

# 紫草提取物的体外抗氧化活性研究

张改平<sup>1</sup>, 杨建雄<sup>2\*</sup>, 朱玉安<sup>3</sup>

(1. 陕西师范大学物理学与信息技术学院, 西安 710062; 2. 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062;

3. 陕西师范大学后勤管理处, 西安 710062)

**摘要:** 为研究紫草色素(LEP)的体外抗氧化活性,采用常规回流方法提取LEP,测定了LEP对超氧自由基( $O_2^-$ )和1,1-二苯基-2-苦苯肼自由基(DPPH·)的清除能力,及其对 $\beta$ -胡萝卜素/亚油酸自氧化体系的抑制作用。结果表明,LEP对DPPH·和 $O_2^-$ 均有较强的清除能力,并且对 $\beta$ -胡萝卜素/亚油酸自氧化体系有明显的抑制作用,说明紫草的药理作用可能与LEP较强的抗氧化能力有关。

**关键词:** 紫草; DPPH自由基; 抗氧化活性; 萘醌

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)05-0490-04

## Study on Antioxidant Activity of *Lithospermum erythrorhizon* in vitro

ZHANG Gai-Ping<sup>1</sup>, YANG Jian-Xiong<sup>2\*</sup>, ZHU Yu-An<sup>3</sup>

(1. College of Physics & Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 3. Logistic Affairs Department, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** *Lithospermum erythrorhizon* pigment (LEP) was isolated from *L. erythrorhizon* by means of regular reflux-extract. Moreover, the antioxidant activity of LEP was evaluated by superoxide anion ( $O_2^-$ ), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) radical scavenging activity and  $\beta$ -carotene linoleate model system assays. The results showed that LEP had strong radical scavenging activity towards DPPH· and  $O_2^-$ , and it owned obvious inhibition against  $\beta$ -carotene linoleate model system. Therefore, the results proved that the pharmacological function of *L. erythrorhizon* was probably related with the strong antioxidant activity of LEP.

**Key words:** *Lithospermum erythrorhizon*; DPPH radical; Antioxidant activity; Naphthoquinone

紫草是多年生紫草科草本植物,其主要成分紫草色素(*Lithospermum erythrorhizon* pigment, LEP)是一类脂溶性很强的萘醌类色素,具有止血<sup>[1]</sup>、抗炎、抗菌<sup>[2,3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>及抗癌<sup>[5]</sup>等作用。LEP还具有电子传递作用,促进或抑制某些生化反应过程,表现出多种生物活性。由于pH值的不同,LEP会呈现不同的颜色,因此LEP被广泛应用于食品和医药等领域。目前关于紫草的研究多集中于其药效及LEP的分离和纯化,而对其抗氧化性能的研究报道很少。我们采用4种化学模拟体系研究了LEP的抗氧化能力,为更好地研究其在医药及食品方面的作用,开发具有保健功能的新型抗氧化剂提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)购于西安市藻

露堂中药店。

### 1.2 主要仪器

紫外-可见分光光度计、旋转薄膜蒸发仪、数显恒温水浴锅等。

### 1.3 主要试剂

1,1-二苯基-2-苦苯肼自由基(DPPH·)、抗坏血酸(Vc)、 $\beta$ -胡萝卜素、亚油酸、Tween-20、铁氰化钾( $[K_3Fe(CN)_6]$ )和三氯乙酸(TCA)购自美国Sigma公司;二丁基羟基甲苯(BHT)、氮蓝四唑(NBT)、吩嗪硫酸甲脂(PMS)、还原型辅酶(NADH)购自德国Applichem公司;甲醇、三氯化铁( $FeCl_3$ )、双氧水、硫酸亚铁、乙酸,以及无水乙醇均为国产分析纯。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 LEP的提取

将干燥紫草粉碎,用20倍量95%乙醇50℃回流提取2次,每次4 h,提取液

收稿日期:2007-03-23,修回日期:2007-05-21。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20175012)。

