

不同品种紫苏叶迷迭香酸的提取及其生物活性

任志清, 李会珍, 张志军, N. Vasudeva Reddy, 赵亚娜, 李河

(中北大学化学工程与技术学院, 山西太原 030051)

摘要: 以 45 个不同品种紫苏叶为原料, 通过超声辅助水提法制备紫苏迷迭香酸, 选取迷迭香酸含量高的三个品种利用 XDA-8 型大孔树脂和中压制备色谱分离纯化, 采用体外抗氧化的方法研究紫苏迷迭香酸对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力, 并通过测定抑菌圈直径比较抑菌能力。结果表明: 45 个不同品种紫苏叶粗提物中迷迭香酸含量有显著差异, 其中 ZY7-1、ZB3、DZ-1 粗提物中迷迭香酸含量最高, 分别为 7.87%、7.34%、7.32%; DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别为 85.18、87.22 和 88.45 $\mu\text{g/mL}$, 且迷迭香酸含量与提取物的抗氧化能力呈显著正相关 ($p < 0.05$)。纯化后迷迭香酸含量分别提高到 59.28%、54.41%、51.13%, 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别为 15.03、19.08、20.91 $\mu\text{g/mL}$, 清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 值分别为 26.57、33.11、36.59 $\mu\text{g/mL}$; 并检测其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌生长的抑制能力, 呈现不同的抑菌能力, 且随着浓度增加, 抑菌作用越明显, ZY7-1 和 ZB3 对金黄色葡萄球菌最大抑菌圈直径为 12.50 mm、11.80 mm; DZ-1 对枯草芽孢杆菌最大抑菌圈直径为 12.40 mm。

关键词: 紫苏; 迷迭香酸; 纯化; 抗氧化性; 抑菌性

文章编号: 1673-9078(2021)01-92-100

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.01.0649

Extraction of Rosmarinic Acid from Different Varieties of *Perilla* Leaves and Its Biological Activity

REN Zhi-qing, LI Hui-zhen, ZHANG Zhi-jun, N. Vasudeva Reddy, ZHAO Ya-na, LI He

(College of Chemical Engineering and Technology, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: Forty-five different varieties of *Perilla* leaves were used as raw materials, the *Perilla* rosmarinic acid was prepared by ultrasonic-assisted water extraction. Three varieties with high rosmarinic acid content were selected and purified by XDA-8 type macroporous resin and medium pressure preparative chromatography. The scavenging ability of DPPH free radicals and ABTS free radicals were tested. The bacteriostatic ability was compared by measuring the diameter of the bacteriostatic zone. The results showed that there were significant differences in the rosmarinic acid content in the crude extracts of 45 different varieties of *Perilla* leaves. Among them, the crude extracts of ZY7-1, ZB3 and DZ-1 had the highest rosmarinic acid content, 7.87%, 7.34% and 7.32% respectively. The IC_{50} values of DPPH free radicals were 85.18, 87.22 and 88.45 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and the content of rosmarinic acid was significantly positively correlated with the antioxidant capacity of the extract ($p < 0.05$). After purification, the content of rosmarinic acid increased to 59.28%, 54.41% and 51.13%, respectively. The IC_{50} values for removing DPPH free radicals were 15.03, 19.08, 20.91 $\mu\text{g/mL}$, the IC_{50} values of scavenging ABTS free radicals were 26.57, 33.11, 36.59 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The inhibitory ability against the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* was tested, showing different antibacterial ability, and as the concentration increases, the antibacterial effect is more obvious. The maximum diameter of ZY7-1 and ZB3 against *Staphylococcus aureus* is 12.50 mm and 11.80 mm, respectively; the maximum diameter of DZ-1 against *Bacillus subtilis* is 12.40 mm. Conclusion: the content of rosmarinic acid in different varieties of *Perilla* is different. The crude extracts of ZY7-1, ZB3 and DZ-1 with the highest rosmarinic acid content are selected for purification to obtain high-content rosmarinic acid for biological activity

引文格式:

任志清,李会珍,张志军,等.不同品种紫苏叶迷迭香酸的提取及其生物活性[J].现代食品科技,2021,37(1):92-100

REN Zhi-qing, LI Hui-zhen, ZHANG Zhi-jun, et al. Extraction of rosmarinic acid from different varieties of perilla leaves and its biological activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 92-100

收稿日期: 2020-07-12

基金项目: 山西省重点研发计划项目 (201803D31060); 山西省重点研发计划重点项目 (201703D211005)

作者简介: 任志清 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源开发利用

通讯作者: 李会珍 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 植物资源开发利用

detection, which shows that they have good antioxidant and antibacterial properties.

Key words: *Perilla*; rosmarinic acid; purification; antioxidant activity; antibacterial activity

紫苏 (*Perilla frutescens* L.) 属于薄荷属唇形科植物, 广泛分布于中国、日本、韩国、印度和其他东南亚国家, 在中国紫苏被当作油料作物种植, 并被用于保健品和医药品方面的开发^[1,2]。紫苏叶中含有多种酚类化合物, 例如迷迭香酸、咖啡酸、原儿茶酸、绿原酸及其衍生物, 其中迷迭香酸含量最高^[3,4]。迷迭香酸是一种水溶性多酚类化合物, 具有较强的清除自由基的活性, 同时具有抗炎、抑菌、抗肿瘤等功效。紫苏叶是抗氧化剂的重要来源, 它有助于减少自由基对人体的损伤, 能够降低脂质过氧化和减少不良胆固醇, 从而有助于血液的健康循环^[5-7]。

据报道, 紫苏叶提取物中主要有迷迭香酸及其三种衍生物, 包括迷迭香酸甲酯, 迷迭香酸-3-O-葡萄糖苷和 3'-O-脱羟-迷迭香酸-3-O-葡萄糖苷^[8,9]。迷迭香酸的抗氧化能力强于维生素 E, 并且迷迭香酸能与脂质过氧基结合, 从而降低脂质过氧化。迷迭香酸因其较强的抗氧化能力, 在食品领域具有很好的应用市场^[10], 迷迭香酸能够通过增强膜的通透性来抑制细菌和真菌的生长代谢^[11]。目前, 已经利用紫苏提取物研制出的药品、化妆品、饮料、食用油等产品^[12,13], 被广泛用于治疗抑郁症^[14]、过敏、哮喘、咳嗽和蛀牙^[15,16]。

