

夏枯草生殖生长期总黄酮积累规律及抗氧化活性研究

张 淼¹,白月梅¹,苗 芳¹,周 乐²

(1. 西北农林科技大学 生命科学院 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学理学院 陕西 杨凌 712100)

摘要:通过测定夏枯草生殖生长期各阶段不同器官的总黄酮含量,揭示夏枯草各器官总黄酮的积累规律。采用70%乙醇超声波提取,后用等体积的乙酸乙酯、正丁醇和水萃取,得到乙酸乙酯、正丁醇和水提取物,以BHT为对照,研究不同溶剂提取物的抗氧化活性。结果表明:夏枯草根、茎、叶中的黄酮含量随着生长进程而升高,至终花期达到最高;花穗中的黄酮含量在花盛期最高;各器官相比,叶中黄酮含量最高。夏枯草不同溶剂提取物及对照BHT清除DPPH·的能力高低次序为:乙酸乙酯提取物>正丁醇提取物>BHT>水提取物,清除·OH的能力高低次序为:BHT>乙酸乙酯提取物>正丁醇提取物>水提取物,并且不同溶剂提取物的抗氧化活性与其总黄酮含量呈较显著的相关性。夏枯草总黄酮具有良好的抗氧化活性,可在夏枯草花终期或果穗干枯期采集叶或全草提炼加工。

关键词:夏枯草;总黄酮;抗氧化活性;自由基

中图分类号:Q621.29 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)02-0170-05

Accumulation of Total Flavonoids at Reproductive Stage and Antioxidant Activity of *Prunella vulgaris* Linn.

ZHANG Miao¹,BAI Yue-mei¹,MIAO Fang¹,ZHOU Le²

(1. College of Life Science Northwest Agricultural and Forestry University,Yangling 712100,China;

2. College of Science,Northwest Agricultural and Forestry University,Yangling 712100,China)

Abstract: The research was aimed to investigate the accumulation of total flavonoids in different organs and antioxidant activities in different extracts of *Prunella vulgaris* Linn., which would provide theoretical basis for further research. The total flavonoids contents in different organs during different periods were measured at reproductive stage. Total flavonoids content was investigated by spectrometric method. The powder of *P. vulgaris* was extracted with 70% ethanol (in water v/v) using ultrasonic extraction and then the filtrate was extracted followed with ethyl acetate, n-butanol and water at equal volume. The extracts of different solvents could be gotten. The antioxidant activities of different extracts were evaluated and BHT was used as a positive control. The results showed that: the total flavonoids content of roots, stems and leaves of *P. vulgaris* increased with plant growth and reached the peak at flower-perished period, while that of the spikes reached the peak at flowers-blooming period. The total flavonoids content of leaves was the highest one among all the organs. Scavenging abilities on DPPH· of the extracts and BHT were in descending order: ethyl acetate > n-butanol > BHT > water. Scavenging abilities on ·OH of the extracts and BHT were in descending order: BHT > ethyl acetate > n-butanol > water. There was strong correlation between antioxidant activity and total flavonoids content in different extracts of *P. vulgaris*. The flavonoids of *P. vulgaris* have great antioxidant activity and they can be obtained by processing the leaves or the whole herb which were collected in flower-perished period or spike-dry period.

Key words: *Prunella vulgaris* Linn.; Total flavonoids; Antioxidant activity; Free radical

夏枯草(*Prunella vulgaris* Linn.)为多年生草本,属唇形科夏枯草属,是我国传统中药之一,以干

燥果穗入药^[1]。历代草本记载,夏枯草具有清火、明目、散结、消肿之功效^[2]。现代医学认为,夏枯草

收稿日期:2011-12-14

基金项目:国家自然科学基金项目(3077145;31172365;31170366)

作者简介:张 淼(1986-),女,河北保定人,在读硕士,主要从事药用植物学研究。

通讯作者:苗 芳(1965-),女,陕西蒲城人,副教授,博士,主要从事植物学、药用植物学研究。

具有抗菌消炎^[3]、抗病毒^[4]、抗癌活^[5]、增强免疫^[6]、增强记忆力^[7]、抗衰老、抗氧化^[8]、降血压^[9]、降血糖及活血化瘀等功效^[10]。夏枯草的有效成分包括甾醇类、三萜类、黄酮类和多糖等,其中,广泛分布在高等植物种子、叶和根中的黄酮类物质有很强的药理活性^[11]。

