

# 不同产地杜仲叶的水提取物体外抗氧化活性

张 强, 苏印泉\*, 李秀红  
(西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:** 研究陕西、四川和新疆产杜仲叶水提取物的 DPPH 自由基清除活性、羟自由基清除活性、抗脂质过氧化活性、金属离子络合力和还原力、杜仲叶萃取物中的总酚含量, 以 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)、VE 和 VC 为阳性对照。结果表明: 四川和陕西产杜仲叶水提取物自由基清除力、羟自由基清除力、金属离子络合力和还原力以及总酚含量均高于新疆产杜仲叶, 但是抗脂质过氧化活性略低于后者。陕西与四川产杜仲叶水提取物体外抗氧化活性样品特点相似, 活性相近, 新疆产杜仲叶与前两者特点不同。

**关键词:** 杜仲; 抗氧化剂; 自由基; 产地

## Antioxidant Activity of *Eucommia ulmoides* Oliv. Leaves Grown in Three Areas

ZHANG Qiang, SU Yin-quan\*, LI Xiu-hong  
(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The antioxidant activities of aqueous extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves grown in Xinjiang, Sichuan and Shaanxi were assayed based on DPPH radical scavenging capacity, hydroxyl radical scavenging capacity, anti-lipid peroxidation activity, metal ion chelating capacity and reducing power with BHT, vitamin C and vitamin E as the positive controls. Their total phenol contents were also determined. *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves grown in Sichuan and Shaanxi had higher total phenol content than those grown in Xinjiang. Meanwhile, the DPPH radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging capacity, metal ion chelating capacity and reducing power of the aqueous extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves from Sichuan and Shaanxi were higher than those of the aqueous extract from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves from Xinjiang. However, the aqueous extract from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves from Xinjiang revealed higher anti-lipid peroxidation activity. *E. ulmoides* Oliv. leaves from Sichuan and Shaanxi showed a similarity in their antioxidant activity *in vitro*, but were different from *E. ulmoides* Oliv. leaves from Xinjiang.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv.; antioxidant; free radical; growth place

中图分类号: TS221

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0126-04

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 树皮是我国传统中药材和功能食品<sup>[1]</sup>。杜仲具有显著的抗氧化作用, 对多种脂质过氧化模型均有一定抑制作用, 其活性以叶提取物最高, 炮制皮提取物次之, 生皮较差<sup>[2]</sup>。在杜仲叶、雄花、生皮、果实中, 以杜仲叶体外抗氧化活性最高<sup>[3]</sup>。杜仲叶水煎液能提高肉杂鸡的抗氧化功能<sup>[4]</sup>, 杜仲内生球毛壳菌发酵液提取物在体外有较显著的抗脂质过氧化作用和通过降低氧化溶血而保护红细胞的作用<sup>[5]</sup>。杜仲中的杜仲素对 3 种自由基均有较强的清除作用<sup>[6]</sup>。近年来, 杜仲叶的研究日趋深入, 以杜仲叶加工制成的

杜仲茶在中日两国均有销售。杜仲茶提取物对小鼠各脏器 MDA 的生成均有一定抑制作用<sup>[7]</sup>。杜仲在我国分布范围较广, 南北方均有大面积栽培种植。杜仲叶次生代谢物含量随生长地区, 显著变化<sup>[8]</sup>。次生代谢物含量必然会影响杜仲的抗氧化活性。本实验研究不同产地杜仲叶的抗氧化活性, 样品为陕西杨凌、新疆乌鲁木齐和四川广元树龄相近的杜仲夏叶, 测定其水提取物的总酚含量、DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率、抗脂质过氧化活性、金属离子络合力和还原力, 以期杜仲叶开发抗氧化功能食品提供实验依据。

收稿日期: 2010-12-18

基金项目: 中日(NEDO)合作项目(K332020908)

作者简介: 张强(1975—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为植物资源利用。E-mail: zhangjack2003@yahoo.com.cn

\* 通信作者: 苏印泉(1954—), 男, 教授, 本科, 研究方向为植物资源利用。E-mail: syq009@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

不同地区杜仲叶 2007 年 8 月分别于陕西杨凌、新疆乌鲁木齐和四川广元采收。叶片洗净风干后粉碎过 20 目筛, 冷冻备用。

1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、福林酚试剂(Folin-Ciocalteu's reagent(2mol/L)) 美国 Sigma 公司; 3-(2-氨基苯基)-5,6-二(4-苯基磺酸)-1,2,4-三氮杂苯(Ferrozine)、亚油酸 瑞士 Fluka 公司; BHT、VC、VE 上海医药集团; 其他试剂(均为分析纯)购自西安试剂厂。

