

## 青钱柳三种成分的含量测定研究

近年来青钱柳的化学成分及药理作用研究成为学者们关注的一个热点。学者们对其化学成分研究发现青钱柳所含无机成分中不仅有人体必需的常量元素镁、钙、钾、磷等，还含有对人体保健具有重要作用的微量元素如硒、铁、铜、锌、锰等<sup>[9]</sup>。而有机成分则有黄酮类化合物、多糖类、萜类化合物、有机酸类等。目前从青钱柳叶中分离得到的黄酮类化合物主要为黄酮醇及其黄酮醇苷类化合物，有山柰酚、槲皮素、异槲皮苷等 40 种黄酮类及苷类化合物；萜类分得有青钱柳苷I、青钱柳苷II、青钱柳苷III等 30 多种成分，主要为三萜酸及三萜皂苷类；此外还有甾体类化合物，苯甲酸、香草酸、逆没食子酸等 18 种有机酸类化合物，以及色氨酸、岩白菜内酯、肌醇等 14 种其他类化合物<sup>[10]</sup>。

青钱柳叶降血糖、降血脂、降血压和提高人体免疫力等作用的主要有效成分为黄酮、三萜、有机酸及多糖类。有文献报道青钱柳中含有的槲皮苷、异槲皮苷、阿福豆苷等成分具有显著的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性<sup>[11]</sup>。段玉书等<sup>[12]</sup>对青钱柳的化学成分及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性进行了研究，对分离得到的 10 个化合物进行了体外酶活性测定，结果显示其中化合物 1 和 2 显示了较强的抑制活性，其中化合物 1 为阿福豆苷。这些成分的含量是评价青钱柳药材品质的重要指标<sup>[13]</sup>。朱贲峰等<sup>[14]</sup>对不同产地青钱柳总黄酮含量进行分析比较，杨万霞<sup>[15]</sup>对不同地区青钱柳总三萜和总多糖含量进行分析比较，发现不同产地的青钱柳成分含量不同。青钱柳老叶和嫩叶，野生与栽培品种中的总黄酮及总三萜皂苷类成分的含量是存在一定的差异<sup>[16-17]</sup>。可见青钱柳的质量因种质、产地、环境等因素而不同，现有研究不够深入，需进一步对其质量差异情况及原因进行探讨。

通过查阅相关文献可知，青钱柳含有的阿福豆苷，异槲皮苷等成分具有显著的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性，是治疗降血脂与降血糖的主要

有效成分。有文献报道以测定青钱柳酸水解产物中槲皮素和山柰酚的含量作为药材质量控制标准,存在一定不足。通过前期对青钱柳的含量进行的初步研究,发现青钱柳中的异槲皮苷,阿福豆苷,槲皮苷的含量比较高。

因此,为更进一步综合、高效利用青钱柳资源,本实验通过用HPLC法对不同产地的野生与栽培青钱柳的活性成分(异槲皮苷,阿福豆苷,槲皮苷)进行含量测定,阐明不同产地青钱柳野生与栽培之间的含量上差异,建立含量测定方法来进行青钱柳的质量分析。

## 1. 实验材料、仪器与试剂

### 1.1 实验材料

采集不同产地青钱柳样品,见下表 1。

表 1 青钱柳药材样品信息

编号	采样地	备注
1	广西桂林龙胜县平等乡	(野生)
2	广西桂林龙胜县三门镇	(野生)
3	广西桂林兴安县	(栽培 5 年)
4	广西桂林资源县	(栽培 5 年)
5	广西桂林永福县	(野生)
6	广西桂林全州县大西江镇	(栽培 5 年)
7	柳州三江县福禄乡	(栽培)
8	广西河池天峨县	(野生)
9	广西来宾金秀大瑶山	(野生)
10	江西井冈山拿山镇	(野生)
11	江西井冈山拿山镇	(栽培 6 年)
12	江西上饶市广信区	(野生)
13	江西上饶市广信区	(栽培 5 年)
14	江西铜鼓县	(野生)

