

邓琳琼,赵菲菲,张以忠. 细野荞水提液清除活性氧的效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):298-300.

# 细野荞水提液清除活性氧的效果

邓琳琼, 赵菲菲, 张以忠

(毕节学院地理与生命科学学院, 贵州毕节 551700)

**摘要:**用 NBT 光化还原法、Fenton 反应法、钼酸铵显色分光光度法对细野荞茎、叶水提液清除羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 的能力进行研究。结果表明:细野荞茎、叶水提液对  $\cdot\text{OH}$  的最高清除率分别为 93.62%、76.63%, 平均清除率分别 68.38%、39.37%;细野荞茎、叶水提液对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的最高清除率分别为 98.45%、73.32%, 平均清除率分别 79.04%、48.25%;细野荞茎、叶水提液对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用相对较弱, 最高清除率仅分别为 31.44%、12.34%, 平均清除率仅分别为 20.19%、7.39%;且茎和叶对  $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用差异显著。

**关键词:**细野荞;活性氧;  $\cdot\text{OH}$ ;  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0298-03

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是指生物体内有氧化代谢过程中或在外界物理、化学因素诱导下产生的含有氧原子且氧化能力很强的多种物质总称<sup>[1-3]</sup>, 主要有超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )、过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 等。它们在生命活动的代谢过程中不断产生, 与生物体衰老及许多疾病发生都有重要关系<sup>[4-9]</sup>。现代医学研究证明, 衰老、癌症、炎症等疾病与体内脂质过氧化和自由基有直接关系, 因此应用抗氧化物质来保持人体健康和预防疾病的研究越来越受到科学家关注<sup>[4,7,10]</sup>。荞麦属于蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum*), 种植适应性强, 属于药食两用植物<sup>[11-12]</sup>。因荞麦含有黄酮、蛋白质、原花青素、膳食纤维等功效分子, 具有降糖、抗缺血、抗氧化、抗菌、抗癌、助睡眠等保健功能<sup>[11,13]</sup>。目前, 对荞麦清除活性氧的研究较少, 且主要集中在甜荞 (*F. esculentum* Moench) 和苦荞 [*F. tataricum* (L.) Gaertn.] 2 个栽培种上。姚亚平等研究发现, 甜荞和苦荞的乙醇提取物对 DPPH 自由基和羟自由基均有显著抗氧化作用, 且呈剂量效应关系<sup>[14]</sup>。何永艳等研究发现, 甜荞和苦荞的乙醇提取物均有较强的抗氧化活性和明显的自由基清除效果<sup>[15]</sup>。而对野生荞麦清除活性氧的研究还未见报道。本研究考察了野生荞麦细野荞 [*F. gracilipes* (Hemsl.) Dammer ex Diels] 的茎、叶水提液对  $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  等活性氧的清除作用, 以期荞麦食品、保健品、化妆品的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试细野荞于 2012 年 7 月采自贵州省毕节市七星关区

收稿日期:2013-11-13

基金项目:贵州省教育厅自然科学研究项目 (编号:黔教科 2010074 号);贵州省科技厅、贵州省毕节市科技局及毕节学院科技联合基金 (编号:黔科合 J 字 LKB[2013]21 号);中央高校基本科研业务费专项 (编号:XDJK2012C111)。

作者简介:邓琳琼 (1982—), 女, 湖南武冈人, 硕士, 助理研究员, 主要从事荞麦遗传育种、生物化学及分子生物学研究。

通信作者:张以忠。E-mail: z8300300@126.com。

鸭池镇。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品制备** 取细野荞植株的茎、叶, 用蒸馏水洗净, 40℃ 下恒温烘干至恒重, 打粉, 称重。分别加干质量 40、45 倍的蒸馏水, 80℃、140 r/min 振荡 1 h, 过滤收集滤液, 对残渣分别再加 25 倍蒸馏水, 80℃、140 r/min 振荡 1 h, 过滤收集滤液, 合并 2 次滤液, 即为细野荞茎、叶的水提取液, 茎、叶提取液浓度分别为 80、61.5 g/L, 将其储存冰箱备用。

