

## · 基础研究 ·

青钱柳叶质量控制方法研究<sup>△</sup>

毛菊华, 余华丽\*, 陈张金, 范蕾, 吴查青

丽水市质量检验检测研究院, 浙江 丽水 323000

**[摘要]** 目的: 建立青钱柳叶的质量控制方法。方法: 运用显微鉴别法、薄层色谱法、超高效液相色谱法分别对青钱柳叶的显微特征、指标性成分(槲皮素、山柰酚、绿原酸、异槲皮苷和槲皮苷)进行定性鉴别和定量测定。结果: 各批次样品显微特征及薄层色谱特征明显, 青钱柳叶中绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷质量分数分别为0.05%~1.79%、0.30%~1.00%、0.11%~0.74%。结论: 建立的质量控制方法简便、准确、重复性好, 可为该药材的质量标准建立提供参考。

**[关键词]** 青钱柳叶; 质量控制; 薄层色谱; 超高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)03-0453-04

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20200407002

## Study on Quality Control of Cyclocaryae Folium

MAO Ju-hua, YU Hua-li\*, CHEN Zhang-jin, FAN Lei, WU Cha-qing

Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, Lishui 323000, China

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for quality control of Cyclocaryae Folium. **Methods:** With the methods of microscopical identification, thin-layer chromatography (TLC) and ultra performance liquid chromatography (UPLC) to identify or determine its microscopic characteristics and index ingredients (quercetin, kaempferol, chlorogenic acid, isoquercitrin and quercitrin). **Results:** The characteristics of microscopic identification and TLC of Cyclocaryae Folium were obviously; the content of chlorogenic acid, isoquercitrin, quercitrin were in the range of 0.05%-1.79%, 0.30%-1.00%, 0.11%-0.74%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and reproducible, which can provide theoretical basis for setting the quality standard of Cyclocaryae Folium.

**[Keywords]** Cyclocaryae Folium; quality control; TLC; UPLC

青钱柳叶为我国特有的药食同源珍稀植物胡桃科落叶乔木青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinsk. 的干燥叶, 民间常作茶叶饮用, 因其味甘甜, 而有“甜茶”“神茶”之称。现代药理研究表明, 青钱柳叶具有降血糖、调血脂、降血压、抗氧化及防治心脑血管疾病等多种作用, 其中降血糖作用尤为突出。青钱柳叶的主要活性成分为黄酮、三萜、有机酸及多糖等类化合物<sup>[1-6]</sup>。目前, 民间对青钱柳叶的采收加工并无明确的指导标准, 每年4—10月均有采集, 故有必要对其药效物质基础进行动态监测, 优选最佳采收期。本研究采用显微鉴别法、薄层色谱法(TLC)、超高效液相色谱法(UPLC)分别对青钱柳叶

的显微特征、指标性成分(槲皮素、山柰酚、绿原酸、异槲皮苷和槲皮苷)进行定性鉴别和定量测定, 优选最佳采收期, 建立质量控制方法, 以期对青钱柳叶质量标准的制定提供参考。

## 1 材料

## 1.1 仪器

H-class 型超高效液相色谱仪(美国沃特世公司); XS105DU 型电子天平(瑞士梅特勒公司); DL-360D 型智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司); DM2500 型正置显微镜(德国徕卡公司); 硅胶 G 薄层色谱板(10 cm × 20 cm, 青岛海洋化工有限公司)。

<sup>△</sup> [基金项目] 丽水市科技项目(2017GYX47)

\* [通信作者] 余华丽, 副主任中药师, 研究方向: 中药与民族药质量研究; Tel: (0578)2185211, E-mail: 516739410@qq.com

## 1.2 试药

对照品山柰酚(批号: 110861-201611, 纯度: 93.2%)、槲皮素(批号: 100081-201408, 纯度: 99.1%)、绿原酸(批号: 110753-201817, 纯度: 98.0%)、异槲皮苷(批号: 111809-201804, 纯度: 90.5%)和槲皮苷(批号: 11538-201105, 纯度: 98.0%)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯; 水为超纯水。

青钱柳药材均为自行采集, 经丽水市质量检验检测研究院余华丽副主任中药师鉴定, 为胡桃科植物青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinsk. 的干燥叶(表1)。

