

不同采收期牛至叶提取物体外抗氧化和降糖活性研究

张盼盼, 程莹, 张桢, 辛曼曼, 孙丽娟*, 陈勇*

湖北大学 中药生物技术湖北省重点实验室及生物资源绿色转化协同创新中心, 药物高通量筛选国家地方联合工程研究中心, 湖北 武汉 430062

摘要: 目的 对比研究不同采收期牛至叶提取物的物质组成与体外抗氧化和降糖活性。方法 采用乙腈-水 (1:1) 提取制备牛至叶提取物, 福林酚法测定其中总酚含量, AlCl_3 比色法测定其中总黄酮含量, LC-Q-TOF-MS 法分析主要成分。采用 ABTS 自由基清除和 FRAP 总抗氧化实验评价不同采收期牛至叶提取物的抗氧化活性, 荧光葡萄糖摄取法和对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制实验评价不同采收期牛至叶提取物体外降糖活性。结果 从牛至叶提取物中鉴定出 6 种主要成分, 分别为牛至苷 I、木犀草素 7-O-葡萄糖醛酸苷、芹菜素 7-O-葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸、紫草酸、牛至苷 I 衍生物; 提取物中总酚含量以开花期 7 月份采收的最高, 总黄酮含量以成熟期 9 月份采收的最高。不同采收期牛至叶提取物均有较好的抗氧化和降糖作用, 其中 7 月份采收的牛至叶提取物体外抗氧化活性最强, 10 月份采收的牛至叶提取物体外降血糖活性最强。结论 牛至叶乙腈-水 (1:1) 提取物具有潜在的抗氧化及降糖活性, 其抗氧化及降糖活性强度受牛至叶采收时间的影响。

关键词: 牛至叶; 采收期; 抗氧化; 降糖; 总酚; 总黄酮; 牛至苷 I; 木犀草素 7-O-葡萄糖醛酸苷; 芹菜素 7-O-葡萄糖醛酸苷; 迷迭香酸; 紫草酸; 牛至苷 I 衍生物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)07-1617-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.020

In vitro anti-oxidant and hypoglycemic activity of acetonitrile-water extract of *Origanum vulgare* leaves harvested in different times

ZHANG Pan-pan¹, CHENG Ying¹, ZHANG Zhen, XIN Man-man, SUN Li-juan, CHEN Yong

Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, National & Local Joint Engineering Research Center for High-throughput Drug Screening Technology, Wuhan 430062, China

Abstract: Objective By investigating the material composition, anti-oxidant and hypoglycemic activity of acetonitrile-water extracts of *Origanum vulgare* leaf (OL) in different harvest time, to acquire the scientific data for the utilization of OL. **Methods** OL was extracted with acetonitrile and water (1:1). The contents of total phenols and total flavonoid were measured by Foline-Phenol reagent method and AlCl_3 colorimetry. The main compositional analysis was performed using LC-QTOF-MS technology. Meanwhile, the anti-oxidation of OL extracts in different harvest time was evaluated by total anti-oxidant capacity assay kit with ABTS method and ferric reducing anti-oxidant potential assay (FRAP). The methods of 2-NBDG glucose uptake and α -glycosides inhibition were applied to evaluate hypoglycemic activity of OL extracts. **Results** The six main components in OL extract were identified to be origanoside I, luteolin 7-O-glucuronide, apigenin 7-O-glucuronide, rosmarinic acid, lithospermic acid and origanoside I derivative. The contents of total phenols and the total flavonoids were the highest in OL extracts harvested in July and September, respectively. There was good *in vitro* anti-oxidant and hypoglycemic activity for OL extracts harvested in different times. Among them, the best anti-oxidant activity was observed in OL extracts harvested in July, while the best hypoglycemic activity was observed in OL extracts harvested in October. **Conclusion** OL has potential anti-oxidant and hypoglycemic activity, which is affected by the harvest time.

