

黔东南州产青钱柳黄酮类成分的含量测定研究

谭霖，杨鑫，龙滢，徐秋萍

(黔东南州食品药品检验检测中心，贵州 凯里 556000)

【摘要】建立高效液相色谱法测定青钱柳中树皮素、山奈素的含量，并测定黔东南州不同产地青钱柳中料皮素、山李素的含量。高效液相色谱法，色谱柱 Symmet15 C18 (5 μ m, 150 X 4.6mm, Waters)；流动相：甲醇-0.4 % 磷酸溶液 (50; 50)；检测波长：360 nm 柱温：30 $^{\circ}$ C；流速：1.0 mL $\cdot$ min⁻¹；进样量：10 μ L。经实验得知黔东南州不同产区的青钱柳中树皮素、山奈素含量存在一定的差异，树皮素的含量范围大概为 0.6632 - 0.814 7 mg / g；山奈素的含量范围大概为 0.5871 - 0.715 5 mg / g。

【关键词】青钱柳；料皮素；山奈素；高效液相色谱仪

【中图分类号】R284 . 1

【文献标识码】A

【文章编号】1003 — 6563 (2016) 04 — 0077 — 05

钱柳 [Cyclocar paliurus (Batal.) Iljinskaja] 又名青钱李、摇钱树等，双子叶植物纲 [Dicotyledneae] 胡桃科 [juglandaceae] 青钱柳属植物。广泛分布于江西、浙江、江苏、福建、台湾、湖北、四川、贵州等地的海拔 420 - 2500m 的山区、溪谷或石灰岩山地。青钱柳为落叶大乔木，高 10 - 30m，髓部薄片状；奇数羽状复叶，小叶 7 - 9 枚。革质椭圆形，上面有盾状腺体，下面网脉明显，边缘有细锯齿；树皮灰色，枝条黑褐色，具灰黄色皮孔；芽密被锈褐色盾状着生的腺体。雌雄同株，雄柔黄花序 2 - 4 条成一束集生在短总梗上，雌柔黄花序单独顶生。果序轴长 25 - 30 cm，上有一串串的果实，果实革质有水平圆盘状翅，顶端有 4 枚宿存花被片及花柱，似铜钱，具观赏价值。花期 4 - 5 月，果期 7 - 9 月。根系比较发达，主侧根多分布于 40 - 80cm 的土层中^[1]。长期以来，民间采其嫩叶制茶实用，该茶具有生津止渴、清热解暑、降压强心及延年益寿的作用，具有调节血脂，降低血糖，增强免疫等功能，抗氧化抗衰老的作用^[2]。研究表明：其中含有丰富的药用成分，如多糖、黄酮、酚类、植物蛋白（小肽）、皂苷、香豆精、生物碱、甾体、砧类、昔类、有机酸、胡萝卜素、维生素 E、咖啡因等和一些人体必需的微量元素。黄酮类成分为青钱柳中报道较多的一类化学成分，主要有懈皮素、异懈皮昔、山奈酚、山奈酚-7-O- α -L-鼠李糖、山奈酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖醛酸昔、皮素-3-氧- α -L-鼠李糖昔等^[3]。本实验通过建立 HPLC 法测定黔东南州不同产地青钱柳懈皮素、山奈素的含量，研究得出黔东南州地区产青钱柳懈皮素、山奈素的含量范围，为青钱柳的进一步研究提供了一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

仪器：Ultimate3000 (DGLC) Chromeleon HPLC 仪 (赛默飞科技 (中国) 有限公司)、色谱柱 Symmet C18 (5 μ m, 150X4.6 mm, Waters 公司生产)、EA-240 电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司)、KQ-500DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司；工作频率：40 kHz，功率：250w)、XMTD-240 数显式电热恒温水浴锅 (常州

