

# Comparison of Ecdysterone, Total Flavonoids and Antioxidant Activity of Ajuga Species in Taiwan

陳美璇、楊博文、何偉真

E-mail: 9707239@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

*Ajuga decumbens* Thunb. ex Murray, *A. pygmaea* A. Gray, *A. taiwanensis* Nakai ex Murata and *A. nipponensis* Makino belong to the genus *Ajuga* (Labiatae). These species of *Ajuga* have been used for the treatment of wounds, abdominal pain, fever, sore throat, lung disease and hepatitis as Taiwanese folk medicines. In this study, ecdysterone and total flavonoids of leaves from *A. decumbens* Thunb. ex Murray, *A. pygmaea* A. Gray, *A. taiwanensis* Nakai ex Murata and *A. nipponensis* Makino were analyzed. The results indicated that the leaves from *A. nipponensis* had the largest amount of ecdysterone  $79.8 \pm 0.02$  mg/100g and the leaves from *A. decumbens* contained the largest amount of total flavonoids  $26.5 \pm 0.23$  QE-mg/g. The best extraction conditions were using methanol as solvent in ultrasonic-assisted extraction for 50 min with a power of 600W. The antioxidant activities (scavenging effect on 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) and total flavonoids contents of four kinds of Taiwan *Ajuga* extracts were evaluated in this study. The antioxidant activities were 94.2% for *A. nipponensis* (the highest value), 93.7% for *A. taiwanensis*, 26.9% for *A. decumbens* and 33.4% for *A. pygmaea*. The contents of ecdysterone from *A. taiwanensis*, *A. decumbens*, *A. pygmaea* and *A. nipponensis* were analyzed by using high performance liquid chromatography. The contents of ecdysterone were between 0.4–79.8 mg/100g in *Ajuga*. The ecdysterone of the *A. nipponensis* had the highest content of  $79.8 \pm 0.02$  mg/100g. The total flavonoids contents of *A. nipponensis*, *A. decumbens*, *A. taiwanensis* and *A. pygmaea* were  $15.2 \pm 0.05$ ,  $26.5 \pm 0.02$ ,  $22.9 \pm 0$  and  $17.1 \pm 0$  QE-mg/g, respectively. The *A. decumbens* had the highest total flavonoids content of  $26.5 \pm 0.02$  QE-mg/g. Moreover, we have established the FTIR and HPLC-UV finger print chromatogram which could distinguish among 4 different *Ajuga* in Taiwan.

Keywords : 匍匐筋骨草;台灣筋骨草;矮筋骨草;日本筋骨草;唇型花科;蛻皮甾酮;總黃酮;超音波輔助萃取;微波輔助萃取;FTIR指紋圖譜; , HPLC-UV指紋圖譜

