

田七总色素的体外抗氧化活性研究^①

梁凌玲¹, 黎入荧², 周琼花², 严婷婷², 满爱燕², 李庭树³, 喻巧容⁴, 黄锁义^{1,5,②}

1. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000 E-mail: linglinggyzz@126.com;
2. 右江民族医学院 2009 级临床医学专业本科生, 广西 百色 533000;
3. 右江民族医学院 2017 级基础医学专业研究生, 广西 百色 533000;
4. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200;
5. 广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 探讨田七总色素的体外抗氧化活性。**方法** 以蒸馏水为溶剂, 从田七中提取总色素; 采用比色法分别测定田七总色素清除 DPPH·、O₂· 和 ·OH 三种自由基的作用, 以及对 Fe³⁺ 的还原能力。**结果** 田七总色素对三种自由基都有一定的清除作用, 清除 DPPH·、O₂· 自由基的 EC₅₀ 分别是 0.17 mg/ml、0.24 mg/ml; 当色素浓度为 0.15 mg/ml 时, 其对 DPPH· 清除率为 45.03%、对 O₂· 为 23.48%、·OH 清除率为 3.71%, 其对三种自由基的清除能力排序为 DPPH· > O₂· > ·OH; 对 Fe³⁺ 也具有较强的还原能力。**结论** 氧自由基清除率与田七总色素浓度存在明显的量效关系, 清除作用随着总色素浓度的增加而增强。还原 Fe³⁺ 能力也随总色素的浓度增加而增强。

关键词: 田七; 总色素; 抗氧化

中图分类号: R282.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)03-0190-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.03.008

The antioxidant effects of total pigments of *Panax notoginseng* in vitro

Liang Lingling¹, Li Ruying², Zhou Qionghua², Yan Tingting²,
Man Aiyang², Li Tingshu³, Yu Qiaorong⁴, Huang Suoyi^{1,5}

1. College of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China E-mail: linglinggyzz@126.com;
2. Undergraduate Student of Grade 2009, College of Clinical Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
3. Postgraduate Student of Grade 2017, College of Basic Medical Science, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
4. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China;
5. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of the Characteristics Ethnic Medicine of the Youjiang Valley, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the antioxidant effects of total pigments in the *Panax notoginseng* in vitro. **Methods** The distilled water was used as solvent to extract pigments from *Panax notoginseng*. A colorimetry method was used to determine the scavenging ability of total pigments in the *Panax notoginseng* on DPPH·, O₂· and ·OH, respectively, and the ability of total pigments on reduction of Fe³⁺ was also detected. **Results** Total pigments from *Panax notoginseng* had certain scavenging effects on three kinds of free radicals. Respectively, the EC₅₀ for scavenging DPPH· and O₂· free radicals was 0.17 mg/ml and 0.24 mg/ml. When the concentration of the total pigments of the *Panax notoginseng* was at 0.15mg/ml, its clearance

① 基金项目: 广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室开放课题(gxzdssysy2015303)

② 通信作者, E-mail: huangsuoyi@163.com

rates for DPPH·, $O_2\cdot$ and $\cdot OH$ were 45.03%, 23.48% and 3.71%, respectively. The scavenging free radical ability ranked: DPPH· > $O_2\cdot$ > $\cdot OH$. Moreover, total pigments also had strong ability of reduction of Fe^{3+} . **Conclusion** The scavenging free radicals rate of total pigment has obvious concentration-response relationship with its concentration. The scavenging effects of the pigments are enhanced when their concentrations are elevated. The reduction ability of Fe^{3+} of the pigments is also increased as their concentration is elevated.

Key words: *Panax notoginseng*; total pigments; anti-oxidant activity

随着生活质量的提高,人们崇尚自然、安全的愿望日益强烈。食品色素中的人工合成色素,因其稳定性高、色调多样且价格低廉,广泛应用于食品行业^[1]。然而近年来,合成色素危害人体健康的食品安全事件屡见报道,甚至可能致畸、致癌^[2-3]。从植物组织和微生物中提取的天然色素,不仅安全性高、色调自然,且具有生理活性,更容易受到消费者的信赖^[4]。田七(*Panax notoginseng*)为五加科植物,药食两用,应用于人体内外各种出血症以及冠心病、高血脂等心脑血管疾病^[5-6]。本文以蒸馏水为溶剂,提取田七中的色素成分,研究田七总色素对自由基的清除作用以及还原 Fe^{3+} 能力,为其今后的开发应用奠定基础研究。

1 实验材料与方法

1.1 仪器与材料 722N 可见分光光度计(上海精科);HH-SA 数显恒温水浴锅(上海上登实验设备有限公司);电子天平(上海民桥精密科仪器有限公司)。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)(美国 Sigma 公司)。田七购自广西百色市。

