杜仲叶树脂分离纯化产物的抗疲劳功效

刘 迪[1]，尚 华[1]，宋晓宇[2]
(1.陕西工业职业技术学院化工与纺织学院，陕西 咸阳 721000；
2.陕西海升果业发展股份有限公司乾县分公司，陕西 西安 713300)

摘 要：为了评价杜仲叶分离纯化产物抗疲劳功效，测定经大孔吸附树脂分离纯化后两种分离纯化产物中多酚含量，并采用动物实验评价纯化产物对小鼠负重游泳时间、血乳酸(LA)、血清尿素氮(SUN)、肝糖原和肌糖原以及乳酸脱氢酶(LDH)的影响，比较各纯化产物的抗疲劳功效。结果表明：多酚含量最高的固体纯化产物为EU1Ⅰ(20%乙醇洗脱液纯化产物)，多酚含量最低的固体纯化产物为EU1Ⅱ(60%乙醇洗脱液纯化产物)；EU1Ⅰ的抗疲劳功效强于EU1Ⅱ；多酚类物质可能为杜仲叶树脂分离纯化产物表现抗疲劳功效的主要功效成分。

关键词：杜仲叶；分离纯化产物；抗疲劳；多酚

Antifatigue Effect of Extract from *Eucommia ulmoides* Leaves Purified by Resin

LIU Di[1]，SHANG Hua[1]，SONG Xiao-yu[2]
(1. College of Chemical Engineering and Textile, Shaanxi Polytechnic Institute, Xianyang 721000, China；
2. Shaanxi Haisheng Fresh Fruit Juice Co. Ltd., Qian County Branch, Xi'an 713300, China)

Abstract：In order to explore the anti-fatigue effect of *Eucommia ulmoides* leaves, the polyphenols in the extract from *Eucommia ulmoides* leaves was separated and purified by resin. The anti-fatigue effect of the extract was investigated by determining weight-loaded swimming time, blood lactic acid (LA), serum urea nitrogen (SUN), hepatic glycogen, muscle glycogen and lactate dehydrogenase (LDH) in mice. The results showed that the content of polyphenols in EU1Ⅰ(20% ethanol eluted product) was higher than that in EU1Ⅱ(60% ethanol eluted product), and the anti-fatigue effect of EU1Ⅰ was better than EU1Ⅱ, suggesting that polyphenols might be major components of anti-fatigue capacity in *Eucommia ulmoides* leaves.

Key words：*Eucommia ulmoides* leaves；extract；anti-fatigue；polyphenols
中图分类号：TS201.1 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)05-0251-04

杜仲(*Eucommia ulmoides*)，为杜仲科杜仲属，在我国有着悠久的药用历史，具有降血压[1-3]、调节血糖[4-5]、保护肝脏[6]、强筋骨[7]等功效。杜仲作为中药材的使用部位主要是杜仲皮，然而现代研究表明，杜仲叶与杜仲皮的成分含量相近[8-9]，甚至某些成分含量较杜仲皮高[10]。杨春霞等[11]的研究表明，杜仲叶具有抗疲劳功效，但另一方面目前所见的相关报道大多是以杜仲叶粗提物为研究对象，较少见对纯化产物分析研究的相关报道，导致抗疲劳功效成分尚不十分明确。本研究采用大孔吸附树脂分离纯化杜仲叶粗提物，并测定得到2种分离纯化产物中多酚物质的质量分数，分别评价它们的抗疲劳功效，分析多酚与各产物抗疲劳功效的相关性，以探索杜仲叶抗疲劳作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杜仲叶，由陕西略阳杜仲人工繁育基地提供。

XDA-8型大孔吸附树脂 西安蓝晓科技有限公司；没食子酸标准品 中国药品生物制品检定所；福林-酚试剂(Folin-Ciocalteu) 美国Sigma公司；全血乳酸(LA)测试盒、血尿素氮(SUN)测试盒、肌糖原及肝糖原检测试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

FW-400A粉碎机 北京科伟仪器有限公司；DK-98-1电热恒温水浴锅 天津泰斯特仪器有限公司；721可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司；HL-2恒流泵 上海亚荣有限公司。

收稿日期：2012-01-12
基金项目：陕西省教育厅专项科研计划项目(12JK0600)；陕西工业职业技术学院自选科研计划项目(ZK11-31)
作者简介：刘迪(1980—)，女，讲师，博士，研究方向为化学新材料的制备。E-mail：didi19801210@163.com

