

青钱柳叶片中活性成分含量的年动态变化

柏明娥¹, 王丽玲¹, 王衍彬¹, 刘本同¹, 徐高福², 秦玉川¹

(1. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023; 2. 浙江省淳安县新安江开发总公司, 浙江 淳安 311700)

摘要:以人工栽培的5年生青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 为研究对象, 通过对4-9月不同月份采集的青钱柳叶片中黄酮、多糖、三萜及黄酮类化合物的含量测定, 分析叶片中主要活性成分的累积变化规律。结果表明: 青钱柳叶片中黄酮含量最高为5月份达4.28%, 最低的为6月份为3.16%, 5月份黄酮含量与6、7月间存在极显著差异 ($P<0.01$), 与4、8月间存在显著差异 ($P<0.05$), 而与9月间无显著差异; 青钱柳叶片中多糖含量以嫩叶期的4月份为最高, 且与其它月份间存在极显著差异 ($P<0.01$), 随着季节变化总体表现出先下降再缓慢上升的变化规律; 青钱柳叶片中的总皂甙含量4-9月一直呈现上升趋势, 至9月含量最高达16.47%; 叶片中的黄酮类化合物异槲皮甙含量远高于槲皮素和山奈酚含量, 6个采样期的平均值占总黄酮平均值的14.23%, 且与总黄酮表现出相似的变化规律。从青钱柳叶片中主要活性成分的动态变化来看, 以黄酮和多糖含量为指标的采收季节应以4、5月为佳, 而以皂甙含量为指标的采收季节应以9月为佳。

关键词: 青钱柳; 叶片; 活性成分; 动态变化

中图分类号: S792.99 文献标识码: A 文章编号: 1001-3776(2018)05-0021-06

Dynamic Change of Active Components in Leaves of *Cyclocarya paliurus*

BAI Ming-e¹, WANG Li-ling¹, WANG Yan-bin¹, LIU Ben-tong¹, XU Gao-fu², QIN Yu-chuan¹

(1. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China; 2. Chun'an Xin'anjiang Development Corporation of Zhejiang, Chun'an 311700, China)

Abstract: Collection of 5-year *Cyclocarya paliurus* leaves were conducted from April to September of 2017 at cultivation base of artificial *C. paliurus* forest in Quzhou of Zhejiang province. Determination and analysis was made on total flavonoids, polysaccharides, triterpenoids and flavonoid compounds in leaves. The results showed that the highest content of total flavonoids was 4.28% in May, and the lowest was 3.16% in June. There was extremely significant differences of flavonoid content in May with that in June and July, significant differences with that in April and August. The content of polysaccharides in leaves was the highest in April, and there was significant difference with in the other months. Total saponins content had trend of increase in leaves from April to September, 16.47%, the highest in September. The content of isoquercetin was much higher than that of quercetin and kaempferol in leaves, the mean of 6 months samples occupied 14.23% of total flavonoids and showed a similar dynamic change of total flavonoids. According to the dynamic changes of main active constituents, the best period for leaf collection was in April and May for much content of flavonoids and polysaccharides, while in September for saponins.

Key words: *Cyclocarya paliurus*; leaf; active constituents; dynamic change

收稿日期: 2018-06-04; 修回日期: 2018-08-22

基金项目: 浙江省省属科研院所扶持专项“叶用青钱柳定向培育技术与产品开发”(2017F30019)

作者简介: 柏明娥, 研究员, 从事资源植物开发; E-mail: baiming66@163.com。

青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 系胡桃科 Juglandaceae 青钱柳属 *Cyclocarya* 高大乔木,是冰川世纪幸存下来的珍贵树种,为我国特有,广泛分布于江西、浙江、安徽、福建、湖北、四川、贵州、湖南、广西等地^[1]。民间用青钱柳叶制茶饮具有悠久的历史,其汤泽金黄、味甜,故被称为“甜茶”^[2]。现代医学研究表明青钱柳叶中含有多糖、黄酮、三萜皂甙、香豆精、生物碱、有机酸等天然药用成分和人体必需的微量元素等^[3-6],具有降血糖、降血压、降血脂、抗氧化、抗肿瘤和增强机体免疫功能等作用^[7-11],特别是在糖尿病防治方面功效显著,被医学界称之为“天然胰岛素”^[12]。国家卫生和计划生育委员会 2013 年第 4 号公告已正式将青钱柳叶列入新食品原料。