### 1.2 仪器与设备

UV-2000 型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 杜仲叶水提取物样品制备

取杜仲样品 20g, 以 200mL 蒸馏水在 60℃提取 2 次, 每次 60min。提取液过滤后 50℃减压浓缩, 真空干燥除尽溶剂, 所得褐色提取物冷冻备用。

#### 1.3.2 清除自由基活性测定

测定清除自由基活性采用 DPPH 法<sup>[9]</sup>。2mL 杜仲提取物乙醇溶液加入 1mL 500μmol/L DPPH 乙醇溶液。振荡混合均匀后室温下避光放置 20min。然后测定波长 517nm 处吸光度, 以 1mL 500μmol/L DPPH 乙醇溶液混合 2mL 乙醇作为空白。空白与样品均测定 3 次。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_1$  为空白溶液吸光度;  $A_2$  为样品溶液吸光度。

#### 1.3.3 $\text{Fe}^{2+}$ 络合力测定

$\text{Fe}^{2+}$  络合力测定方法参考文献[10-11]的方法并稍作改动。样品溶液(1mg/mL, 用蒸馏水溶解) 5mL 与 0.1mL 2mmol/L  $\text{FeCl}_2$  溶液混合均匀后室温下放置 10min。然后加入 0.2mL 5mmol/L Ferrozine 水溶液, 混匀后室温放置 10min 后测定波长 562nm 处吸光度。5mL 蒸馏水加入 0.1mL 2mmol/L  $\text{FeCl}_2$  水溶液和 0.2mL 5mmol/L Ferrozine 水溶液作为空白溶液。所有处理与空白均重复 3 组。按照式(2)计算  $\text{Fe}^{2+}$  络合率。

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 络合率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_1$  为空白溶液吸光度;  $A_2$  为样品溶液吸光度。

#### 1.3.4 还原力测定

还原力测定采用 Oyaizu<sup>[12]</sup>的方法。2.5mL 杜仲样品溶液加入 2.5mL 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.6) 和 2.5mL 10g/L 铁氰化钾溶液, 50℃水浴中放置 20min, 迅速冷却

后, 加入 2.5mL 100g/L 三氯乙酸溶液, 混匀后在 3000r/min 离心 10min。取上清液 2.5mL 加入 2.5mL 蒸馏水和 0.5mL 1g/L  $\text{FeCl}_2$  溶液, 反应 10min 后测定波长 700nm 条件下吸光度。空白以样品溶剂代替杜仲样品溶液, 其余操作相同。吸光度越大表明还原力越强。所有处理与空白均重复 3 组。

#### 1.3.5 抗脂质过氧化活性测定

采用亚油酸乳浊液体系, 以硫氰酸铵法测定氧化程度<sup>[13]</sup>。亚油酸乳浊液为 0.2840g 亚油酸、0.2804g 吐温-20 乳化剂, 加入 50mL 0.2mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)。取 0.5mg 杜仲样品溶解于 0.5mL 蒸馏水中, 再加入 2.5mL 亚油酸乳浊液(0.02mol/L, pH 7.0)。混匀后反应液放置于 37℃培养箱中。每隔一定时间取出 0.1mL 混合液, 依次加入 4.7mL 体积分数为 75% 乙醇溶液, 0.1mL 30g/100mL 硫氰酸铵, 和 0.1mL 0.02 mol/L  $\text{FeCl}_2$ (溶剂为 1mol/L HCl)。混合物放置 3min 后, 测定波长 500nm 处吸光度。空白以 0.5mL 蒸馏水代替杜仲样品溶液, 培养同样时间。所有处理与空白均重复 3 组。抗脂质过氧化活性计算公式同式(1)。

#### 1.3.6 羟自由基清除活性测定

羟基自由基清除活性测定采用参考文献[14]的方法。所有处理与空白均重复 3 组。羟自由基清除率计算公式同式(1)。

#### 1.3.7 总酚含量测定

杜仲样品总酚含量测定采用参考文献[15]方法进行测定。标准曲线以没食子酸为标准品。总酚含量以每克杜仲水提取物中没食子酸含量计。

#### 1.3.8 数据处理

所有数据表示为平均值  $\bar{x} \pm s$ 。显著性检验( $P < 0.05$ ) 以 Duncan's 检验计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同采收地杜仲叶水提取物 DPPH 自由基清除率

