

青钱柳老叶和嫩叶化学成分液质分析及5种成分含量的比较

彭攸灵*, 彭丽英, 杨先国, 冯传平, 狄庆峰, 罗红梅
(湖南中医药大学高等专科学校, 湖南 株洲 412012)

[摘要] 目的:对青钱柳老叶和嫩叶中的化学成分进行分析和鉴定,比较老嫩叶中所含成分类别及含量差异。方法:采用UPLC-Q-TOF-MS/MS分析方法,对青钱柳老叶和嫩叶50%甲醇提取液中的化学成分进行分析和鉴定。同时,采用Inter Sustain-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,流速1 mL·min⁻¹,紫外波长254 nm,柱温30 ℃,梯度洗脱,对青钱柳叶50%甲醇提取液进行HPLC分析,测定其中绿原酸、山柰酚、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素5种成分的含量。并对结果进行主成分分析。结果:从青钱柳老叶和嫩叶中共鉴别出30种化合物,其中老叶和嫩叶共有成分21种,2种成分为嫩叶仅有,7种成分为老叶仅有。青钱柳老叶和嫩叶中5种成分含量存在差异,主成分分析将15个样品聚为老叶和嫩叶两大类。结论:青钱柳老叶和嫩叶化学成分基本相同,相对来说老叶的化学成分较嫩叶丰富,成分含量较高。建立的方法能够较好鉴别青钱柳中的化学成分,区分老叶和嫩叶,为青钱柳老嫩叶的质量控制提供依据。

[关键词] 青钱柳; 老叶; 嫩叶; 超高压液相色谱-飞行时间质谱; 化学成分分析; 含量测定

[中图分类号] R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0085-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181917

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180712.1121.028.html>

[网络出版时间] 2018-07-13 9:29

Comparative Analysis of Chemical Constituents and Contents of Five Components in Old Leaves and Young Leaves of *Cyclocandra paliurus*

PENG You-ling*, PENG Li-ying, YANG Xian-guo, FENG Chuan-ping, DI Qing-feng, LUO Hong-mei
(Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012, China)

[Abstract] **Objective:** To analyse and identify the chemical components between old leaves and young leaves of *Cyclocandra paliurus*, and compare the category and contents of components between the old leaves and young leaves. **Method:** The main chemical components in 50% methanol extract from old leaves and young leaves of *C. paliurus* were analyzed and identified by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). The contents of chlorogenic acid, kaempferol, isoquercitrin, quercitrin and quercetin of *C. paliurus* were determined by high performance liquid chromatography on an Inter Sustain-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature at 30 ℃. Then the results were analyzed by using principal component analysis. **Result:** We finally identified 30 compounds from old leaves and young leaves. There were 21 common components among the two types of leaves. 2 components were only in young leaves, while 7 components were only in old leaves. There were quantitative differences in the contents of five components between old leaves and young leaves. 15 samples were divided into two main groups by principal component analysis. One was old leaves and the other was young leaves. **Conclusion:** The main chemical components in old leaves and young leaves of *C. paliurus* were basically similar. Comparatively,

[收稿日期] 20180419(007)

[基金项目] 湖南省中医药科研计划项目(201432)

[通信作者] * 彭攸灵,副教授,从事中药及中药制剂研究,E-mail:1259819195@qq.com

the chemical components in the old leaves were more abundant and the contents of five components were higher than those in young ones. The established method could be used to better identify the chemical components in the leaves of *C. paliurus*, and distinguish the old leaves and young leaves, providing a reference for its quality control based on leaves of *C. paliurus*.

[Key words] *Cyclocandra paliurus*; old leaves; young leaves; UPLC-Q-TOF-MS/MS; chemical components analysis; content determination

青钱柳来源于胡桃科植物青钱柳的叶,《全国中草药汇编》记载其具有祛风止痒,清浊降脂之功,适用于皮肤瘙痒,糖尿病^[1]。湖南、湖北等地民间长期用于保健及治疗消渴等疾病。青钱柳叶中主要含有的化学成分有黄酮类、三萜类、多糖类等,以黄酮类成分较为丰富^[2]。现代药理研究表明,青钱柳的降血压^[3]、降血糖^[4]、抗菌^[5]、抗氧化^[6]等作用均与黄酮类成分密切相关,而绿原酸具有抗氧化、抗炎、抗菌抗病毒、降糖降脂等活性^[7],本实验拟选取绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚 5 种指标性成分对青钱柳叶进行定量分析。