青钱柳作为一种具有广阔发展前景的树种已引起了极大的关注,对它的研究也在不断深入。为解决青钱柳天然资源的不足,不少地方进行规模化人工栽培。因此开展青钱柳叶片中活性成分含量的动态变化研究对指导青钱柳的资源培育和产品开发具有重要意义。已有文献报导不同产地青钱柳中主要活性成分的含量测定及其累积变化规律^[13-15],但研究较多的是以自然分布的天然资源。然而,以人工栽培的青钱柳资源为研究对象且同时进行多糖、黄酮及三萜类成分的含量变化的研究相对较少。本试验以人工栽培的 5 年生青钱柳为研究对象,通过对不同月份采集的叶片中黄酮、多糖、三萜及黄酮类化合物的含量测定,分析叶片中主要活性成分的累积变化规律,为青钱柳资源的定向培育及进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器设备

试验地青钱柳人工栽培基地位于浙江省衢州市上方镇上龙村,28°20'49" N, 119°04'53" E,海拔 417 m。2014 年 2 月采购 2 年生青钱柳实生苗进行移栽,种苗来自江西修水,种植时采用截干法,截干高度为 0.5 ~ 0.8 m,种植密度为株间距 2 m,行间距 4 m,种植面积 13.33 hm²。于 2017 年选取生长相对较为一致的 3 株青钱柳苗作为固定取样植株,分别于 4 月 26 日、5 月 26 日、6 月 26 日、7 月 26 日、8 月 26 日、9 月 26 日在不同方位采集枝条中上部新鲜叶片,去除叶柄,每株约 500 g,自然风干,50℃干燥至恒重,粉碎后置于干燥皿中保存备用。

主要化学试剂:芦丁(纯度≥98%)、人参皂苷 Rb1、槲皮素(纯度≥98.5%)、异槲皮苷(纯度 98%)和山柰酚等标准品(纯度≥98%)均购自上海晶纯生物科技股份有限公司;甲醇、乙醇、浓硫酸、苯酚、三氯化铝、香草醛、冰醋酸、葡萄糖、高氯酸、磷酸等分析用试剂均为国产分析纯,购自杭州汇普化工仪器有限公司;液相色谱分析用甲醇为国产色谱纯,购自天津市康科德科技有限公司。

实验仪器:UV-759S 紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),HH-ZK1 数显式电热恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司),U3000 戴安高效液相色谱仪(美国戴安公司),色谱柱 SymmetryC18(美国 Waters 公司,5 μm,150x4.6 mm),CleanertC₁₈ 小柱(杭州迈狮科技有限公司);CS-700 高速多功能粉碎机(永康市天祺盛世工贸有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 黄酮的提取与含量测定 称取约 1.5 g 青钱柳叶烘干样品,置于 250 mL 平底烧瓶中,加入 50 mL 70%乙醇溶液,80℃水浴回流 2 h,过滤,收集滤液,残渣再用 50 mL 70%乙醇溶液回流提取 1 h,过滤,合并滤液,置 100 mL 容量瓶中,用 70%乙醇定容,摇匀,作为样品提取液;黄酮含量的测定参照李富民等^[16]方法。