## Table of Contents

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書iii 中文摘要iv 英文摘要vi 誌謝viii 目錄ix 圖目錄xiii 表目錄xv 第一章 緒論1 第二章 文獻回顧3 第一節 筋骨草屬(*Ajuga*)植物簡介3 第二節 台灣產筋骨草屬植物型態及分佈簡介3 一、匍匐筋骨草3 二、網果筋骨草6 三、日本筋骨草8 四、矮筋骨草10 五、台灣筋骨草12 第三節 筋骨草屬植物研究概況15 一、筋骨草屬植物生理及藥理作用簡介14 二、筋骨草屬植物相關成分研究進展16 三、蛻皮甾酮18 四、類黃酮化合物18 五、自由基簡介23 第四節 中草藥植物其活性成分之不同萃取方法簡介23 一、超音波輔助萃取24 二、微波輔助萃取25 第五節 , -Diphenyl-picrylhydrazyl(DPPH)自由基清除能力28 第六節 中草藥指紋圖譜28 一、中草藥指紋圖譜發展及其應用價值29 二、中草藥指紋圖譜種類簡介29 第三章 材料與方法31 第一節 材料31 一、植物來源31 二、藥品清單31 三、儀器清單32 第二節 實驗方法32 一、樣品前處理33 二、不同萃取方法之建立33 (一) 標準萃取分析方法33 1. 超音波輔助萃取33 2. 微波輔助萃取34 三、成分分析34 (一) 蛻皮甾酮分析34 (二) 總黃酮分析35 (三) 產量計算方式36 (四) DPPH自由基清除能力測定36 四、筋骨草HPLC及FTIR指紋圖譜建立36 (一) HPLC-UV指紋圖譜建立步驟36 (二) FTIR指紋圖譜建立步驟37 (三) KBr樣品分析37 第四章 結果與討論38 第一節 超音波輔助之最佳操作時間萃取來比較筋骨草之蛻皮甾酮產量38 第二節 比較四種台灣產筋骨草超音波輔助萃取甲醇及95%乙醇之蛻皮甾酮及總黃酮產量41 一、超音波輔助萃取分析蛻皮甾酮之產量比較41 二、超音波輔助萃取總黃酮之產量比較49 第三節 微波輔助萃取4種筋骨草蛻皮甾酮與總黃酮萃取產量之比較52 一、微波輔助萃取分析蛻皮甾酮及總黃酮產量之比較52 第四節 清除DPPH 自由基能力測定分析57 第五節 FTIR傅利葉轉換紅外線光譜儀以及HPLC-UV指紋圖譜之建立61 一、分析方法61 二、Fourier Transform Infrared Spectrometry -FTIR指紋圖譜建立61 三、以KBr方式進行樣品分析62 四、High performance liquid chromatogram HPLC-UV 指紋圖譜建立69 第五章 結論76 參考文獻77 附錄83 圖目錄 圖一 匍匐筋骨草4 圖二 匍匐筋骨草5 圖三 網果筋骨草6 圖四 網果筋骨草7 圖五 日本筋骨草8 圖六 日本筋骨草9 圖七 矮筋骨草10 圖八 矮筋骨草11 圖九 台灣筋骨草12 圖十 台灣筋骨草13 圖十一 筋骨草屬植物中活性成分結構圖17 圖十二 類黃酮基本結構圖19 圖十三 苯丙氨酸合成類黃酮化合物路圖20 圖十四 日本筋骨草之超音波甲醇萃取圖42 圖十五 日本筋骨草之微波甲醇萃取分析圖43 圖十六 日本筋骨草之超音波乙醇萃取分析圖44 圖十七 日本筋骨草之微波乙醇萃取分析圖 45 圖十八 矮筋骨草超音波之乙醇萃取分析圖46 圖十九 超音波輔助萃取-甲醇及95%乙醇之蛻皮甾酮產量比較圖48 圖二十 超音波輔助萃取-甲醇及95%乙醇之總黃酮產量比較圖51 圖二十一 微波輔助萃取-甲醇及95%乙醇之蛻皮甾酮產量比較圖54 圖二十二 微波輔助萃取-甲醇及95%乙醇之總黃酮產量比較圖56 圖二十三 筋骨草清除自由基能力比較圖60

圖二十四 日本筋骨草FTIR指紋圖譜63 圖二十五 台灣筋骨草FTIR指紋圖譜64 圖二十六 匍匐筋骨草FTIR指紋圖譜65 圖二十七 矮筋骨草FTIR指紋圖譜66 圖二十八 四種台灣產之筋骨草FTIR圖譜67 圖二十九 四種台灣產筋骨草FTIR400~1300(cm<sup>-1</sup>)指紋圖譜68 圖三十 日本筋骨草之HPLC-UV 248 nm波長指紋圖譜70 圖三十一 台灣筋骨草之HPLC-UV 248 nm波長指紋圖譜71 圖三十二 匍匐筋骨草之HPLC-UV 248 nm波長指紋圖譜72 圖三十三 矮筋骨草之HPLC-UV 248 nm波長指紋圖譜73 圖三十四 四種台灣筋骨草之HPLC-UV 248 nm波長指紋圖譜74 表目錄 表一黃酮類化合物的結構分類21 表二超音波輔助萃取台灣筋骨草(葉) 50~80分鐘-甲醇及95%乙醇之蛻皮甙酮產量39 表三超音波輔助萃取台灣筋骨草(葉) 50~80分鐘-甲醇及95%乙醇之總黃酮產量40 表四超音波輔助萃取4種筋骨草甲醇及95%乙醇蛻皮甙酮產量47 表五超音波輔助萃取4種筋骨草甲醇及95%乙醇總黃酮產量50 表六微波輔助萃取4種筋骨草甲醇及95%乙醇之蛻皮甙酮產量53 表七微波輔助萃取4種筋骨草-甲醇及95%乙醇之總黃酮產量55 表八筋骨草清除自由基能力59