随着人们生活水平的提高, 消费者更加追求优质食品, 因此提高食品营养价值和延缓食品的氧化所导致的腐败就成为研究的热点。作为一种天然抗氧化剂, 迷迭香酸可以延缓食品氧化, 提高食品稳定性^[17], 例如已经应用于沙棘果酒的发酵^[18]; 此外, 它还具有抗菌活性, 可以很好地代替化学合成型防腐剂, 用于食品保鲜防腐^[19], 在食品领域具有广阔的市场前景和现实意义^[20]。目前, 对于不同品种紫苏叶中迷迭香酸在食品方面的研究较少, 本文主要研究不同品种紫苏叶中迷迭香酸含量及其抗氧化性和抑菌性, 以期天然抗氧化产品和食品防腐的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料: 紫苏叶, 不同紫苏品种由课题组按产地命名编号, 均种植于中北大学试验田, 清洗叶片表面, 于无阳光直射且通风处阴干至恒重, 粉碎过 80 目筛, 保存备用, 45 个紫苏品种信息见表 1。

试剂: 迷迭香酸标品 (HPLC 级, ≥98%): 成都普菲德生物技术有限公司; DPPH (1,1-二苯基-2-三硝

基苯肼): 美国 Sigma 公司; ABTS (2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸): 美国 Sigma 公司; XDA-8 大孔树脂: 天津欧瑞生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

表 1 紫苏品种信息表

Table 1 Information of *perilla* variety

序号	编号	原产区	序号	编号	原产区
1	ZB1	山西	24	ZY7-2	山西
2	ZB4	山西	25	ZY7-1	山西
3	GS	甘肃	26	CLX-2	山西
4	SDH	山东	27	CR1	澳大利亚
5	SY	山西	28	ZY10	山西
6	CZ	山西	29	ZY10T	山西
7	ZY10-1	山西	30	DZ	山西
8	DZ-1	山西	31	ZB3-1	山西
9	CZ2	山西	32	CLX	山西
10	SDB	山东	33	PXI	山西
11	XL	山东	34	YN	云南
12	ZB4-1	山西	35	ZY10T-1	山西
13	YX3	山西	36	TS	重庆
14	ZY7	山西	37	YX2	山西
15	ZQ	山西	38	XL-1	山东
16	HB	河北	39	XL-2	山东
17	QY	山西	40	LN	辽宁
18	ZB2	云南	41	HLJ	黑龙江
19	ZB2-3	云南	42	JL	吉林
20	SDB-1	山东	43	HN	湖南
21	CLX-1	山西	44	SDY-1	山东
22	ZB3	山西	45	SDY-2	山东
23	ZB3-2	山西			

1.2 仪器与设备

BJ-400 型高速多功能粉碎机: 北京普朗新技术科学仪器有限公司; SB-5200 DTDN 超声波清洗机: 宁波新芝生物科技股份有限公司; TDL-5-A 高速离心机: 上海安亭科学仪器厂; RE-52 AA 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; 中压制备液相色谱 (配有二元溶剂输送泵、UV 检测器、自动馏份收集器): 瑞典 Biotage 公司; Agilent 1260 高效液相色谱 (Zorbax Eclipse XDA-C18 150×4.6 mm, 5 μm column): 美国 Agilent 公司; SPX-150 B-Z 生化培养箱: 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; LDZX-75 KBS 立式压力蒸汽灭菌器:

上海申安医疗器械厂; 7220 N 可见分光光度计; 上海菁华科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 紫苏叶水提物的制备

参考薛姣^[21]的方法并进一步优化制备紫苏叶活性物质。分别称取不同品种紫苏叶粉末 20.00 g, 按照料液比 1:20 加入蒸馏水, 超声功率为 300 W, 超声温度为 45 ℃, 提取 30 min。提取完成后 5000 r/min, 离心 15 min, 取上清液真空减压浓缩, 浓缩液经冷冻干燥, 得到紫苏叶提取物, 4 ℃ 保存备用。

1.3.2 迷迭香酸含量的测定

参考李荣贵等^[22]的方法测定紫苏叶提取物中迷迭香酸的含量。精确称取 1.00 mg 迷迭香酸标准品, 溶于 10 mL 乙醇中, 经稀释得到不同浓度的标准品溶液。配制 5 mL 反应体系: 4 mL 0.10 mol/L NaAc 缓冲液 (pH 为 6.0), 0.03 mL 0.2 mol/L 现配 FeSO₄ 溶液, 0.2 mL 样品溶液, 0.77 mL 蒸馏水, 充分混匀, 室温暗反应 5 min, 在 568 nm 下测其吸光度值。以迷迭香酸的浓度、吸光度值分别为横、纵坐标, 绘制迷迭香酸的标准曲线方程为: $y=0000.4x+0.001$, 相关系数 $R^2=0.9993$, 可知吸光度值与迷迭香酸含量有极好的线性关系。样品溶液采用同样的方法测定其吸光度, 根据标准曲线计算迷迭香酸含量, 每个样品重复三次, 取平均值。计算公式如下:

$$\text{迷迭香酸含量}/\% = \frac{\text{迷迭香酸浓度 (mg/mL)}}{\text{样品浓度 (mg/mL)}} \times 100\%$$

1.3.3 大孔树脂柱色谱纯化紫苏迷迭香酸

参考薛姣^[23]的方法经进一步优化。选用 XDA-8 型大孔树脂湿法装柱, 柱体积为 25 mL, 将样品配制成 5.00 mg/mL 的溶液进行上样, 吸附流速为 2.00 BV/h, 当流出液的浓度为上样浓度的 1/10 时停止上样; 先用盐酸水溶液 (pH 3.0) 进行洗脱, 至流出液无色时停止洗脱, 最后用 70% 乙醇进行洗脱, 洗脱流速为 1.00 BV/h, 洗脱剂用量 12 BV, 分段收集, 当洗脱液的浓度保持不变时, 停止洗脱, 收集合并洗脱液, 45 ℃ 烘 24 h 得紫苏水提物, 备用。