1.2.2 多糖提取与含量测定 精密称取 1 g 青钱柳叶样品,置于 250 mL 平底烧瓶中,加 80%乙醇 80 mL,90℃回流提取 1 h,趁热抽滤,弃去滤液,滤渣用 80%乙醇 20 mL 洗涤 3 次,弃去洗液。滤渣连同滤纸一起放入烧瓶内,加蒸馏水 80 mL,90℃回流 1 h 过滤,重复加水 80 mL,90℃回流 1 h 过滤,滤渣用热水 20 mL 洗涤 2 次,合并滤液与洗液,冷却后定容至 250 mL 容量瓶作为样品提取液;多糖含量的测定参照谢建华等^[17]方法,以葡萄糖为对照品,根据标准曲线计算样品中以葡萄糖计的多糖含量。

1.2.3 总皂甙提取与含量测定 精密称取青钱柳干燥粉末 4 g,加甲醇 40 mL,回流提取 1 h,趁热过滤,收集滤液,残渣再加甲醇 40 mL,回流提取 1 h,趁热过滤,合并滤液,冷却后用甲醇定容至 100 mL;实验以人参皂甙 Rb1 为对照品,采用陈金华等^[18]方法进行总皂甙含量测定。

1.2.4 黄酮化合物槲皮素、异槲皮甙、山奈酚的测定 样品溶液的制备: 精密称取 3 g 青钱柳叶样品, 加 70% 甲醇 100 mL, 回流提取 2 h, 冷却后过滤, 用 70% 甲醇定容至刻度, 溶液过 C_{18} 小柱备用。

对照品溶液的配制: 分别精密称取异槲皮甙标准品用 70% 甲醇配制成浓度为 0.041 6, 0.083 2, 0.124 8, 0.166 4, 0.208 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液作为异槲皮甙对照品, 精密称取槲皮素标准品用甲醇配制成浓度为 0.040 8, 0.081 6, 0.122 4, 0.163 2, 0.204 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液作为槲皮素对照品, 精密称取山奈酚标准品用甲醇配制成浓度为 0.036 8, 0.073 6, 0.110 4, 0.147 2, 0.184 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液作为山奈酚对照品。

色谱条件: 流动相选用 0.4% 磷酸水溶液-甲醇 (55:45), 等度洗脱, 流速 $1\cdot\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$, 检测波长 360 nm, 进样量 5 μL 。

标准曲线的制作: 分别精密吸取异槲皮甙、槲皮素、山奈酚不同浓度的对照品溶液 5 μL 注入高效液相色谱仪中, 记录色谱图, 测定峰面积, 分别以各自的峰面积为横坐标, 浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为纵坐标进行线性回归计算。

异槲皮甙线性回归方程为: $Y=0.005\ 49x$ ($R^2=0.999\ 9$)

槲皮素线性回归方程为: $Y=0.003\ 29x$ ($R^2=1$)

山奈酚线性回归方程为: $Y=0.003\ 04x$ ($R^2=0.999\ 9$)

在各试验的浓度范围内线性关系均为良好。样品测定与含量计算: 分别吸样上述样品溶液 5 μL , 按上述色谱条件测定峰面积, 根据标准曲线进行含量计算。

1.3 数据处理

样品中各成分的含量取 3 株的平均值, 所有数据采用 Excel 进行绘图, 采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析, 多重比较采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 青钱柳叶片中黄酮含量及其动态变化规律

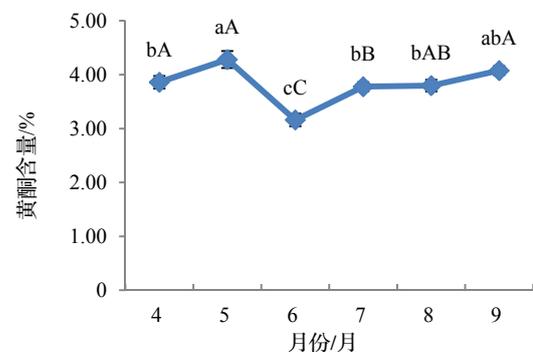
2017 年 4-9 月, 采集的青钱柳叶片中的黄酮含量的变化幅度为 3.86%~4.08%, 其动态变化规律见图 1。由图 1 可知, 黄酮含量最高的为 5 月 (4.28%), 最低的为 6 月 (3.16%), 即从 4-5 月呈上升趋势, 此时属于气温适宜的春季, 青钱柳处于抽稍长叶的生长期; 而从 5 月开始黄酮含量出现下降, 至 6 月份降至最低, 可能与此时在浙江省处于雨水较多的梅雨季节有关; 从 6 月以后又呈现缓慢上升趋势, 至 9 月升至 4.08%, 接近于 5 月时的含量。方差分析结果表明 5 月份黄酮含量与 6, 7 月间存在极显著差异 ($P<0.01$), 与 4, 8 月间存在显著差异 ($P<0.05$), 而与 9 月间无显著差异。

