

# 关黄柏和川黄柏黄酮含量及抗氧化性的比较分析

李铁纯, 潘慧敏, 叔思宇, 王嘉琦, 宁彩琳, 回瑞华

(鞍山师范学院 化学与生命科学学院, 辽宁 鞍山 114007)

**摘要** 采用高效液相色谱法分别测定关黄柏和川黄柏中黄酮含量, 采用流动注射化学发光法测定关黄柏和川黄柏的抗氧化性, 并对关黄柏和川黄柏中黄酮含量和抗氧化性进行比较分析. 高效液相色谱法分别测定关黄柏和川黄柏中黄酮含量的变异系数为 0.63%; 测得关黄柏的回收率为 90.2%~98.4%, 川黄柏的回收率为 92.4%~106.8%. 测得关黄柏中黄酮含量为 0.24 mg/g, 川黄柏中黄酮含量为 0.40 mg/g. 流动注射化学发光法测定关黄柏抗氧化性的  $IC_{50}$  (抑制率为 50% 时的溶液的浓度) 为 0.76 mg/mL, 川黄柏抗氧化性为 0.64 mg/mL. 结果可知, 川黄柏中黄酮化合物含量大于关黄柏中黄酮化合物含量, 川黄柏的抗氧化性亦大于关黄柏的抗氧化性.

**关键词** 关黄柏; 川黄柏; 黄酮; 高效液相色谱法; 抗氧化性; 流动注射化学发光法

**中图分类号** S853.74 **文献标识码** A **文章编号** 1008-2441(2019)06-0043-04

关黄柏为芸香科植物黄檗的干燥树皮, 主产于长江以北的辽宁、吉林、黑龙江、内蒙古、河北等省; 川黄柏为芸香科植物黄皮树的干燥树皮, 主要产于长江以南的四川、贵州、云南、广西、湖南等省. 关黄柏厚 2~4 mm, 川黄柏厚 3~7 mm. 两种黄柏均具有气微、味极苦、嚼之有黏性等特点.

目前关于黄柏化学成分的研究, 特别是关于关黄柏中黄酮的报道较多<sup>[1-4]</sup>. 黄酮类化合物是一种天然的抗氧化剂, 具有清除人体中超氧离子自由基、抗衰老、增加机体免疫力的生理活性作用. 通常认为关黄柏、川黄柏有着相同的功效和组成, 而关于关黄柏和川黄柏中黄酮含量和抗氧化性的比较研究少见报道.

本文采用高效液相色谱法测定关黄柏和川黄柏的含量, 采用流动注射化学发光法测定关黄柏和川黄柏的抗氧化性<sup>[5]</sup>, 并对两种黄柏的黄酮含量和抗氧化性进行比较分析<sup>[6]</sup>, 为关黄柏和川黄柏开发利用提供实验参考.

## 1 仪器与材料

1525-2996 液相色谱仪(美国 Waters 公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司); IFFM-D 型流动注射化学发光仪(西安瑞迈电子科技有限公司); AL-204 电子天平(梅特勒-托利多); HX-200A 型华西高速中药粉碎机(浙江永康溪岸五金药具厂).

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、磷酸(色谱纯)、无水乙醇(分析纯)、盐酸(分析纯)、邻苯三酚(分析纯, 贵州遵义市第二化工厂)、碳酸钠及碳酸氢钠(分析纯)、3-氨基苯二甲酰肼(分析纯, 陕西师范大学)、水为二次蒸馏水. 芦丁(标准品, 中国药品生物制品鉴定所). 关黄柏和川黄柏购于鞍山某药房, 粉碎后过孔径 0.45 mm 筛备用.

收稿日期 2019-10-16

基金项目 国家级大学生创新创业项目(201810169001).

作者简介 李铁纯(1968-), 男, 辽宁鞍山人, 鞍山师范学院化学与生命科学学院教授, 博士, 研究方向为天然产物及药物分析.