根据采收期的不同,市场上青钱柳叶原料多有嫩叶和老叶之分。前人研究发现青钱柳老嫩叶中黄酮^[8]及三萜皂苷^[9]类成分含量存在一定的动态变化,但对老嫩叶中化学成分整体特征描述及二者差异研究较少。为进一步开发利用青钱柳资源,本研究对青钱柳老叶和嫩叶中的化学成分进行分析和鉴定,并对鉴定出的指标性成分进行含量测定和主成分分析比较,描述青钱柳老嫩叶化学成分的整体特征,明晰青钱柳老叶和嫩叶之间的化学成分群差异,为青钱柳叶的质量控制和评价标准的建立奠定基础,为青钱柳叶资源的综合、高效利用提供一定的参考。

1 材料

1290 系列超高效液相色谱仪,6530 Q-TOF 型质谱仪(电喷雾离子源 ESI),MassHunter 质谱工作站,1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);AL204 型 1/1 万电子分析天平,XPE105 型 1/10 万分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);KM-500DB 型超声波清洗器(昆山美超声仪器有限公司)。

绿原酸(批号 110753-201716)购于中国食品药品检定研究院;山柰酚(批号 MUST-17032911,纯度 ≥98%),槲皮苷(批号 MUST-16120510,纯度 ≥98%)和槲皮素(批号 MUST-16111114,纯度 ≥98%)均购于成都曼斯特生物科技有限公司;异槲皮苷(批号 CHB160912,纯度 ≥98%)购于成都克洛

玛生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。所有样品经湖南省中医药研究院中药研究所刘浩助理研究员鉴定为青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 的干燥叶。见表 1。

表 1 青钱柳样品信息

Table 1 Sample information of *Cyclocarya paliurus* leaves

编号	成熟度	产地	编号	成熟度	产地
1	嫩叶	湖南绥宁	9	老叶	湖南绥宁
2	嫩叶	湖南浏阳	10	老叶	湖南浏阳
3	嫩叶	湖北恩施	11	老叶	湖南绥宁
4	嫩叶	湖南绥宁	12	老叶	湖北鹤峰
5	嫩叶	湖北鹤峰	13	老叶	江西修水
6	嫩叶	湖南武冈	14	老叶	陕西略阳
7	嫩叶	湖南武冈	15	老叶	陕西略阳
8	嫩叶	湖南武冈			

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 取绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素和山柰酚对照品适量,精密称定,置于棕色量瓶中,用适量甲醇溶解后定容,摇匀,制成含绿原酸 $0.615\ 2\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,异槲皮苷 $0.196\ 8\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,槲皮苷 $0.204\ 8\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,槲皮素 $2.007\ 2\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,山柰酚 $0.217\ 6\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液母液。精密吸取混合对照品溶液母液 2.5 mL,置于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇定容后摇匀,制成含绿原酸 $0.153\ 8\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,异槲皮苷 $0.049\ 20\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,槲皮苷 $0.051\ 20\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,槲皮素 $0.050\ 18\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,山柰酚 $0.054\ 40\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 分别称取各产地的青钱柳叶样品 1.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入 50% 的乙醇 50 mL,超声 30 min(功率 500 W,频率 40 kHz),放冷,补足减失的质量,滤过,滤液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜后,备用。

2.3 色谱条件 Inter Sustain-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B),梯度洗脱,(0 ~ 5 min, 9% A; 5 ~ 10 min, 9% ~ 18%

A; 10 ~ 30 min, 18% ~ 28% A; 30 ~ 38 min, 28% ~ 52% A; 38 ~ 45 min, 52% ~ 80% A; 45 ~ 55 min, 80% ~ 95% A; 55 ~ 70 min, 95% A), 检测波长为 254 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。

2.4 质谱条件 液质分析采用分流设置, 分流比 1:4, 负离子模式扫描; 毛细管电压 3 500 V; 离子源温度 320 °C; 雾化气压力 241.325 kPa; 干燥器体积流量 8 L·min⁻¹; 锥孔电压 65 V; 干燥器温度 350 °C; 碎片电压 130 V; 质量数扫描范围 m/z 100 ~ 1 500; 采样频率 0.1 s, 间隔 0.02 s; 碰撞能量分别采用 5 ~ 50 eV。测量样品前, 使用调谐液校准质量轴, 以保证质量精度误差 $< 1 \times 10^{-6}$ 。