1.3 实验动物

清洁级雄性昆明种小鼠，体质量(20±2)g，由西安交通大学医学实验动物中心提供。

1.4 方法

1.4.1 杜仲叶粗提物的制备

杜仲叶洗净，用烘箱于50℃烘干，粉碎成粉，过60目筛。将提取溶剂按照1:10的料液比与杜仲叶粉混合，50℃恒温水浴锅中浸提1h，浸提3次，过滤，合并滤液，离心分离，上清液为杜仲叶粗提溶液。

1.4.2 树脂分离

采用XDA-8型大孔吸附树脂对杜仲叶粗提物进行分离。树脂经过预处理后按照规定的方法装柱，将1BV体积的杜仲叶粗提液以1BV/h的流速流过树脂柱，然后依次用4BV左右的20%、40%、60%和80%乙醇溶液以1BV/h的流速进行梯度洗脱。收集各洗脱溶液，减压浓缩至干，真空冷冻干燥成粉。

1.4.3 多酚含量测定

以没食子酸为标准品，用Folin-Ciocalteu[12]法对4种洗脱液干燥后的固体纯化产物中多酚进行检测，计算各样品中的多酚含量。选取多酚含量最高的固体纯化产物为EU1Ⅰ，多酚含量最低的固体纯化产物为EU1Ⅱ，作为后实验的研究对象。

1.4.4 动物实验方法

小鼠被随机分为对照组、EU1Ⅰ组和EU1Ⅱ组，每组40只，分笼饲养。小鼠在SPF动物房中饲养，温度为(23±1)℃，相对湿度为40%～60%，小鼠先在SPF动物房适应3d。用纯水将EU1Ⅰ和EU1Ⅱ溶解成0.2g/mL的水溶液。每组小鼠每天用灌胃针灌胃1次，对照组灌胃纯水，EU1Ⅰ组灌胃EU1Ⅰ，EU1Ⅱ组灌胃EU1Ⅱ，按0.1mL/10g(以体质量计)连续灌胃15d。小鼠每天定时进行20～30min的游泳训练，在灌胃饲养期间自由饮水和进食。

1.4.5 抗疲劳评价

1.4.5.1 体质量测定

灌胃饲养前和末次灌胃后，分别称量各组小鼠的体质量。

1.4.5.2 负重游泳实验

末次灌胃1h后，分别从对照组、EU1Ⅰ组和EU1Ⅱ组取10只小鼠，然后在距小鼠尾尖1cm处负5%体质量的橡皮泥，橡皮泥用保鲜膜包裹。将小鼠置于水深30cm、水温(25.0±1.0)℃的水箱中，记录小鼠自游泳开始至沉入箱底10s[11]不能浮上水面的时间为小鼠负重游泳时间。

1.4.5.3 LA测定实验[11]

末次灌胃1h后，分别从对照组、EU1Ⅰ组和EU1Ⅱ组取10只小鼠，然后在距小鼠尾尖1cm处负5%体质量的橡皮泥，橡皮泥用保鲜膜包裹。将小鼠置于水深30cm、水温(25.0±1.0)℃的水箱中游泳30min，然后立即取出摘眼球取血，血液被肝素抗凝后用分光光度法按照LA测试盒说明测定LA含量。

1.4.5.4 SUN、LDH[13]和糖原的测定[14]

末次灌胃1h后，分别从对照组、EU1Ⅰ组和EU1Ⅱ组取10只小鼠，将小鼠置于水深30cm、水温(25.0±1.0)℃的水箱中游泳90min[11,14]，然后立即取出摘眼球取血，将血液在4000r/min条件下离心10min后取血清，用分光光度法按照SUN测试盒和LDH测试盒说明测定SUN含量和LDH活力。取血后的小鼠被处死，解剖后取肝脏和大腿处肌肉，用分光光度法按照肝糖原及肌糖原测试盒说明测定肝糖原和肌糖原含量。

1.4.6 统计分析方法

实验数据用$\bar{x}\pm s$表示，t检验法检验，$P<0.05$为显著性差异，$P<0.01$为极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 多酚含量测定结果

经测定，20%、40%、60%和80%乙醇洗脱液干燥以后的固体纯化产物中多酚含量分别为49.07、34.38、12.24、12.36g/100g。20%乙醇洗脱液固体纯化产物中多酚含量最高，60%乙醇洗脱液固体纯化产物中多酚含量最低，所以选择前者为EU1Ⅰ、后者为EU1Ⅱ；60%和80%乙醇洗脱液固体纯化产物中多酚含量相当。测定结果显示，固体纯化产物中多酚含量总的变化趋势为随着乙醇体积分数的降低而升高，表明杜仲叶多酚物质极性较大，适宜用极性较大的溶液分离纯化。

