12-20.
- [11] 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, 36(4): 80-84.
- [12] 张辰露, 梁宗锁, 吴三桥, 等. 不同方法提取紫苏叶挥发油成分 GC-MS 分析 [J]. 中药材, 2016, 39(2): 337-341.
- [13] 霍立娜, 王 威, 刘 洋, 等. 紫苏叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 26-31.
- [14] 陈永康, 赵志刚, 孙丽娟. 液相色谱-飞行时间质谱法快速鉴定紫苏叶中的化学成分 [J]. 医药导报, 2013, 32(3): 371-374.
- [15] 张桂清, 杨宇森, 许艺敏, 等. 采用高分辨离子淌度液质联用技术鉴定紫苏的化学成分 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2019, 48(1): 123-130.
- [16] Guan Z, Li S, Lin Z, *et al.* Identification and quantitation of phenolic compounds from the seed and pomace of *Perilla frutescens* using HPLC/PDA and HPLC-ESI/QTOF/MS/MS [J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25(6): 508-513.
- [17] 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.
- [18] 张琛武, 李卫萍, 郭宝林, 等. 紫苏醛型紫苏不同种质中紫苏醛含量变化规律研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(12): 1722-1727.
- [19] 倪新兴. 中药材品质影响因素研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [20] 申 琳, 许桂玲, 郝 福, 等. 一测多评法测定丹酚酸 A 原料药中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 C [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 32-36.
- [21] 闫 丹, 江敏瑜, 王云红, 等. 一测多评法在玄参药材质量控制中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4892-4898.