15	江西铜鼓县	(栽培)
16	湖南常德石门县	(栽培 10 年)
17	湖南常德石门县	(野生)
18	湖南城步县	(野生)
19	湖南益阳资阳区张家寨乡	(野生)
20	湖南张家界桑植县	(栽培 5 年)
21	湖北宜昌市五峰县	(栽培 5 年)
22	安徽池州市石台县	(野生)
23	安徽池州市石台县	(栽培 5 年)
24	贵州贵阳黔陶乡	(栽培 5 年)

## 1.2 实验仪器

表 2-2 实验仪器

仪器与型号	产家
E2695 高效液相色谱仪	美国 WATERS 公司
SQP 型电子分析天平	赛多利斯科学仪器公司
DFY-500 型摇摆式高中药粉碎机	温岭市林大机械公司
DP5 系列超纯水仪	法国密里博公司
HH-2 数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
KQ-500DA 型数控超声清洗仪	昆山市超声仪器有限公司

## 1.3 试剂

异槲皮苷(批号:PS001042)、槲皮苷(批号:PS010791)、阿福豆苷(批号:PS01119)以上对照品购自成都普思生物科技股份有限公司。乙腈(色谱级, Fisher Chemical 公司)、甲醇(色谱级, Fisher Chemical 公司)、Agilent XDB-C18(5 $\mu$ m, 4.6x250mm)色谱柱(美国 Agilent 公司)。

## 2. 方法与结果

### 2.1 实验条件考察

由于异槲皮苷，槲皮苷和阿福豆苷这 3 种成分最大吸收下的检测波长基本相同，异槲皮苷和槲皮苷的最大吸收波长为 256nm，阿福豆苷最大吸收波长为 265nm，因槲皮苷和槲皮苷的含量均比阿福豆苷含量高，综合考虑下，因此青钱柳的含量测定选择的最大吸收波长为 256nm，其色谱条件如下: Agilent 公司 CB-C18 柱(5 $\mu$ m, 4.6x250mm) 色谱柱: Waters 2998 UV/Vis 紫外检测器:乙腈(A) -0.1%磷酸(B)为流动相，梯度洗脱程序:

0~15min,10%~12%(A);16~20min,12%~15%(A);21~33min,15%~18.3%(A);34~40min,18.3%~19.3%(A);41~50min,19.3%~22%(A);51~60min,22%~25%(A),柱温 30°C;流速 1.0mL/min。

## 2.2 供试品溶液的制备

称取青钱柳药材 1.0g，精密称定，精密加入 50%乙醇 30mL，超声提取 45min，放冷，补重，取上清液过微孔滤膜进样检测，供试品色谱图见图 1。

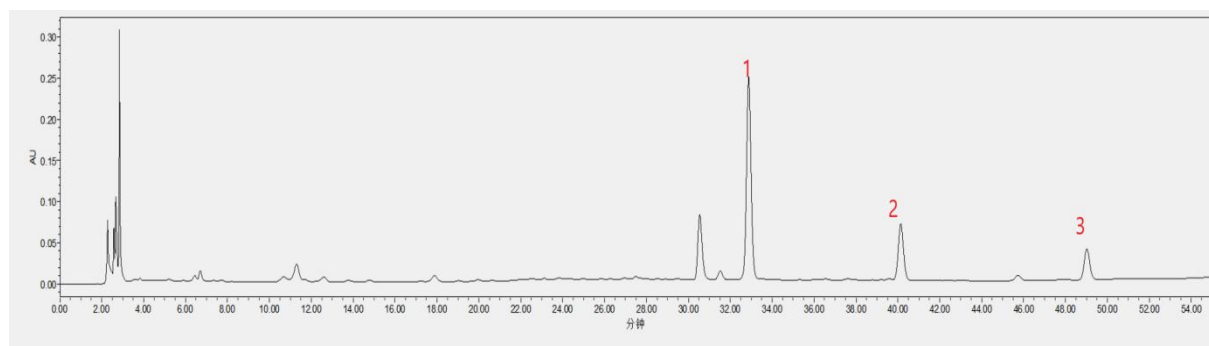


图 1 供试品色谱图

1.异槲皮苷 2.槲皮苷 3.阿福豆苷

## 2.3 对照品溶液的制备

分别称取阿福豆苷，槲皮苷和异槲皮苷对照品适量置于 10 mL 容量瓶中，加 50%乙醇至刻度，充分溶解后混合制成含异槲皮苷 0.8 mg/mL、槲皮苷 0.4 mg/mL、阿福豆苷 0.4 mg/mL 混合对照品溶液，备用。进样测定，对照品色谱图见图 2-2。