作者简介:张改平(1983-),女,硕士,主要从事天然产物的分离鉴定与功能评价研究。

\* 通讯作者(E-mail:jxyang@snnu.edu.cn)。

3500 r/min 离心 10 min, 上清液用旋转薄膜蒸发仪于 50℃ 浓缩, 再置烘箱中干燥, 最后用分析天平称重。做抗氧化活性研究时以 95% 的乙醇为溶剂配制所需浓度的待测液。

**1.4.2 羟基萘醌总色素含量测定** 根据中国药典<sup>[6]</sup> 测定羟基萘醌总色素的含量。精确称取 8 mg 紫草提取物, 置于 100 mL 容量瓶中, 95% 乙醇定容, 在 516 nm 处测定其吸光度值, 根据中国药典记载, 按左旋紫草素的吸光系数  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 242$  计算紫草提取物中羟基萘醌总色素的含量。

**1.4.3 清除 DPPH·自由基作用的测定<sup>[7]</sup>** 精确称取 4 mg 的 DPPH·, 用 95% 的甲醇溶解并定容到 100 mL。将 1 mL 不同浓度的待测液与 3 mL DPPH·溶液分别加入试管中, 摆匀, 室温静置 20 min 后于 517 nm 处测定吸光度  $A_i$  (分别以 1 mL 不同浓度的待测液与 3 mL 95% 甲醇溶液调零)。测定 1 mL 95% 乙醇与 3 mL DPPH·溶液混合后的吸光度  $A_j$  作为阴性对照, 以 Vc 和 BHT 作阳性对照, 每个浓度平行做 3 次, 根据下列公式计算清除率: 清除率 =  $[1 - A_i/A_j] \times 100\%$ 。

**1.4.4 清除超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^-$ ) 作用的测定<sup>[8]</sup>** 用双蒸水分别配制 0.078 mol/L NBT、0.468 mol/L NADH 和 0.06 mol/L PMS 溶液。依次向试管中加入 1 mL NBT、1 mL NADH 和 1 mL 不同浓度的待测液, 最后加入 0.4 mL 的 PMS, 混匀后室温静置 5 min, 于 560 nm 处测定吸光度  $A_i$  (分别以 1 mL 不同浓度的待测液加入 1 mL NBT、1 mL NADH 和 0.4 mL 双蒸水调零), 同时测定用 1 mL 95% 乙醇代替待测液时的吸光度  $A_j$  作为阴性对照, 以 Vc 作阳性对照, 清除率计算方法与 1.4.3 相同。

**1.4.5 还原力的测定<sup>[9]</sup>** 取 1 mL 不同浓度的待测液与 2.5 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.6) 及 2.5 mL 铁氰化钾 (1%) 混合, 混合物在 50℃ 水浴中孵育 20 min, 然后加入 2.5 mL 的 TCA (10%, W/V), 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2.5 mL, 分别加入 2.5 mL 无水乙醇和 0.5 mL  $\text{FeCl}_3$  (0.1%), 于 700 nm 处测定吸光度 (分别在不同浓度待测液构成的反映体系中, 以蒸馏水代替  $\text{FeCl}_3$  溶液作为空白调零), 以 Vc 和 BHT 作阳性对照, 每个浓度平行做 3 次。

**1.4.6 抗氧化能力的测定<sup>[8]</sup>** 采用  $\beta$  胡萝卜素-亚油酸体系测定样品的抗氧化能力。反应液的配制: 将 5 mg 的  $\beta$  胡萝卜素溶于 10 mL 氯仿中, 再加入 0.25 mL 的亚油酸和 2 mL 的 Tween-20, 将此混合物

移入圆底瓶中于 50℃ 旋转蒸发 4 min, 之后加入 500 mL 蒸馏水。向各试管中加入 1 mL 不同浓度的待测液和 4 mL 反应液, 置于 50℃ 水浴中每隔 25 min 测其在 470 nm 处的吸光度 (分别在不同浓度待测液构成的体系中, 以蒸馏水代替  $\beta$  胡萝卜素作为空白调零), 共测量 150 min。抗氧化能力按下列公式计算: 抗氧化力 =  $[1 - (A_0 - A_t)/(A_0' - A_t')] \times 100\%$ 。