**1.2.2 水提液对活性氧的清除试验** 参照龚宁等的方法<sup>[16-17]</sup>并稍加改动, 测定水提液对活性氧的清除效果。

**1.2.2.1 细野荞各器官水提液对  $\cdot\text{OH}$  的清除试验** 对样品的茎、叶均设 5 个浓度梯度处理 (0.094、0.188、0.282、0.376、0.470 g/L), 分别测定各浓度梯度处理下的清除率。反应体系总体积为 3 mL, 含 pH 值 7.4 的 PBS 0.75 mL、2 mmol/L EDTA  $\text{Na}_2 - \text{Fe}(\text{II})$  1 mL、70 mg/L 番红花红 T 0.5 mL、不同浓度供试液 0.25 mL、体积分数 0.33% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.5 mL。将其充分混匀, 置于 37℃ 恒温水浴锅中保温 30 min, 用 723 N 分光光度计于 520 nm 波长处测吸光度 ( $D$ ), 加不同浓度供试液的体系吸光度为  $D_{\text{样品}}$ , 以提取介质代替供试液的体系吸光度为  $D_{\text{空白}}$ , 两者均以未加 EDTA  $\text{Na}_2 - \text{Fe}(\text{II})$  (用蒸馏水代替) 作对照, 各自与其对照之差分别记为  $\Delta D_{\text{样品}}$ 、 $\Delta D_{\text{空白}}$ 。供试液对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力以清除率 ( $E$ ) 表示:

$$E = (\Delta D_{\text{空白}} - \Delta D_{\text{样品}}) / \Delta D_{\text{空白}} \times 100\% \quad (1)$$

以提取液浓度为横坐标、清除率为纵坐标绘制曲线, 并计算清除率为 50% 的提取液浓度 ( $IC_{50}$ )。

**1.2.2.2 细野荞各器官水提液对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除试验** 对样品的茎、叶均设 5 个浓度梯度 (0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 g/L), 分别测定各浓度梯度处理下的清除率。反应体系总体积为 3.25 mL, 含 0.25 mL 样品, 14.5 mmol/L  $L - \text{Met}$  2.7 mL, 3 mmol/L EDTA 0.1 mL, 2.25 mmol/L NBT 0.1 mL, 60  $\mu\text{mol/L}$  核黄素 0.1 mL (EDTA、NBT、核黄素均以 pH 值 7.8 的 50 mmol/L PBS 配制)。将其混匀后倒入吸光度一致的比色皿中, 在 3 000 lx 下光照 10 min, 反应后立即避光, 迅速颠倒混匀, 立即在 560 nm 波长下测吸光度。供试液对

$O_2^- \cdot$  的清除能力及  $IC_{50}$  的计算方法同“1.2.2.1”节。

1.2.2.3 细野荠各器官水提液对  $H_2O_2$  的清除试验 对样品的茎、叶均设 5 个浓度梯度 (0.784、1.568、2.352、3.316、3.920 g/L), 分别测定各浓度梯度处理下的清除率。反应体系总体积为 3.25 mL, 在样品管中加入 0.25 mL 不同浓度样品, 然后放入 37 °C 水浴锅, 迅速加入 1.5 mL 基质液 (pH 值 7.4 的 60 mmol/L PBS, 含 65  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ ) 作为样品对照组, 保温 1.5 min 后立即加入 32.4 mmol/L 钼酸铵溶液 1.5 mL, 自来水中终止反应 5 min, 405 nm 波长处测吸光度 ( $D$ )。供试液对  $H_2O_2$  的清除能力及  $IC_{50}$  的计算方法同“1.2.2.1”节。

1.3 数据处理

利用 Excel 2003 软件进行数据处理及绘图。

2 结果与分析

2.1 细野荠茎、叶水提液对  $\cdot OH$  的清除作用

从图 1 可见, 细野荠茎、叶水提液均对  $\cdot OH$  有清除作用, 随着其浓度增加,  $\cdot OH$  清除率逐渐升高。细野荠茎、叶

水提液与  $\cdot OH$  清除率的线性回归方程分别为  $y = 1.42x + 0.28 (r = 0.98^{**})$  和  $y = 1.75x - 0.10 (r = 0.99^{**})$ , 当清除率为 50% 时, 细野荠茎、叶水提液浓度分别为 0.155、0.343 g/L, 因此细野荠茎水提液对  $\cdot OH$  的清除能力大于叶。

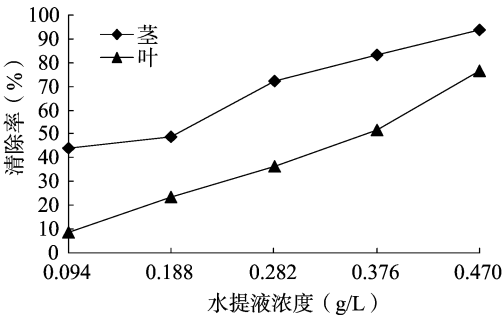


图1 细野荠茎、叶水提液对  $\cdot OH$  的清除作用

由表 1 可知, 细野荠茎、叶水提液对  $\cdot OH$  的平均清除率分别为 68.38%、39.37%,  $t = 1.91, P = 0.046 < 0.05$ , 因此细野荠茎水提液对  $\cdot OH$  的清除率显著高于叶。

表 1 细野荠茎和叶对  $\cdot OH$  清除作用

部位	$\cdot OH$ 清除率 (%)	方差 (%)	样本数	合并方差 (%)	自由度	$t$ 值	$P$ 值
茎	68.38	4.62	5	5.76	8	1.91	0.046
叶	39.36	6.89	5	5.76	8	1.91	0.046