1.3.4 中压制备色谱富集紫苏迷迭香酸

配制迷迭香酸浓缩液上样, 以体积分数为 0.1% 的冰乙酸 (A) 和甲醇 (B) 为流动相, 检测波长为 320 nm。按表 2 中条件进行洗脱, 根据色谱峰收集流份。

将洗脱液通过 HPLC 进一步检测其主要成分, 流动相同上, 进样量 10 μL, 流速 1 mL/min, 柱温: 35 ℃, 进样程序见表 3。

表 2 中压制备色谱洗脱梯度

Table 2 The elution gradient of medium-pressure liquid chromatography

时间/min	流动相 B 比例/%
0~15	5~55
15~35	55~80
35~50	80
50~55	80~90

表 3 HPLC 进样程序

Table 3 Sample injection procedure of HPLC

时间/min	流动相 B 比例/%
0~5	20~40
5~10	40~55
10~15	55~60
15~20	60~65
20~25	65~70
25~30	70~60
30~35	60~55
35~40	55~50

1.3.5 紫苏迷迭香酸抗氧化能力的测定

对纯化后样品进行抗氧化性测定。按照 Shimada 等^[24]的实验方法测定 DPPH 自由基的清除能力, 在 3 mL 体系中分别加 1 mL 不同浓度样品溶液 (20.00、40.00、60.00、80.00、100.00 μg/mL) 和 2 mL 1.00 mmol/mL DPPH 自由基溶液, 充分混匀 3 min, 室温暗反应 30 min 后, 以无水甲醇为参比, 在 517 nm 处测定样品吸光度 A_s , 同时测定 DPPH 自由基溶液的吸光度 A_c , 每个浓度重复 3 次, 取平均值。计算清除率公式如下:

$$Y/\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

根据 Re 等^[25]的方法测定紫苏迷迭香酸清除 ABTS 自由基的能力。将 7.00 mmol/mL ABTS 自由基溶液添加到 2.45 mmol/mL 过硫酸钾中, 在黑暗中反应 12~16 h, 直到吸光度稳定为止。该 ABTS 自由基阳离子溶液用 70% 乙醇稀释至在 734 nm 处的吸光度为 0.02~0.07。将 0.9 mL 的该溶液添加到 0.1 mL 的待测样品溶液 (20.00、40.00、60.00、80.00 和 100.00 μg/mL) 中, 并充分混合 45 s。将反应溶液在黑暗中反应 15 min, 然后在 734 nm 处测定样品吸光度 A_t 。同时测定 ABTS 溶液吸光度值 A_c , 每个浓度重复 3 次, 取平均值。清除率计算公式如下:

$$Y/\% = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100\%$$

1.3.6 紫苏迷迭香酸抑菌能力的测定

滤纸片法测定抑菌圈选取迷迭香酸含量最高的三个品种进行抑菌性研究,将迷迭香酸配制成 1.25、2.50、5.00 mg/mL 溶液,以 5% 苯甲酸钠为阳性对照。将大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌分别于 LB 液体培养基中活化,当吸光度值达到 0.2~0.4 时用生理盐水将其稀释成一定浓度的菌悬液。向每个加有固体培养基的平板各加入 100 μ L 的菌悬液,涂布均匀后,于平板中等距放入 4 个直径为 6.00 mm 无菌滤纸片,分别在滤纸片上滴加 15 μ L 待测溶液,将平板于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中倒置培养 24 h,测量其抑菌圈直径^[26],每次试验做三个平行。

1.3.7 数据处理

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行方差统计分析 (LSD, $p < 0.05$),除有特殊说明外,试验均进行 3 次平行试验,结果以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示;采用 Origin 8.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 紫苏叶片迷迭香酸含量与清除 DPPH 自由基能力测定

不同品种紫苏叶中迷迭香酸的含量如图 1 所示,方差分析结果 F 值为 282.79, p 值为 0.04<0.05,所以不同品种紫苏叶提取物中迷迭香酸的含量具有显著性差异。由图 1 可得不同紫苏提取物中迷迭香酸含量变化范围为 4.69%~7.87%,ZY7-1、ZB3、DZ-1 粗提取物中迷迭香酸含量最高,分别为 7.87%、7.34%、7.32%。含量最低的是 HB,为 4.69%,仅为 ZY7-1 的 0.59 倍。

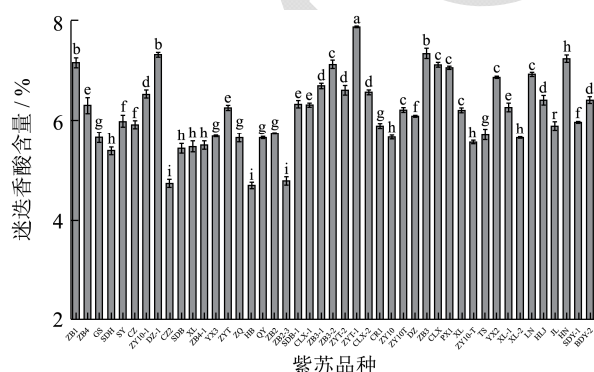


图 1 不同品种紫苏叶中迷迭香酸的含量

Fig.1 Content of rosmarinic acid in leaves of different varieties of *Perilla*

注: 不同字母表示各样品间存在显著的差异性 ($p < 0.05$, $n=3$), 下图同。

图 2 所示为不同品种紫苏粗提取物清除 DPPH 自

由基的 IC_{50} , F 值为 2430.94, p 值为 0.01<0.05,所以不同品种间紫苏叶提取物对 DPPH 自由基的清除率也具有显著差异,由图知 ZY7-1、ZB3、DZ-1 粗提取物对 DPPH 自由基的清除能力最强, IC_{50} 值分别为 85.18 μ g/mL、87.22 μ g/mL 和 88.45 μ g/mL,而 ZY10T 的清除能力最弱, QY 次之, IC_{50} 分别为 110.36、105.86 μ g/mL。