Key words: *Origanum vulgare* L. leaf; harvest time; anti-oxidant; hypoglycemic; total phenols; total flavonoid; origanoside I; luteolin 7-O-glucuronide; apigenin 7-O-glucuronide; rosmarinic acid; lithospermic acid; origanoside I derivative

收稿日期: 2017-11-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: 基于体内过程的 CYP2E1 靶点酸浆降糖活性成分及其作用机制研究 (31400304); 教育部产学研合作协同育人项目: 基于 CYP2E1 靶点的牛至降糖活性的研究 (201601031002)

作者简介: 张盼盼 (1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事分子药理学研究。Tel: 15871710645 E-mail: 1255265299@qq.com

*通信作者 孙丽娟 (1980—), 女, 硕士生导师, 副教授, 主要从事分子药理学研究。Tel: (027)88668035 E-mail: lijuansun1212@163.com

陈勇 (1966—), 男, 博士生导师, 教授, 主要从事分子药理学和药理学研究。Tel: (027)88661237-8067 E-mail: 1740952455@qq.com

牛至 *Origanum vulgare* L. 为唇形科 (Labiatae) 牛至属 *Origanum* Linn. 多年生草本植物, 曾收载于《中国药典》1977 年版^[1], 具有清暑解表、利水消肿的功效, 用于中暑、感冒、头痛、身痛、急性肠炎及腹痛腹泻等症的治疗。现代药理研究表明牛至叶提取物具有抗菌^[2-4]、抗氧化^[5]、抗黑色素沉积^[6]、抗癌^[7]等多种药理作用。以往对牛至叶的研究多集中在化学成分 (尤其是其挥发油成分) 及其活性评价方面。赵海伊^[8]通过 3 种不同的方法对牛至中的挥发性成分进行提取, 并最终确定了其主要的挥发性物质, 并在后期对其挥发精油进行了抗氧化、抗 DNA 氧化损伤、抑菌等方面的活性研究。韩飞等^[9]从湖北产的牛至药材不同部位提取挥发油, 其中牛至叶和花挥发油中鉴定出 37 个化合物, 占挥发油总量的 98.78%, 并证明其根、叶、花挥发油中除了含有相同的抗菌物质外还存在较强的抗氧化物质。张莉等^[10]研究发现将牛至挥发油添加到肉鸡的饲料中, 将增加肌肉中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及鸡肉的生产效率。而对不同生长期牛至叶非挥发性化学成分及总酚、总黄酮的含量变化, 及其抗氧化和降血糖活性的变化, 仍缺乏较系统的研究。

大量的实验研究^[11-12]表明抗氧化活性与中药中的总酚和总黄酮含量具有一定的相关性。本研究以不同采收期牛至叶为研究对象, 检测其乙腈-水 (1:1) 提取物中与抗氧化活性相关的主要成分总酚和总黄酮的含量, 并评价提取物体外抗氧化和降血糖活性。通过总结不同采收期牛至叶提取物物质组成和活性的变化规律, 为进一步开发利用牛至叶提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

分别于不同采收时期 (4~10 月) 采收牛至叶, 采自于湖北省团风县高坪镇, 经武汉植物园李建强研究员鉴定为唇形科牛至属植物牛至 *Origanum vulgare* L. 的叶; 自由基清除实验试剂盒 (ABTS, 货号 s0119)、总抗氧化实验试剂盒 (FRAP, 货号 s0116), 碧云天生物科技有限公司; 对照品槲皮素 (批号 10081-9905, 质量分数 \geq 98%), 中国食品药品检定研究院; 对照品没食子酸 (批号 20131118, 质量分数 \geq 98%), 国药集团化学试剂有限公司; α -葡萄糖苷酶 (货号 g5003)、4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG, 货号 1377)、二甲基亚砜 (DMSO, 货号 5879), Sigma 公司; 荧光 D-葡萄糖同系物 (2-NBDG, 货号 N13195), 英潍捷基 (上海) 贸易有限公司; 无糖培养基 (货号

GNM11966), 杭州吉诺生物医药技术有限公司; DMEM 培养基 (货号 1776587)、胎牛血清 (FBS, 货号 1414426), Gibco 公司; 乙腈 (货号 155174, 色谱级), 美国 Tedia 公司; 维生素 C (批号 20160301, 质量分数 \geq 99.7%) 国药集团化学试剂有限公司; 胰岛素 (批号 033216160426), 上海碧云天生物技术有限公司; 阿卡波糖 (批号 I1630021, 质量分数 \geq 98%) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器