## 2 方法与结果

### 2.1 关黄柏和川黄柏中黄酮的提取

分别取 2.00 g 川黄柏和关黄柏样品于锥形瓶中,精密加入甲醇与 15% 盐酸混合溶液(4 : 1(V : V)) 50 mL,水浴回流 1 h,放冷至室温,滤液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜备用。

### 2.2 关黄柏和川黄柏中黄酮的测定

2.2.1 芦丁标准储备液 准确称取芦丁标准品 10.4 mg 于 50 mL 容量瓶中,以 80% 乙醇溶液定容至刻度,作为贮备液。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: Kromasil  $\text{C}_{18}$  柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇与 0.08% 磷酸混合溶液(35 : 65(V : V)); 检测波长 280 nm; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

2.2.3 测定方法的确定 精确移取经 2.1 制备的川黄柏和关黄柏样品溶液,按 2.2.2 的色谱条件进行测定。

再取经 2.2.1 配制的芦丁标准品溶液在 2.2.2 色谱条件下进样分析,结果表明: 标准品芦丁的保留时间为 24.0 min,样品在相同的保留时间出现吸收峰,样品的紫外吸收与标准品芦丁的紫外吸收相同,从而确定可以用芦丁作为黄柏中黄酮的标准品。

2.2.4 标准曲线的绘制 将 2.2.1 芦丁标准储备液用甲醇精确稀释至 2.6, 5.2, 10.4, 20.8, 41.6  $\mu\text{g/mL}$  并定容至 10 mL 容量瓶。

按 2.2.2 色谱条件,分别进样测定,以样品浓度  $C$  为横坐标,峰面积  $A$  为纵坐标作图,线性回归方程和标准曲线如图 1 所示。

其线性回归方程为  $y = 268\,585x - 10\,434$ , 相关系数  $\gamma = 0.996\,9$ 。

2.2.5 精密度试验 按 2.2.2 的色谱条件,对同一浓度的芦丁标准品溶液进行 7 次测定,得到其在测定波长下的峰面积,求其变异系数为 0.63%。

2.2.6 稳定性试验 取按 2.1 提取的川黄柏和关黄柏提取液,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜后,在 2.2.2 色谱条件下分别在 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 间隔内进行 HPLC 测定,由色谱峰相对峰面积计算其 RSD 为 1.06%,结果表明该方法稳定性良好。

2.2.7 回收率实验 按 2.2.2 的色谱条件,用 2.2.1 配制的芦丁储备液对关黄柏和川黄柏进行加标实验,分别加入不同量的芦丁标准品,在测定波长下测定峰面积,回收率如表 1 所示。

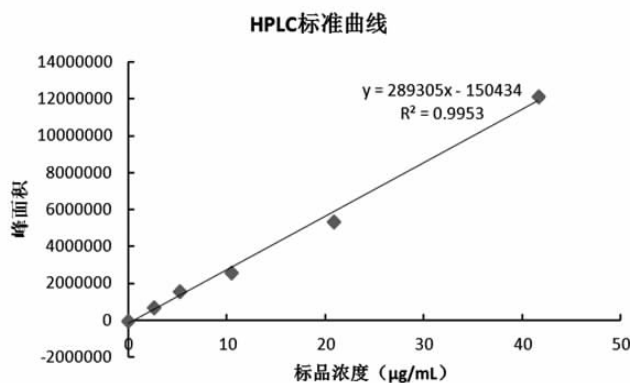


图 1 芦丁标准曲线图

表 1 回收率实验

样品	样品量/( $\mu\text{g/mL}$ )	加标量/( $\mu\text{g/mL}$ )	理论值/( $\mu\text{g/mL}$ )	实测值/( $\mu\text{g/mL}$ )	回收率/%
川黄柏	9.385	5.200	14.585	14.190	92.4
	9.385	10.400	19.785	20.024	102.3
	9.385	20.800	30.185	31.599	106.8
关黄柏	9.359	5.200	13.559	14.049	90.2
	9.359	10.400	19.759	19.435	93.3
	9.359	20.800	30.159	29.826	98.4