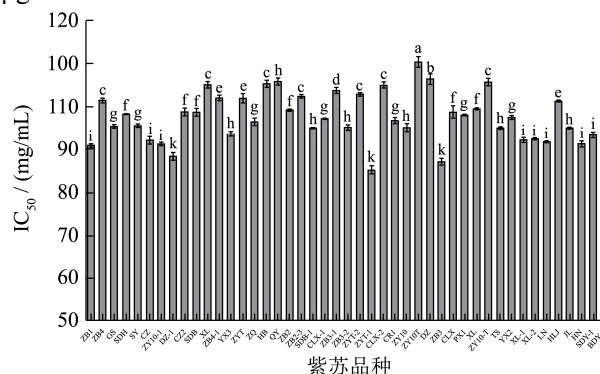


图 2 不同品种紫苏迷迭香酸清除 DPPH 自由基的 IC_{50}

Fig.2 The IC_{50} of different varieties of *Perilla rosmarinic acid* in scavenging DPPH free radicals

利用 SPSS Statistics 对迷迭香酸含量与 DPPH 自由基清除率进行相关性分析 (图 3),根据建立的模型得回归方程为 $y=10.1546x+0.7711$, 相关系数 R^2 为 0.9963,呈显著正相关 ($p < 0.05$),故选取这三个品种进行后续纯化试验。

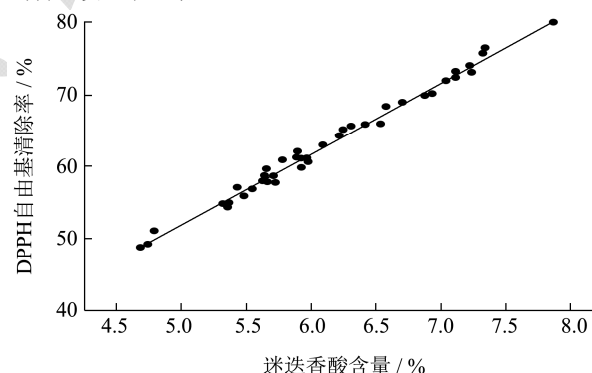


图 3 紫苏迷迭香酸含量对提取物清除 DPPH 自由基能力的影响

Fig.3 Effect of rosmarinic acid on DPPH free radical scavenging ability of *Perilla* extract

2.2 迷迭香酸的富集纯化

经大孔树脂纯化后, ZY7-1、ZB3、DZ-1 提取物中迷迭香酸含量分别提高到 37.30%、32.65%、32.02%。将纯化后样品通过中压制备色谱进行再次分离纯化,经多次实验调整洗脱程序和参数,优化洗脱工艺,确定上样量为 1 mL,上样浓度为 5 mg/mL,洗脱流速为 15 mL/min,当流速大于 15 mL/min 时色谱峰会出现拖尾现象。

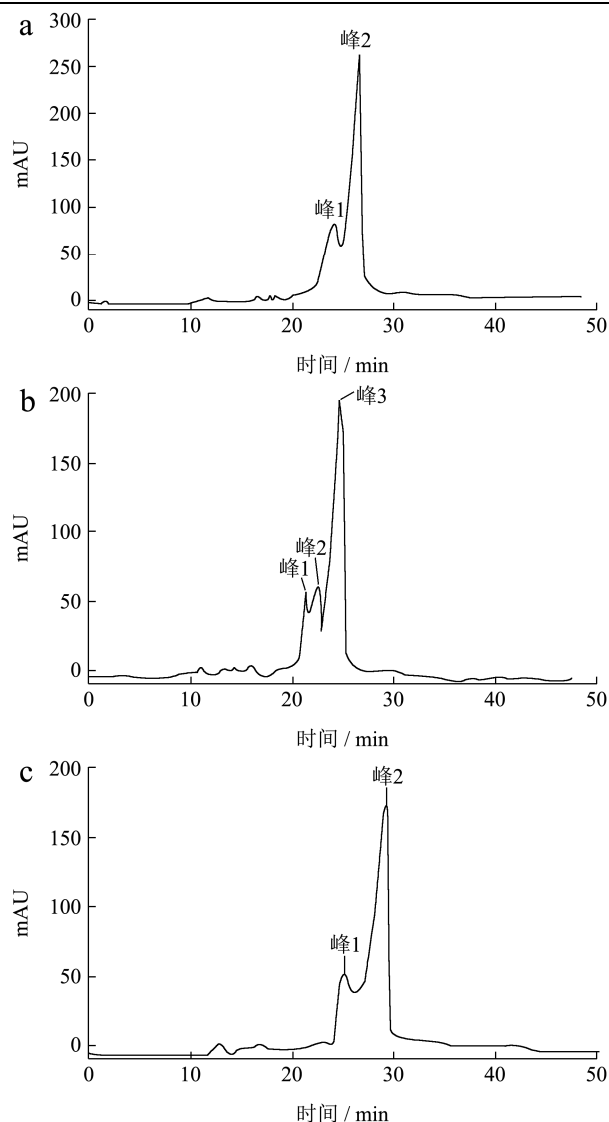


图4 紫苏提取物的中压制备色谱图

Fig.4 Chromatogram of medium-pressure preparation of rosmarinic acid standard and *Perilla* extract

注: a: ZY7-1; b: ZB3; c: DZ-1。

图4分别为三种紫苏迷迭香酸的色谱图,收集图中ZY7-1峰2、ZB3峰3、DZ-1峰2的洗脱液,测定迷迭香酸含量分别为: 59.28%、54.41%、51.13%,同时测定多酚含量为 76.62%、72.13%、70.43%,其中迷迭香酸分别占 77.36%、75.43%、72.59%。