TriStar LB 多功能酶标仪 (德国 Berthold 公司); 高效液相色谱 Agilent 1200 (安捷伦公司); microTOF-Q 质谱仪 (美国 Bruker Daltonic 公司); BIO-RAD iMARKTM 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞 (武汉大学病毒学国家重点实验室馈赠), 培养于含 10% FBS 和 1% 双抗 (青霉素-链霉素) 的 DMEM 培养液中, 培养条件为 37 °C、5% CO₂, 当细胞融合至 80% 时用 0.25% 的胰蛋白酶消化并传代或接入孔板进行实验。

2 方法

2.1 牛至叶提取物制备

干燥的牛至叶粉碎后过 40 目筛。称取牛至叶粉末样品 50 mg 于 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL 的乙腈-水 (1:1) 溶液, 混匀后用超声提取器以 30 kHz 的频率提取 50 min, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清于 5 mL 离心管中。按照上述提取方法对残渣再提取 2 次, 合并提取液, 减压浓缩并冷冻干燥得到无定形粉末, 放入棕色干燥器中备用。

2.2 提取物中总酚的定量测定^[13]

取不同采收期牛至叶提取物 10 μ L (0.5 mg/mL, DMSO 溶解), 100 μ L 福林-酚试剂工作液室温反应 5 min, 加入 Na₂CO₃ (0.1 g/mL) 溶液 100 μ L 室温反应 60 min, 570 nm 处测样品的吸光度 (A) 值, 以没食子酸对照品绘制标准曲线, 计算不同采收期牛至叶提取物的总酚含量。

2.3 提取物中总黄酮的定量测定^[14]

将不同采收期牛至叶提取物 180 μ L (0.5 mg/mL, DMSO 溶解) 与 20 μ L 10% 的 AlCl₃ 混匀, 室温反应 50 min, 迅速在 405 nm 波长测定其 A 值。以槲皮素对照品绘制标准曲线, 计算不同采收期牛至叶提取物的总黄酮含量。

2.4 提取物中主要成分分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Eclipse XD-C₁₈ (250

mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~15 min, 5%→15% B; 15~45 min, 15%→25% B; 25~60 min, 25%→45% B。DAD 波长范围为 190~690 nm, 其中固定的检测波长设置为 254 nm。

2.4.2 质谱条件 选用电喷雾 (ESI) 离子源负离子检测模式, 离子源参数为毛细管电压 4 000 V、雾化气 (N₂) 压力 80 kPa、干燥气 (N₂) 体积流量 8.0 L/min、干燥气温度 200 °C、质量扫描范围为 m/z 100~1 600。

2.5 提取物体外抗氧化活性评价

2.5.1 ABTS⁺ 自由基清除能力测定^[15] 取 7 mmol/L 的 ABTS 和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液, 等体积混合, 室温黑暗放置 16 h, 生成 ABTS 自由基储备液。临用前用 PBS 稀释为在 630 nm 处 A 值为 0.70 ± 0.02 的 ABTS 自由基工作液。取 1 mL ABTS 工作液与 100 μL 不同月份牛至叶提取物 (根据产品说明书及前期对药物质量浓度的摸索, 最终确定提取物测定质量浓度为 0.2 mg/mL, DMSO 配制) 混匀, 室温反应 6 min 后迅速于 630 nm 处测定 A 值, 用 VC 溶液作阳性对照测定各个样品的自由基清除能力。

2.5.2 FRAP 总抗氧化能力测定^[16] 取 7.5 mL TPTZ 稀释液与 0.75 mL TPTZ 溶液混匀后, 加 0.75 mL 的检测缓冲液得到 FRAP 工作液。在孔板中加入 FRAP 工作液与不同采收期牛至叶提取物 (根据产品说明书及前期对药物质量浓度的摸索, 最终确定提取物测定质量浓度为 0.2 mg/mL, DMSO 配制) 反应, 37 °C 孵育 5 min, 570 nm 处测定 A 值, 计算各样品的总抗氧化能力。

2.6 体外降糖活性评价

2.6.1 2-NBDG 摄取能力测定^[17] 将 HepG2 细胞 (约 2×10^5 个) 接种至 6 孔板, 培养 24 h 后细胞融合, 给予不同采收期牛至叶提取物 [以 DMSO 配成 100 mg/mL 母液, 临用前 DMEM 稀释为 100 μg/mL (在前期给药质量浓度摸索实验中确定了最适的无毒质量浓度为 100 μg/mL)] 处理 24 h, 再换无糖培养基饥饿 3 h, 加入 2-NBDG (50 μmol/L) 30 min。以 DMSO 为溶剂对照组, 以胰岛素 (9 μg/mL) 为阳性对照组, 以 485 nm 为发射波长, 以 535 nm 为吸收波长测其荧光值, 计算相对荧光强度。