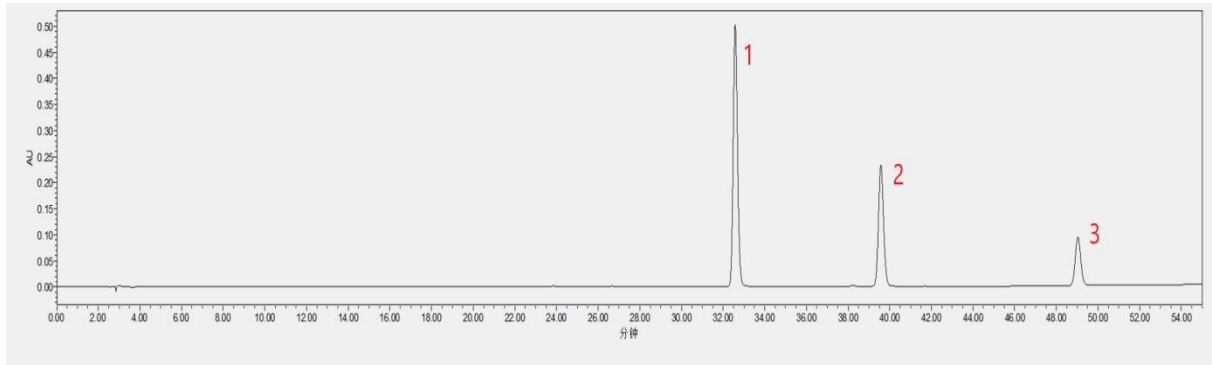


图 2 对照品色谱图

1.异槲皮苷 2.槲皮苷 3.阿福豆苷

### 3. 含量测定结果

分别称取 24 批不同产地青钱柳药材粉末 1.0g，精密称定，提取供试品溶液后并进行进样检测，考察 24 批次不同产地、野生与栽培青钱柳药材中异槲皮苷、槲皮苷、阿福豆苷 3 中成分的含量，测定结果见表 2-14。

表 2-14 24 批不同产地青钱柳药材中 3 种化学成分含量测定结果

序 号	含量 (mg/g)			
	异槲皮苷	槲皮苷	阿福豆苷	总含量
S1	4.7702	0.9390	1.7094	7.4186
S2	6.6580	2.0497	1.6066	10.3143
S3	10.4928	1.5855	2.8619	14.9402
S4	6.6533	2.2317	2.4824	11.3674
S5	0.8452	1.6677	1.9732	4.4861
S6	3.9875	1.7626	0.8688	6.6189
S7	1.5678	0.9488	0.6423	3.1588
S8	1.1512	1.2208	2.4393	4.8112
S9	3.7294	1.0979	3.0722	7.8994
S10	4.4547	2.0287	1.7660	8.2494
S11	5.2191	1.7838	0.8805	7.8834

S12	3.1057	2.4256	1.3631	6.8944
S13	5.8245	3.0786	1.6194	10.5225
S14	1.6326	2.0332	3.6134	7.2793
S15	6.3510	1.7582	1.2439	9.3531
S16	7.2385	2.6330	2.8271	12.6986
S17	2.3543	2.3577	0.3645	5.0765
S18	6.1804	2.7213	2.0018	10.9036
S19	6.4462	1.2873	3.0043	10.7379
S20	6.4127	2.7728	3.9694	13.1550
S21	6.4948	1.3396	1.2582	9.0926
S22	3.9771	1.3631	0.2659	5.6061
S23	4.0126	1.2219	0.9885	6.2229
S24	1.7802	2.0695	0.7650	4.6147