由表 1 可知,川黄柏的回收率为 92.4%~106.8%; 关黄柏的回收率为 90.2%~98.4%。

2.2.8 样品测定 取 2.1 提取的川黄柏和关黄柏提取液,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜后在 2.2.2 色谱条件下进样,对样品进行 3 次平行测定,结果如表 2 所示。

表 2 高效液相色谱样品测定

川黄柏	保留时间/min	峰面积 A/( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	测定含量/(mg/g)	关黄柏	保留时间/min	峰面积 A/( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	测定含量/(mg/g)
1	11.544	1 285 895	0.403 7	1	11.257	32 797	0.231
2	11.476	1 234 534	0.387 7	2	11.356	45 332	0.287
3	11.589	1 309 874	0.412 8	3	11.532	29 786	0.190
平均值	11.536	1 276 756	0.401 4	平均值	11.382	35 972	0.236

由表 2 可知,川黄柏中黄酮含量为 0.401 4 mg/g,关黄柏中黄酮含量为 0.236 mg/g.

2.3 流动注射化学发光法测定川黄柏和关黄柏的抗氧化性

2.3.1 邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-3-氨基苯二甲酰肼发光体系的确定 在试管中分别加入  $5\times10^{-5}$  mol/L 的邻苯三酚溶液、pH 为 9.95 的碳酸盐缓冲溶液(含浓度为 0.2 mmol/L 的 3-氨基苯二甲酰肼),由流动注射化学发光仪测定邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-3-氨基苯二甲酰肼发光体系的发光<sup>[7-8]</sup>,测定 3 次,取平均值进行计算.

2.3.2 抗氧化性测定及抑制率计算 按 2.3.1 确定的发光体系,测定一系列浓度川黄柏和关黄柏样品溶液抑制后的发光,分别测定 3 次,同样取平均值进行计算.发光强度以计数表示.以邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-3-氨基苯二甲酰肼发光体系的发光强度为空白发光峰值,可计算出加入样品后抑制发光的程度.

抑制率 % = (空白发光峰值 - 加样品后的发光峰值) / 空白发光峰值 × 100%

2.3.3 抗氧化性的测定

2.3.3.1 样品溶液的配制 分别称取经粉碎过筛处理的川黄柏和关黄柏样品 1.00 g,加入 25 mL 水,于室温水浴超声 15 min,过滤,滤液用水定容至 50 mL.

2.3.3.2 样品抗氧化性的测定 从 2.3.4 配制的样品液中吸取不同梯度量的样品于 25 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,配成不同浓度的测定液.在邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-3-氨基苯二甲酰肼发光体系中测定样品的抗氧化性结果如图 2、图 3.

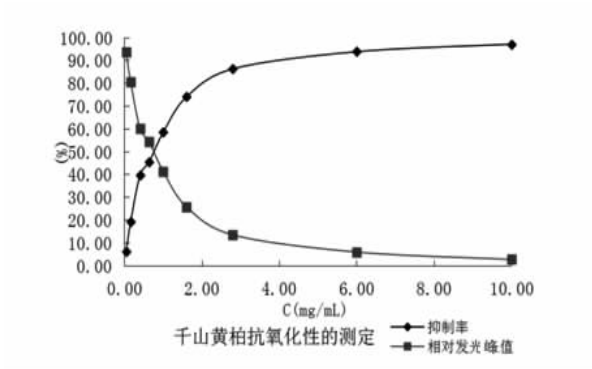


图 2 关黄柏抗氧化性测定

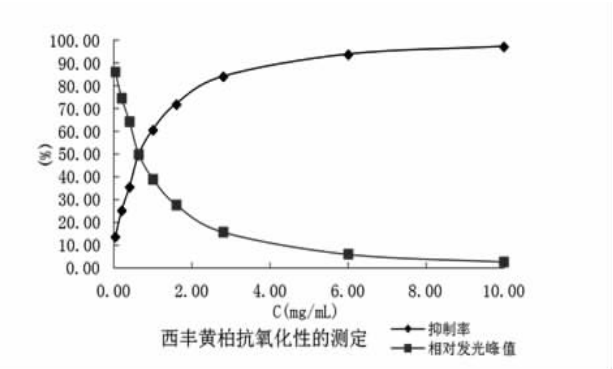


图 3 川黄柏抗氧化性测定

由图 2 可知,川黄柏抑制率 50%对应的浓度为 0.64 mg/mL.由图 3 可知,关黄柏抑制率 50%对应的浓度为 0.76 mg/mL.