2.6.2 α-葡萄糖苷酶抑制能力测定^[18] 用 DMSO-PBS (1:9, 0.1 mol/L PBS, pH 6.8) 配制不同质量

浓度的牛至叶提取物, 加入 0.5 U/mL α-葡萄糖苷酶, 37 °C 孵育 10 min。随后加入 5.0 mmol/L 的 pNPG, 37 °C 孵育 20 min, 再加入浓度为 0.3 mol/L NaCO₃ 终止反应。以阿卡波糖为阳性对照, 检测 405 nm 处 A 值。计算各提取物对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制能力 [用 Origin 8.6 软件拟合图形, 计算半数抑制浓度 (IC₅₀)]。

2.7 数据分析

实验数据来自 3 次独立重复实验, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 组间数据比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 牛至叶提取物中的总酚和总黄酮含量

牛至叶提取物中的总酚和总黄酮质量分数测定结果见表 1。结果显示, 从出芽期 4 月到开花期 7 月采摘的牛至叶提取物中, 总酚含量逐渐增加, 在 7 月达到最大值, 随后含量有所降低, 但在整个成熟期 (8 月~10 月) 变化不大。从出芽期 4 月到成熟期 9 月不同采收期牛至叶提取物中总黄酮含量逐渐增加, 到 9 月时总黄酮含量达到最高, 但 10 月时, 其总黄酮含量锐减。

表 1 不同采收期牛至叶提取物中的总酚和总黄酮含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

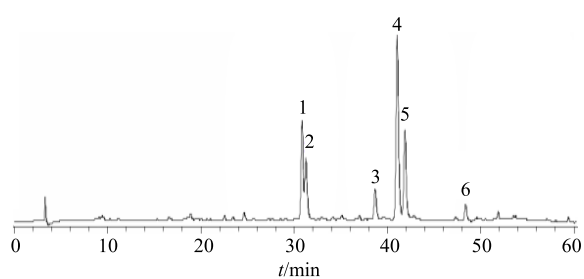
Table 1 Total phenolic content and total flavonoid content of extracts from *O. vulgare* leaf in different harvest time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

采收期	总酚/(mg·g ⁻¹)	总黄酮/(mg·g ⁻¹)
4 月	99.64±3.43	25.60±0.63
5 月	105.40±3.93	31.60±0.74
6 月	138.66±4.07	30.93±0.95
7 月	144.54±3.54	36.27±1.07
8 月	111.18±3.53	42.27±1.08
9 月	106.26±4.79	50.93±1.56
10 月	118.19±4.29	32.93±0.74

3.2 牛至叶提取物中主要成分分析

在牛至叶提取物 (7 月份采收样品) 的 HPLC 图 (280 nm, 图 1) 中观察到 6 个较高强度的色谱峰, 根据质谱数据 (表 2) 以及相关参考文献报道^[19-21], 鉴定出牛至苷 I、木犀草素 7-*O*-葡萄糖醛酸苷、芹菜素 7-*O*-葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸、紫草酸和牛至苷 I 衍生物 (未知物) 6 个主要成分。

从表 3 峰面积数据可以看出, 牛至苷 I、牛至苷 I 衍生物及紫草酸随着生长月份的增加, 其含量



1-牛至苷 I 2-木犀草素 7-O-葡萄糖醛酸苷 3-芹菜素 7-O-葡萄糖醛酸苷 4-迷迭香酸 5-紫草酸 6-牛至苷 I 衍生物
1-origanoside I 2-luteolin 7-O-glucuronide 3-apigenin 7-O-glucuronide 4-rosmarinic acid 5-lithospermic acid 6-origanoside I derivative

图 1 7 月份采收的牛至叶提取物 HPLC 图 (280 nm)

Fig. 1 Liquid chromatogram of extracts from *O. vulgare* leaf in July (280 nm)