自由基学说认为,导致疾病与衰老的机制可能是自由基攻击生命大分子造成组织损伤^[12]。所以,寻找适当的外源性抗氧化剂,清除体内自由基,对治疗疾病和保护人体健康大有裨益。但研究发现,人工合成抗氧化剂对生物体有潜在的毒副作用^[13]。近年来,寻求高效、低毒的天然抗氧化剂和抗衰老保健品,已成为新的研究热点之一^[14]。

植物黄酮类物质包括黄酮、黄酮醇、双氢黄酮、异黄酮和查耳酮及各种衍生物,是多种中草药的有效成分,有些植物黄酮类物质具有良好的抗氧化活性,并且此活性与其黄烷核上的官能团及其排列有关^[15]。Fariba 等^[16]从狭叶香料的甲醇提取物中分离出 4 种黄酮类物质,证实其具有很强的自由基清除活性,并能抑制叶红素的氧化和脂质过氧化。Susanti 等^[17]从马拉巴野牡丹中提取 4 种黄酮类物质,发现他们均有抗氧化活性,但活性因结构不同而有差异。植物黄酮以其较好的抗氧化能力和优良的安全性,具有开发为天然抗氧化剂的潜力。

本研究对花期夏枯草根、茎、叶和花中的总黄酮积累规律和不同溶剂提取物对 DPPH· 和 ·OH 的清除能力进行研究,旨在为夏枯草的合理开发利用、适时采收以及寻找新的抗氧化药源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2009 年 3 月将夏枯草幼苗从太白山蒿坪森林保护试验站移栽至西北农林科技大学农作物试验站。于 2009 年 5 月 18 日夏枯草长出花蕾时开始采样,每次采样间隔 5 d,直到果穗干枯为止。将夏枯草根、茎、叶、花分开,分别阴干保存,用于测定夏枯草各器官总黄酮积累规律。2010 年 7 月底,在秦岭采集夏枯草全草,阴干后粉碎装袋备用,用于测定夏枯草的抗氧化活性。

1.2 夏枯草不同溶剂提取物的制备

取夏枯草全草粗粉 40 g,溶于 70% 乙醇,料液比为 1:20(g/mL),45℃ 条件下进行超声提取 2 h,提取 3 次,合并提取液,减压浓缩。加石油醚去除叶绿素后,依次用等体积的乙酸乙酯、正丁醇和水萃取,每级重复 3 次,得到乙酸乙酯、正丁醇和水提取物。

1.3 总黄酮含量测定

总黄酮含量测定按照 Lai P 等^[18]的方法进行。

1.4 夏枯草不同溶剂提取物抗氧化活性测定

抗氧化活性测定所用的 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT) 购于上海阿拉丁试剂有限公司;1,1-二苯基-2-苦苯肼自由基(DPPH·) 购于美国 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。

清除 DPPH· 活性测定参照 Sarikurkcü 等^[19]的方法。清除 ·OH 活性测定参照 Qin 等^[20]的方法。以清除率 R 对样品浓度进行回归处理,计算出提取物的半数抑制浓度(IC₅₀) 数值。半数抑制浓度是当自由基被清除 50% 时的提取物浓度,即 IC₅₀ 越小,提取物清除自由基的能力越强。

1.5 数据处理

采用 SPSS V13.0 和 Excel 软件对数据进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 夏枯草营养器官根、茎、叶中总黄酮积累规律

从图 1 可以看出,夏枯草营养器官根、茎、叶中的总黄酮积累随着花的发育和果实的形成越来越多。在花蕾期(05-18),总黄酮含量均较低,而在果实成熟期(06-7)和果实干枯期(06-12)总黄酮含量达到最高值。营养器官根、茎、叶相比,叶中的总黄酮含量最高。试验结果表明,夏枯草适宜于果实成熟期或干枯期采集。