收稿日期：2014 - 04 - 13；修回日期：2016 - 04 - 18

作者简介：谭霖，男，苗族，贵州省天柱县人，本科，就职于黔东南州食品药品检验检测中心，研究领域：中药学，研究方向：中药材质量。

市诺基仪器有限公司)、SHZ—D(m)循环水式真空泵(常州普天仪器制造有限公司)等。

试剂: 盐酸(分析纯)、甲醇(色谱纯、分析纯)、磷酸(分析纯); 水为娃哈哈纯净水。

对照品: 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 100081—200406)、山奈素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 110861—201209)。

供试品: 黔东南州剑河县产 2 批(剑河 1、剑河 2)、雷山县产 2 批(雷山 1、雷山 2)、施秉县产 2 批(施秉 1、施秉 2), 共 6 个批次。

1.2 试验方法

1.2.1 提取溶剂的考察

根据青钱柳槲皮素、山奈素的理化性质, 分别选取甲醇、25%盐酸溶液—甲醇(1:6)作为提取溶剂, 考察最佳提取溶剂。分别取本品粉末约 1.09 g(过 3 号筛)各平行 2 份共 4 份, 其余按 1.4 项进行测定, 每份平行进两针。平均含量结果见表 1。

表 1 不同提取溶剂的平均含量
Tab. 1 the average content of different extraction solvents

提取溶剂	槲皮素平均 含量/(mg/g)	山奈素平均 含量/(mg/g)
25%盐酸溶液—甲醇(1:6)	0.668 3	0.599 5
甲醇	0.597 7	0.496 5

通过表 1 结果表明用甲醇提取槲皮素、山奈素的平均含量最高且溶剂方便直接取用不需要配制。故选择 25%盐酸溶液—甲醇(1:6)作为提取溶剂。

1.2.2 提取时间的考察

分别取本品粉末约 1.09 g(过 3 号筛)各平行 2 份共 6 份, 精密称定, 并加 25%盐酸溶液, 甲醇(1:6)的混合溶液 40 mL, 分别置于 80℃水浴加热回流 20 min、30 min、40 min, 取出, 并都迅速冷却至室温; 转移至 50 mL 量瓶中, 用甲醇 5 mL 洗涤回流瓶, 洗液并入同一量瓶中并加入甲醇稀释至刻度; 摇匀; 滤过; 取续滤液; 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。其余按 1.4 项进行测定, 每份平行进两针。平均含量结果见表 2。

表 2 不同提取时间的平均含量
Tab. 2 The average content of different extraction time

不同回流 时间/min	槲皮素平均 含量/(mg/g)	山奈素平均 含量/(mg/g)
20	0.426 8	0.388 5
30	0.668 3	0.599 5
40	0.670 2	0.601 1

上述结果表明,随着回流时间的增加,槲皮素、山奈素的提取量也逐渐增加,但是 80 ℃ 水浴回流 30 min 和 40 min 的含量差异不大,所以选择 80 ℃ 水浴回流 30 min。

1.3 色谱条件的优化

1.3.1 流动相的优化

根据资料显示,槲皮素、山奈素的 HPLC 含量测定的流动相一般有:甲醇-0.4 %磷酸溶液(60:40);甲醇-0.4 %磷酸溶液(50:50);甲醇-0.4 %磷酸溶液(43:57)。经过研究者在自身拥有的条件下研究摸索:流动相为甲醇-0.4 %磷酸溶液(60:40)时槲皮素、山奈素目标峰的保留时间过短,出峰时间过早,均在 10 min 以内;流动相为甲醇-0.4 %磷酸溶液(43:57)时槲皮素、山奈素目标峰的保留时间又太过于长,出峰时间太晚在 20 min 之后了。故选择尝试做流动相为甲醇-0.4 %磷酸溶液(50:50),其余按 1.4 项进行测定(图 1)。