$A_0$  和  $A_t$  分别为加入样品后 0 min 和 150 min 时的吸光度,  $A_0'$  和  $A_t'$  分别为不加样品时 0 min 和 150 min 时的吸光度。

## 1.5 统计分析

用 Excel 处理数据, 计算资料用 *t* 检验, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 羟基萘醌总色素含量测定

根据左旋紫草素吸光系数计算出 LEP 中羟基萘醌总色素含量为 37.5%。

### 2.2 对 DPPH·的清除作用

DPPH·是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 在 517 nm 处有强吸收峰, DPPH·通常被用来检测抗氧化剂的抗氧化活性。当有自由基清除剂存在时, DPPH·会和清除剂提供的质子结合形成 DPPH-H, 从而使溶液颜色由紫色变为黄色。实验结果表明, LEP 是一种很好的质子供体, 可作为一种抗氧化剂。从表 1 可知 LEP 具有很强的清除 DPPH·的能力, 当色素浓度为 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 其清除率可达 91.1%, 半抑制率  $IC_{50}$  为 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Vc 和 BHT 的  $IC_{50}$  分别为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

表 1 LEP、BHT 和 Vc 对 DPPH·自由基的

清除作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 Effects of LEP, BHT and Vc on DPPH· radical scavenging

LEP		BHT		Vc	
浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	抑制率 (%)	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	抑制率 (%)	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	抑制率 (%)
10	$11.4 \pm 2.3$	20	$31.6 \pm 2.8$	5	$29.3 \pm 2.7$
20	$23.2 \pm 2.5$	40	$42.2 \pm 3.3$	10	$50.6 \pm 2.6$
50	$37.5 \pm 2.6$	60	$50.3 \pm 2.4$	14	$65.3 \pm 3.1$
100	$52.6 \pm 2.8$	80	$71.2 \pm 2.8$	18	$80.0 \pm 2.3$
150	$65.2 \pm 2.7$	100	$74.6 \pm 2.2$	20	$84.1 \pm 2.7$
200	$83.1 \pm 2.7$	120	$82.5 \pm 2.5$	30	$96.5 \pm 2.4$
300	$91.1 \pm 2.1$	140	$83.3 \pm 2.6$	40	$97.3 \pm 3.1$

### 2.3 LEP 对超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )的清除作用

超氧阴离子自由基是在线粒体电子传递过程中形成的,线粒体利用一系列的传递体将4个电子转移给氧分子,将氧还原并生成水,同时产生能量。但是在此过程中,一些参加链式反应的电子会发生泄漏而与氧反应形成超氧阴离子<sup>[10]</sup>。超氧阴离子的氧化性较弱,但它会分解成氧化性很强的单线态氧自由基或者羟自由基,而单线态氧和羟自由基能使DNA的股链断裂,对生物体产生极大的损伤。表2表明LEP具有较强的清除超氧阴离子自由基的能力,它与Vc的 $IC_{50}$ 分别为253  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,当浓度都为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,LEP与Vc清除超氧的能力分别为15.3%和33.1%。在此化学模拟体系中LEP呈现出对 $O_2^-$ 较强的清除能力,并且其清除超氧自由基的能力随着浓度的增加而增大。

表2 LEP和Vc对超氧阴离子自由基的清除作用( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Superoxide anion radical scavenging activity of LEP and Vc

LEP		Vc	
浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	抑制率(%) Inhibition	浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	抑制率(%) Inhibition
50	15.3 $\pm$ 1.9	10	8.2 $\pm$ 1.8
100	26.5 $\pm$ 2.3	20	10.3 $\pm$ 2.6
200	41.3 $\pm$ 3.0	30	12.5 $\pm$ 2.5
300	61.5 $\pm$ 2.6	40	22.4 $\pm$ 2.9
400	65.6 $\pm$ 1.8	50	33.1 $\pm$ 2.1
500	71.4 $\pm$ 2.6	60	69.3 $\pm$ 3.2
600	85.2 $\pm$ 2.4	70	97.3 $\pm$ 2.5