表1 青钱柳叶样品信息

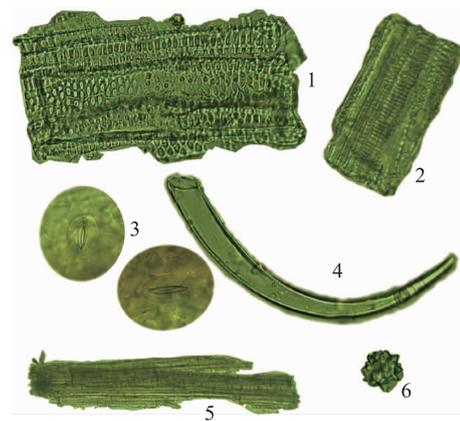
编号	采集地	批号	水分/%
1	青田县谷甫村	20180426	8.4
2	青田县谷甫村	20180523	8.7
3	青田县谷甫村	20180630	7.9
4	青田县谷甫村	20180730	9.0
5	青田县谷甫村	20180830	10.5
6	青田县谷甫村	20180930	9.1
7	青田县谷甫村	20181024	9.8
8	景宁县敕木山	20180628	8.1
9	缙云县石菟村	20180608	8.0
10	青田县尖山村	20180611	7.9
11	莲都区小岭根村	20180614	7.5
12	松阳县紫草村	20180627	8.4

注: 水分采用烘干法测得。

## 2 方法与结果

### 2.1 显微鉴别

青钱柳叶粉末为黄绿色至绿褐色, 非腺毛单细胞, 多碎断、弯曲, 完整者长 60 ~ 130  $\mu\text{m}$ , 直径 10 ~ 20  $\mu\text{m}$ ; 草酸钙簇晶较多, 单个散在或存在于薄壁细胞中, 直径 15 ~ 30  $\mu\text{m}$ , 棱角锐尖; 上表皮细胞不规则, 壁微波状弯曲。下表皮细胞多角形, 壁波状弯曲, 气孔椭圆形, 周围有辐射状纹理, 无副卫细胞; 腺鳞头部由 8 个细胞组成, 直径约 80  $\mu\text{m}$ , 柄短, 由 2 ~ 3 个细胞组成; 网纹导管和具缘纹孔导管直径约 50  $\mu\text{m}$ ; 纤维成束, 细长, 直径 6 ~ 12  $\mu\text{m}$ , 纹孔稀疏, 见图 1。



注: 1. 具缘纹孔导管; 2. 网纹导管; 3. 气孔; 4. 非腺毛; 5. 纤维; 6. 草酸钙簇晶。

图1 青钱柳叶粉末显微特征

### 2.2 TLC 鉴别

取本品粉末 1 g, 加 25% 盐酸溶液-甲醇(1:4) 50 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加入乙酸乙酯 20 mL 使溶解, 滤过, 乙酸乙酯液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。另取槲皮素、山柰酚对照品, 加甲醇制成质量浓度为 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液。吸取上述 2 种溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(7:6:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝乙醇溶液, 105  $^{\circ}\text{C}$  加热 2 min, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。结果见图 2 [比移值(Rf)为 0.6 ~ 0.7]。



注: S. 混合对照品; 1~6. 供试品。

图2 青钱柳叶样品及混合对照品薄层色谱图

### 2.3 UPLC 测定绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷的含量

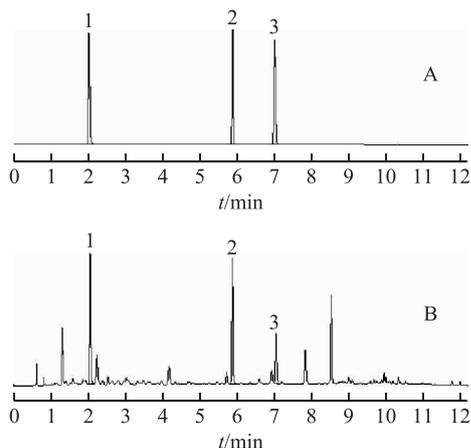
**2.3.1 色谱条件** 色谱柱: ACQUITY UPLC@HSS T3(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 磷酸水(B), 梯度洗脱(0 ~ 2.5 min, 12% ~ 13% A; 2.5 ~ 3.5 min, 13% ~ 18% A; 3.5 ~ 4.5 min, 18% ~ 20% A; 4.5 ~ 6.2 min, 20% ~ 21% A; 6.2 ~ 7.8 min, 21% ~ 28% A; 7.8 ~ 12 min, 28% ~ 50% A; 12 ~ 13 min, 50% ~ 70% A; 13 ~ 15 min, 70% ~ 90% A; 15 ~ 16 min, 90% A); 流速: 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 40 °C; 样品温度: 15 °C; 检测波长: 330 nm; 进样量: 1 μL。