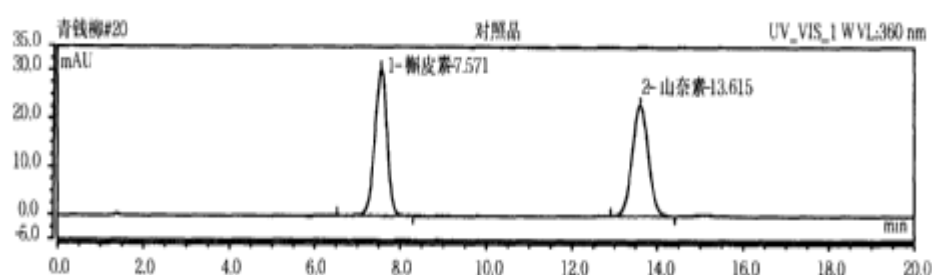


图 1 流动相为甲醇-0.4 %磷酸溶液(50:50)

Fig. 1 mobile phase of methanol to 0.4 % phosphoric acid solution(50:50)

由色谱图得出:槲皮素、山奈素目标峰的保留时间适中,出峰时间在 15 min 以内,分离效果好。故选择流动相为甲醇-0.4 %磷酸溶液(50:50)为最佳流动相。

为了检测前后峰的名称,故选择按“1.4 色谱条件”进样 10 μL,对槲皮素对照品进行定位,见图 2。

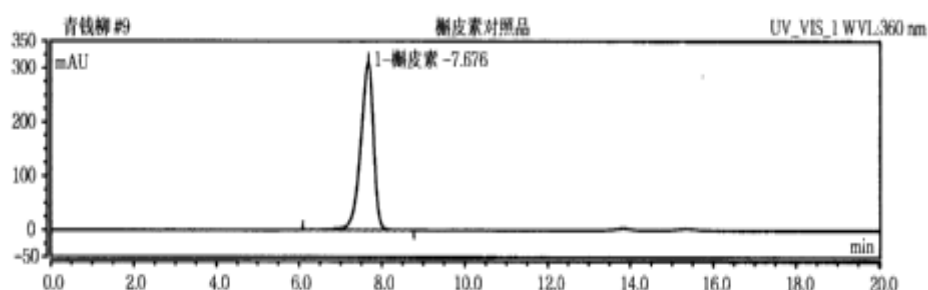


图 2 槲皮素定位图

Fig. 2 quercetin location map

由色谱图可以得出第一个峰为槲皮素，第二个峰为山奈素。

1.3.2 检测波长的确定

根据查阅资料文献显示，槲皮素、山奈素在 360 nm 处有最大吸收，故确定检测波长为 360nm^[4]。

1.4 色谱条件及溶液制备

1.4.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇—0.4%磷酸溶液（50：50）为流动相；流速 1.0 mL · min⁻¹；检测波长为 360 nm；柱温 30℃；理论板数按槲皮素、山奈素峰计算应不低于 2500。

1.4.2 对照品溶液的制备

取干燥至恒重的槲皮素对照品 0.010 019（97.3%）、山奈素 0.010 229（93.2%），分别于 25 mL 量瓶中定容至刻度，摇匀，得 0.389 6 mg / mL 的原槲皮素对照品溶液、0.38 1 0 mg / mL 原山奈素对照品溶液。再分别取 1.0 mL 的原槲皮素对照品溶液及原山奈素对照品溶液，于同一 25 mL 的量瓶中定容至刻度，摇匀，得到含槲皮素 58.4 μg / mL 及含山奈素 15.24 μg / mL 的混合对照品溶液。

1.4.3 供试品溶液的制备

取本品粉末约 1.09（过 3 号筛），精密称定，加 25%盐酸溶液—甲醇（1：6）的混合溶液 40 mL，置于 80℃水浴上加热回流 30 min，取出，迅速冷却至室温；转移至 50 mL 量瓶中，用甲醇 5 mL 洗涤回流瓶，洗液并入同一量瓶中并加入甲醇稀释至刻度；摇匀；滤过；取续滤液；过 0.45 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

1.4.4 测定法

分别精密吸取上述对照品溶液及供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，测定峰面积，计算槲皮素、山奈素的含量。