2.2 青钱柳叶片中多糖含量及其动态变化规律

青钱柳叶片中多糖含量的动态变化规律见图 2。由图 2 可知, 多糖含量最高的为 4 月份, 为 2.01%, 最低的为 7 月份, 为 1.13%; 4-9 月呈现出“先大幅下降再小幅上升”的变化趋势, 即从 4 月开始多糖含量出现下降, 至 7 月降至最低, 然后又开始缓慢上升。方差分析结果表明 4 月份的多糖含量与其它月份间均存在极显著差异 ($P<0.01$)。

2.3 青钱柳叶片中总皂甙含量及其动态变化规律

青钱柳叶片中的总皂甙含量的动态变化规律见图 3。从图 3 可以看出, 青钱柳叶片中的总皂甙含量 4-9 月一直呈现上升趋势, 4 月份含量较低为 6.24%, 然后逐渐上升, 至 9 月份上升至 16.47%, 是 4 月份的 2.64 倍。青钱柳从 4 月份新叶长出, 到 9 月份逐渐成熟变老, 说明青钱柳叶片中总皂甙的含量随着叶龄的增大、叶片的



注: 误差线上标有不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$); 标有不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。下同。

图 1 青钱柳叶片黄酮含量动态变化

Figure 1 Dynamics of flavonoid content in *C. paliurus* leaves

成熟而逐渐增大,而且变化幅度明显大于黄酮和多糖含量的变化幅度。方差分析结果表明,4月份的皂甙含量与5月份的差异不明显,与6月份存在显著差异($P<0.05$),而与7月、8月、9月间存在极显著差异($P<0.01$)。