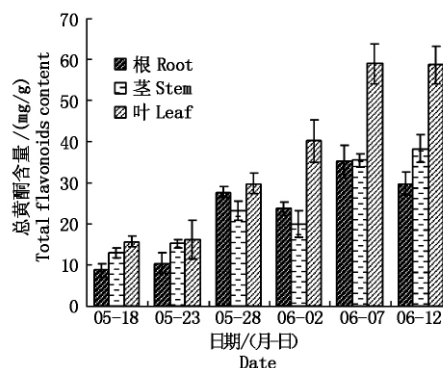


图 1 夏枯草营养器官总黄酮积累规律

Fig. 1 The accumulation of the total flavonoids contents in vegetative organs of *P. vulgaris*

2.2 夏枯草花(果)穗中总黄酮积累规律

由图 2 可知,夏枯草花(果)穗中总黄酮含量随着花的发育和果实的形成呈现先升高后降低的趋势。从花蕾期(05-18)至花盛期(05-28),花中的总黄酮含量明显升高,盛花期花中的总黄酮含量是花蕾期的 1.6 倍。在果实成熟期(06-07),花中的总黄酮含量接近于盛花期,但在果实干枯期(06-12)花中的总黄酮含量明显降低,比果实成熟期降

低约 30%。因此,若以提取黄酮为目的,则夏枯草果穗最好在果实干枯之前采集。

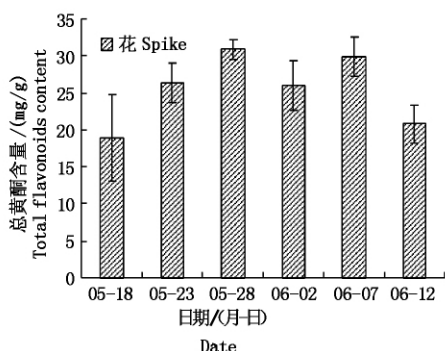


图 2 夏枯草花(果)穗中总黄酮的积累规律
Fig. 2 The accumulation of the total flavonoids contents in spike of *P. vulgaris*

2.3 夏枯草不同溶剂提取物对 DPPH· 的清除活性

DPPH· 具有单电子,其醇溶液呈紫色,在 517 nm 处有强吸收峰。当自由基清除剂与其单电子配对,溶液的紫色变淡或消失。因此,可利用分光光度计测定提取物对自由基的清除率。

从图 3 可以看出,夏枯草不同溶剂提取物对 DPPH· 均有清除能力,且在一定浓度范围内清除能力与浓度呈正相关。当提取物浓度达到一定值后,随着浓度的增加,对 DPPH· 的清除率增加缓慢或趋于平缓。夏枯草 3 种溶剂提取物相比,乙酸乙酯提取物对 DPPH· 的清除活性最强 ($IC_{50} = (0.154 \pm 0.017) \mu\text{g/mL}$),强于阳性对照 BHT ($IC_{50} = (0.311 \pm 0.005) \text{ mg/mL}$)。正丁醇提取物的清除能力弱于乙酸乙酯提取物 ($IC_{50} = (0.204 \pm 0.023) \text{ mg/mL}$),但也强于阳性对照 BHT。水提物清除活性 ($IC_{50} = (0.402 \pm 0.020) \text{ mg/mL}$) 略弱于 BHT。

夏枯草 3 种溶剂提取物及阳性对照 BHT 清除 DPPH· 能力由强到弱依次为:乙酸乙酯提取物 > 正丁醇提取物 > BHT > 水提物。

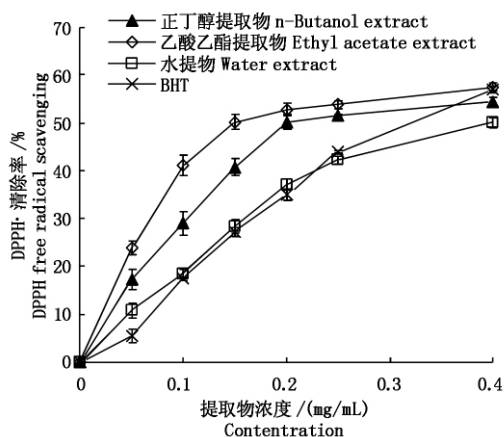


图 3 夏枯草不同溶剂提取物对 DPPH· 清除活性
Fig. 3 DPPH radical-scavenging activity of different extracts of *P. vulgaris*