2.2 细野荠茎、叶水提液对  $O_2^- \cdot$  的清除作用

从图 2 可见, 细野荠茎、叶水提液均对  $O_2^- \cdot$  有清除作用, 随着其浓度增加,  $O_2^- \cdot$  清除率也升高。细野荠茎、叶水提液与  $O_2^- \cdot$  清除率的线性回归方程分别为  $y = 0.52x + 0.01 (r = 0.97^{**})$  和  $y = 0.50x + 0.34 (r = 0.90^{**})$ 。当清除率为 50% 时, 细野荠茎、叶水提液浓度分别为 0.94、0.32 g/L, 因此细野荠叶水提液对  $O_2^- \cdot$  的清除能力大于茎。

由表 2 可知, 细野荠茎、叶水提液对  $O_2^- \cdot$  的平均清除率分别为 48.25%、79.04%,  $t = 1.88, P = 0.048 < 0.05$ , 因此细野荠叶水提液对  $O_2^- \cdot$  的清除率显著高于茎。

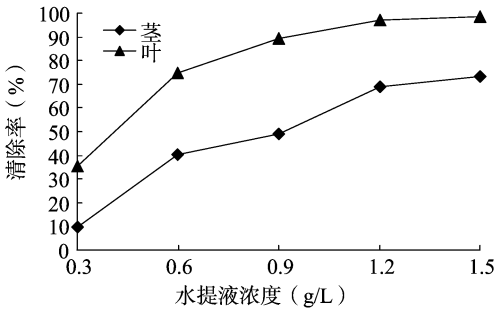


图2 细野荠茎、叶水提液对  $O_2^- \cdot$  的清除作用

表 2 细野荠茎、叶水提液对  $O_2^- \cdot$  的清除作用

部位	$O_2^- \cdot$ 清除率 (%)	方差 (%)	样本数	合并方差 (%)	自由度	$t$ 值	$P$ 值
叶	79.04	6.88	5	6.72	8	1.88	0.048
茎	48.25	6.56	5	6.72	8	1.88	0.048

2.3 细野荠茎、叶水提液对  $H_2O_2$  的清除作用

从图 3 可见, 细野荠茎、叶水提液均对  $H_2O_2$  具有清除作用, 随着其浓度增加,  $H_2O_2$  清除率逐渐升高。但清除率均较小, 细野荠茎、叶水提液对  $H_2O_2$  的最高清除率仅分别为 31.44%、12.34%。由表 3 可知, 细野荠茎、叶水提液对  $H_2O_2$  的平均清除率分别为 20.19%、7.39%,  $t = 2.70, P = 0.013 < 0.05$ , 因此细野荠茎水提液对  $H_2O_2$  的清除率显著高于叶。

3 结论与讨论

自由基具有高度的活性和极强的氧化能力, 对人体危害很大, 被认为是人体衰老和某些慢性病发生的原因之一, 当人体内自由基产生过多或清除过慢, 就会使机体受到损伤, 加速其衰老并诱发多种疾病的发生<sup>[18-20]</sup>。由于一些人工合成清

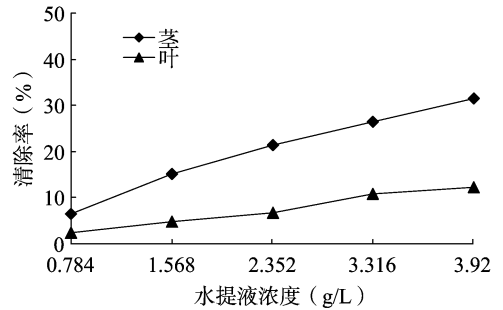


图3 细野荠茎、叶水提液对  $H_2O_2$  的清除作用

除活性氧的制剂被证实有毒, 以及人们不断追求绿色环保消费, 因此寻找清除活性氧的天然制剂越来越成为研究热

表 3 细野荞茎、叶水提液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的清除作用

部位	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 清除率(%)	方差(%)	样本数	合并方差(%)	自由度	t 值	P 值
茎	20.19	0.95	5	0.56	8	2.7	0.013
叶	7.39	0.17	5	0.56	8	2.7	0.013

点<sup>[15]</sup>。目前已在栽培荞麦<sup>[12,14-15]</sup>、花叶开唇兰<sup>[17]</sup>、南瓜<sup>[21]</sup>、少花龙葵<sup>[22]</sup>、葡萄<sup>[23]</sup>、拳参<sup>[24]</sup>、荔枝<sup>[25]</sup>等植物上进行了相关研究,证明其提取物具有较强的清除活性氧作用,为寻找安全、清除活性氧的天然制剂提供了理论依据。