1.2 方法

1.2.1 田七总色素的提取 取田七粉 18.75 g。以蒸馏水为提取剂,室温下浸泡 24 h,过滤去除药渣,滤液装于广口瓶,置于水浴锅中水浴浓缩,待浓缩至稠膏备用^[7-8]。

1.2.2 田七总色素清除 DPPH 自由基抗氧化活性测定 DPPH 是一种早期人工合成的稳定自由基,其醇溶液为紫色。DPPH 自由基具有孤电子对,其在 517 nm 处有一强吸收,当与抗氧化物相遇时,孤电子对被配对,DPPH 的吸光值降低,其醇溶液颜色逐渐褪去。即吸收值越小,抗氧化活性越强。可采用分光光度计进行快速的定量分析。①田七总色素溶液的配制:取田七提取物稠膏,以高浓度逐渐稀释的方式,用蒸馏水稀释使浓度分别为 0.50 mg/ml、1.00 mg/ml、1.50 mg/ml、2.00 mg/ml、2.50 mg/ml 的溶液备用。②DPPH 溶液的配制:称取 DPPH 粉末于 500 ml 无水乙醇溶液中,配制 0.6 mmol/L DPPH 溶液备用。DPPH 溶液现配现用。③田七总色素溶液 DPPH 自

由基吸光值测定:参照张华^[9]的方法,稍作修改。取 0.5 ml 上述 DPPH 溶液于 10 ml 的具塞比色管中,分别加入不同浓度的田七总色素溶液 0.5 ml,用无水乙醇定容至 5 ml,充分混匀,在室温避光静置 30 min。以无水乙醇作为空白对照,测定 517 nm 处田七总色素提取物的吸光值。每个样品重复检测 3 次。吸光值越低,表明样品溶液抑制或者清除自由基的能力越强。样品清除 DPPH 自由基抗氧化活性用清除率来表示。其清除率计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100\%$$

式中, A_1 为加空白无水乙醇的 DPPH 自由基吸光度; A_2 为加田七总色素溶液反应后 DPPH 自由基吸光度。计算以清除 DPPH 自由基 50% 时,反应液中田七总色素提取物的浓度,计为 EC_{50} 。

1.2.3 田七总色素清除超氧自由基 $O_2\cdot$ 抗氧化活性测定 田七总色素清除超氧自由基 $O_2\cdot$ 抗氧化活性采用邻苯三酚自氧化法进行测定。参照茹宗玲等^[10]方法,稍作修改。分别取 1.2.2 中不同浓度的田七总色素溶液 0.5 ml 作为待测样品,加入反应试剂后使最终样品浓度稀释 10 倍,以蒸馏水调零,于 320 nm 处测定田七总色素溶液的吸光值。每个样品重复检测 3 次。以清除率表示,计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

式中, A_0 为不加田七总色素溶液时邻苯三酚的吸光值; A_1 为加田七总色素溶液和邻苯三酚时的吸光值; A_2 为不加邻苯三酚时田七总色素溶液的吸光值。计算以清除 $O_2\cdot$ 自由基 50% 时,反应液中田七总色素提取物的浓度,计为 EC_{50} 。

1.2.4 田七总色素清除 $\cdot OH$ 自由基抗氧化活性测定 田七总色素清除 $\cdot OH$ 自由基抗氧化活性采用 Fenton 反应的方法测定^[11]。分别取 1.2.2 中不同浓度的田七总色素溶液 0.5 ml 作为待测样品,加入反应试剂后用无水乙醇定容使最终样品浓度稀释 10 倍。于 510 nm 处测定田七总色素提取物的吸光值。每个样品重复检测 3 次。吸光值越低,表明样品溶液抑制或者清除自由基的能力越强。样品清除 $\cdot OH$ 自由基抗氧化活性用清除率来表示。其清除率计算公式:

$$\text{清除率}(\%) = [(A_0 - A_x) / A_0] \times 100\%$$

式中, A_0 为不加田七总色素溶液时的吸光值; A_x 为加田七总色素溶液时的吸光值。

1.2.5 田七总色素对 Fe^{3+} 抗氧化活性测定 采用普鲁士兰法测定田七总色素溶液还原 Fe^{3+} 能力。参照商渊婷等^[12]方法。分别取 1.2.2 中不同浓度的田七总色素溶液 2.5 ml 作为待测样品, 加入反应试剂后使最终样品浓度稀释 10 倍, 于 700 nm 处测定田七总色素溶液的吸光值。每个样品重复检测 3 次。吸光值越大, 表明样品溶液还原能力越强。

