

紫草提取物的体外抗氧化活性研究

张改平¹, 杨建雄^{2*}, 朱玉安³

(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($O_2^{\cdot-}$)和 1,1-二苯基-2-苦苯肼自由基(DPPH \cdot)的清除能力, 及其对 β -胡萝卜素/亚油酸自氧化体系的抑制作用。结果表明, LEP 对 DPPH \cdot 和 $O_2^{\cdot-}$ 均有较强的清除能力, 并且对 β -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-Ping¹, YANG Jian-Xiong^{2*}, ZHU Yu-An³

(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 ($O_2^{\cdot-}$), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) radical scavenging activity and β -carotene linoleate model system assays. The results showed that LEP had strong radical scavenging activity towards DPPH \cdot and $O_2^{\cdot-}$, and it owned obvious inhibition against β -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^[1]、抗炎、抗菌^[2,3]、抗肿瘤^[4]及抗癌^[5]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 \cdot)、抗坏血酸 (Vc)、 β -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器于 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^[6]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^[7] 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, 摇匀, 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 ($O_2^{\cdot-}$) 作用的测定^[8] 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^[9] 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 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 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^[8] 采用 β 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 β 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 β 胡萝卜素作为空白调零), 共测量 150 min。抗氧化能力按下式计算: 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 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其清除率可达 91.1%, 半抑制率 IC_{50} 为 80 $\mu\text{g/mL}$ (Vc 和 BHT 的 IC_{50} 分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 60 $\mu\text{g/mL}$)。

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 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	抑制率 Inhibition (%)	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	抑制率 Inhibition (%)	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	抑制率 Inhibition (%)
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(O₂⁻)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^[10]。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 IC₅₀分别为 253 μg/mL 和 56 μg/mL,当浓度都为 50 μg/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 O₂⁻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(μg/mL) Concentration	抑制率(%) Inhibition	浓度(μg/mL) Concentration	抑制率(%) Inhibition
50	15.3 ± 1.9	10	8.2 ± 1.8
100	26.5 ± 2.3	20	10.3 ± 2.6
200	41.3 ± 3.0	30	12.5 ± 2.5
300	61.5 ± 2.6	40	22.4 ± 2.9
400	65.6 ± 1.8	50	33.1 ± 2.1
500	71.4 ± 2.6	60	69.3 ± 3.2
600	85.2 ± 2.4	70	97.3 ± 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^[8]。

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 Concentration (μg/mL)	吸光度 A _{700nm}	浓度 Concentration (μg/mL)	吸光度 A _{700nm}	浓度 Concentration (μg/mL)	吸光度 A _{700nm}
200	0.198 ± 0.006	50	0.394 ± 0.007	100	0.481 ± 0.007
400	0.318 ± 0.003	100	0.761 ± 0.006	200	0.821 ± 0.011
600	0.416 ± 0.001	150	1.180 ± 0.008	300	1.070 ± 0.004
800	0.512 ± 0.001	200	1.593 ± 0.005	400	1.263 ± 0.006
1000	0.610 ± 0.007	250	1.595 ± 0.002	500	1.375 ± 0.003

2.5 LEP 的抗氧化能力

在 β 胡萝卜素-亚油酸体系中,当没有加入抗氧化剂时,β 胡萝卜素的颜色会迅速褪去,这是因为 β 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 β 胡萝卜素分子,结果使 β 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 β 胡萝卜素分子的漂白作用^[11]。图 1 和表 4 表明 LEP 具有较强的抗氧化性能,当浓度为 200 μg/mL、300 μg/mL 和 400 μg/mL 时,清除率分别为 61%、68% 和 72%。

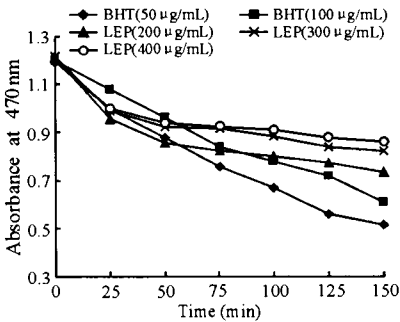


图 1 LEP 和 BHT 的抗氧化能力
Fig. 1 Antioxidant activity of LEP and BHT

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 β-carotene-linoleic acid system

BHT		LEP	
浓度(μg/mL) Concentration	抑制率(%) Inhibition	浓度(μg/mL) Concentration	抑制率(%) Inhibition
50	44.2 ± 2.2	200	61.0 ± 2.4
100	50.2 ± 4.2	300	68.0 ± 4.1
		400	72.0 ± 3.0

3 结论

本实验结果表明 LEP 对 O₂⁻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,并且在临床上被广泛使用,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

本结果也可作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 α -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://whzwxxyj.cn