2.2 抗疲劳功效结果

2.2.1 小鼠体质量

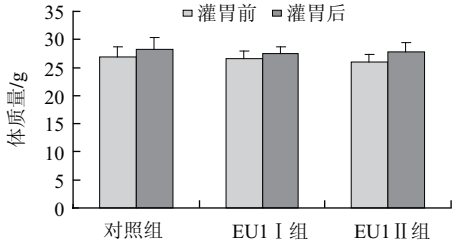


图1 EU1Ⅰ和EU1Ⅱ对小鼠体质量的影响

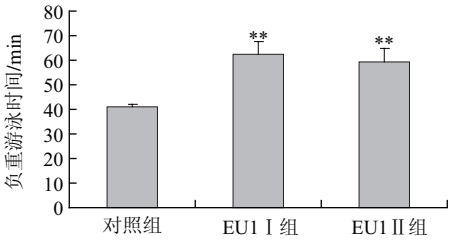
Fig.1 Effect of EU1Ⅰ and EU1Ⅱ on body weights of mice

如图1所示，灌胃饲养前和灌胃饲养后，各组小鼠的平均体质量相差范围在0.83～1.70g，3组间无明显差异，说明EU1Ⅰ和EU1Ⅱ对小鼠体质量无显著影响($P>0.05$)。

2.2.2 小鼠游泳时间

如图2所示，对照组小鼠平均负重游泳为47.01min，EU1Ⅰ组和EU1Ⅱ组小鼠平均负重游泳时间分别为62.52、59.26min，比对照组分别延长了52.23%、

44.29%，且差异显著($P<0.01$)，表明EU1Ⅰ和EU1Ⅱ均可以显著地延长小鼠负重游泳时间，即二者可以显著地提高小鼠运动耐受力，表现了较强的抗疲劳能力。



*.与对照组比较，有显著性差异($P<0.05$)；**.与对照组比较，有极显著性差异($P<0.01$)。下同。

图2 EU1Ⅰ和EU1Ⅱ对小鼠负重游泳时间的影响

Fig.2 Effect of EU1Ⅰ and EU1Ⅱ on weight-loaded swimming time of mice

2.2.3 小鼠血LA含量

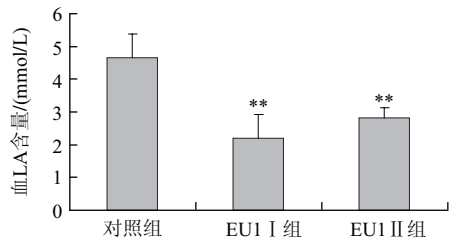


图3 EU1Ⅰ和EU1Ⅱ对小鼠血LA含量的影响

Fig.3 Effect of EU1Ⅰ and EU1Ⅱ on blood LA in mice

如图3所示，对照组小鼠平均血LA含量为4.65mmol/L，EU1Ⅰ组和EU1Ⅱ组小鼠平均血LA含量分别为2.21mmol/L和2.82mmol/L，比对照组分别降低了52.5%、39.4%，且差异极显著($P<0.01$)，EU1Ⅰ对小鼠LA含量的降低幅度要高于EU1Ⅱ。

血液中的LA在机体处于无氧条件下剧烈运动会大量产生，引起体内pH值降低，如果这时LA不能被及时地从体内清除，大量聚集的LA会导致机体平衡失调，从而引起疲劳。因此，防止LA的大量生成，或者加速LA的清除，均可起到减缓疲劳的作用，EU1Ⅰ和EU1Ⅱ正是通过降低血LA含量表现其具有抗疲劳的能力。

2.2.4 小鼠SUN含量

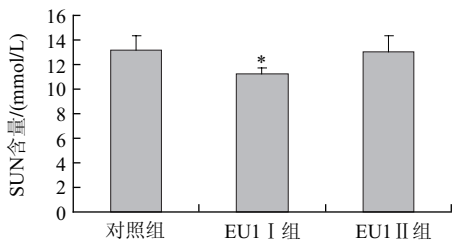


图4 EU1Ⅰ和EU1Ⅱ对小鼠SUN含量的影响

Fig.4 Effect of EU1Ⅰ and EU1Ⅱ on SUN in mice

如图4所示，对照组小鼠平均SUN含量为13.20mmol/L，EU1Ⅰ组小鼠平均SUN含量为11.26mmol/L，比对照组降低了14.7%，且差异显著($P<0.05$)，表明EU1Ⅰ可以显著地减少SUN含量；EU1Ⅱ组小鼠平均SUN含量为13.03mmol/L，比对照组只降低了1.28%，且无明显差异，表明EU1Ⅱ不能显著地减少SUN含量。