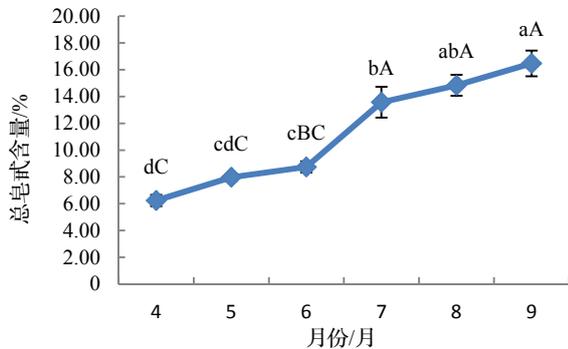


图2 青钱柳叶片总皂甙含量的动态变化

Figure 2 Dynamics of total saponins content in *C. paliurus* leaves

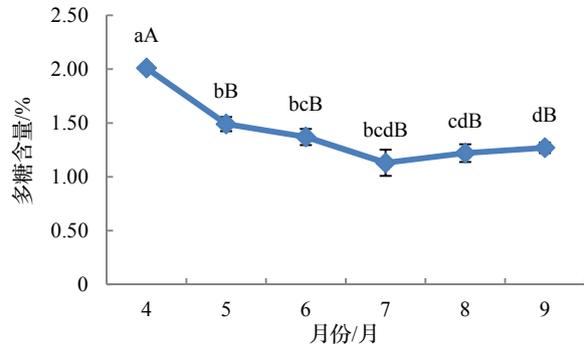
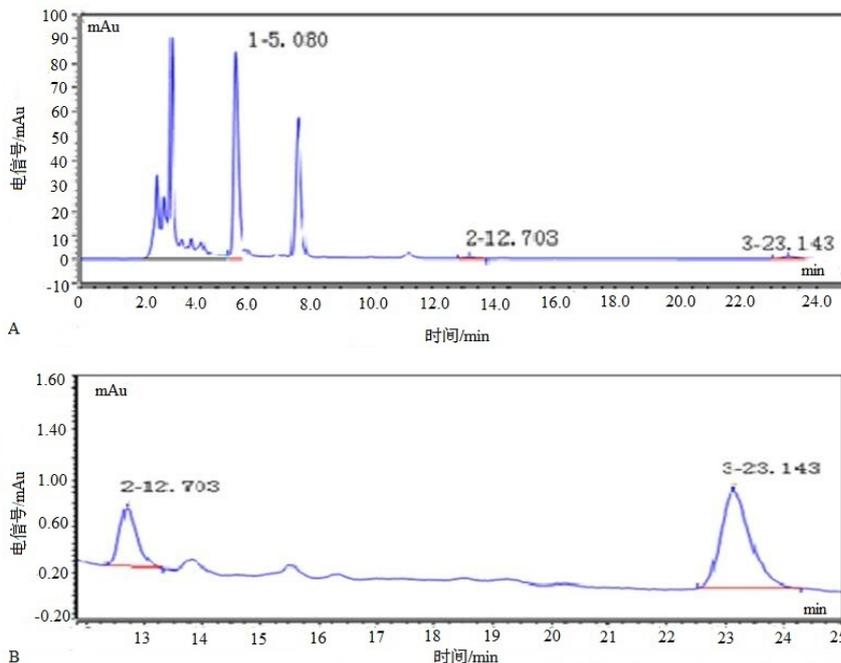


图3 青钱柳叶片多糖含量的动态变化

Figure 2 Dynamics of polysaccharide content in *C. paliurus* leaves

2.4 青钱柳叶片中黄酮类化合物异槲皮甙、槲皮素、山奈酚含量及其动态变化规律

青钱柳叶片样品的高效液相色谱见图4,不同月份青钱柳叶片中黄酮类化合物异槲皮甙、槲皮素、山奈酚含量的变化规律见图5,图6。从测定结果可以看出,青钱柳片中的黄酮类化合物异槲皮甙的含量相对较高,而槲皮素、山奈酚的含量相对较少。



1-异槲皮甙; 2-槲皮素;
3-山奈酚。

A: 3个组分的色谱全图;

B: 2, 3组分的放大图。

图4 青钱柳叶片样品高效液相色谱图

Figure 4 High performance liquid chromatogram of *C. paliurus* leaves

青钱柳叶片中的异槲皮甙含量最高的为9月份达 $7.97 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,最低的为6月的 $3.44 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,其动态变化规律为“先上升后下降再上升”,与总黄酮的变化规律相似,即4-5月呈上升趋势,而5-6月出现一个下降过程,从6月份开始又呈现上升趋势,与总黄酮变化规律的不同之处在于6月以后的上升幅度较大,至9月升至全年最高。方差分析结果表明,4月份的异槲皮甙含量与5月、6月间无显著差异,与7月有显著差异($P<0.05$),而与8月、9月间有极显著差异($P<0.01$)。

青钱柳叶片中的槲皮素和山奈酚含量最高的为 5 月, 分别为 $0.0661 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $0.0502 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 槲皮素含量最低的为 6 月, 而山奈酚含量最低的为 8 月。从动态变化规律来看, 槲皮素含量呈现“升-降-升-降-升”的交替变化, 而山奈酚含量呈现“先上升后下降”的变化趋势, 特别是从 7 月份开始下降幅度较为明显。方差分析结果表明 4 月的槲皮素含量与 5 月间存在极显著差异 ($P<0.01$), 与 7 月、9 月间有显著差异 ($P<0.05$), 而与 6 月、8 月间差异不明显。山奈酚含量 4 月与 5 月间有显著差异 ($P<0.05$), 与 6 月、7 月间无显著差异, 而与 8 月、9 月间存在极显著差异 ($P<0.01$)。