#### 2.3.2 溶液的制备

**2.3.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷对照品适量, 置同一量瓶中, 用甲醇稀释成绿原酸质量浓度为 449.00 μg·mL<sup>-1</sup>、异槲皮苷质量浓度为 330.80 μg·mL<sup>-1</sup>、槲皮苷质量浓度为 168.24 μg·mL<sup>-1</sup>的溶液, 作为混合对照品溶液。

**2.3.2.2 供试品溶液的制备** 取药材粉末(过三号筛)约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇水 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.3.3 系统适用性试验** 取上述 2 种溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 3。结果显示, 在该色谱条件下, 绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷与其他成分分离度均大于 1.5, 理论板数均大于 5000。



注: A. 混合对照品; B. 青钱柳叶供试品; 1. 绿原酸; 2. 异槲皮苷; 3. 槲皮苷。

图 3 青钱柳叶样品及混合对照品 UPLC 图

**2.3.4 线性关系考察** 将 2.3.2.1 项下混合对照品

溶液用甲醇稀释制成系列质量浓度的对照品溶液, 分别进样测定, 以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归。结果表明, 绿原酸在 22.45 ~ 449.00 μg·mL<sup>-1</sup>呈良好的线性关系,  $Y = 4.913 16X - 1 686.237 69$  ( $r = 0.999 9$ ); 异槲皮苷在 16.54 ~ 330.80 μg·mL<sup>-1</sup>呈良好的线性关系,  $Y = 400 651X - 3 954.259 97$  ( $r = 0.999 9$ ); 槲皮苷在 8.41 ~ 168.24 μg·mL<sup>-1</sup>呈良好的线性关系,  $Y = 4.155 40X - 2 572.015 79$  ( $r = 0.999 9$ )。

**2.3.5 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.37%、1.18%、1.58%, 结果显示仪器精密度良好。

**2.3.6 重复性试验** 精密称取同一批供试品(编号: 3), 平行取样 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 按干燥品计, 绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷质量分数分别为 0.53%、0.55%、0.74%, RSD 分别为 1.50%、1.35%、1.43%, 表明方法重复性良好。

**2.3.7 稳定性试验** 取 2.3.6 项下供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样测定, 结果绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.75%、1.53%、1.36%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

**2.3.8 加样回收率试验** 取已知含量的样品(编号: 3)6 份, 各 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入绿原酸对照品溶液(512.02 μg·mL<sup>-1</sup>)、异槲皮苷对照品溶液(536.4 μg·mL<sup>-1</sup>)、槲皮苷对照品溶液(708.12 μg·mL<sup>-1</sup>)各 5 mL, 另精密加入 70% 甲醇水 45 mL, 按 2.3.2.2 项下方法制备回收率试液, 进样测定, 并计算回收率, 结果见表 2。

**2.3.9 样品含量测定** 取表 1 中 12 批供试品, 照 2.3.2.2 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱峰, 并按干燥品计, 计算青钱柳叶中绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷的含量, 结果见表 3。

## 3 讨论

### 3.1 含量测定方法考察

提取方法考察了超声处理法及加热回流提取法, 提取溶剂考察了 50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇等。结果显示, 70% 甲醇超声处理 60 min, 样品中 3 种成分的提取率最高; 经二极管阵列检测器(DAD)扫描, 绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷在 330 nm 处紫外吸收均较高, 可作为检测波长; 本研究采用 UPLC 进行检测, 可缩短出峰时间, 达到快速检测的效果。