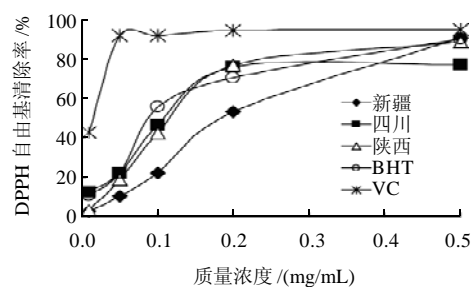


图1 不同采收地杜仲叶水提取物 DPPH 自由基清除活性  
Fig.1 DPPH radical scavenging activities of aqueous extracts from *E. ulmoides* leaves grown in different areas

由图 1 可知, 在 0.01mg/mL 到 0.5mg/mL 质量浓度区

间,杜仲叶水提取物 DPPH 清除率和质量浓度呈现正相关,但在 0.2mg/mL 之后,随杜仲叶水提取物质量浓度增加活性增长趋缓。如表 1 所示,在质量浓度为 0.2mg/mL 时,杜仲叶 DPPH 水提取物自由基清除率分别为新疆样品 53.24%、四川样品 75.78%、陕西样品 76.62%。四川和陕西杜仲叶水提取物活性高于 BHT(70.4%),但是低于 VC(94.73%)。陕西样品和四川样品在 0.2mg/mL 质量浓度以下活性和 BHT 相似,三者都大于新疆样品活性但是远远低于 VC 活性。新疆样品活性在质量浓度为 0.5mg/mL 时活性增长较快,和同质量浓度 BHT 以及陕西样品活性相仿。新疆不是杜仲传统产区,系近年引种,新疆水土条件、气候与川陕差异很大,也许会导致其次生代谢物组成与一般杜仲叶不同。从活性剂量曲线可看出,新疆叶曲线形状与川陕样品差异较大,可能正是由于其组成有较大差异。

## 2.2 不同采收地杜仲叶 Fe<sup>2+</sup> 络合力

如表 1 所示,3 种杜仲叶水提取物均具备一定金属离子络合力。其中四川和陕西样品在供试质量浓度下,Fe<sup>2+</sup> 络合率依次为 74.55% 和 63.32%,与 VC(67.72%)相近,新疆叶络合力较差,仅为 VC 络合率 50%。商业抗氧化剂 BHT 没有显示出离子络合力,表明络合金属离子不是 BHT 可能的抗氧化途径。

## 2.3 不同采收地杜仲叶羟自由基清除活性

如表 1 所示,在 1mg/mL 供试质量浓度条件下,3 种杜仲叶水提取物均显示出一定羟自由基清除活性,新疆样品清除率为 24.40%,四川样品清除率为 43.96%,陕西样品清除率为 42.82%,四川和陕西杜仲叶羟自由基清除率显著大于新疆杜仲叶,但是所有植物样品活性均显著小于 BHT(96.08%)和 VE(82.31%)。与 DPPH 自由基清除活性相比,杜仲叶样品羟自由基清除活性较差,供试质量浓度高达 1mg/mL,活性依然低于 50%。而样品的 DPPH 自由基清除率在样品质量浓度仅为 0.2mg/mL 时,活性超过 50%。表明 DPPH 自由基与羟自由基还原机理不同,所以两种自由基敏感的抗氧化剂不同。自由基的位阻效应不同可能是导致这种差异的原因之一。羟自由基体积小,对 BHT 这种结构简单,但有较大位

阻基团的酚类敏感。DPPH 自由基体积较大,BHT 的位阻基团可能对和 DPPH 自由基反应有一定影响。新疆叶羟自由基活性再次显著小于川陕样品,显示其次生代谢物组成可能与后两者存在明显差异。