2.5 供试品液质联用分析 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS, 按 2.3 和 2.4 项下条件对青钱柳老叶 (12 号样品) 和嫩叶 (5 号样品) 中化学成分进行定性分析, 得到的负离子模式的质谱总离子流图, 见图 1。

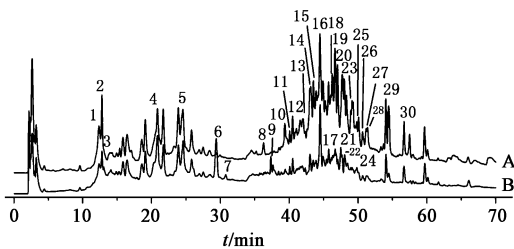


图 1 青钱柳老叶 (A) 和嫩叶 (B) 负离子模式下的总离子流
Fig. 1 TIC of UPLC-Q-TOF-MS/MS by negative mode for *Cyclocandra paliurus* sample of young leaves (A) and old leaves (B)

使用 MassHunter 质谱工作站进行质谱数据处理, 根据各化学成分的保留时间、紫外吸收及一、二级质谱信息, 结合考文献数据进行化合物分析鉴定。从青钱柳老叶和嫩叶中共鉴别出 30 种化合物, 结果见表 2。根据解析结果, 发现化合物 19, 20 仅在嫩叶中含有, 化合物 6, 7, 9, 17, 21, 22, 24 仅在老叶中含有; 二者共有成分 21 种, 主要为苯丙素类、黄酮类、三萜类、甾体类。绿原酸及黄酮的裂解规律见图 2。

2.6 供试品 HPLC 含量测定

2.6.1 线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液母液 5, 2.5, 0.625, 0.625, 0.25 mL, 依次置于 10, 10, 5, 10, 10 mL 的棕色量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 按 2.3 项下色谱条件, 吸取混合对照品母液和上述 5 个质量浓度溶液各 10 μ L, 分别进样。以峰面积为纵坐标, 混合对照品质量浓度为横坐标进行线性回归。按信噪比的 3 倍和 10 倍考察检测限和定量限, 结果见表 3。

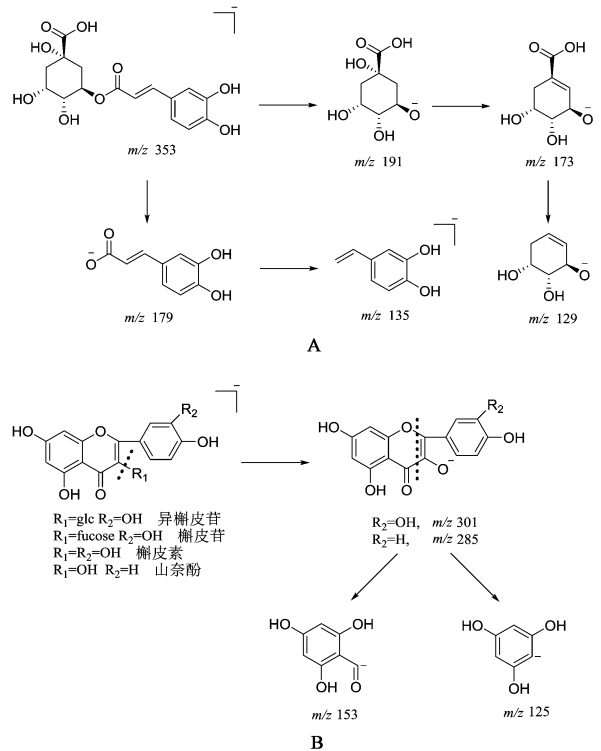


图 2 绿原酸 (A) 及黄酮 (B) 的裂解规律
Fig. 2 Fragmentations of chlorogenic acid and flavone

2.6.2 精密度试验 取同一混合对照品溶液, 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测定峰面积。结果绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素和山柰酚峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.2%, 0.9%, 1.5% 和 0.7%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 日内稳定性试验: 取同一供试品溶液 (6 号样品), 于室温放置 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 后, 注入液相色谱仪, 测定峰面积。结果绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素和山柰酚峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 2.5%, 1.4%, 1.7% 和 2.0%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

日间稳定性试验: 取 2.2 项下制备的供试品溶液 (6 号样品), 于室温条件下继续放置 2, 3, 4, 5, 6 d 后, 注入液相色谱仪, 测定峰面积。结果绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素和山柰酚峰面积的 RSD 分别为 2.6%, 1.8%, 2.1%, 2.4% 和 1.7%。表明供试品溶液在 6 d 内依然稳定。