## REFERENCES

- 1.王艷和張鐵軍。2005。微波萃取技術在中藥有效成分提取中的應用。中草藥學誌3(36):470-473。
- 2.白雪蓮和章華偉。2005。微波萃取技術及在食品化學中的應用。食品工業科技雜誌11(26):182-185。
- 3.甘尉棠。2004。現代化工分離技術講座。精細石油化工4:63-65。
- 4.朱國輝、邱泰球和黃卓烈。2001。超聲波在萃取中的應用。聲學技術20(4):188-190。
- 5.李靈霞和師伯省。2006。指紋圖譜技術的應用概況。健康大視野-醫學分冊(8):42-43。
- 6.李明、彭艷麗和田永云。2006。指紋圖譜技術在中藥鑑定中的應用。衛生職業教育24(7):105-107。
- 7.吳立軍。2006。中藥化學。第1-33頁。科技圖書館。台北。台灣。李岡榮。2005。實用台灣草藥百科。第108頁。漢宇國際文化有限公司。臺北。台灣。
- 8.吳旭、王武軍、張軍花、熊俊和侯量。2006。植物藥有效成分 -蛻皮甙酮抑制血管內皮細胞的凋亡。中國臨床康10(19):72-73。
- 9.林進和唐仕榮。2005。論天然黃酮類化合物及其抗氧化作用。徐州工程學院學20:187-190。
- 10.吳德峰。1997。淺析筋骨草的藥用價值。福建畜牧獸醫(1):32-33。
- 11.邱年永和張光雄。2001。原色台灣藥用植物圖鑑(6)。第181及184頁。南天書局有限公司。台北。台灣。
- 12.邱明華和邢其毅。1998。具有生理活性的天然有機化合物。化學進展10(3):265-272。
- 13.金繼曙和都述虎。1994。筋骨草中黃酮類成份的研究。安徽醫學15(2):51-52。
- 14.武繼彪、隋在雲和張玲。2001。 -蛻皮甙酮延緩衰老的初步實驗研究。天然產物研究與開發13(5):28-29。
- 15.袁珂和俞莉。2006。超聲提取與微波萃取冬凌草甲素的工藝比較。中國中藥雜誌9(31):778-779。
- 16.徐世清、戈志強、戴漩穎、喬洪根、司馬楊虎和鄭必平。2005。20-羥基蛻皮甙的藥理作用和醫學應用研究進展。科技通報21(1):56-62。
- 17.馬志平和黃榕。2002。筋骨草有效部位黃酮類粗品的保肝試驗。海峽藥學14(5):40-41。
- 18.張英、俞卓裕和吳曉琴。2004。中草藥和天然植物有效成分提取新技術-微波協助萃取。中國中藥雜誌29(2):104-108。
- 19.張曉東、潘國鳳和呂圭源。超聲提取在中藥化學成分提取中的應用研究進展。2004。時珍國醫國藥15(12):861-862。
- 20.張英、韋異和粟暉。2002。超聲提取-反相高效液相色譜法測定牛膝中蛻皮甙酮。光譜實驗室19(5):668-671。
- 21.陳莉莉、吳紅權、李穎和帥琴。2002。漏蘆中蛻皮甙酮提取方法研究。中藥材3(25):195-197。
- 22.曾茂貴、賈鈞和吳符火。2003。筋骨草對小鼠S180肉瘤的抑瘤試驗。福建中醫學院學報13(2):30-31。
- 23.單文軍、郭芳齡、王科軍和徐建平。2006。微波技術在天然產物生物活性成份提取中的應用研究。江西化工(4):46-49。
- 24.項昭保、霍丹群和任紹光。2002。超音波在中草藥化學成分提取中的應用。自然雜誌23(5):289-291。
- 25.馮年平、范廣平、吳春蘭和韓朝陽。2002。微波萃取技術在中藥提取中的應用。世界科學技術-中藥現代化2(4):49-52。
- 26.楊遠波、劉和義、彭鏡毅、施炳霖和呂勝由編著。1999。臺灣維管束植物簡誌第四卷，行政院農業委員會，台北，臺灣。
- 27.褚小蘭和王漢章。1997。筋骨草的本草考証。中藥材20(11):586-587。
- 28.鄧湘慶和龔盛昭。2006。微波輔助萃取中藥有效成分的研究進展。廣東化工33(164):89-92。
- 29.劉斌、石任兵、葛小俠、周瑩和周靜。2001。筋骨草屬植物化學成分與藥理活性。國外醫藥(植物藥分冊)16(3):96-101。
- 30.蔡旻都和陳皓君。2006。蔬果中類黃酮之抗氧化作用與生物活性。化學學64(3):315-353。
- 31.蔡寶昌和劉訓紅。2005。常用中藥材HPLC指紋圖譜測定術。第1-33頁。化學工業出版社。北京。中國。
- 32.黎彧、高虹和歐步青。2004。應用微波技術提取紫荊花色素的 研究。林產化學與工業24(2):80-82。
- 33.薛聰賢。2003。台灣原生景觀植物圖鑑。第149頁。台灣普綠有限公司出版部。彰化。台灣。謝宗欣。1998。台灣筋骨草屬植物介紹。自然保育季刊21:21-27。
- 34.謝明勇和陳奕。2006。微波輔助萃取技術研究進展。食品與生物技術學報25(1):105-114。
- 35.龍春、高志強、陳鳳鳴和王林。2006。黃酮類化合物的結構-抗氧化活性關係研究進展。重慶文理學院學報(自然科學版)5(2):13-17。
- 36.鍾錠全。1997。青草世界-彩色圖鑑。第273頁。協聯印書館股份有限公司。台北。台灣。
- 37.蕭久富。2007。不同萃取方法對台灣筋骨草及匍匐筋骨草活性成分之比較研究。大葉大學碩士論文。
- 38.蕭培根。1990。中國本草圖錄。第123頁。台灣商務印書館股份有限公司。台北。台灣。
- 39.譙斌宗、楊元和高玲。2002。微波萃取在衛生檢驗中的應用。中國衛生檢驗雜誌12(5):632-634。
- 40.嚴偉。2002。超聲波協助提取技術。21(9):649-651。
- 41.Blosi, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical.
- 42.Chenni, A., Ait Yahia, D., Boukourt, F. O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A. and Bouchenak, M. 2007. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Ethnopharmacology* 109(2):207-213.
- 43.Chen, Q., Xia, Y.P. and Qiu, Z.Y. 2006. Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro. *Life Sciences* 78(10):1108-1113.
- 44.Chenni, A., Ait Yahia, D., Boukourt, F.O., Prost, J., Lacaille -Dubois, M.A., Bouchenak, M. 2007. Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high -cholesterol diet. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2):207-213.
- 45.Fishman, M. L., Chau, H. K., Hoagland, P. D. and Hotchkiss, A. T. 2006. Microwave-assisted extraction of lime pectin. *Food Hydrocolloids* 20:1170-1177.
- 46.Fulzele, D. P. and Satdive, R. K. 2005. Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*. *Journal of Chromatography A* 1063:9-13.
- 47.Ganzler, K., Salgo', A. and Valko', K. 1986. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography* 371:299-306.
- 48.Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C. and Wen, M. 2001. Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine

Radix puerariae. *Analytica Chimica Acta* 436:41-47. 49. Hilaly El, J. and Lyoussi, B. 2002. Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 80(2):109 – 113. 50. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1985. *Free Radicals in Biology and Medical*. Oxford University Press. 51. Hilaly El, J., Lyoussi, B., Wibo M. and Morel, N. 2004. Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 93(1):69-74. 52. Kariba, R. M. 2001. Antifungal activity of *Ajuga remota*. *Fitoterapia* 72:77-178. 53. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H. and Nishino H. 2000. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*. *Cancer Letters* 157(1):87-92. 54. Labbozzetta, S., Valvo, L., Bertocchi, P. and Manna, L. 2005. Focused microwave-assisted extraction and LC determination of the active ingredient in naproxen-based suppositories. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:463-468. 55. Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). *Journal of Chromatography A* 1054:95-111. 56. Pan, X., Liu, H., Jia, G. and Shu, Y. Y., 2000. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Biochemical Engineering Journal* 5:173-177. 57. Shu, Y. Y., Ko, Y. M. and Chang, Y. S. 2003. Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. *Microchemical Journal* 74:131-139. 58. Terahara, N., Callebaut A., Ohba R., Nagata T., Ohnishi-Kameyama M. and Suzuki M. 2001. Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures. *Phytochemistry* 58:493-500.