2 结果

2.1 田七总色素提取物清除 DPPH 自由基能力 由图 1 可知, 在试验浓度范围内, 随着田七总色素提取物浓度的增加, 对 DPPH 自由基的清除作用增强。当自由基清除率为 50% 时, 田七总色素提取物的浓度 (EC_{50}) 为 0.17 mg/ml, EC_{50} 较低, 表明田七总色素对 DPPH 自由基表现出很好的清除能力。

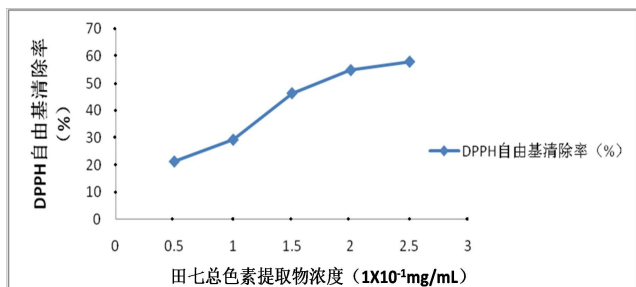


图 1 田七总色素提取物对清除 DPPH 自由基的影响

2.2 田七总色素提取物清除超氧自由基 $\text{O}_2 \cdot$ 能力 由图 2 可知, 在试验浓度范围内, 随着田七总色素提取物浓度的增加, 对 $\text{O}_2 \cdot$ 自由基的清除作用增强。当自由基清除率为 50% 时, 田七总色素提取物的浓度 (EC_{50}) 为 0.24 mg/ml, EC_{50} 较低, 表明田七总色素对 $\text{O}_2 \cdot$ 自由基表现出较好的清除能力。

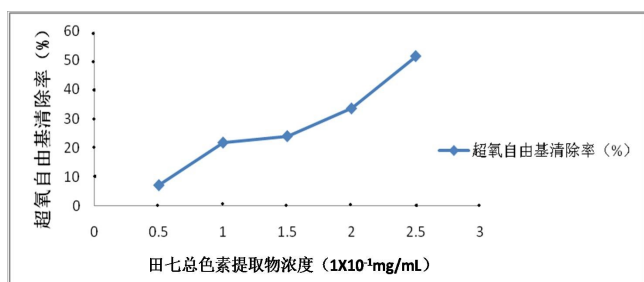


图 2 田七总色素提取物对清除超氧自由基的影响

2.3 田七总色素提取物清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基能力 由图 3 可知, 在试验浓度范围内, 随着田七总色素提取物浓度的增加, 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除力表现出微弱增强的趋势。田七总色素提取物对 $\cdot\text{OH}$ 自由基表现出一定的清除作用, 但效果不显著。

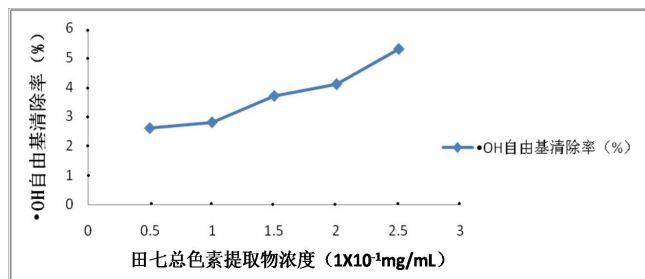


图 3 田七总色素提取物对清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的影响

2.4 田七总色素对 DPPH \cdot 、 $\text{O}_2 \cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 三种自由基清除率的比较 通过研究田七总色素提取物对清除 DPPH \cdot 、 $\text{O}_2 \cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 三种自由基的影响, 发现其在试验浓度范围内, 清除力依赖于浓度, 三种自由基的清除率均存在随着提取物浓度的增加而增强的趋势。结果表明, 当田七总色素提取物的浓度为 0.15 mg/ml 时, DPPH \cdot 、 $\text{O}_2 \cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 三种自由基的清除率分别是 45.03%、23.48% 和 3.71%, 如图 4 所示。田七总色素对 DPPH \cdot 、 $\text{O}_2 \cdot$ 自由基表现出较好的清除作用, 与 DPPH \cdot 、 $\text{O}_2 \cdot$ 自由基相比, 田七总色素提取物清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的作用不显著。

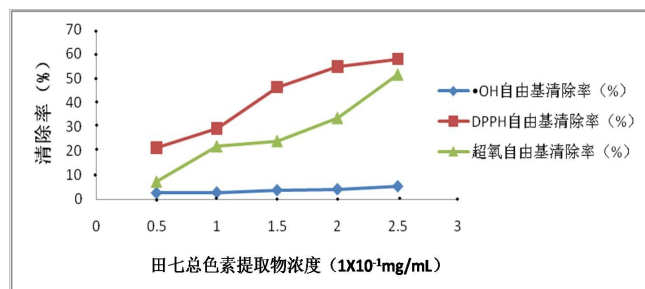


图 4 田七总色素提取物对 DPPH \cdot 、 $\text{O}_2 \cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 三种自由基清除率的比较