2.6.4 重复性试验 取样 6 粉末 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 注入液相色谱仪, 计算含量。结果绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素和山柰酚的质量分数分别为 2.823 4, 2.473 8, 1.126 3, 0.082 9, 0.072 8 mg·g⁻¹, RSD 分别为 0.6%, 0.5%, 1.6%, 1.5% 和 1.0%, 表明该方法重复性

表 2 青钱柳老叶、嫩叶中 UPLC-Q-TOF-MS/MS 化学成分分析

Table 2 Identification of extracted compounds from *Cyclocandra paliurus* of young leaves and old leaves

No.	保留时间 /min	名称	分子式	实测值	理论值	碎片离子	参考文献
1	12.391	3-O-咖啡酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.088 2 [M-H] ⁻	353.087 3	191, 179, 173, 135	[10]
2	12.790	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.088 3 [M-H] ⁻	353.087 3	191, 179, 173, 135, 125	[10]
3	13.061	5-O-咖啡酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.088 3 [M-H] ⁻	353.087 3	191, 179, 135	[10]
4	20.890	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.088 5 [M-H] ⁻	463.087 7	301, 153, 125	[11]
5	24.557	槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.093 7 [M-H] ⁻	449.092 7	301, 153, 125	[11]
6	29.457	山柰酚-3-O-鼠李糖苷 ^b	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 0 [M-H] ⁻	431.097 8	285	[11]
7	30.790	1-O-glu-(1→6)-glu-1,3,2-octanediol ^b	C ₂₀ H ₃₈ O ₁₂	469.228 9 [M-H] ⁻	469.228 5	307, 145	[12]
8	36.294	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.035 1 [M-H] ⁻	301.034 8	273, 153, 125	[11]
9	37.356	cholest-5-en-22-one ^b	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₂	695.402 2 [M-H] ⁻	695.400 7	652, 563, 520	[11]
10	39.439	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 1 [M-H] ⁻	285.039 9	153, 125	[11]
11	40.089	山柰酚-3-(6"-Z-肉桂基葡萄糖苷)	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₇	577.136 2 [M-H] ⁻	577.140 5	285	[11]
12	40.523	majonoside R ₂ [*]	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₄	785.470 2 [M-H] ⁻	785.468 7	726, 653, 491	[12]
13	42.977	越南参皂苷 R ₂	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₅	827.480 8 [M-H] ⁻	827.479 3	768, 474	[12]
14	43.144	notoginsenoside Rw ₂ [*]	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₄	785.469 6 [M-H] ⁻	785.468 7	740, 651, 514	[11]
15	43.922	soulieoside N [*]	C ₃₅ H ₅₈ O ₁₀	637.395 5 [M-H] ⁻	637.395 2	514, 223	[12]
16	44.506	beesioside A	C ₃₅ H ₅₈ O ₉	621.401 4 [M-H] ⁻ , 1 243.809 1 [2M-H] ⁻	621.400 3	489, 471, 133	[11]
17	45.456	beesioside N ^{*b}	C ₃₅ H ₅₈ O ₁₀	637.396 6 [M-H] ⁻	637.395 2	514, 313, 223	[13]
18	45.756	人参皂苷 Rh ₇	C ₃₆ H ₆₀ O ₉	635.417 3 [M-H] ⁻	635.415 9	617, 473	[11]
19	46.677	beesioside M ^{*a}	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₀	663.411 6 [M-H] ⁻ , 1 327.828 2 [2M-H] ⁻	663.410 8	620, 531, 293	[14]
20	47.089	beesioside F ^{*a}	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₀	663.411 4 [M-H] ⁻ , 1 327.828 6 [2M-H] ⁻	663.410 8	620, 531, 490	[14]
21	47.489	beesioside III ^{*b}	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	679.406 9 [M-H] ⁻ , 1 359.820 9 [2M-H] ⁻	679.405 7	636, 620, 547, 488	[14]
22	47.689	越南参皂苷 R ₁ ^b	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₅	841.496 4 [M-H] ⁻	841.494 9	795, 753, 736	[11]
23	48.055	(3β,11β,16β,22S)-3,11,22-trihydroxycholest-5-en-16-yl-2-O-acetyl-6-deoxy-α-L-mannopyranoside	C ₃₅ H ₅₈ O ₉	621.402 0 [M-H] ⁻ , 1 243.808 6 [2M-H] ⁻	621.400 3	430, 415	[11]
24	48.522	β-D-glucopyranosiduronic acid ^{*b}	C ₂₈ H ₄₄ O ₁₁	555.285 7 [M-H] ⁻	555.280 5	471, 393, 165	[12]
25	48.972	ilexasoside A [*]	C ₃₇ H ₅₈ O ₁₀	661.396 6 [M-H] ⁻	661.395 2	616, 602, 472	[13]
26	49.839	ilexasoside B [*]	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	603.390 8 [M-H] ⁻	603.389 7	558, 471, 426	[13]
27	50.110	kudzusaponin SA ₄ [*]	C ₃₅ H ₅₈ O ₈	605.406 0 [M-H] ⁻	605.405 3	546, 473, 404	[15]
28	51.410	tetrahydroxyolean-12-en-3-one [*]	C ₃₅ H ₅₈ O ₈	605.406 1 [M-H] ⁻	605.405 3	532, 489, 473	[15]
29	54.043	kuguaoside D [*]	C ₃₇ H ₆₀ O ₉	647.416 8 [M-H] ⁻ , 1 295.839 6 [2M-H] ⁻	647.415 9	617, 603, 470	[15]
30	56.709	soyasapogenol B [*]	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	457.368 7 [M-H] ⁻ , 915.744 9 [2M-H] ⁻	457.368 2	441, 426	[16]