逐渐下降; 而迷迭香酸、木犀草素 7-O-葡萄糖醛酸苷和芹菜素 7-O-葡萄糖醛酸苷随着生长月份的增加, 其含量有稳步上升趋势, 其中 2 种主要黄酮类成分在 10 月份的含量略有下降。

3.3 牛至叶提取物的体外抗氧化活性

不同采收期牛至叶提取物均显示出一定的抗氧化能力 (图 2)。FRAP 结果显示 7 月采摘的牛至叶提取物抗氧化能力最强, 相当于 Fe^{2+} 的 (4.10 ± 0.44) 倍 ($P < 0.01$), 10 月次之, 其他月份差异较小。ABTS 结果显示以 7 月采收的牛至叶提取物清除自由基能力最强, 相当于 VC 的 0.71% ($P < 0.01$), 5 月能力最弱, 而其他月份则相差不大。虽然通过 FRAP 法和 ABTS 法测定的不同采收期牛至叶提取物的抗氧

表 2 7 月份采收的牛至叶提取物中主要成分的色谱及质谱数据

Table 2 Chromatographic and mass spectrometric data of main constitutions of extracts from *O. vulgare* leaf collected in July

化合物	t_R/min	准分子离子峰	理论相对分子质量	碎片离子峰	化学式	化合物
1	30.6	421.111 8	421.114 0	259.060 9, 153.024 3	$C_{20}H_{22}O_{10}$	牛至苷 I
2	31.0	461.072 2	461.072 6	285.039 5	$C_{21}H_{18}O_{12}$	木犀草素 7-O-葡萄糖醛酸苷
3	35.1	445.076 4	445.077 6	269.044 0	$C_{21}H_{18}O_{11}$	芹菜素 7-O-葡萄糖醛酸苷
4	41.0	359.074 4	359.077 2	197.045 4, 179.035 8, 161.024 9	$C_{18}H_{16}O_8$	迷迭香酸
5	41.6	537.104 0	537.103 9	493.109 9, 295.061 2	$C_{27}H_{22}O_{12}$	紫草酸
6	48.4	599.143 0	599.140 6	555.195 0, 421.112 7, 287.057 1	$C_{29}H_{28}O_{14}$	牛至苷 I 衍生物

表 3 不同采收期牛至叶提取物中 6 种主要成分相对含量

Table 3 Relative content of six main components of extracts from *O. vulgare* leaf in different harvest time

采收期	峰面积					
	牛至苷 I	木犀草素 7-O-葡萄糖醛酸苷	芹菜素 7-O-葡萄糖醛酸苷	迷迭香酸	紫草酸	牛至苷 I 衍生物
4 月	856.1	212.8	395.8	838.1	1 563.6	152.5
5 月	723.0	270.7	307.4	873.1	1 087.6	104.4
6 月	637.8	348.4	305.3	1 046.9	981.9	189.2
7 月	700.0	377.6	369.8	1 055.3	785.4	127.6
8 月	636.6	391.8	267.7	1 183.8	667.6	94.4
9 月	561.9	371.1	200.3	961.7	559.0	74.0
10 月	498.6	252.4	169.3	1 151.6	507.0	92.0

化活性不完全相同, 但结果均显示 7 月份的牛至叶提取物抗氧化性最强。提取物中总酚含量的变化趋势与牛至叶提取物的抗氧化活性基本一致, 推测其总酚类化合物可能是其主要抗氧化活性成分。

3.4 牛至叶提取物的体外降糖活性

3.4.1 对 2-NBDG 摄取能力的影响 2-NBDG 作为检测活细胞摄取葡萄糖的荧光示踪剂, 通过葡萄糖

转运蛋白进入细胞, 常用于细胞糖代谢研究^[22]。本研究采用 2-NBDG 摄取实验来评价各采收期牛至叶提取物对葡萄糖的吸收能力, 结果见图 3。与对照组相比, 各采收期牛至叶提取物均能明显增加 HepG2 细胞对 2-NBDG 的摄取, 且作用均好于阳性对照药 (胰岛素), 表明牛至叶提取物能刺激肝细胞对葡萄糖的利用率而降低血糖。此外, 结果还表明