2 分析方法验证

2.1 线性关系考察精密吸取混合对照品溶液 2 μL、4 μL、6 μL、8 μL、10 μL、12 μL，按 1.4 项色谱条件进行测定，每份平行进两针。注入液相色谱仪，记录色谱图，并以混合对照品进样质量（μg）为横坐标，峰面积为纵坐标进行线性回归计算。槲皮素线性回归方程为： $y = 63.226x + 0.00527$ ，相关系数 $r = 0.99986$ ；线性关系考察结果、标准曲线见图 3。山奈素线性回归方程为： $y = 66.168x - 0.02883$ ，相关系数： $r = 0.99994$ ；线性关系考察结果、标准曲线见图 4。

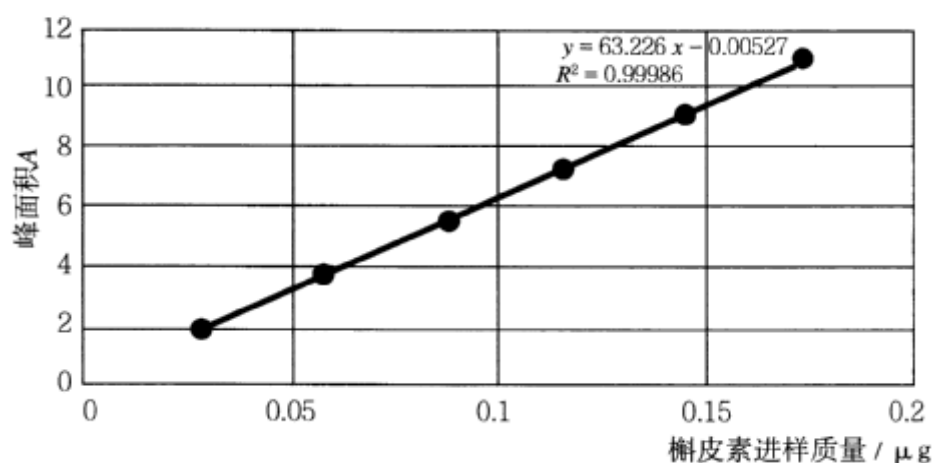


图 3 槲皮素标准曲线

Fig. 3 quercetin standard curve

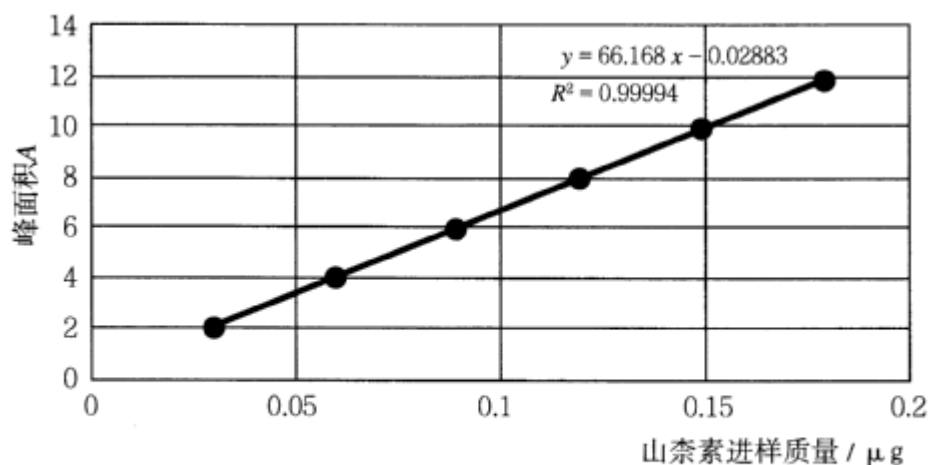


图 4 山柰素标准曲线

Fig. 4 kaempferia galanga standard curve

由上述测定结果表明槲皮素进样量在 $0.0289 - 0.1734 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系；山柰素进样量在 $0.0299 - 0.1794 \mu\text{g}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2 精密度试验