2.4 夏枯草不同溶剂提取物对 ·OH 的清除活性

·OH 是生物体内最具活性的活性氧自由基之一,可降解 DNA、细胞膜和多糖类化合物,威胁生物体健康。从图 4 可以看出,夏枯草不同溶剂提取物都具有清除 ·OH 的活性,且清除能力与浓度呈正相关。在 3 种不同溶剂提取物中,乙酸乙酯提取物的清除能力最强,在浓度为 0.6 mg/mL 时清除率就已达到 88.37%;正丁醇提取物活性稍差于乙酸乙酯提取物,在浓度为 0.7 mg/mL 时清除率达到 85.24%;而水提物对 ·OH 的清除活性最弱。

夏枯草 3 种溶剂提取物及阳性对照 BHT 清除 ·OH 活性由强到弱依次为: BHT ($IC_{50} = (0.266 \pm 0.003) \text{ mg/mL}$) > 乙酸乙酯提取物 ($IC_{50} = (0.406 \pm 0.012) \text{ mg/mL}$) > 正丁醇提取物 ($IC_{50} = (0.538 \pm 0.003) \text{ mg/mL}$) > 水提物 ($IC_{50} = (1.244 \pm 0.029) \text{ mg/mL}$)。

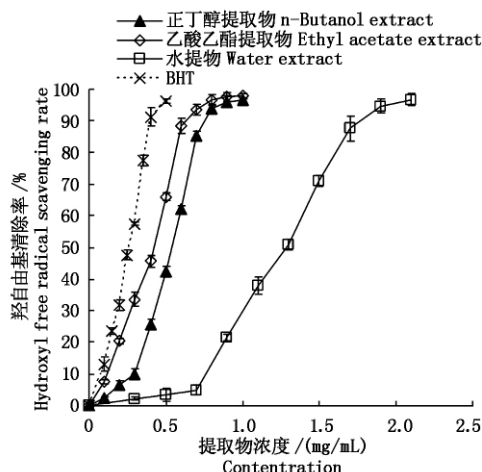


图 4 夏枯草不同溶剂提取物对 ·OH 的清除活性
Fig. 4 Hydroxyl radical scavenging activity of different extracts of *P. vulgaris*

2.5 夏枯草不同溶剂提取物总黄酮含量与抗氧化活性的相关性分析

从表 1 可以看出,乙酸乙酯提取物的总黄酮含量高于正丁醇提取物,正丁醇提取物的总黄酮含量高于水提物。

表 1 夏枯草不同溶剂提取物的总黄酮含量

Tab. 1 Total flavonoids content of different extracts of *P. vulgaris*

| 提取物 Extract | 乙酸乙酯 Ethyl acetate | 正丁醇 n-Butanol | 水 Water |
|--|-----------------------|------------------|---------------|
| 总黄酮含量/(mg/g) Total flavonoids content | 14.456 ± 0.160 | 10.306 ± 0.065 | 4.732 ± 0.104 |

用 SPSS 进行分析,以不同溶剂提取物清除 DPPH· 和 ·OH 活性(y) 为因变量,总黄酮含量(x) 为自变量作回归分析,并计算 Pearson 相关系数,研究抗氧化