### 2.4 LEP 的还原能力

物质的还原能力可以反映其潜在抗氧化性能。具有还原能力的物质通常是电子供体,能够还原脂质过氧化过程中的中间氧化产物,因此具有初级或次级抗氧化性能。表3表明LEP具有较强的还原能力,并且还原力与浓度呈正相关,提示LEP可以作为电子和质子供体,终止自由基链反应<sup>[8]</sup>。

表3 LEP、BHT和Vc的还原能力( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Reducing power of LEP, BHT and Vc

LEP		BHT		Vc	
浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	吸光度 $A_{700\text{nm}}$	浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	吸光度 $A_{700\text{nm}}$	浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	吸光度 $A_{700\text{nm}}$
200	0.198 $\pm$ 0.006	50	0.394 $\pm$ 0.007	100	0.481 $\pm$ 0.007
400	0.318 $\pm$ 0.003	100	0.761 $\pm$ 0.006	200	0.821 $\pm$ 0.011
600	0.416 $\pm$ 0.001	150	1.180 $\pm$ 0.008	300	1.070 $\pm$ 0.004
800	0.512 $\pm$ 0.001	200	1.593 $\pm$ 0.005	400	1.263 $\pm$ 0.006
1000	0.610 $\pm$ 0.007	250	1.595 $\pm$ 0.002	500	1.375 $\pm$ 0.003

### 2.5 LEP 的抗氧化能力

在 $\beta$ 胡萝卜素-亚油酸体系中,当没有加入抗氧化剂时, $\beta$ 胡萝卜素的颜色会迅速褪去,这是因为 $\beta$ 胡萝卜素和亚油酸被双重氧化产生自由基的结果。亚油酸自由基会攻击不饱和 $\beta$ 胡萝卜素分子,结果使 $\beta$ 胡萝卜素分子失去双键而被氧化,体系失去发色团,橙色消失。抗氧化剂的加入会中和亚油酸自由基以及其他自由基,从而阻止其对 $\beta$ 胡萝卜素分子的漂白作用<sup>[11]</sup>。图1和表4表明LEP具有较强的抗氧化性能,当浓度为200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,清除率分别为61%、68%和72%。

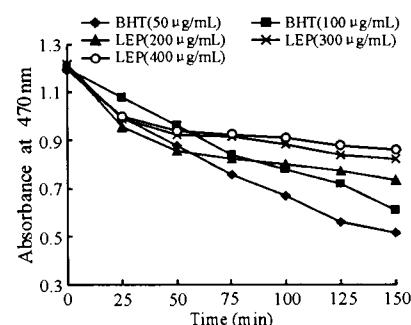


图1 LEP和BHT的抗氧化能力  
Fig. 1 Antioxidant activity of LEP and BHT

表4 对LEP和BHT抗氧化能力的测定( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Antioxidant activity of LEP and BHT tested by  $\beta$ -carotene-linoleic acid system

BHT		LEP	
浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	抑制率(%) Inhibition	浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	抑制率(%) Inhibition
50	44.2 $\pm$ 2.2	200	61.0 $\pm$ 2.4
100	50.2 $\pm$ 4.2	300	68.0 $\pm$ 4.1
		400	72.0 $\pm$ 3.0

### 3 结论

本实验结果表明LEP对 $O_2^-$ 和DPPH·均具有较强的清除作用,总还原力和抗氧化力虽然较阳性对照物BHT弱一些,但与一些天然产物相比,其作用是相当强的。BHT为人工合成的强抗氧化剂,近年研究表明,其使用安全性存在一定问题,不少研究工作正在探索用天然产物代替BHT的可能性。本研究的结果表明,LEP在抗氧化作用方面有良好的开发价值,紫草药理作用的机制也可能与其抗氧化作用有关。紫草中含有丰富的萘醌类色素及其衍生物,目前,关于萘醌类色素具有抗菌、消炎和抗病毒等功效的报道较多,并且在临幊上被广泛使用,但关于萘醌类色素与抗氧化活性之间关系的报道甚少,因此