注: * 为首次从青钱柳叶中发现; ^a 仅嫩叶中含有, ^b 仅老叶中含有。

表 3 5 种成分的线性关系

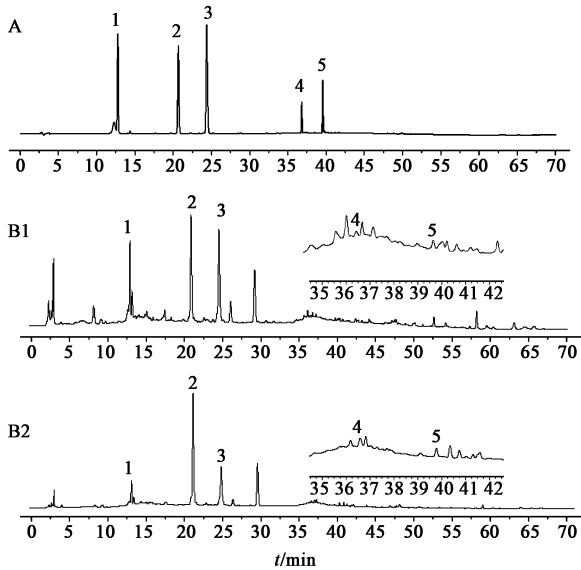
Table 3 Results of linear equations of five components

成分	回归方程	R ²	线性范围/g·L ⁻¹	检测限/ng	定量限/ng
绿原酸	Y = 6 939.6X - 18.914	0.999 8	0.015 380 ~ 0.615 2	5.29	17.82
异槲皮苷	Y = 25 928X - 1.978 8	1	0.004 920 ~ 0.196 8	7.21	23.87
槲皮苷	Y = 33 635X - 21.417	0.999 7	0.005 120 ~ 0.204 8	5.51	18.22
槲皮素	Y = 36 341X + 180.07	0.999 9	0.005 018 ~ 0.207 2	5.79	18.76
山柰酚	Y = 27 916X + 1.127 8	1	0.005 440 ~ 0.217 6	6.01	19.54

良好。

2.6.5 加样回收试验 取 6 号样品粉末 6 份,每份 0.5 g,精密称定,加入适量的对照品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,在 2.3 项色谱条件下测定,计算回收率。结果绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素和山柰酚的平均回收率分别为 99.24%, 99.17%, 97.72%, 100.80% 和 100.69%, RSD 分别为 0.6%, 0.7%, 1.1%, 2.8% 和 0.5%。见表 4。

2.6.6 含量测定 按 2.3 项下的色谱条件,对供试品进行 HPLC 分析,在该色谱条件下,目标色谱峰分离度均 > 1.5。结果见图 3。利用外标法,计算各样品中 5 种指标性成分的含量,结果见表 5。