机体内的能源物质是机体运动时产生能量的来源，糖原和蛋白质就属于这些能源物质。糖原在机体运动之初会首先被消耗，当糖原消耗殆尽后蛋白质就会随之被代谢分解。蛋白质被消耗的产物就是SUN，因此SUN含量的高低可以表明体内蛋白质被消耗的情况。如果机体具有很好的运动负荷适应能力，那么机体内的SUN含量就会比较低。实验结果表明，只有EU1Ⅰ可以显著地降低SUN含量，表明EU1Ⅰ可以显著地提高机体对运动负荷的适应性。

2.2.5 小鼠肝糖原和肌糖原含量

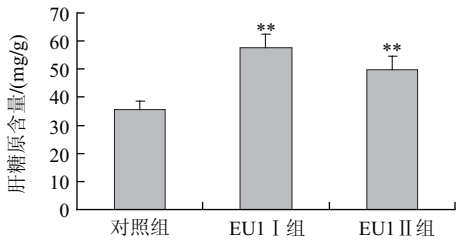


图5 EU1Ⅰ和EU1Ⅱ对小鼠肝糖原含量的影响

Fig.5 Effect of EU1Ⅰ and EU1Ⅱ on hepatic glycogen in mice

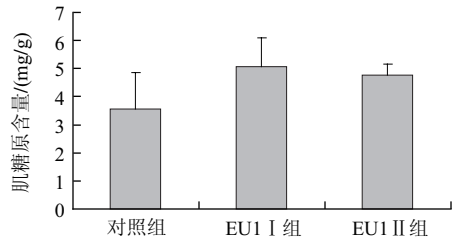


图6 EU1Ⅰ和EU1Ⅱ对小鼠肌糖原含量的影响

Fig.6 Effect of EU1Ⅰ and EU1Ⅱ on hepatic glycogen in mice

如图5、6所示，对照组小鼠平均肝糖原含量为35.46mg/g，EU1Ⅰ组和EU1Ⅱ组小鼠平均肝糖原含量分别为57.72、49.67mg/g，比对照组分别提高了62.77%、40.07%，且差异显著($P<0.01$)，表明EU1Ⅰ和EU1Ⅱ可以非常显著地增加小鼠肝糖原含量；对照组小鼠平均肌糖原含量为3.57mg/g，EU1Ⅰ组和EU1Ⅱ组小鼠平均肌糖原含量分别为5.07、4.77mg/g，3组间无明显差异($P>0.05$)，说明EU1Ⅰ和EU1Ⅱ并没有显著地影响肌糖原含量。

机体内的糖原分为肝糖原和肌糖原，肌糖原在运动中会首先被大量消耗，当肌糖原被消耗尽后，为了满足能量的需求，肝糖原就会开始被消耗，如果机体

继续运动，肝糖原的储存量就会不断地减少，这时疲劳就会产生。EU1Ⅰ和EU1Ⅱ可以显著地增加肝糖原的含量，从而延缓疲劳的产生。然而，二者对肌糖原含量的影响并不显著，说明二者通过增加肌糖原含量延缓疲劳的作用有限。

2.2.6 小鼠LDH活力

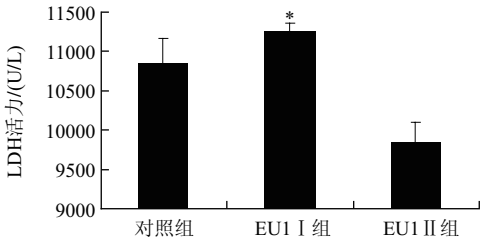


图7 EU1Ⅰ和EU1Ⅱ对小鼠LDH活力的影响

Fig.7 Effects of EU1Ⅰ and EU1Ⅱ on LDH activity in mice

EU1I和EU1Ⅱ对小鼠LDH活力的影响见图7。对照组小鼠平均LDH活力为10853.45U/L，EU1I组小鼠平均LDH活力为11247.75U/L，比对照组提高了3.64%，且差异显著($P<0.05$)，表明EU1Ⅰ可以显著地增强LDH活力；EU1Ⅱ组小鼠平均LDH活力为9844.33U/L，EU1Ⅱ组小鼠的LDH活力低于对照组，说明EU1Ⅱ没有增强LDH活力的功能。