3 讨论

实验表明川黄柏和关黄柏中都含有丰富的黄酮类化合物,川黄柏中黄酮含量为 0.401 4 mg/g,关黄柏中黄酮含量为 0.236 mg/g,川黄柏中黄酮含量大于关黄柏中黄酮含量.

黄酮类化合物是一种天然的抗氧化剂,由于川黄柏和关黄柏中都含有丰富的黄酮,因此它们都具有较强的抗氧化性能.经测定,川黄柏抗氧化性的 IC<sub>50</sub>(抑制率为 50% 时的溶液的浓度)为 0.64 mg/mL,关黄柏抗氧化性的 IC<sub>50</sub>为 0.76 mg/mL,川黄柏抗氧化性大于关黄柏抗氧化性.

## 参考文献

- [1] 吴嘉瑞,张冰,张光敏.黄柏药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2009,5(11):160-162.
- [2] 王衡奇,秦民坚,余国蓼.黄柏的化学成分及药理学研究进展[J].中国野生植物资源,2000,20(4):6-8.
- [3] 侯小涛,戴航,周江煜.黄柏的药理研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(2):498-500.
- [4] 张义虎,孙静.黄柏的临床应用总述[J].中国医学创新,2010,7(3):182-183.
- [5] Song zhenghua,Zhang ni.Flow-injection chemiluminescence determination of reserpine in midicine and biological fluids with controlledreagent-releasetechnology[J].Chemistry,2003,21:175-180.
- [6] 侯冬岩,回瑞华,杨梅,等.金银花中总黄酮的光谱分析及抗氧化性能测定[J].分析试验室,2004,23(11):56-59.
- [7] 侯冬岩,回瑞华,刘晓媛.万寿菊花、叶、茎中黄酮的含量及抗氧化性能的分析[J].鞍山师范学院学报,2008,10(4):15-18.
- [8] 回瑞华,侯冬岩,刘晓媛.山楂果中黄酮化合物的光谱分析及抗氧化性能测定[J].食品科学,2006,27(1):199-202.

## Comparative Analysis on Flavonoids Content and Antioxidant Activity of Guan Cortex Phellodendri and Chuan Cortex Phellodendri

LI Tiechun,PAN Huimin,SU Shiyu,WANG Jiaqi,NING Chailin,HUI Ruihua

(School of Chemistry and Life Science,Anshan Normal University,Anshan Liaoning 114007,China)

**Abstract** High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of flavonoids in Guan Cortex phellodendri and Chuan Cortex phellodendri and flow injection chemiluminescence method was used to determine the antioxidant activity of Guan Cortex phellodendri and Chuan Cortex phellodendri. The coefficient of variation of flavonoids content in Guan Cortex phellodendri and Chuan Cortex phellodendri was 0.63% by HPLC. The recovery rate was 90.2% ~ 98.4% and 92.4% ~ 106.8% respectively. The content of flavonoids in Guan Cortex phellodendri and Chuan Cortex phellodendri was 0.24 mg /g and 0.40 mg/g respectively. The  $IC_{50}$  (the concentration of the solution when the inhibition rate was 50%) was 0.76 mg/mL and 0.64 mg/mL respectively. The result shows that, The content of flavonoids in Guan Cortex phellodendri was higher than that of Chuan Cortex phellodendri, and the antioxidant activity of Chuan Cortex phellodendri was also higher than that of Guan Cortex phellodendri.

**Key words** Guan Cortex phellodendri; Chuan Cortex phellodendri; Flavonoids; High performance liquid chromatography; Antioxidation; Flow injection chemiluminescence

(责任编辑:陈欣)