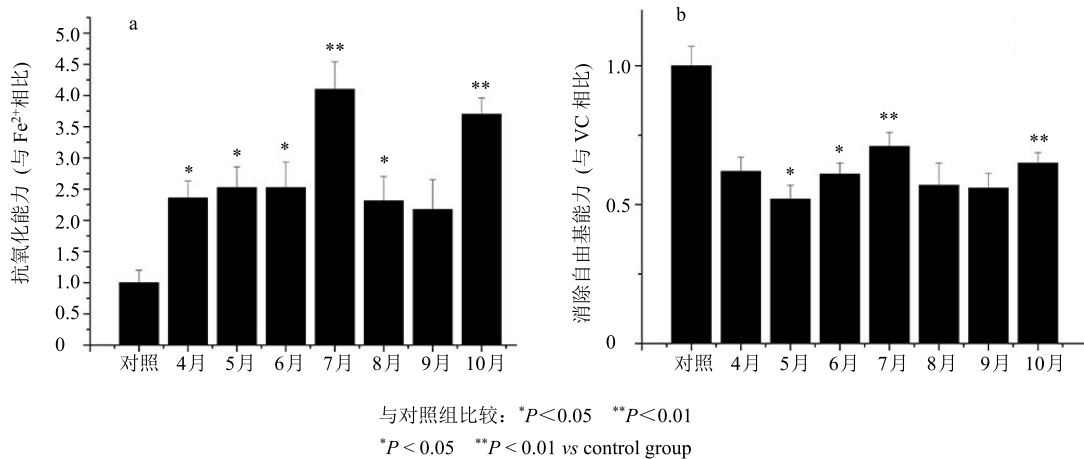


图 2 不同采收期牛至叶提取物的 FRAP (a) 和 ABTS (b) 实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Results of FRAP test (a) and ABTS test (b) of extracts from *O. vulgare* leaf in different harvest time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

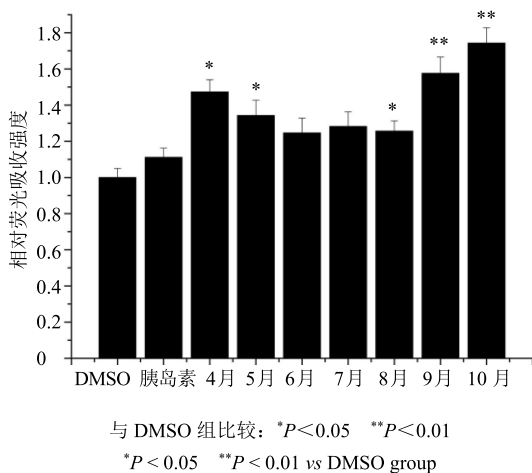


图 3 不同采收期牛至叶提取物对 HepG2 细胞 2-NBDG 摄取能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of extracts from *O. vulgare* leaf in different harvest time on 2-NBDG glucose uptake by HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

出芽期 4 月及成熟期 9~10 月的牛至叶提取物对荧光葡萄糖摄取的促进作用较强, 6~8 月的促进作用较小。

3.4.2 对 α -葡萄糖苷酶抑制能力 多糖须经水解酶水解成单糖后才能被人体吸收, 其中 α -葡萄糖苷酶是多糖水解中的关键酶类^[23], 其活性直接影响血浆中的葡萄糖浓度, 抑制其活性是降低 2 型糖尿病患者体内高血糖症状的有效方法^[24]。本实验以一种快速简单的 α -葡萄糖苷酶抑制作用筛选模型^[25], 研究了不同采收期牛至叶提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的体外影响, 结果见表 4。结果显示, 牛至叶提取物从出芽期 (4、5 月份) 到开花期 (6、7 月份) 抑制

表 4 不同采收期牛至叶提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 α -Glucosidase inhibition effect of extracts from *O. vulgare* leaf in different harvest time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
阿卡波糖	2.93 ± 0.05
4 月采收牛至叶提取物	1.12 ± 0.09
5 月采收牛至叶提取物	2.08 ± 0.11
6 月采收牛至叶提取物	2.40 ± 0.22
7 月采收牛至叶提取物	2.63 ± 0.52
8 月采收牛至叶提取物	0.45 ± 0.08
9 月采收牛至叶提取物	0.49 ± 0.02
10 月采收牛至叶提取物	0.35 ± 0.03**