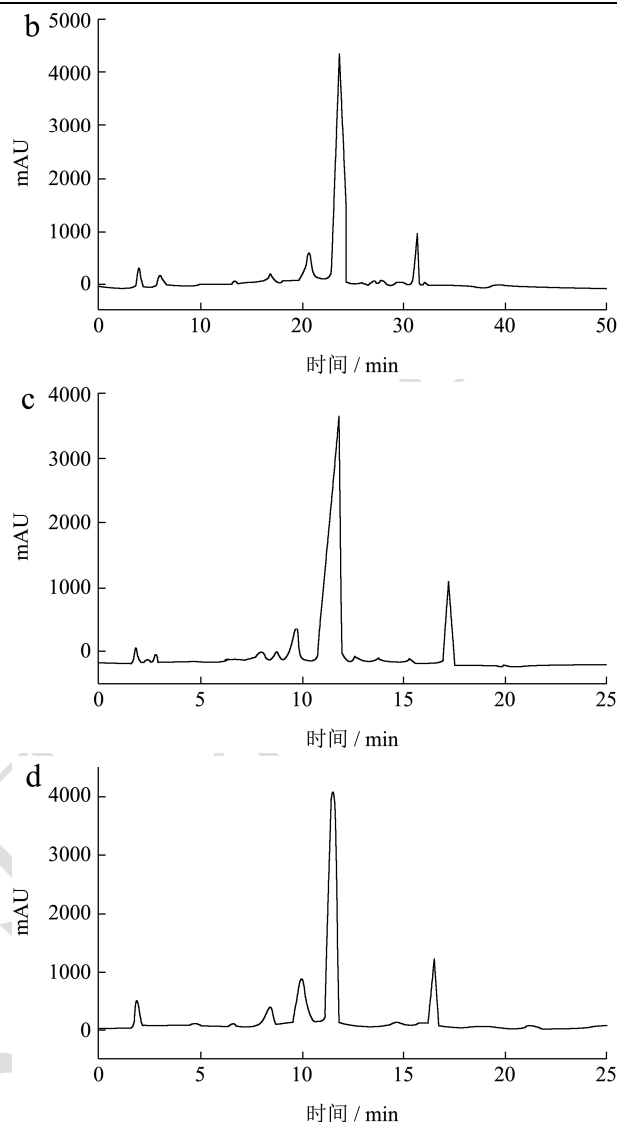
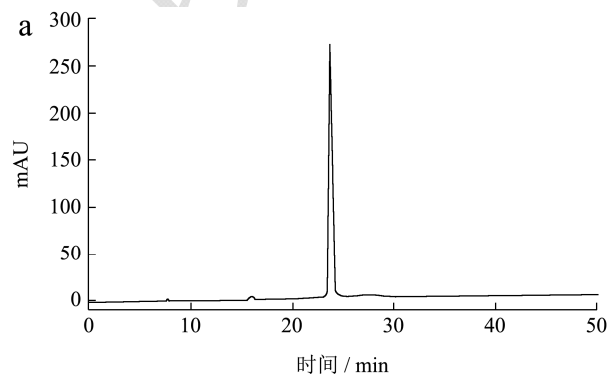


图5 迷迭香酸标准品与洗脱液的HPLC图

Fig.5 HPLC of rosmarinic acid standard and eluent

注: a: 迷迭香酸标准品; b: ZY7-1峰2; c: ZB3峰3; d: DZ-1峰2。

进一步通过 HPLC 检测物质成分,结果如图5,与迷迭香酸标准品对照可知该流分主要物质为迷迭香酸。

2.3 紫苏叶迷迭香酸抗氧化能力的测定

2.3.1 紫苏迷迭香酸对 DPPH 自由基的清除能力

DPPH 能够提供稳定的自由基,当反应体系中存在抗氧化物质时,溶液体系颜色逐渐变浅,从而根据吸光度值的大小可测定物质的抗氧化能力^[27,28]。迷迭香酸标准品做阳性对照,由图6可知,纯化后的三个紫苏迷迭香酸对 DPPH 自由基的清除率均随浓度的增加而增大,当达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,清除率基本保持不变。当浓度为 120.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,迷迭香酸标准品、

ZY7-1、ZB3、DZ-1 对 DPPH 自由基清除率分别为 94.25%、89.82%、82.65%、79.12%， IC_{50} 值分别为 9.12、15.13、19.08、20.91 $\mu\text{g/mL}$ ，因此可知三个品种紫苏迷迭香酸均具有一定的清除 DPPH 自由基的能力。

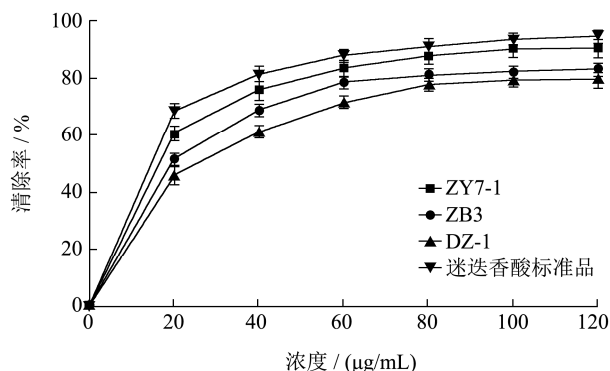


图 6 三个品种紫苏迷迭香酸对 DPPH 自由基的清除率

Fig.6 Scavenging rate of DPPH free radical by rosmarinic acid of three *Perilla* varieties

2.3.2 紫苏迷迭香酸对 ABTS 自由基的清除能力

利用 ABTS 法测定物质抗氧化性时，ABTS 经过硫酸钾氧化后产生稳定的蓝绿色物质-ABTS 自由基，当反应体系存在抗氧化剂时，会与 ABTS 自由基结合，使溶液颜色变浅^[29]。图 7 结果显示随着浓度的增加三个样品对 ABTS 自由基的清除率逐渐增大，但低于迷迭香酸标准品的清除率，当浓度为 120.00 $\mu\text{g/mL}$ 时，迷迭香酸标准品、ZY7-1、ZB3、DZ-1 对 ABTS 自由基清除率分别为 95.63%、87.08%、81.99%、80.23%。 IC_{50} 值分别为 18.34、26.57、33.11、36.59 $\mu\text{g/mL}$ ，故三个品种紫苏迷迭香酸均对 ABTS 自由基有一定的清除能力。