本结果也可为萘醌类色素药理机制方面的研究提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 孙培杰.紫草的药理作用与临床应用研究进展[J].中医药信息,2002,19(4):19.
- [2] Kaith B S, Kaith N S, Chauhan N S. Anti-inflammatory effect of *Arnebia euchroma* root extracts in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 1996, 55(1):77-80.
- [3] Staniforth V, Wang S Y, Shyur L F, Yang N S. Shikonins, phytocompounds from *Lithospermum erythrorhizon* inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor  $\alpha$ -promoter *in vivo* [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(7):5877-5885.
- [4] 管鹏健,徐德锋,李绍顺.萘醌类化合物抗肿瘤活性研究进展[J].中国药物化学杂志,2004,14(4):249-256.
- [5] 刘红兵,崔承彬,任虹,顾谦群.天然来源萘醌及其人工衍生物抗癌剂的研究进展[J].天然产物研究与开发,2005,17(1):104-107.
- [6] 国家药品典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005.238-239.
- [7] Kumaran A, Karunakaran R J. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus* [J]. *Food Chem*, 2007, 100(1):356-361.
- [8] Siddhuraju P, Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea seed (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) extracts [J]. *Food Chem*, 2007, 101(1):10-19.
- [9] Kumaran A, Karunakaran R J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus* [J]. *Food Chem*, 2006, 97(1):109-114.
- [10] Lee J, Koo N, Min D B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2004, 3(1):21-33.
- [11] Jayaprakasha G K, Singh R P, Sakariah K K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro* [J]. *Food Chem*, 2001, 73(3):285-290.

## 欢迎订阅 2008 年《武汉植物学研究》

双月刊 大 16 开 国内定价 15 元 全年 90 元  
 邮发代号 38-103(国内) BM872(国外)  
 刊号 CN 42-1149/Q ISSN 1000-470X

《武汉植物学研究》是科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊(学报级),主要报道植物学及各分支学科的基础研究和应用研究方面具创新性、有重要意义的最新研究成果,植物学研究的新技术、新方法等。

**栏目设置:**研究论文、技术与方法、综合评述、研究简报、学术讨论、重要书刊评介、学术动态等。

**读者对象:**从事植物学研究的科技人员、大专院校师生,以及相关学科,包括农、林、牧、医药、轻工、水产和环保等方面的科技工作者。

《武汉植物学研究》为中国科技核心期刊、中国中文核心期刊,已被中国科学引文数据库(CSCD)核心库、《中文核心期刊要目总览》、中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知识资源总库《中国科技期刊精品数据库》、《中国生物学文摘》、美国《化学文摘》(CA)、美国《生物学文摘》(BA)、美国《剑桥科学文摘:自然科学》(CSA: NS)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、万方数据——数字化期刊群等二十多种国内外检索期刊、数据库作为核心期刊或统计源期刊收录。本刊曾相继获全国优秀科技期刊奖、中国科学院优秀期刊奖、湖北省优秀期刊奖。

**订阅方式:**全国各地邮局均可订阅(邮发代号:38-103);或通过天津“联合征订服务部”订阅,  
**地址:**天津市大寺泉集北里别墅 17 号 联合征订服务部,邮编:300385,电话:022-23962479,  
 022-23973378;E-mail: lhzd@public.tpt.tj.cn。如漏订,本刊编辑部随时可办理邮购,免收邮寄费。

**通讯地址:**武汉市 武昌磨山 中科院武汉植物园(或武汉市 74006 信箱)《武汉植物学研究》编辑部(邮编:430074);**电话:**027-87510755

E-mail: editor@rose.whiob.ac.cn; 网址: <http://whzwxyj.cn>