#### 4. 结果

含量测定结果显示，不同产地青钱柳样品中 3 种黄酮类成分的各自含量及总含量相差很大：发现不同产地青钱柳样品各成分含量及总含量相差很大：异槲皮苷含量在 0.8452 ~10.4928 mg/g，槲皮苷：0.9390~3.0786 mg/g，阿福豆苷：0.2659 ~3.9694 mg/g，总含量：3.1588mg/g~14.9402 mg/g 之间，最高为广西桂林兴安县栽培样品，其次为江西铜鼓县栽培，最低为三江县栽培样品，总含量为 3.1588 mg/g。

#### 5. 结论

青钱柳的主要有效成分有黄酮类、多糖类、萜类化合物、有机酸类等。其药理作用主要是降血糖，降血脂和降血压。研究表明，不同产地、不同采收期及野生与栽培青钱柳药材主要化学成分种类及含量均存在一定差异。本研究含量测定结果表明：不同产地野生与栽培青钱柳样品中 3 种黄酮类成分的各自含量及总含量均值有所差异：异槲皮苷野生品平均含量：3.3689mg/g，栽培品平均含量：5.9094mg/g；

槲皮苷野生品平均含量：1.7378mg/g，栽培品：1.9604mg/g；阿福豆苷野生品平均含量：1.7348mg/g，栽培品平均含量：1.8972mg/g；野生品平均总含量：6.8415mg/g，栽培品：9.6795mg/g，其中，异槲皮苷含量相差较大，野生与栽培品含量平均值相差接近2倍，同时三个黄酮类成分的结果均显示为栽培品高于野生品。这一研究结果也与章发盛等<sup>[17]</sup>对野生树与人工种植青钱柳叶黄酮类物质含量的比较研究结果一致。同时，对不同产地的总含量进行分析发现，广西桂林和湖南产地的青钱柳总体上相对较高，而广西三江县，广西天峨县，安徽池州及贵州黔陶乡等产地的含量则相对较低，分析原因可能与该地的生长环境，海拔高度及经纬度等因素有关。以上结果表明青钱柳不同产地，种质及生长环境对青钱柳的黄酮类成分的积累存在一定的影响。

## 青钱柳指纹图谱研究

中药指纹图谱是一种基于中药中的有效成分的整体作用的概念下，全面且较为客观地表征出中药的化学成分的数量及含量的评价中药质量的有效手段，具有特征性、系统性、稳定性的特点。中药指纹图谱技术现如今已广泛应用于中药质量评价，对提高中药的质量控制水平具有积极作用。本章节通过对色谱柱、流动相、比例、检测波长、柱温、流速等进行考察，梯度洗脱，应用 HPLC 法优选出信息量大、分离度好、峰形好的色谱条件，选择青钱柳中稳定的有效成分作为参照峰，采用相似度评价系统来建立青钱柳指纹图谱的共有模式，并进行相似度评价，建立青钱柳 HPLC 化学指纹图谱。

### 1. 实验材料、仪器与试剂

#### 1.1 实验材料

见表 1，青钱柳粉末药材经干燥后粉碎，过 24 目筛备用。

#### 1.2 实验仪器

表 3-1 实验仪器表

仪器与型号	产家
e2695 高效液相色谱仪(2998 PDA 检测器)	美国 Waters 公司
SQP 型电子分析天平	赛多利斯科学仪器有限公司
DP5 系列超纯水仪	法国密里博公司
HH-2 数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
KQ-500DA 型数控超声清洗仪	昆山市超声仪器有限公司

### 1.3 试剂

异槲皮苷(批号:PS001042)、槲皮苷(批号:PS010791)、阿福豆苷(批号:PS01119)以上对照品购自成都普思生物科技股份有限公司。乙腈(色谱级, Fisher Chemical 公司)、甲醇(色谱级, Fisher Chemical 公司)、实验室自制超纯水、中药指纹图谱相似度评价系统、Agilent XDB-C18(5 $\mu$ m, 4.6x250mm)色谱柱(美国 Agilent 公司)。