LA可以通过LDH的作用而被氧化，从而使LA得到清除，使体内pH值恢复正常，减缓疲劳的产生。EU1Ⅰ提高了LDH活力，表明EU1Ⅰ可以通过提高LDH活力降低血LA含量，表现抗疲劳功效。2.2.3节中结果显示，EU1Ⅱ也可以显著降低血LA含量，但是本部分实验结果显示EU1Ⅱ并不能提高LDH活力，即在EU1Ⅱ组中血LA并不是通过LDH活力提高被降低，可能是通过其他途径或被EU1Ⅱ中其他成分降低。

综合以上各项指标的测定结果，EU1Ⅰ具有更为明显地延长小鼠负重游泳时间、降低LA含量、降低SUN含量、提高肝糖原含量、增强LDH活力的能力，即具有明显的抗疲劳功效。多酚含量实验结果表明，EU1Ⅰ中多酚含量要高于EU1Ⅱ，而EU1Ⅰ的抗疲劳功效也较EU1Ⅱ显著，表明杜仲叶树脂分离纯化产物的抗疲劳功效与多酚含量有关，推测多酚物质可能为杜仲叶纯化产物表现抗疲劳功效的主要功效成分，但尚不清楚是否还与杜仲叶的其他成分有关，还有待于今后的进一步研究，如进一步分离纯化EU1Ⅰ，以得到纯度更高、成分更明确的杜仲叶纯化产物，确定杜仲叶抗疲劳功效成分等。

3 结 论

杜仲叶经过大孔吸附树脂分离纯化，得到20%乙醇洗脱溶液(EU1Ⅰ)和60%乙醇洗脱溶液(EU1Ⅱ)，EU1Ⅰ中多酚含量高于EU1Ⅱ。

杜仲叶树脂分离纯化产物表现了一定的抗疲劳功效，并且EU1Ⅰ的抗疲劳功效强于EU1Ⅱ。杜仲叶树脂分离纯化产物的抗疲劳功效与多酚含量有关，推测多酚物质可能为纯化产物表现抗疲劳功效的主要功效成分。

参考文献：

[1] GU Juan, WANG Junjie, YAN Jin, et al. Effects of lignans extracted from *Eucommia ulmoides* and aldose reductase inhibitor epalrestat on hypertensive vascular remodeling[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 133(1): 6-13.

[2] KWAN C Y, CHEN Changxun, DEYAMA T, et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action[J]. Vascular Pharmacology, 2003, 40(5): 229-235.

[3] LUO Lifang, WU Weihua, ZHOU Yingjun, et al. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 129(2): 238-243.

[4] KIM H Y, MOON B H, LEE H J, et al. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 93: 227-230.

[5] LEE M K, KIM M J, CHO S Y, et al. Hypoglycemic effect of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2005, 67(1): 22-28.

[6] HUNG M Y, FU T Y C, SHIH P H, et al. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves inhibits CCl_4-induced hepatic damage in rats original research article[J] . Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(8): 1424-1431.

[7] ZHANG R, LIU Z. G, LI C, et al. Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats[J]. Bone, 2009, 45: 553-559.

[8] 管淑玉, 苏薇薇. 杜仲化学成分与药理研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(2): 124-129.

[9] 辛晓明, 冯蕾, 王浩, 等. 杜仲的化学成分及药理活力研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(19): 1507-1509.

[10] 罗秀阳, 田呈瑞. 杜仲叶保健作用及其在食品加工中的应用[J]. 晋东南师范专科学校学报, 2003, 20(5): 36-37.

[11] 杨春霞, 翟文俊. 杜仲叶提取物抗疲劳作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 550-552.

[12] 刘丽香, LAURA T L, 梁兴飞, 等. Folin-Ciocalteu比色法测定苦丁茶中多酚含量[J]. 茶叶科学, 2008, 28(2): 101-106.

[13] DING Jinfeng, LI Yanyan, XU Jiajie, et al. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1350-1353.

[14] 高珊, 童英, 吴少平, 等. 昆明种小鼠抗疲劳试验中若干参考值测定[J]. 实验动物科学与管理, 2001, 18(1): 16-18.