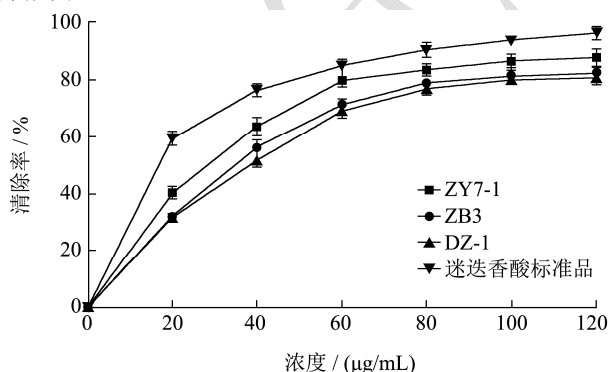


图 7 三个品种紫苏迷迭香酸对 ABTS 自由基的清除率

Fig.7 Scavenging rate of ABTS free radical by rosmarinic acid of three *Perilla* varieties

2.3.3 迷迭香酸含量与紫苏叶提取物抗氧化性的相关性

从 45 个品种选取 10 个迷迭香酸含量较高的品种比较其清除不同自由基的 IC_{50} 。从图 8 可以看出，紫

苏叶提取物中迷迭香酸含量与清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基的 IC_{50} 呈极显著负相关 ($p < 0.01$)，迷迭香酸含量越高， IC_{50} 越小，其清除自由基能力越强，表明迷迭香酸是紫苏叶提取物清除自由基的主要有效成分之一。

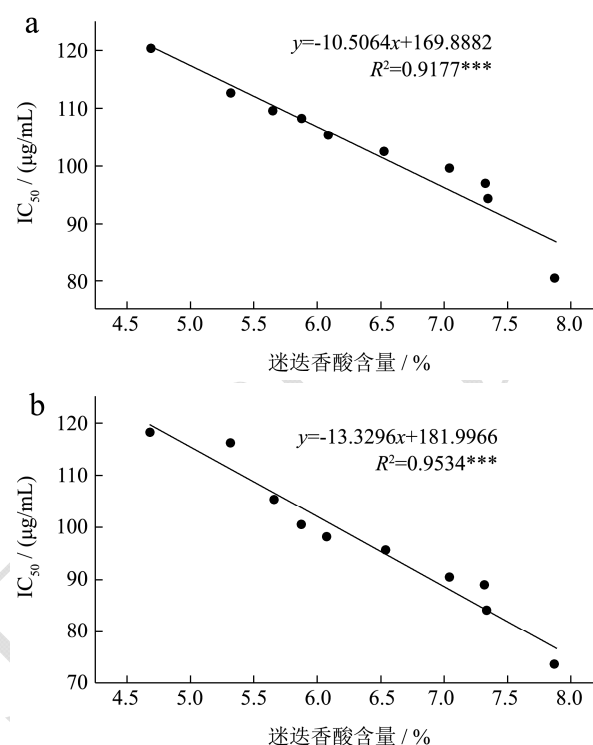


图 8 迷迭香酸含量与清除 DPPH 自由基 (a)、ABTS 自由基 (b) IC_{50} 的相关性

Fig.8 Correlation between rosmarinic acid content and scavenging DPPH free radical (a), ABTS free radical (b) IC_{50}

2.4 紫苏迷迭香酸抑菌性的测定

紫苏迷迭香酸对三种供试菌种的抑菌圈直径见表 4，图 9 是呈现了三个品种紫苏迷迭香酸对三种不同供试菌的抑制效果。

表 4 可知，不同品种紫苏迷迭香酸对三种供试菌的生长均具有一定程度的抑制作用，并且抑菌能力随着迷迭香酸浓度的降低而减弱。ZY7-1 对金黄色葡萄球菌的抑制能力最强，浓度为 20.00 mg/mL 时抑菌圈直径最大，为 12.50 ± 0.26 mm；ZB3 对金黄色葡萄球菌的抑制能力最强，最大抑菌圈直径为 11.80 ± 0.10 mm；DZ-1 对枯草芽孢杆菌的抑制能力最强，最大抑菌圈直径为 12.40 ± 0.14 mm，三个品种的紫苏提取物均对大肠杆菌的抑制能力最弱。图 9 是选取浓度为 5.00、10.00、20.00 mg/mL 的紫苏迷迭香酸溶液的抑菌图，阳性对照为 5% 的苯甲酸钠，可以看出在一定浓度范围内随着迷迭香酸浓度增加抑菌效果更加明显。

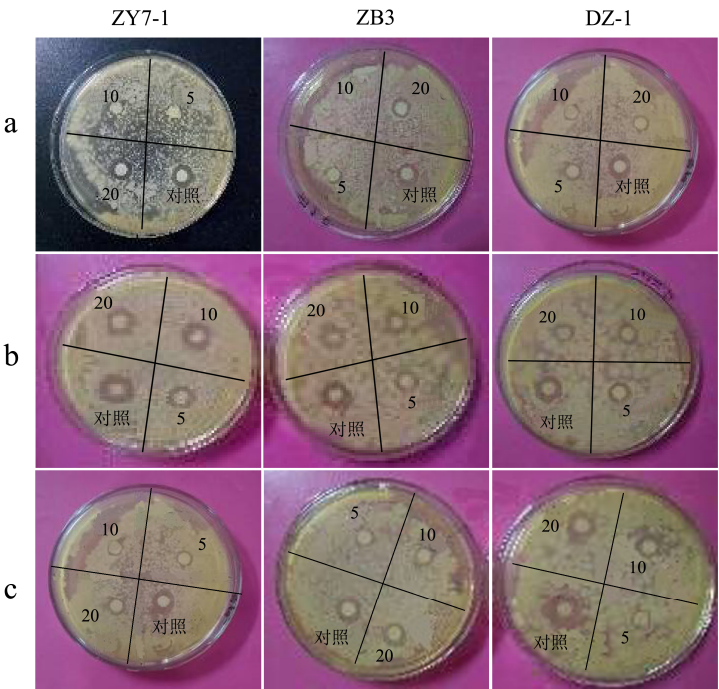


图 9 三个品种紫苏迷迭香酸的抑菌能力

Fig.9 Antibacterial ability of three different varieties of *perilla rosmarinic acid*

注：a：对大肠杆菌的抑菌效果；b：对金黄色葡萄球菌的抑菌效果；c：对枯草芽孢杆菌的抑菌效果。

表 4 不同浓度紫苏迷迭香酸对各供试菌种的抑菌圈直径 d (mm)