与阿卡波糖比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs acabose group

α -葡萄糖苷酶活性能力逐渐降低, 而成熟期 (8、9、10 月份) 抑制能力明显增强。其中 10 月份采收的牛至叶提取物对 α -葡萄糖苷酶有较强的抑制活性, 而且明显优于阳性药物阿卡波糖, 为阳性对照的 8.37 倍, 与阳性对照相比差异显著 ($P < 0.01$)。

4 讨论

本研究以牛至叶乙腈-水 (1:1) 提取物为研究对象, 对不同采收期牛至叶提取物进行了体外抗氧化和降糖活性研究。结果表明, 不同采收期牛至叶提取物均具有一定的抗氧化和降糖活性, 其中以 7 月份采收的牛至叶提取物抗氧化活性最强, 10 月份采收的牛至叶提取物体外抗 α -葡萄糖苷酶活性及刺激肝细胞葡萄糖摄取能力最强, 为筛选所需牛至叶提供了科学参考, 若要开发牛至叶的抗氧化活性, 应采摘 7 月的牛至叶为宜, 同理要对其降糖活性进

行进一步的开发利用,则应该选择在 10 月对牛至叶进行采摘。

对提取物总酚及总黄酮含量测定结果显示,7 月份采收的牛至叶提取物总酚含量最高,9 月份采收的牛至叶提取物中总黄酮含量最高。采用液质联用技术研究不同采收期牛至叶提取物中主要化学成分发现,牛至昔 I^[26]、木犀草素 7-O-葡萄糖醛酸苷^[27-28]、芹菜素 7-O-葡萄糖醛酸苷^[28-29]、迷迭香酸^[30-31]、紫草酸^[32-33]和牛至昔 I 衍生物为其主含物质,这些化合物多具有一定的抗氧化活性或降血糖活性,提示牛至叶中的总酚与总黄酮可能是其抗氧化与降糖主要活性部位。

综上所述,牛至叶乙腈-水(1:1)提取物体外具有较明显的抗氧化及降糖活性,其活性与其生长期有密切关系。本研究结果为牛至叶抗氧化及降血糖作用的进一步开发利用提供了实验参考。牛至叶中非挥发性成分相对复杂,对其活性成分研究将会是一个漫长的过程。本研究中对牛至叶乙腈-水提取物中的 6 种主要成分进行了鉴定及相对含量测定,但具体是哪一种或哪几种成分发挥主要抗氧化及降糖活性尚不明确。后续研究中主要将对其已知的主要成分进行活性筛选,并从体内、体外 2 种途径研究其作用机制,为牛至叶的进一步开发利用奠定科学基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 1977.
- [2] Bouhdid S, Abrini J, Zhiri A, et al. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(5): 1558-1568.
- [3] de Souza E L, de Barros J C, de Oliveira C E V, et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 137(2): 308-311.
- [4] Sagdıç O, Özcan M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols [J]. *Food Control*, 2003, 14(3): 141-143.
- [5] Sarikurcu C, Zengin G, Oskay M, et al. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils [J]. *Industr Crops Prod*, 2015, 70: 178-184.
- [6] Ding H Y, Chou T H, Liang C H. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare* [J]. *Food Chem*, 2010, 123(2): 254-262.
- [7] Al-Kalaldeh J Z, Abu-Dahab R, Afifi F U. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells [J]. *Nutr Res*, 2010, 30(4): 271-278.
- [8] 赵海伊. 三种不同方法提取牛至挥发精油的化学成分比较研究 [A] // 2011 年中国农业工程学会农产品加工及贮藏工程分会学术年会暨全国食品科学与工程博士生学术论坛论文集 [C]. 重庆: 国务院学位委员会办公室教育部学位管理与研究生教育司、中国农业工程学会农产品加工及贮藏工程分会、西南大学研究生部, 2011.
- [9] 韩飞, 陈泣, 舒积成, 等. 湖北产牛至药材不同提取部位挥发油 GC-MS 分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(13): 1887-1891.
- [10] 张莉, 宋代军. 牛至油对肉鸡生产性能和血液指标的影响 [J]. *中国饲料*, 2009(4): 25-27.
- [11] Hossain A, Hamood A, Humaid M T. Comparative evaluation of total phenols, flavonoids content and antioxidant potential of leaf and fruit extracts of *Omani Ziziphusjuzuba* L. [J]. *Pacif Sci Rev A Nat Sci Engin*, 2016, 18(1): 78-83.
- [12] 孙丹, 黄士淇, 蔡圣宝. 不同加工方式对苦芥中总酚、总黄酮及抗氧化性的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(1): 141-147.
- [13] Zengin G, Nithyanantham S, Locatelli M, et al. Screening of *in vitro* antioxidant and enzyme inhibitory activities of different extracts from two uninvestigated wild plants: *Centranthus longiflorus* subsp. *longiflorus* and *Cerintho minor* subsp. *auriculata* [J]. *Europ J Integr Med*, 2016, 8(3): 286-292.
- [14] 颜仁梁, 刘志刚. 中草药、中药制剂中总黄酮类化合物含量测定方法综述 [J]. *广州医药*, 2005, 36(6): 6-10.
- [15] Mahendran G, Manoj M, Prasad K J R, et al. Antioxidants, anti-proliferative, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-microbial effects of isolated compounds from *Swertia corymbosa* (Grieb.) Wight ex CB Clark-An *in vitro* approach [J]. *Food Sci Human Wellness*, 2015, 4(4): 169-179.
- [16] Xu Z, Ju J, Wang K, et al. Evaluation of hypoglycemic activity of total lignans from *Fructus Arctii* in the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 548-555.
- [17] Zou C, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement [J]. *J*