## 2. 青钱柳指纹图谱液相色谱条件考察

分别对色谱柱, 流动相, 洗脱程序, 检测波长, 柱温及进样量进行考察, 确定了青钱柳指纹图谱液相色谱最佳的条件。结果如下。

### 2.1 供试品实验

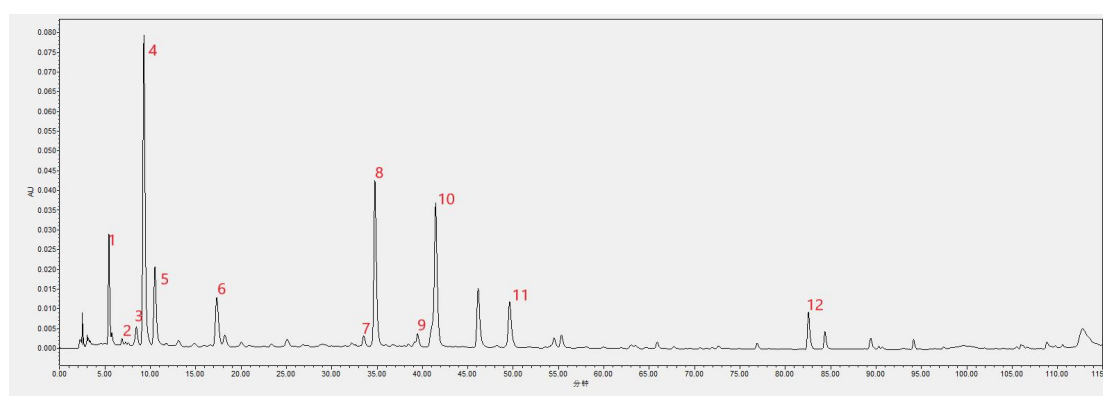


图 3-47 供试品图

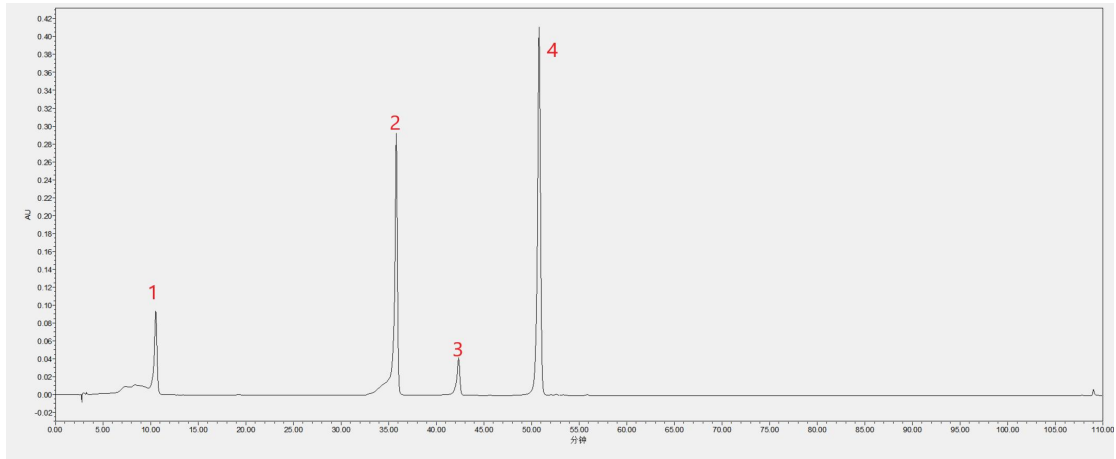


图 3-48 对照品图

### 3. 结果

#### 3.1 HPLC特征指纹图谱的生成

取 24 批次不同产地的青钱柳样品各约 1.0g，按“3.5”项下方法制备不同产地青钱柳的供试品溶液，用最终确定的色谱条件进样，记录各个色谱图。对实验结果所得的数据结果进行相关的处理和分析后，将所有数据导入到相关软件中，建立 24 批青钱柳的 HPLC 叠加色谱图。以 S-12 样品图谱(S12)作为参照图谱，设置时间窗宽度为 0.2，进行多点校正及 Mark 峰匹配，生成青钱柳样品的共有模式，并采用中位数法生成对照指纹图谱(SR)。24 批次不同产地青钱柳样品 HPLC 叠加色谱图见图 3-50，对照指纹图谱见图 3-51。