浓度/ mg/mL	大肠杆菌			金黄色葡萄球菌			枯草芽孢杆菌		
	ZY7-1	ZB3	DZ-1	ZY7-1	ZB3	DZ-1	ZY7-1	ZB3	DZ-1
20.00000	11.60±0.10 ^a	8.20±0.10 ^a	7.20±0.42 ^a	12.50±0.26 ^a	11.80±0.10 ^a	11.10±0.36 ^a	7.80±0.35 ^a	8.10±0.10 ^a	12.40±0.14 ^a
10.00000	9.80±0.36 ^b	7.30±0.20 ^b	6.80±0.35 ^b	11.70±0.35 ^b	11.50±0.17 ^a	9.50±0.30 ^b	7.40±0.17 ^b	7.90±0.26 ^b	9.60±0.26 ^b
5.00000	7.10±0.17 ^c	6.80±0.17 ^c	6.50±0.61 ^c	9.60±0.10 ^c	9.10±0.26 ^b	8.30±0.20 ^c	7.20±0.36 ^c	7.70±0.00 ^c	7.90±0.00 ^c
2.50000	6.80±0.02 ^c	6.20±0.20 ^d	6.10±0.10 ^d	8.80±0.52 ^d	8.40±0.26 ^c	7.50±0.30 ^d	6.80±0.17 ^d	7.20±0.20 ^d	7.50±0.10 ^d
1.25000	6.20±0.20 ^d	6.00±0.00 ^e	6.00±0.00 ^e	7.90±0.20 ^e	7.50±0.10 ^d	6.30±0.17 ^e	6.60±0.44 ^e	6.90±0.10 ^e	7.20±0.17 ^e
0.62500	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^e	6.00±0.00 ^e	7.20±0.36 ^f	6.90±0.17 ^e	6.00±0.00 ^f	6.20±0.26 ^f	6.00±0.00 ^f	6.40±0.26 ^f
0.31250	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^e	6.00±0.00 ^e	6.30±0.26 ^f	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^g	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^g
0.15625	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^e	6.00±0.00 ^e	6.00±0.00 ^g	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^g	6.00±0.00 ^f	6.00±0.00 ^g

注：同一列不同字母表示各样品间存在显著性差异 ($p<0.05$, $n=3$)。

3 结论

本文从 45 个不同品种紫苏叶中提取迷迭香酸,并检测其对 DPPH 自由基的清除能力,进一步对含量最高的 3 个较优品种 ZY7-1、ZB3、DZ-1 的抗氧化性及抑菌性进行研究。实验结果表明,不同品种紫苏所含迷迭香酸含量不同,3 个较优品种经过大孔树脂柱色谱以及中压制备色谱分离纯化后迷迭香酸含量由 7.87%、7.34%、7.32%提高到 59.28%、54.41%、51.13%。3 个品种均具有较强的抗氧化性,迷迭香酸标准品对清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基的 IC₅₀ 值分别为 9.12、18.34 μg/mL,而 ZY7-1、ZB3、DZ-1 清除 DPPH

自由基的 IC₅₀ 值分别为: 15.03、19.08、20.91 μg/mL;清除 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值分别为: 26.57、33.11、36.59 μg/mL,而且迷迭香酸含量与清除自由基的 IC₅₀ 值呈极显著负相关。三个品种紫苏迷迭香酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的生长均具有一定的抑制效果。ZY7-1 和 ZB3 对金黄色葡萄球菌的抑制作用较大肠杆菌和枯草芽孢杆菌强,最大抑菌圈直径分别为: 12.50 mm、11.80 mm; DZ-1 对枯草芽孢杆菌的抑制作用最强,最大抑菌圈直径为 12.40 mm。目前鲜有利用中压制备色谱分离纯化紫苏迷迭香酸的研究,本研究结果为紫苏作为抗氧化剂的应用提供了理论基础,也为紫苏的品种选育以及开发新的天然抗