- Biochem Biophys Methods*, 2005, 64(3): 207-215.
- [18] Chen H, Ouyang K H, Jiang Y, *et al.* Constituent analysis of the ethanol extracts of *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves and their inhibitory effect on α -glucosidase activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 98(8): 829-836.
- [19] Lin Y L, Wang C N, Shiao Y J, *et al.* Benzolignanoid and polyphenols from *Origanum vulgare* [J]. *J Chin Chem Soc*, 2013, 50(5): 1079-1083.
- [20] Nagy T O, Solar S, Sontag G, *et al.* Identification of phenolic components in dried spices and influence of irradiation [J]. *Food Chem*, 2011, 128(2): 530-534.
- [21] Takeda Y, Tomonari M, Arimoto S, *et al.* A new phenolic glucoside from an Uzbek medicinal plant, *Origanum tyttanthum* [J]. *J Nat Med*, 2008, 62(1): 71-74.
- [22] Kim W H, Lee J, Jung D W, *et al.* Visualizing sweetness: increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications [J]. *Sensors*, 2012, 12(4): 5005-5027.
- [23] Kim S D, Nho H J. Isolation and characterization of α -glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum* [J]. *J Microbio*, 2004, 42(3): 223-227.
- [24] Poovitha S, Parani M. *In vitro* and *in vivo* α -amylase and α -glucosidase inhibiting activities of the protein extracts from two varieties of bitter melon (*Momordica charantia* L.) [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2016, 16(1): 185-186.
- [25] Lordan S, Smyth T J, Soler-Vila A, *et al.* The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2170-2176.
- [26] Nakatani N, Kikuzaki H. A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.) [J]. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(10): 2727-2732.
- [27] Rehecho S, Hidalgo O, de Cirano M G I, *et al.* Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2011, 44(4): 875-882.
- [28] Zeid A H A, Farag M A, Hamed M A A, *et al.* Flavonoid chemical composition and antidiabetic potential of *Brachychiton acerifolius* leaves extract [J]. *Asian Pacific J Trop Biomed*, 2017, 7(5): 389-396.
- [29] Zaabat N, Hay A E, Michalet S, *et al.* Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noé [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(12): 3328-3335.
- [30] Fadel O, El Kirat K, Morandat S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation *in situ* [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembr*, 2011, 1808(12): 2973-2980.
- [31] Jayanthi G, Subramanian S. Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet-STZ induced experimental diabetes mellitus [J]. *Biomed Prevent Nutr*, 2014, 4(3): 431-437.
- [32] Chan K W K, Ho W S. Anti-oxidative and hepatoprotective effects of lithospermic acid against carbon tetrachloride-induced liver oxidative damage *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 673-680.
- [33] Ferreres F, Vinholes J, Gil-Izquierdo A, *et al.* *In vitro* studies of α -glucosidase inhibitors and antiradical constituents of *Glandora diffusa* (Lag.) DC Thomas infusion [J]. *Food Chem*, 2013, 136(3): 1390-1398.