#### 3.2 相似度评价结果

表 3-13 不同产地青钱柳药材相似度计算结果

编号	样品信息	野生/栽培	相似度计算结果
1	桂林龙胜县三门镇	栽培	0.954
2	桂林兴安县	栽培	0.910
3	桂林资源县	栽培	0.994
4	桂林永福县	栽培	0.909
5	桂林全州	栽培	0.962

6	桂林平等乡	野生	0.909
7	河池天峨县	野生	0.940
8	来宾金秀大瑶山	野生	0.907
9	柳州三江县	栽培	0.995
10	湖南张家界	栽培	0.890
11	湖南益阳资阳区	栽培	0.983
12	湖南城步县	野生	0.943
13	湖南常德石门县	栽培	0.986
14	湖南常德石门县	野生	0.888
15	江西铜鼓县	栽培	0.970
16	江西铜鼓县	野生	0.939
17	江西上饶广信区	野生	0.985
18	江西上饶广信区	栽培	0.961
19	江西井冈山	野生	0.978
20	江西井冈山	栽培	0.951
21	湖北五峰县	栽培	0.931
22	安徽池州石台县	野生	0.967
23	安徽池州石台县	栽培	0.929
24	贵州黔陶乡	栽培	0.967

通过分析可知，24批不同产地的青钱柳相似度在0.888~0.995之间，基本上均在0.90以上，表明构建的青钱柳对照指纹图谱具有一定的代表性，不同产地，野生与栽培样品之间的主要化学成分具有一致性，测定的方法专属性比较好。其中发现，栽培样品的相似度总体上会比野生的高，表明不同产地，栽培样品之间的主要化学成分一致性比野生样品的高。其中，湖南常德县，湖南益阳县及广西三江县的相似度较高，表明该产地青钱柳药材的化学成分类型一致性较好，化学成分分布较稳定。

### 3.3 基于主成分分析建立

基于主成分分析结果可知，当产地的样品其综合得分越高，可以在一定程度上暗示该产地的样品其整体质量会越好。24批不同产地青钱柳的各个主成分的综合得分及相应的排名见下表4-17。由下表结果表明，产地S3、S18、S19的药材整体质量最好，其次到S4、S7、S8、S11、S15、S16，整体质量最差为S10、S17、S20、S21、S22、S23、S24。通过提取特征值>1的原则，选取前2个主成分的得分做成分得分图，见图3-54。结果表明，24批青钱柳样品大致归为3类，基本按照综合得分的高低进行分类，其中，成分综合得分较高及排名靠前的分为一类，得分较低和排名最后的分为一类，S12、S13单独聚为一类的原因是由于这两个产地为同一个产地的野生与栽培样品，综合得分和排名相差不大，因此将其聚为一类。