1. 绿原酸; 2. 异槲皮苷; 3. 槲皮苷; 4. 槲皮素; 5. 山柰酚; A. 对照品; B1. 嫩叶; B2. 老叶

图 3 对照品和青钱柳叶样品 HPLC

Fig. 3 HPLC of reference substances and *Cyclocandra paliurus* sample of young leaves and old leaves

分析上述结果可知,青钱柳老叶和嫩叶之间异槲皮苷、槲皮苷 2 种成分含量均存在极显著差异,绿原酸、槲皮素和山柰酚含量差异不显著。从整体来看,老叶中 5 种成分含量较嫩叶高,老叶中异槲皮苷

和槲皮苷的含量平均值分别为嫩叶中的 2.5 倍和 3.6 倍。5 种成分中绿原酸的含量变化幅度较大,质量分数在 0.684 2 ~ 3.947 6 mg·g⁻¹。

不同产地青钱柳叶中 5 种成分含量存在差异。老叶中陕西略阳产地的青钱柳叶中绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、山柰酚的含量最高,江西修水的老叶中槲皮素的含量最高;嫩叶中湖北鹤峰产地的青钱柳叶中 5 种成分含量最高。

2.7 主成分分析 采用主成分分析(PCA)方法对 15 批青钱柳叶样品的 4 种主要成分(异槲皮苷含量、槲皮苷含量、槲皮素含量、山柰酚含量)进行特征分析(图 4)。先将所有数据进行标准化处理,利用 PCA 程序对数据进行分解,并利用其得分矩阵绘制聚类平面图。结果显示,15 批青钱柳叶样品分为两类,第一类样品为嫩叶,基本聚集在平面图的右上侧;第二类样品为老叶,平面分布较为分散。

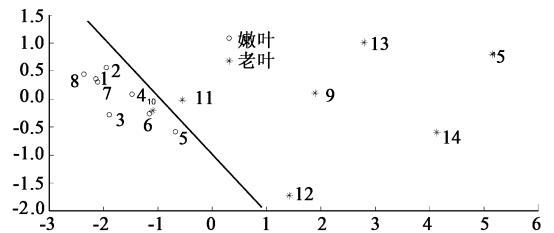


图 4 青钱柳老叶和嫩叶 4 种有效成分含量主成分聚类平面

Fig. 4 Principal component cluster analysis for four components in old leaves and young leaves of *Cyclocandra paliurus*

通过主成分分析,客观地反应了青钱柳老叶和嫩叶之间的差异,能较好的区分青钱柳老叶和嫩叶样品。从图上可以看出,1 号和 7 号两个样品,6 号和 10 号两个样品 4 种主要成分含量相似,距离较近;而 14,15 号样品与其他样品之间距离较远,4 种主要有效成分含量差异较大。相比于嫩叶,老叶样品之间的距离均较大,呈分散分布,说明老叶的样品之间存在较大差异。

3 讨论

根据青钱柳老嫩叶化学成分结果分析,仅老叶

表 4 5 种成分的加样回收试验

Table 4 Results of recovery test of five components

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
绿原酸	0.501 8	1.417	1.4	2.801	98.87	99.24	0.6
	0.504 4	1.424	1.4	2.831	100.49		
	0.498 8	1.408	1.4	2.793	98.91		
	0.502 1	1.418	1.4	2.804	99.03		
	0.497 5	1.405	1.4	2.788	98.81		
	0.504 6	1.425	1.4	2.815	99.31		
异槲皮苷	0.501 8	1.241	1.25	2.489	99.81	99.17	0.7
	0.504 4	1.248	1.25	2.505	100.58		
	0.498 8	1.234	1.25	2.497	101.05		
	0.502 1	1.242	1.25	2.501	100.71		
	0.497 5	1.231	1.25	2.493	100.98		
	0.504 6	1.248	1.25	2.511	101.02		
槲皮苷	0.501 8	0.565	0.55	1.114	99.79	97.72	1.1
	0.504 4	0.568	0.55	1.107	97.98		
	0.498 8	0.562	0.55	1.109	99.49		
	0.502 1	0.566	0.55	1.115	99.91		
	0.497 5	0.560	0.55	1.105	99.03		
	0.504 6	0.568	0.55	1.112	98.85		
槲皮素	0.501 8	0.042	0.04	0.08	96.00	100.8	2.8
	0.504 4	0.042	0.04	0.081	97.96		
	0.498 8	0.041	0.04	0.081	99.12		
	0.502 1	0.042	0.04	0.081	98.44		
	0.497 5	0.041	0.04	0.08	96.89		
	0.504 6	0.042	0.04	0.081	97.92		
山柰酚	0.501 8	0.037	0.04	0.078	103.67	100.69	0.5
	0.504 4	0.037	0.04	0.078	103.20		
	0.498 8	0.036	0.04	0.075	96.72		
	0.502 1	0.037	0.04	0.077	101.12		
	0.497 5	0.036	0.04	0.077	101.96		
	0.504 6	0.037	0.04	0.076	98.16		