本研究首次对荞麦属野生荞麦细野荞不同器官清除活性氧(·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)作用进行研究,结果发现,细野荞茎、叶水提液对·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·均具有较强的清除作用,最高清除率分别为93.62%、76.63%和73.32%、98.45%;而对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除能力相对较低,最高清除率仅分别为31.44%、12.34%。另外,细野荞不同器官水提液对自由基的清除能力不同。对于·OH和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,细野荞茎水提液的清除率均显著高于叶;而对于O<sub>2</sub><sup>-</sup>·,细野荞叶水提液的清除率显著高于茎。以往研究认为,·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等自由基中,·OH是对生物体毒性最强、危害最大的自由基,对·OH的清除率是反映药物抗氧化作用的重要指标<sup>[15,26]</sup>,因此常用清除·OH的能力来评价一种物质对自由基的清除效果。本研究中细野荞茎、叶水提液对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>具有一定的清除作用,而对·OH和O<sub>2</sub><sup>-</sup>·均具有较强的清除能力,表明细野荞茎、叶对自由基具有很好的清除效果。

细野荞是荞麦属中一个野生种,广泛分布于我国,作为一种潜在的天然抗氧化剂原料,具有很大的开发应用价值。本研究结果对于细野荞在保健品、化妆品及其深加工等方面均有一定的理论和实际意义。

参考文献:

[1]杨玲,许速.氧化应激与疾病发生的相关性[J].西南国防医药,2012,22(11):1268-1270.

[2]Gill S S,Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2010,48(12):909-930.

[3]Chen Y,Azad M B,Gibson S B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy[J]. Cell Death and Differentiation,2009,16(7):1040-1052.

[4]方允中,郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京:科学出版社,2002:327-329.

[5]赵保路. 自由基、天然抗氧化剂与神经退行性疾病[J]. 生物物理学报,2010,26(4):263-274.

[6]Chen Y,Xie M Y,Nie S P, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*[J]. Food Chemistry,2008,107(1):231-241.

[7]Ali S,Choudhary M I,Rahman A U. Superoxide anion radical,an im-

portant target for the discovery of antioxidants[J]. Atherosclerosis Supplements,2008,9(1):268.

[8]左玉. 自由基、活性氧与疾病[J]. 粮食与油脂,2011(9):9-11.

[9]张献忠,黄海智,钟烈洲,等. 植物提取物体外抗氧化活性评价方法研究进展[J]. 中国粮油学报,2012,27(11):122-128.

[10]刘微微,任虹,曹学丽,等. 天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展[J]. 食品科学,2010,31(17):415-419.

[11]张以忠,陈庆富. 荞麦研究的现状与展望[J]. 种子,2004,23(3):39-42.

[12]任顺成,孙军涛. 荞麦粉、皮、芽中黄酮类化合物抗氧化研究[J]. 河南工业大学学报:自然科学版,2008,29(2):15-17,21.

[13]赵秀玲. 荞麦的功效因子与保健功能的研究进展[J]. 食品工程,2011(3):16-18.

[14]姚亚平,曹炜,陈卫军,等. 不同品种荞麦提取物抗氧化作用的研究[J]. 食品科学,2006,27(11):49-52.

[15]何永艳,冯佰利,邓涛,等. 荞麦提取物抗氧化活性研究[J]. 西北农业学报,2007,16(6):76-79,84.

[16]龚宁,邓琳琼,曾坤. 金线兰各器官水提液清除·OH和O<sub>2</sub><sup>-</sup>·的比较研究[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(6):821-824.

[17]龚宁,邓琳琼,唐兰秀,等. 花叶开唇兰清除活性氧作用研究[J]. 中药药理与临床,2006,22(2):39-41.

[18]孙存普,张建中,段绍谨. 自由基生物学导论[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,1999:1-15.

[19]Kaliora A C,Dedoussis G V. Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD[J]. Pharmacological Research,2007,56(2):99-109.

[20]Valko M,Leibfritz D,Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2007,39(1):44-84.

[21]柳红,张静. 不同南瓜多糖体外清除羟基自由基作用的研究[J]. 武汉植物学研究,2007,25(4):356-359.

[22]贤景春,郑鑫源,陈明真. 少花龙葵多酚超声提取工艺及其抗氧化性研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(8):275-277.

[23]张泽生,李博轩,王冀. 葡萄皮中花色苷的体外抗氧化研究[J]. 食品研究与开发,2007,28(2):148-151.

[24]吴璐璐,许剑锋,赵勇. 拳参乙醇提取物和水提取物体外抗菌和抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):246-249.

[25]熊何健,郑建华,吴国宏,等. 荔枝多酚的分离制备及清除DPPH活性[J]. 食品科学,2006,27(7):86-88.

[26]钟希琼,谢嘉虹,张英慧. 野生薯蓣膳食纤维的提取及对自由基的清除作用[J]. 粮油食品科技,2012,20(6):16-18.