取混合对照品溶液，按 1.4 项色谱条件进行测定，重复进样 6 次，测定峰面积，以峰面积计算 RSD (%)。样品色谱图及测定结果分别见图 5 及表 3。

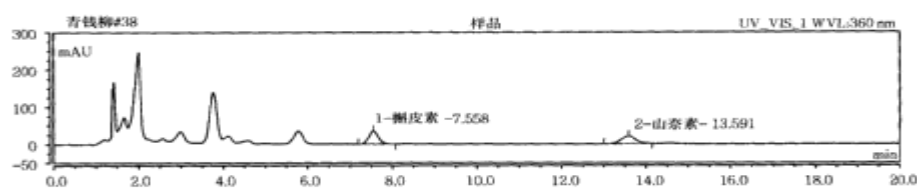


图 5 青钱柳样品色谱图

Fig. 5 samples of cyclocarya paliurus chromatograms

由色谱图可看出样品中含有山奈素和槲皮素。

表 3 精密度试验

Tab. 3 precision test

次 数	1	2	3	4	5	6	RSD / %
槲皮素峰 面积	10.015 9	10.031 0	9.928 9	10.001 4	9.926 7	9.809 2	0.83
山奈素峰 面积	10.003 5	9.874 4	9.723 8	9.692 8	9.668 4	9.476 2	1.9

从表中可看出槲皮素和山奈素的精密度（RSD）均小于 2.0%，结果表明，本方法精密度好。

2.3 重复性实验

精密称取剑河地区青钱柳（剑河 1）粉末（过 3 号筛），平行制备 6 份，按 1.4 项色谱条件进行测定，RSD 以平均含量计算，槲皮素 RSD= 1.1%，山奈素 RSD= 0.58%。测定结果见表 4。

表 4 重复性实验

Tab. 4 repetitive experiments

样品 序号	取样量 / g	槲皮素 峰面积	山奈素峰 面积	槲皮素峰 面积的 RSD / %	山奈素峰 面积的 RSD / %
1	1.001 1	9.217 8	7.321 2	1.1	0.58
2	1.000 0	9.078 7	7.362 3		
3	1.000 7	9.049	7.392 6		
4	1.000 1	9.053 5	7.385 5		
5	1.000 6	9.144 3	7.403 1		
6	1.000 5	9.307 0	7.446 7		

由表 4 可知该方法的重现性良好。

2.4 稳定性试验

取重复性实验中的第一份供试液于 0、4h、8h、12h、16h、24h 时间点，按 1.4 项色谱条件测定槲皮素、山奈素峰面积，进行 RSD 以平均含量计算。槲皮素平均峰面积值为 9.1942，RSD 为 1.3%；山奈素平均峰面积值为 7.4724，RSD 为 1.3%。结果见表 5。

表 5 稳定性试验
Tab. 5 stability test

样品 序号	时间点 / h	槲皮素 峰面积	山奈素 峰面积	槲皮素峰 面积 RSD / %	山奈素峰 面积 RSD / %
1	0	9.146 4	7.525 5		
2	4	9.307 3	7.467 0		
3	8	9.306 7	7.426 5	1.3	
4	12	9.284 0	7.645 1		
5	16	9.046 6	7.387 7		1.3
6	24	9.074 0	7.382 5		