## 2.4 不同采收地杜仲叶水提取物还原力

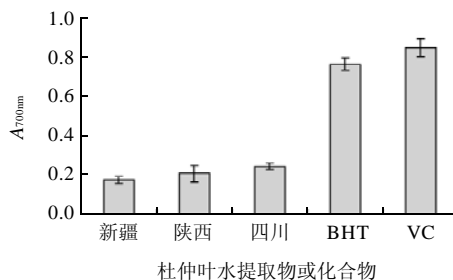


图 2 不同采收地杜仲叶水提取物还原力

Fig.2 Reducing power of *E. ulmoides* leaves grown in different areas

在还原力测定中,抗氧化剂的抗氧化活性由其将 Fe<sup>3+</sup> 络合物还原为 Fe<sup>2+</sup> 络合物的能力表示。测定了 3 种杜仲叶水提取物在质量浓度为 0.1mg/mL 时还原力。吸光度越高表示样品还原力越强。由图 2 可见,3 种杜仲叶水提取物均具有一定还原力。其中新疆叶还原力较低。四川样品还原力最高。但是 3 种杜仲叶水提取物还原力均显著低于抗氧化剂 BHT 以及 VC。表明杜仲叶中具有还原力的化合物其平均氧化还原电位可能低于 BHT 与 VC 的氧化还原电位。当然,由于反应物是铁离子络合物,具有一定位阻效应,所以活性化合物的活性基团的位阻也有影响。

## 2.5 不同采收地杜仲叶抗脂质过氧化活性

如图 3 所示,在 72h 实验过程中,无样品和抗氧化剂的亚油酸吸光度快速持续升高,显示其氧化速度快且氧化程度持续加深。而含有 1mg/mL 杜仲样品或抗氧化剂的亚油酸其吸光度上升缓慢,显示出亚油酸过氧化反应被添加物所抑制。即使在实验 72h 后,仍显示出明显的抑制活性。亚油酸培养 24h 后,空白吸光度已经超过 2.0,但是加入杜仲样品和抗氧化剂的亚油酸吸光度均低于 0.7。48h 后,空白吸光度接近 3.0,处理吸光

表 1 不同采收地杜仲叶总酚含量和抗氧化活性(n=3)

Table 1 Total phenol contents and antioxidant activities of *E. ulmoides* leaves grown in different areas (n=3)

采收地点	总酚含量/(mg/g)	DPPH 自由基清除率/%	Fe <sup>2+</sup> 络合率/%	抗脂质过氧化活性/%	羟自由基清除率/%
新疆	61.66 ± 1.69 <sup>c</sup>	53.24 ± 2.13 <sup>d</sup>	33.01 ± 6.90 <sup>c</sup>	72.22 ± 4.36 <sup>b</sup>	24.40 ± 2.27 <sup>d</sup>
四川	99.79 ± 4.49 <sup>a</sup>	75.78 ± 2.14 <sup>b</sup>	74.55 ± 3.26 <sup>a</sup>	58.82 ± 3.73 <sup>c</sup>	43.96 ± 3.62 <sup>c</sup>
陕西	80.51 ± 3.26 <sup>b</sup>	76.62 ± 3.07 <sup>b</sup>	63.32 ± 3.46 <sup>b</sup>	66.79 ± 2.48 <sup>b</sup>	42.82 ± 1.94 <sup>c</sup>
VE	—	—	—	65.22 ± 4.13 <sup>b</sup>	82.31 ± 2.58 <sup>b</sup>
BHT	—	70.40 ± 0.86 <sup>c</sup>	—0.22 ± 2.37 <sup>d</sup>	89.93 ± 1.24 <sup>a</sup>	96.08 ± 3.02 <sup>a</sup>
VC	—	94.73 ± 2.58 <sup>a</sup>	67.72 ± 3.42 <sup>b</sup>	—	—

注:同列肩标字母不同表示差异显著(P < 0.05);羟自由基清除率、铁离子络合力测定和抗脂质过氧化活性测定中样品配制质量浓度均为 1mg/mL;抗脂质过氧化活性测定时间为培养 72h;DPPH 自由基清除率活性测定中样品质量浓度为 0.2mg/mL;—表示未测定。

度除四川样品外其他样品吸光度均低于0.8。72h后,空白吸光度高达3.2,腐败味明显,所有处理吸光度仍保持在1.5以下。其中新疆样品和陕西样品每一天测定活性均高于VE,四川样品和VE活性相近。3种样品活性均低于BHT。从表1可知,在亚油酸体系培养72h后,新疆样品抗脂质过氧化活性高达72.22%,高于陕西样品的66.79%,同时也高于VE的65.22%和四川杜仲叶的58.82%,但是低于BHT的89.93%。

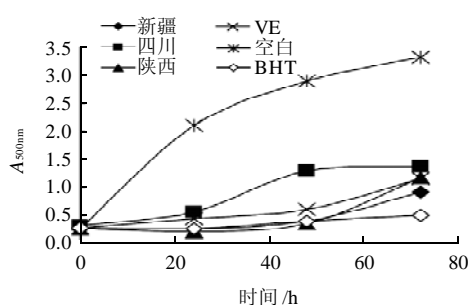


图3 不同采收地杜仲叶水提取物抗脂质过氧化活性

Fig.3 Anti-lipid peroxidation activities of *E. ulmoides* leaves grown in different areas