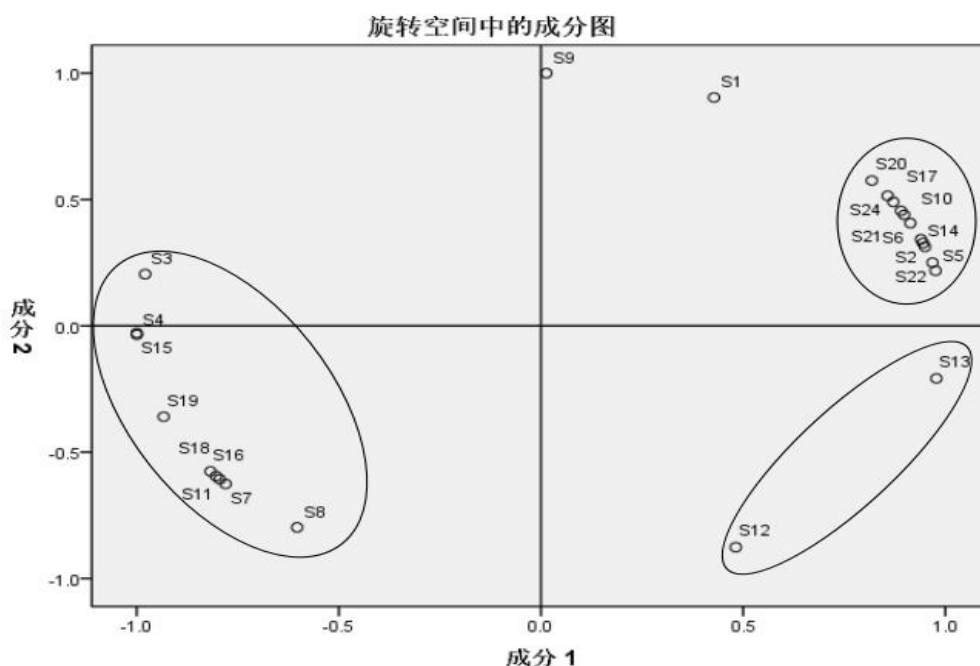


图 3-54 不同产地青钱柳成分得分图

表 4-17 不同产地青钱柳主成分得分、综合得分及排名

产地编号	F1 得分	F2 得分	F3 得分	综合得分	排名
1	-0.4267	0.1619	-0.1932	-0.6100	14
2	-0.1604	-0.0131	0.0158	-0.2101	12

3	0.9473	0.4664	-0.4165	1.3282	3
4	0.2613	0.0728	-0.0737	0.3468	11
5	-0.5001	-0.0999	0.0496	-0.7331	16
6	-0.3838	-0.0747	-0.0495	-0.6766	15
7	0.4784	-0.1233	-0.0030	0.4689	8
8	0.7731	-0.4551	0.0669	0.5125	7
9	0.0570	0.1849	0.0534	0.3932	9
10	-1.6160	0.0826	0.1454	-1.8486	23
11	0.9585	-0.3891	-0.1508	0.5576	6
12	-0.0873	-0.1205	-0.0520	-0.3461	13
13	-0.3591	-0.2337	-0.0001	-0.7897	17
14	0.0386	0.1119	0.1278	0.3707	10
15	0.5428	0.1809	-0.1069	0.8215	4
16	0.6319	-0.1055	-0.0038	0.6961	5
17	-0.6971	-0.0858	-0.1043	-1.1817	21
18	2.5797	-0.1729	0.2721	3.5679	2
19	2.4685	0.4522	0.1546	4.0958	1
20	-0.8534	0.0571	-0.0674	-1.1503	20
21	-1.3704	-0.0607	-0.0399	-1.9592	24
22	-0.7424	-0.1378	0.0547	-1.0995	19
23	-0.9833	-0.1583	-0.0157	-1.5413	22
24	-1.5572	0.4595	0.3369	-1.0132	18

根据 24 批不同产地青钱柳的主成分、综合得分及排名见表结果可知，产地 S3、S18、S19 的药材整体质量最好，其次到 S4、S7、S8、S11、S15、S16，整体质量最差为 S10、S17、S20、S21、S22、S23、S24。其中，成分综合得分较高及排名靠前的分为一类，得分较低和排名最后的分为一类，S12、S13 单独聚为一类的原因是由于这两个

产地为同一个产地的野生与栽培样品，综合得分和排名相差不大，因此将其聚为一类。其中，S1 和 S9 单独分为一类，与另外三类距离较远，可能是由于其均为野生样品的原因。按照综合得分的高低进行分类，其中，成分综合得分排名靠前的分为一类，得分排名最后的分为一类，S12、S13 单独聚为一类的原因可能是由于这两个产地为同一个产地的野生与栽培样品，综合得分和排名相差不大，因此将其聚为一类。

本研究建立了 HPLC 指纹图谱，结合化学计量学，从系统聚类 and 主成分分析等的角度对青钱柳的药材质量进行评价，为其质量控制提供了实验依据。从 HPLC 指纹图谱可知，青钱柳所含的化学成分较为丰富，标定了 12 个共有峰，通过对照品比对指认出了四个成分，均为黄酮类成分，表明青钱柳中黄酮类成分较丰富。