中含有的化学成分 **9, 21**, 是嫩叶中化合物 **19** 或 **20** 的羟基化产物。化合物的生成与植物生长发育的不同阶段其次生代谢产物的相互转化有关。陈晓亚^[17]认为,植物次生代谢终产物是在基本骨架形成之后经过甲基化、羟基化等修饰生成的。青钱柳叶由嫩到老的生长发育过程中,代谢产物向羟基化转化,根据质谱结果做大致推断,化合物 **9, 21** 由化合物 **20** 羟基化而来,化合物衍变示意图 5。具体转化关系如何,还需要进一步研究验证。

表 5 青钱柳老叶和嫩叶中 5 种成分含量

Table 5 Content of five components in old leaves and young leaves of *Cyclocandra paliurus*

编号	绿原酸	异槲皮苷	槲皮苷	槲皮素	山柰酚
1	2.398 1	1.340 5	0.852 4	0.020 5	0.046 4
2	2.141 6	1.327 6	1.134 8	0.016 6	0.016 4
3	0.784 2	1.972 6	0.583 3	0.070 8	0.036 4
4	1.038 9	1.998 4	1.143 1	0.037 2	0.023 0
5	3.947 6	3.040 3	1.235 9	0.174 3	0.182 4
6	2.823 4	2.473 8	1.126 3	0.082 9	0.072 8
7	1.065 3	1.403 3	0.834 8	0.069 7	0.055 8
8	0.684 2	1.126 9	0.750 7	0.048 2	0.038 4
9	7.278 5	4.320 7	3.587 2	0.096 2	0.109 5
10	0.827 2	2.482 5	1.207 5	0.087 0	0.073 8
11	5.227 0	2.715 4	1.738 7	0.061 9	0.068 5
12	2.412 9	5.316 3	1.970 4	0.058 7	0.060 0
13	0.720 4	4.316 0	4.799 7	0.196 1	0.793 9
14	12.092 4	6.382 8	4.695 3	0.193 0	0.222 3
15	0.592 9	6.075 2	6.420 5	0.136 7	0.137 6

本研究对 15 批青钱柳叶中的绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚 5 种成分含量进行了同时测定,采用主成分分析法对 15 批青钱柳叶样品进行分类时,考虑到青钱柳叶的干燥加工过程对绿原酸的含量有较大影响^[18-20],实际测定结果也表明了绿原酸含量结果变化幅度较大。故在进行主成分分析时,仅将其余 4 种成分作为指标进行综合分析考察,更能客观反映样品本身的差异。

本研究选取的含量测定指标主要为黄酮类化合物。其是很多植物体内的重要的次生代谢产物,是植物与环境协同进化过程中产生的一类防御物质,在植物生长繁殖和植物胁迫保护过程中起着重要的作用^[21]。有报道称,增加太阳辐照能提高植物黄酮类化学成分的含量^[22]。在青钱柳生长过程中,老叶比嫩叶的发育周期更久,接受光照等外界环境胁迫的时间也越长,可能是导致老叶比嫩叶中黄酮类成分含量更高的原因之一。

主成分分析结果中青钱柳嫩叶样品点相对聚集,老叶样品点相对分散,一方面可能是产地差异对老叶中的黄酮类成分的积累影响较大,另一方面可能与老嫩叶的采收时间有关,不同采收时间青钱柳叶中的黄酮类成分含量存在差异^[8]。一般嫩叶的采集中在每年的 4~5 月,而老叶的采收时间相对分散,在落叶之前均能适时采收。