由上述测定结果表明，供试品溶液在 24h 内比较稳定。

3 不同产地样品的测定

精密称取黔东南州 3 个不同产地的 6 批青钱柳样品约 1.0g（过 3 号筛），按 1.4 项色谱条件进行测定。色谱叠加图及测定结果分别见图 6 和表 6。

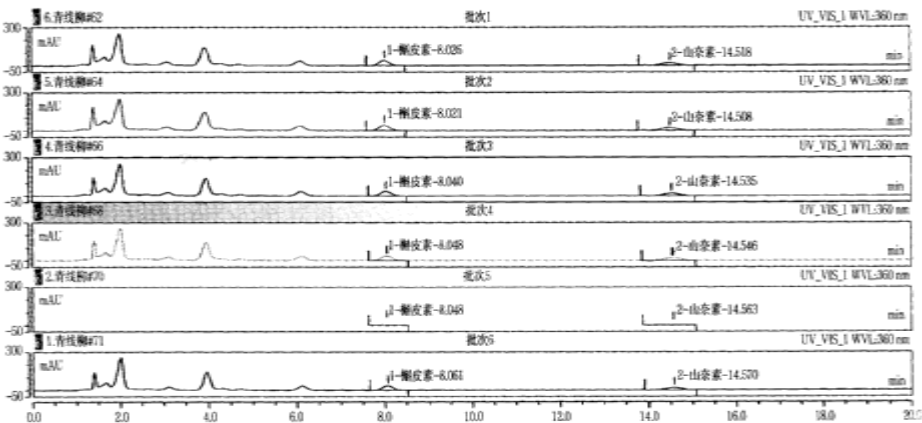


图 6 六种不同批次样品色谱叠加图
Fig. 6 six different batches sample chromatographic overlay chart

表 6 样品测定结果

Tab. 6 samples determination results

样品批号	称样量/ g	槲皮素含量 / (mg / g)	山柰素含量 / (mg / g)
剑河 1	1.000 4	0.663 2	0.587 1
剑河 2	1.000 8	0.668 2	0.583 1
雷山 1	1.000 3	0.734 6	0.641 5
雷山 2	1.000 9	0.724 1	0.639 3
施秉 1	1.000 4	0.814 7	0.715 5
施秉 2	1.001 3	0.809 6	0.704 9

4 结果与讨论

通过对黔东南州 3 个不同产地 6 个不同批次的青钱柳中槲皮素、山柰素进行含量测定；结果表明，黔东南州地区青钱柳中槲皮素的含量范围大概为 $0.663\ 2\ \text{mg} / \text{g} - 0.814\ 7\ \text{mg} / \text{g}$ ；山柰素的含量范围大概为 $0.587\ 1\ \text{mg} / \text{g} - 0.715\ 5\ \text{mg} / \text{g}$ 。其中，同一产地的不同批次的青钱柳中槲皮素、山柰素含量均有细小的差异，不同产地间青钱柳中槲皮素、山柰素含量存在着较为明显的差异。因此为保证质量应注意产地和批次。本次没有对样品的生长环境、干燥方法和具体采收时间进行考察，这几个因素对样品的质量有一定的影响。

参考文献：

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志： 21 卷 [M]. 北京：科学出版社， 1979 .
- [2] 上官新晨，陈锦屏，吴少福，等. 青钱柳提取物对家兔实验性糖尿病模型降血糖作用的研究 [J] . 西北农林科技大学学报（自然科学版） ， 2003 ， 31 （ 6 ）： 117 — 120 .
- [3] 舒任庚. 青钱柳植物化学成分研究简报 [J] . 江西中医学院学报， 1996 ， 8 （ 2 ）： 34 .
- [4] 李俊，陆圆圆，许子竞，等. 青钱柳中黄酮成分的研究 [J] . 广西师范大学学报， 2005 ， 25 （ 12 ）： 1 055 — 1059 .
- [5] 朱贵峰，贺肇东，王正峰，陈玲. 不同产地青钱柳的总黄酮含量比较 [J]. 海峡药学， 2004 ， 16 （ 3 ）： 58 — 59 .
- [6] 李磊，赵丽，谢明勇，等. 青钱柳多糖组分生物活性及元素化学形态分析 [J]. 厦门大学学报（自然科学版） ， 2003 ， 42 （ 1 ）： 73 — 77 .
- [7] 易醒，谢明勇，王远兴. 反相高效液相色谱法测定青钱柳中黄酮化学物含量 [J] . 南昌大学学报（理科版） ， 2002 ， 25 （ 2 ）： 161 — 164 .

[8] 冷任轩. 青钱柳的基础理论研究和临床观察[J]. 江西中医药, 1994, 25 (2) : 64 .

[9] 张晓蓉, 廖循, 丁立生. 青钱柳的化学成分[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7 (1) : 90 — 9 1 .