## 2.6 不同采收地杜仲叶总酚含量

研究杜仲炮制皮、生皮和叶水提取物抗氧化活性时发现杜仲水提取物的抗氧化活性和其总酚含量呈正相关<sup>[2]</sup>。采用福林酚法,以没食子酸为标准化合物得到标准曲线。测定了产自新疆、四川和陕西的杜仲叶提取物总酚含量,结果折算为每克干叶提取物中没食子酸含量。如表1所示,三产地的杜仲叶总酚含量差异显著。四川样品总酚含量最高,为99.79mg/g,显著高于陕西杜仲叶总酚含量(80.51mg/g)和新疆样品(61.66mg/g)。四川和陕西南部为杜仲传统种植地区,气候为亚热带气候,雨量充沛。陕西关中不是杜仲传统种植区,属于温带气候,雨量较四川少,四季温差大。新疆近年开始引种杜仲,乌鲁木齐深处大陆腹地,属于中温带大陆干旱气候区。气候特点是:温差大,寒暑变化剧烈;降水少,且随高度垂直递增;冬季寒冷漫长,四季分配不均,冬季有逆温层出现。采收地水土与气候的巨大差异可能都会影响杜仲叶中次生代谢物组成和含量。新疆杜仲叶总酚含量低,但是抗脂质过氧化活性高于陕西和四川样品,表明新疆叶抗氧化物质组成与后两者差异较大,值得深入研究。

## 3 结 论

采收四川、陕西和新疆杜仲叶并测定了其水提取物的体外抗氧化活性与总酚含量。结果发现,陕西和四川杜仲叶样品体外抗氧化活性相近。新疆叶体外抗氧化活性与前两者特点不同。陕西和四川杜仲叶DPPH自由基清除率、羟自由基清除率、金属离子络合力和还原力以及总酚含量较高。新疆杜仲叶抗脂质过氧化活性较高。新疆叶水提取物组成可能与四川和陕西叶有较大差异,其化学组成值得深入研究。

## 参考文献:

- [1] 张康健,张檀. 中国神树: 杜仲[M]. 北京: 经济管理出版社, 1997: 1-26.
- [2] YEN G C, HSIEH C L. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro* [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(10): 3952-3957.
- [3] ZHANG Qiang, SU Yinquan, YANG Fangxia, et al. Antioxidative activity of water extracts from leaf, male flower, raw cortex and fruit of *Eucommia ulmoides* Oliv[J]. Forest Prod J, 2007, 57(12): 74-78.
- [4] 吕锦芳, 吴睿, 陈广庭, 等. 杜仲叶对肉鸡抗氧化功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12): 52-54.
- [5] 谢辉, 陈双林, 姚慧琴, 等. 杜仲内生球壳菌发酵产物体外抗脂质过氧化和保护红细胞的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 355-359.
- [6] 彭密军, 彭胜, 吴吉林, 等. 杜仲素抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 84-86.
- [7] 王汉屏, 刘静. 杜仲茶提取物的体外抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 465-467.
- [8] 王亚琴, 张檀, 董娟娥. 引种地与原产地杜仲叶次生代谢物含量比较[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(1): 50-52.
- [9] NORIE T, KAZUTAKA N, KANJI I. Antioxidative capacity of extracts and constituents in cornus capitata adventitious roots[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(20): 5906-5910.
- [10] DECKER E A, WELCH B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food[J]. J Agric Food Chem, 1990, 38(3): 674-677.
- [11] HSIEH C L, YEN G C. Antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules[J]. Life Sci, 2000, 66(15): 1387-1400.
- [12] OYAIZU M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Jpn J Nutr, 1986, 44: 307-315.
- [13] MITSUDA H, YASUMOTO K, IWAMI K. Antioxidative action of indole compounds during the autooxidation of linoleic acid[J]. Eiyo to Shokuryo, 1966, 19: 210-214.
- [14] CHUNG S K, OSAWA T, KAWAKISHI S. Hydroxyl radical-scavenging effect of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*) [J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(1): 118-124.
- [15] SLINKARD K, SINGLETON V L. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods[J]. Am J Enol Vitic, 1977, 28(1): 49-55.