2.5 田七总色素还原 Fe^{3+} 能力 如表 1 所示, 在试验浓度范围内, 随着田七总色素提取物浓度的增加, 其吸光值增强, 即表明田七总色素还原 Fe^{3+} 能力随着浓度的增加而增强。本实验中, 田七总色素提取物浓度增加, 其总色素活性基团随之增加, 还原 Fe^{3+} 的能力

随之增强。

表1 田七总色素提取物还原 Fe^{3+} 能力

浓度 C(mg/ml)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
吸光度值 A	0.00	0.19	0.33	0.57	0.67	0.73

3 讨论

本研究以田七为原料,采用水提法提取田七总色素,通过考察不同提取物浓度对清除 DPPH·、 $O_2\cdot$ 和 $\cdot OH$ 三种自由基以及还原 Fe^{3+} 的影响,结果表明田七总色素对 DPPH·、 $O_2\cdot$ 和 $\cdot OH$ 三种自由基均具有一定的清除作用,对 Fe^{3+} 也具有较强的还原能力。试验浓度范围内,田七总色素对 DPPH·、 $O_2\cdot$ 和 $\cdot OH$ 三种自由基的清除作用随着溶液浓度的增加而增强,其中 DPPH 自由基的 EC_{50} 为 0.17mg/ml, $O_2\cdot$ 自由基的 EC_{50} 为 0.24mg/ml, EC_{50} 较低,表现出较强的清除能力。与 DPPH·、 $O_2\cdot$ 自由基相比,田七总色素提取物清除 $\cdot OH$ 自由基的作用不显著,清除力大小为: DPPH· > $O_2\cdot$ > $\cdot OH$ 。对 Fe^{3+} 的还原能力随着田七总色素溶液浓度的增加而增强。结果表明田七总色素具有一定的抗氧化活性。

鉴于合成色素发生的种种不安全事件,天然色素对人体某些疾病具有一定的防治作用^[13],无毒无公害的天然色素将会逐步取代合成色素,成为食品、化妆品、药物等领域的主流。植物色素作为天然色素的一种,来源广泛,取材方便,从根本上满足目前人们对“绿色,安全”的追求。田七作为我国名贵中草药,资源丰富,本身具有较高药用价值。人体内多余的自由基不利于人体健康,田七总色素表现出对自由基较强的清除作用,有望成为未来理想色素来源,其抗氧化活性值得进一步挖掘。

参考文献:

- [1] 吴红静,王维亚,叶维佳,等. 软饮料中人工合成色素快速测定试纸条的研制[J/OL]. 食品科学. (2017-04-05). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20170405.1226.008.html>.
- [2] 路勇,渠岩,冯楠,等. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法快速筛查食品中的45种工业染料[J]. 食品科学, 2012,33(6):176-180.
- [3] 王彧婕,叶善蓉,刘明东,等. 大米中限用合成色素测试方法研究[J]. 中国测试, 2016,42(3):48-52.
- [4] 杨合超. 浅谈天然食用色素的开发[J]. 农村新技术, 2008(18):17-18.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 11-12.
- [6] 周金花,廖春景,黄锁义,等. 影响田七色素稳定性的因子研究[J]. 检验医学教育, 2012,19(2):46-48.
- [7] 谢燕飞,梁绍兰,覃冬,等. 茉莉花叶色素的提取及其理化性质研究[J]. 检验医学教育, 2011,18(2):45-47.
- [8] 李楠. 黑花生色素抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2012,33(3):107-109.
- [9] 张华. 柑橘果实快速高效在线抗氧化活性评价方法的建立及其应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [10] 茹宗玲,李安林,张换平. 月季花黄色素清除超氧自由基和羟自由基作用研究[J]. 化学研究与应用, 2009, 21(9):1331-1334.
- [11] 高昌勇. 迎春花色素提取及抗氧化性研究[J]. 生物技术, 2010,20(1):59-60.
- [12] 商渊婷,周志鹏,李原,等. 茉莉花叶多酚的抗氧化作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2016,35(5):32-34.
- [13] Becker EM, Cardoso DR, Skibsted LH. Quenching of excited states of red-pigment zinc protoporphyrin IX by hemin and natural reductors in dry-cured hams [J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(2): 343-349.

收稿日期:2017-05-05;修回日期:2017-05-27