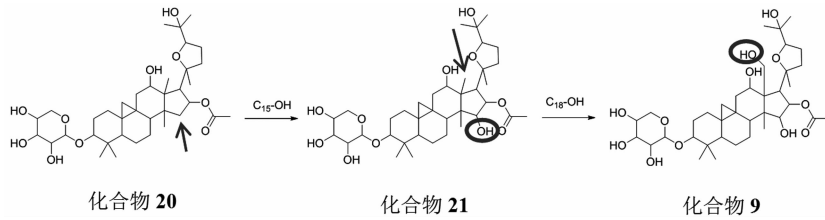


图 5 化合物 9,20,21 衍生示意

Fig.5 Derivative diagram of compound 9,20,21

本研究在对青钱柳老嫩叶中化学成分分析鉴别的基础上,对其中主要化学成分进行了定量分析,阐明青钱柳老叶和嫩叶之间的差异。二者化学成分基本相同,含量差异较大。相对来说,老叶的化学成分较嫩叶丰富,成分含量较高。研究结果可为青钱柳叶的质量控制及高效开发利用提供依据。

[参考文献]

[1] 王国强. 全国中草药汇编[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2014;334-335.

[2] 范冰舵,魏颖,李沧海,等. 青钱柳化学成分及降血糖活性研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(13):239-242.

[3] 侯小利,刘晓霞,王硕,等. 青钱柳叶总黄酮对自发性高血压大鼠的影响[J]. 中药药理与临床,2014,30(2):62-69.

[4] 杨武英,上官新晨,徐明生,等. 青钱柳黄酮对 α -葡萄糖苷酶活性及小鼠血糖的影响[J]. 营养学报,2007,29(5):507-509.

[5] 冯宗帅. 青钱柳叶总黄酮提取分离及抗氧化、抗菌研究[D]. 南京:南京林业大学,2009.

[6] 应瑞峰,季苏杰,李婷婷,等. 青钱柳叶黄酮的分离纯化与抗氧化性研究[J]. 食品科技,2015,40(12):174-178.

[7] 邢丽娜,周明眉,李云,等. 绿原酸及其肠道代谢产物对中枢神经系统疾病的作用和机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(6):1044-1047.

[8] 吴琳琳,姚文丽,罗奕,等. 10 个采收期青钱柳 HPLC 指纹图谱建立及 4 种成分测定[J]. 中成药,2017,39(2):347-352.

[9] 王玉. 青钱柳三萜皂苷的组织化学和细胞化学定位[D]. 南京:南京林业大学,2011.

[10] 王亚丹,何轶,戴忠,等. HPLC-MS/MS 法同时测定山银花中 7 个有机酸的含量[J]. 药物分析杂志,2016,36(6):998-1005.

[11] 陈玮玲,钟培培,王远兴. 青钱柳叶活性成分的抗氧化活性及 UPLC-QTOF-MS/MS 分析[J]. 食品科学,

2017,38(8):122-128.

[12] 魏春雁. 越南人参的化学成分和药理作用[J]. 特产研究,2001,23(1):57-61.

[13] WANG L, CAI Y, ZHANG X Q, et al. New triterpenoid glycosides from the roots of *Ilex asprella*[J]. Carbohydr Res,2012,349(2):39-43.

[14] JIAN H J, LIU D, LIN G, et al. Beesiosides G, H, and J-N, seven new cycloartane triterpene glycosides from *Beesia calthifolia* [J]. J Nat Prod, 2002, 65 (2): 147-152.

[15] Arao T, Kinjo J, Nohara T, et al. Oleanene-type triterpene glycosides from puerariae radix. IV. Six new saponins from *Pueraria lobata* [J]. Chem Pharmaceut Bull (Tokyo), 1997, 45(2):362-366.

[16] WEI Z, Davidg P. Behaviour of soyasapogenol B under optimised hydrolysis and ESI mass spec conditions[J]. Food Chem,2010,123(4):993-999.

[17] 陈晓亚. 植物次生代谢研究[J]. 世界科技研究与发展,2006,28(5):1-4.

[18] 罗磊,杨彬,张国庆,等. 金银花气调热泵干燥过程中绿原酸降解动力学研究[J]. 食品科学,2015,36(17):7-12.

[19] 王永香,罗勇,沈娟,等. 不同产地加工方法对江苏省东海县种植基地金银花质量影响的研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(14):2665-2669.

[20] 胡璇,李卫东,李欧,等. 滚筒杀青烘干加工方法对四倍体金银花药材质量的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(17):2554-2557.

[21] 曾燕,郭兰萍,王继永,等. 植物黄酮类化合物的化学生态学功能及中药材定向栽培的构想[J]. 中国现代中药,2015,17(8):776-790.

[22] Tattini M, Galardi C, Pinelli P, et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress [J]. New Phytologist, 2004, 163 (3): 547-561.

[责任编辑 顾雪竹]