化活性与总黄酮的相关性 结果如表 2 所示。从表 2 可看出 夏枯草不同溶剂提取物清除 DPPH · 和 · OH 活性均与总黄酮含量之间具有极显著的相关性。

表 2 夏枯草不同溶剂提取物抗氧化活性与总黄酮含量的相关性分析

Tab. 2 Correlation between antioxidant activities of different extracts of *P. vulgaris* and total flavonoids content

| 提取物 Extract | DPPH · 清除活性 | | · OH 清除活性 | |
|--------------------|--------------------------------------|-------------------------|---|--------------------------|
| | DPPH radical-scavenging activity | | Hydroxyl free radical scavenging activity | |
| | 相关系数(r) Correlation coefficient | 拟合方程 Equation | 相关系数(r) Correlation coefficient | 拟合方程 Equation |
| 乙酸乙酯 Ethyl acetate | 0.981 ** | $y = 9.037 + 443.714x$ | 0.991 ** | $y = -11.762 + 237.675x$ |
| 正丁醇 n-Butanol | 0.999 ** | $y = 6.586 + 530.404x$ | 0.966 ** | $y = -20.693 + 335.45x$ |
| 水 Water | 0.955 ** | $y = 13.379 + 683.717x$ | 0.980 ** | $y = -30.316 + 449.037x$ |

注: ** . 表示相关性达极显著水平($P < 0.01$) 。
Note: ** . Correlation is significant at 0.01 level.

3 讨论

黄酮类物质是植物界分布很广泛的一类次生代谢产物 , 它的产生与分布具有器官及生长发育时期的特异性^[21] , 因此 , 各器官中总黄酮含量存在差异。本试验研究表明 , 生殖生长时期 , 在夏枯草各器官中 , 叶片黄酮含量最高 , 根和茎含量次之 , 花(果) 穗中较少 , 总黄酮含量由高到低依次为: 叶 > 茎 > 根 > 花(果) 穗 , 研究结果与廖丽等^[22] 的研究基本一致。因此 , 夏枯草黄酮类化合物的利用和提取 , 可打破药典中只取果穗入药^[23] 的传统。

夏枯草提取物具有良好的抗氧化活性 , 尤其是乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物。但由于抗氧化反应机制不同 , 各评价体系中各提取物可能表现出不同的抗氧化活性。Min 等^[24] 采用多体系对 4 种草药提取物抗氧化活性进行评估发现 , 各体系评估结果有所差异。Yi Chen 等^[25] 从黑灵芝子实体中提取并纯化出一种活性多糖 , 用多体系对其抗氧化活性进行评估 , 发现此种多糖在不同体系中均表现较高活性 , 从而证明其有显著抗氧化活性。可见 , 有必要采用多体系综合评价有效物质的抗氧化活性。

夏枯草不同溶剂提取物抗氧化活性变化规律与总黄酮含量相一致 , 并且有显著的相关性。其中夏枯草乙酸乙酯提取物抗氧化能力最强 , 总黄酮含量也最高。试验结果说明 , 夏枯草中黄酮类物质具有较强的抗氧化活性 , 并且在抗氧化成分中占主导地位。有国内外学者也对黄酮类化合物在抗氧化中的作用进行了研究报道。Débora 等^[26] 认为 , 黄酮类化合物儿茶素是绿茶中最主要的抗氧化成分。吴晓宁等^[27] 研究表明 , 乌蕨黄酮类物质具有显著的抗脂质体氧化和清除自由基作用。Margalit 等^[28] 对菠菜水提物中的黄酮类物质进行研究分析 , 证实它有比一般人工抗氧化剂强的抗氧化能力。夏枯草中黄酮类物质具有良好的抗氧化活性 , 加之植物药的天然低

毒性 , 有开发为天然抗氧化剂和抗衰老保健品的潜力 , 具有广阔的发展前景。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社 2005: 197.

[2] 王祝举 , 唐力英 , 付梅红 , 等. 夏枯草中的黄酮类化合物研究[J]. 时珍国医国药 2008 , 19(8) : 1966 – 1967.

[3] Zdarilovà A , Svobodová A , Ulrichová J , et al. Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid suppress lipopolysaccharide-induced alteration in human gingival fibroblasts [J]. Toxicol in Vitro 2009 23: 386 – 392.

[4] Xu H X , Lee S H S , Lee S F et al. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from Prunella vulgaris[J]. Antiviral Research 1999 44: 43 – 54.

[5] Feng L , Jia X B , Shi F et al. Identification of two polysaccharides from prunella vulgaris L. and evaluation on their anti-Lung adenocarcinoma activity [J]. Molecules 2010 , 15: 5093 – 5103.