表2 青钱柳叶中3个成分加样回收率试验结果

成分	称样量/g	样品中含量/mg	对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	0.512 3	2.519 6	2.560 1	5.020 4	97.69	98.05	1.17
	0.503 8	2.477 8	2.560 1	5.030 8	99.72		
	0.505 1	2.484 2	2.560 1	5.011 2	98.71		
	0.520 7	2.560 9	2.560 1	5.023 5	96.19		
	0.516 5	2.540 2	2.560 1	5.052 3	98.12		
	0.502 4	2.470 9	2.560 1	4.976 7	97.88		
异槲皮苷	0.512 3	2.604 5	2.682 0	5.253 4	98.77	98.40	1.25
	0.503 8	2.561 3	2.682 0	5.156 7	96.77		
	0.505 1	2.567 9	2.682 0	5.243 4	99.76		
	0.520 7	2.647 2	2.682 0	5.257 1	97.31		
	0.516 5	2.625 8	2.682 0	5.254 3	98.00		
	0.502 4	2.554 2	2.682 0	5.230 1	99.77		
槲皮苷	0.512 3	3.501 0	3.540 6	6.922 4	96.63	96.63	1.22
	0.503 8	3.442 9	3.540 6	6.923 5	98.31		
	0.505 1	3.451 8	3.540 6	6.926 7	98.15		
	0.520 7	3.558 4	3.540 6	6.963 4	96.17		
	0.516 5	3.529 7	3.540 6	6.932 1	96.10		
	0.502 4	3.433 3	3.540 6	6.935 2	98.91		

表3 青钱柳叶中绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷质量分数(n=2)

编号	质量分数			%
	绿原酸	异槲皮苷	槲皮苷	
1	1.788	0.453	0.640	
2	0.438	0.561	0.209	
3	0.634	0.552	0.742	
4	0.808	0.671	0.276	
5	0.300	0.543	0.316	
6	0.376	0.326	0.328	
7	0.265	0.366	0.297	
8	0.430	0.529	0.280	
9	0.673	1.001	0.218	
10	0.625	0.776	0.472	
11	0.526	0.474	0.347	
12	0.559	0.403	0.506	

### 3.2 青钱柳干燥方法考察

考察了同一批青钱柳叶(编号:5)不同加工方法干燥品的含量。结果表明,干燥温度对各成分含量影响不大;用加热杀青后再烘干法干燥,绿原酸含量相对增加,黄酮类成分相对减少;阴干和晒干方法的干燥品各含量相近,晒干品黄酮类成分含量最高。鉴于晒干或阴干的干燥方法简单,且青钱柳有效成分以黄酮类物质为主<sup>[5-6]</sup>,故干燥方法建议采用晒干或阴干。

### 3.3 采收期对成分含量的影响

由表3可见,4—10月于青田同一地点采集的青钱柳叶中绿原酸的含量以4月份最高,槲皮苷和异

槲皮苷的含量总和以6月份最高,考虑到叶类药材6月份产量最高,且6月份采集的青钱柳叶泡茶口感较好、涩味少,故建议以6月份为采收期;不同采集地间,各成分的含量有一定的差异,可能与气候及树龄等有关。

本研究建立的青钱柳叶显微鉴别方法特征性强,TLC鉴别各斑点清晰、分离良好,UPLC含量测定简便快速、准确度高,均可作为青钱柳叶的质量控制方法。若要建立各指标成分的限度范围,还需进一步增大样本量进行分析。

### 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[M]. 北京:科学出版社,1979:18-19.
- [2] 陈淑慧,纵伟. 基于文献计量学的青钱柳研究进展[J]. 安徽农学通报,2019,25(24):34-35.
- [3] 谢雪姣,刘国华,武青庭,等. 青钱柳主要化学成分研究进展[J]. 江西中医药,2017,48(12):78-80.
- [4] 温晓梨,蔡芳燕. 青钱柳药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药,2017,13(20):88-90.
- [5] 唐梅,赵立春,扈芷怡,等. 青钱柳化学成分及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2017,44(9):851-859.
- [6] 邹荣灿,吴少锦,焦思棋,等. 青钱柳主要功能性成分含量变异研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(8):1782-1785.