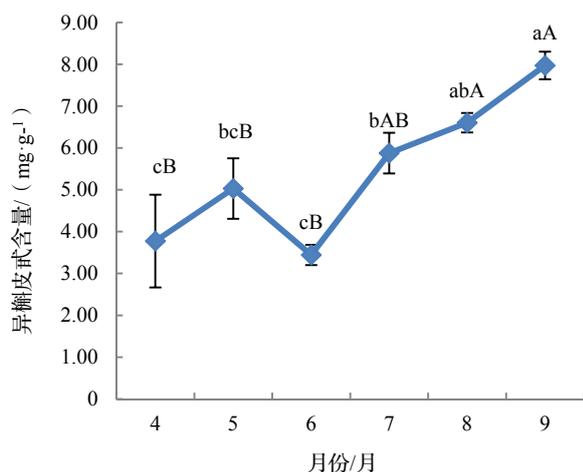


图 5 青钱柳叶片异槲皮甙含量动态变化

Figure 5 Dynamics of isoquercitrin content in *C. paliurus* leaves

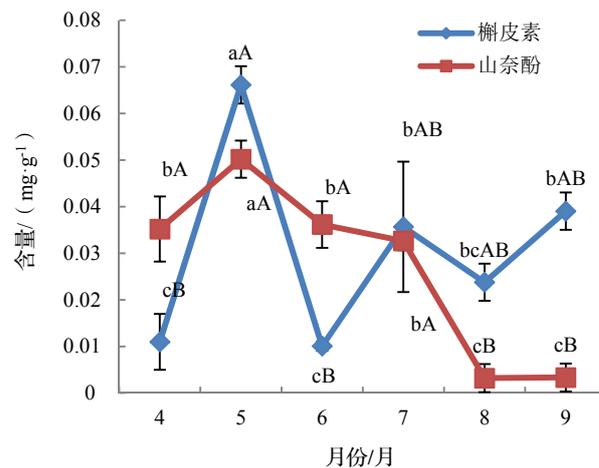


图 6 青钱柳叶槲皮素、山奈酚含量动态变化

Figure 6 Dynamics of quercetin and kaempferol content in *C. paliurus* leaves

3 结论与讨论

目前青钱柳的开发利用主要以茶用为主, 收获的主要是叶片, 因此了解青钱柳叶片内主要活性成分的含量变化, 对合理确定采收季节和以提高叶片内活性成分含量为目标的科学管理及针对不同功效成分的产品开发具有重要意义。通过上述试验分析表明青钱柳叶片内含有丰富的黄酮类化合物、多糖化合物和三萜皂苷类化合物, 且这些化合物随着季节和叶龄的变化表现出不同的变化规律。

黄酮及黄酮醇类化合物具有较多的酚羟基, 表现出很强的清除自由基活性。青钱柳中已报导至少含有 16 种黄酮及其苷类成分, 主要为黄酮醇类结构, 多为葡萄糖或葡萄糖酸苷^[2]。本试验测定结果也表明青钱柳叶片中的黄酮化合物主要以异槲皮甙为主, 从其总黄酮及黄酮类化合物的含量变化来看, 黄酮含量最高的为 5 月份, 最低的为 6 月份, 5 月份黄酮含量与 6 月、7 月间存在极显著差异 ($P<0.01$), 与 8 月间存在显著差异 ($P<0.05$), 而与 4 月、9 月间无显著差异。因此以黄酮含量为指标的采收季节以 4 月、5 月为佳, 其次为 9 月。青钱柳叶片中的黄酮类化合物异槲皮甙、槲皮素、山奈酚在不同采样期的变化幅度明显大于总黄酮, 测定结果表明青钱柳叶片中的黄酮化合物异槲皮甙含量较高, 6 个采样期的平均值占总黄酮平均值的 14.23%, 而槲皮素、山奈酚含量相对较少, 分别仅占总黄酮平均值的 0.08% 和 0.07%, 且异槲皮甙含量随季节的变化表现出与总黄酮相似的变化规律, 说明异槲皮甙是青钱柳叶片中占主导作用的黄酮类化合物。另外从样品的高效液相色谱图可以看出, 在近异槲皮甙位置尚有 2 个峰较为明显, 具体为何种化合物有待进一步研究。