[6] Han E H , Choi J H , Hwang Y P et al. Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from Prunella vulgaris [J]. Food and Chemical Toxicology 2009 47: 62 – 69.

[7] Park S J , Kim D H , Lee K I et al. The ameliorating effect of the extract of the flower of Prunella vulgaris var. lilacina on drug-induced memory impairments in mice [J]. Food and Chemical Toxicology 2010 48(6) : 1671 – 1676.

[8] Liu F , Ng T B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs [J]. Life Sciences , 2000 66(8) : 725 – 735.

[9] Ahmed B , Al-Howiriny T A , Mossa J S et al. Isolation , antihypertensive activity and structure activity relationship of flavonoids from three medicinal plants [J]. Indian Journal of Chemistry 2005 44B: 400 – 401.

[10] 庄玲玲. 夏枯草药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志 2009 5(16) : 94 – 95.

[11] Tsimogiannis D I , Oreopoulou V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging effi-

- ciency. A kinetic approach for the 3'-4'-hydroxy substituted members [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2006 ,7: 140 – 146.
- [12] Ozsoy N ,Can A ,Yanardag R *et al.* Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts [J]. *Food Chemistry* , 2008 ,110: 571 – 583.
- [13] Dolatabadi J E N ,Kashanian S. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives [J]. *Food Research International* 2010 ,43: 1223 – 1230.
- [14] Liu J R ,Chen M J ,Lin C W. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir [J]. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 2005 ,53: 2467 – 2474.
- [15] Heim K E ,Tagliaferro A R ,Bobilya D J. Flavonoid antioxidants: chemistry ,metabolism and structure-activity relationships [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002 ,13: 572 – 584.
- [16] Fariba S ,Gholamreza D N ,Mansour M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L [J]. *Food Chemistry* 2009 ,112: 885 – 888.
- [17] Susanti D ,Sirat H M ,Ahmad F *et al.* Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabathricum* L [J]. *Food Chemistry* 2007 ,103: 710 – 716.
- [18] Lai P ,Li K Y ,Lu S *et al.* Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from *Japonica* rice bran [J]. *Food Chemistry* 2009 ,117 (3) : 538 – 544.
- [19] Sarikurcu C ,Tepe B ,Semiz D K *et al.* Evaluation of metal concentration and antioxidant activity of three edible mushrooms from Mugla ,Turkey [J]. *Food and Chemical Toxicology* 2010 ,48(5) : 1230 – 1233.
- [20] Wei Q ,Ma X H ,Zhao Z *et al.* Antioxidant activities and chemical profiles of pyroligneous acids from walnut shell [J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2010 , 88: 149 – 154.
- [21] Braidot E ,Zancani M ,Petrussa E *et al.* Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Signaling & Behavior* 2008 ,3(9) : 626 – 632.
- [22] 廖 丽 ,郭巧生 ,刘 丽 ,等. 夏枯草总黄酮提取方法及其在居群间分布特征研究 [J]. *中国中药杂志* , 2008 ,33(6) : 651 – 653.
- [23] 陈宇航 ,郭巧生 ,王澄亚. 夏枯草本草及其入药部位变化的考证 [J]. *中国中药杂志* 2010 ,35(2) : 242 – 246.
- [24] Su M S ,Shyu Y T ,Chien P J. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts [J]. *Food Chemistry* , 2008 ,111: 892 – 896.
- [25] Chen Y ,Xie M Y ,Nie S P *et al.* Purification ,composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* [J]. *Food Chemistry* 2008 ,107: 231 – 241.
- [26] Kodama D H ,Goncalves A E S S ,Lajolo F M *et al.* Flavonoids ,total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations [J]. *Ciênc Tecnol Aliment* 2010 ,30(4) : 1077 – 1082.
- [27] 吴晓宁 ,余陈欢 ,徐静红. 乌蕨总黄酮体外抗氧化活性的研究 [J]. *医药导报* 2010 ,29(3) : 292 – 294.
- [28] Bergman M ,Perelman A ,Dubinsky Z *et al.* Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucurinated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach [J]. *Phytochemistry* 2003 ,62: 753 – 762.