氧化剂提供了依据。

参考文献

- [1] 谭美莲, 严明芳, 汪磊, 等. 国内外紫苏研究进展概述[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(2): 225-231
TAN Mei-lian, YAN Ming-fang, WANG Lei, et al. Research progress on *Perilla frutescens* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012, 34(2): 225-231
- [2] 张琛武, 郭佳琪, 郭宝林. 紫苏中酚酸类成分研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(11): 1651-1658
ZHANG Chen-wu, GUO Jia-qi, GUO Bao-lin. Review on research of phenolic acids in *Perilla frutescens* [J]. Modern Chinese Medicine, 2017, 19(11): 1651-1658
- [3] 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
AI Xin-wei, HU Si-ping, GONG Heng-heng, et al. Quantitation of phenolic compounds in *Perilla frutescens* at different growing stages using HPLC-MS/MS [J]. Food Science, 2016, 37(18): 126-132
- [4] Jung-Sook Sung, Hyun-Choong Ok, Hyung-Jin Baek, et al. Characterization, identification, and quantification of phenolic compounds using UPLC-Q-TOF-MS and evaluation of antioxidant activity of *Perilla frutescens* accessions [J]. Food Research International, 2018, 111(9): 153-167
- [5] 朱双全. 紫苏化学成分及药理学研究进展概要[J]. 生物化工, 2018, 4(2): 148-149, 152
ZHU Shuang-quan. Summary of research progress on the chemical constituents and pharmacology of *Perilla* [J]. Biological Chemical Engineering, 2018, 4(2): 148-149, 152
- [6] Norihiro BANNŌ, Toshihiro AKIHISA, et al. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004, 68(1): 85-90
- [7] 周伟, 羊欢欢, 黄苏红, 等. 紫苏提取物对鲢鱼鱼柳的抗菌和抗脂质氧化作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 41-49
ZHOU Wei, YANG Huan-huan, HUANG Su-hong, et al. Antimicrobial and anti-lipid oxidation effects of *Perilla* leaf extract on the bonito fish fillet [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(1): 41-49
- [8] Jun Hyun-II, Kim Beom-Tae, Song Geun-Seoup, et al. Structural characterization of phenolic antioxidants from purple *Perilla* (*Perilla frutescens* var. *acuta*) leaves [J]. Food Chemistry, 2014, 148(1): 367-372
- [9] YU Hua, QIU Jian-feng, MA Li-juan, 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(1): 375-391
- [10] QIAO Shan-lou, LI Wei-hua, Ryoko Tsubouchi, et al. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW 264.7 macrophages [J]. Free Radical Research, 2005, 39(9): 995-1003
- [11] 孙岫, 汪靖超, 李洪涛, 等. 迷迭香酸的抗菌机理研究[J]. 青岛大学学报(自然科学版), 2005, 18(4): 41-45
SUN Xun, WANG Jing-chao, LI Hong-tao, et al. Study on the antibacterial mechanism of rosmarinic acid [J]. Journal of Qingdao University (Natural Science Edition), 2005, 18(4): 41-45
- [12] HOU De-xing. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins [J]. Current Molecular Medicine, 2003, 3(2): 149-159
- [13] 王德宝, 包迎春, 包万柱. 紫苏功能特性及产品加工研究进展[J]. 北方农业学报, 2019, 47(5): 96-99
WANG Bao-de, BAO Ying-chun, BAO Wan-zhu. Research progress on functional characteristics and product processing of *Perilla frutescens* [J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2019, 47(5): 96-99
- [14] JI Wei-Wei, LI Rui-Peng, LI Meng, et al. Antidepressant-like effect of essential oil of *Perilla frutescens* in a chronic, unpredictable, mild stress-induced depression model mice [J]. China Natural Medicine, 2014, 12(10): 753-759
- [15] Miho Igarashi, Yoshifumi Miyazaki, Wagner Vilegas. A review on bioactivities of *Perilla*: progress in research on the functions of *Perilla* as medicine and food [J]. Hindawi Publishing Corporation, 2013, 152(2): 658-663
- [16] Elufioye Taiwo O, Habtemariam Solomon. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action [J]. Pubmed, 2019, 112(1): 296-301
- [17] F. E. Sikwese, K. G. Duodu. Antioxidant effect of a crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions [J]. Food Chemistry, 2006, 104(1): 324-331
- [18] 王莹, 刘凤霞, 王文庆, 等. 迷迭香酸在沙棘果酒中的应用研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(10): 121-123
WANG Ying, LIU Feng-xia, WANG Wen-qing, et al. Application of rosemary acid in sea buckthorn fruit wine [J]. China Brewing, 2018, 37(10): 121-123

- [19] 刘胜男,马云芳,杜桂红,等.迷迭香及其提取物在食品保鲜中的应用研究进展[J].中国调味品,2019,44(6):181-185
LIU Sheng-nan, MA Yun-fang, DU Gui-hong, et al. Research progress of application of rosemary and its extracts in food preservation [J]. China Condiment, 2019, 44(6): 181-185
- [20] 李珂.迷迭香酸生物学作用研究进展[J].国际检验医学杂志, 2019,40(9):1032-1036
LI Ke. Advances in biological effects of rosmarinic acid [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40(9): 1032-1036
- [21] 薛姣.紫苏迷迭香酸提取工艺及其应用研究[D].中北大学, 2016
XUE Jiao. Study on extraction technology and its application of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* [D]. North University of China, 2016
- [22] 李荣贵,滕大为,杜桂彩,等.紫苏愈伤组织迷迭香酸的纯化及抗菌活性研究[J].微生物学通报,2000,27(5):324-327
LI Rong-gui, TENG Da-wei, DU Gui-cai, et al. Isolation of rosmarinic acid from callus of *Perilla frutescens* and studies of its inhibition on the growths of bacteria and fungal [J], Microbiology, 2000, 27(5): 324-327
- [23] 薛姣,张志军,李晓君,等.大孔树脂分离纯化紫苏迷迭香酸的研究[J].食品科技,2015,40(9):184-187
XUE Jiao, ZHANG Zhi-jun, LI Xiao-jun, et al. Separation and purification of rosmarinic acid from *Perilla* with microporous resins [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(9): 184-187
- [24] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative Properties of Xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 945-948
- [25] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [26] 张卫星,何开泽,蒲蕾.核桃青皮提取物的抗菌和抗氧化活性[J].应用与环境生物学报,2014,20(1):87-92
ZHANG Wei-xing, HE Kai-ze, PU Qiang. Antimicrobial and antioxidant activities of extracts from walnut green husks [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(1): 87-92
- [27] 普天磊,韩学琴,邓红山,等.辣木抗氧化成分提取方法和抗氧化能力研究进展[J].食品工业科技,2019,40(19):310-315
PU Tian-lei, HAN Xue-qin, DENG Hong-shan, et al. Research progress of extraction method of antioxidant components and antioxidant activity of *Moringa oleifera* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(19): 310-315
- [28] 罗冬兰,黎晓燕,曹森,等.贵州不同种类茶叶的几种抗氧化成分及其抗氧化能力分析[J].食品研究与开发,2019,40(17): 35-41
LUO Dong-lan, LI Xiao-yan, CAO Sen, et al. Comparison on several antioxidant components and activity for different kinds of Guizhou tea [J]. Food Research and Development, 2019, 40(17): 35-41
- [29] 包宇欣,陈宝英,马妍妍,等.紫苏提取物的抗氧化性能及其对晚期糖基化末端产物的抑制作用[J].食品工业科技,2020, 41(3):58-64
BAO Yu-xin, CHEN Bao-ying, MA Yan-yan, et al. Antioxidant properties and inhibitory effect on AGEs of *Perilla frutescens* extract [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(3): 58-64

(上接第 46 页)

- [25] 谢勇,洪晓昆,鄢仁祥,等.重组琼胶酶 rAgaN3 基因的生物信息学分析[J]. 生物信息学,2017,15(1):16-26
XIE Yong, HONG Xiao-kun, YAN Ren-xiang, et al. Bioinformatics analysis of the recombinant rAgaN3 gene of agarase [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2017, 15(1): 16-26
- [26] Brendan T, Joseph H, Federica D L, et al. The crystal structure and insight into the substrate specificity of the α -L rhamnosidase RHA-P from *Novosphingobium* sp. PP1Y [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020, 679: 108189