多糖类化合物广泛存在于动物细胞膜和植物、微生物的细胞壁中, 是由醛基和酮基通过苷键连接的高分子聚合物, 也是构成生命的四大基本物质之一, 是一类具有广泛生物活性的生物大分子物质, 具有多种多样的生物学功能^[19]。青钱柳中含有较高的多糖含量, 并具有多种药理活性, 是近年来较受关注的一类成分。从青钱柳多糖的变化规律来看, 以嫩叶期的 4 月份含量最高, 且与其它月份间均存在极显著差异 ($P<0.01$)。青钱柳为

落叶树种, 4月份新叶刚刚长出, 经过一个冬季的休眠, 青钱柳叶片内积累了较多的多糖成分, 随着气温的逐渐上升, 叶片内的多糖含量逐渐降低, 至7月底降至最低, 此时也是温度最高的盛夏, 随着秋节的到来, 气温逐渐回落, 多糖含量又稍有回升。因此, 从多糖成分的变化来看嫩叶期的4月为最佳采收季节。

青钱柳中的萜类成分主要有三萜酸及三萜皂苷类, 三萜类化合物具有抗肿瘤、抗衰老等诸多作用, 青钱柳苷也是青钱柳中特有的天然甜味剂^[20-21]。从青钱柳总皂甙含量的变化规律来看, 表现出与黄酮和多糖不同的变化趋势, 即随着叶片的不断成熟, 其含量逐渐增大, 且变化幅度较大, 说明随着叶龄的增大青钱柳叶片中的总皂甙含量的积累越多。

植物中次生代谢产物的含量差异与不同时期植物所处的环境条件如光照、湿度、温度等因素密切相关, 本试验仅对青钱柳叶片中主要的几类化合物的含量变化进行研究, 至于引起这些变化的原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 方升佐, 洪香香. 青钱柳资源培育与开发利用的研究进展[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(1): 95-100.
- [2] 何春年, 彭勇, 肖伟, 等. 青钱柳神茶的应用历史与研究现状[J]. 中国现代中药, 2012, 14(5): 62-68.
- [3] 张晓琦, 叶文才, 殷志琦, 等. 青钱柳的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 791-792.
- [4] 李俊, 黄锡山, 陆园园, 等. 青钱柳化学成分的研究[J]. 中成药, 2008, 30(2): 238-240.
- [5] 舒任庚, 刘玉凤, 陈杰, 等. 青钱柳植物中三萜成分的研究[J]. 中药材, 2005, 28(7): 558-559.
- [6] 陈春强, 李俊, 许子竞, 等. 青钱柳叶多种无机元素含量的测定[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2003, 21(1): 87-89.
- [7] 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.
- [8] 黄明圈, 上官新晨, 徐明生, 等. 青钱柳多糖降血脂作用的研究[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(1): 157-161.
- [9] 董彩军, 谢明勇, 聂少平, 等. 青钱柳提取物体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 31-34.
- [10] 刘昕, 王顺启, 谢明勇, 等. 青钱柳多糖对子宫颈癌 HeLa 细胞和人脐带内皮细胞生长的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 520-522.
- [11] 黄贝贝, 肖凤仪, 张文平, 等. 青钱柳对小鼠免疫功能的影响[J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(5): 59-60.
- [12] 黄新亚, 杨丽. 浅谈青钱柳的开发利用价值[J]. 绿色科技, 2013(9): 143, 145.
- [13] 谭霖, 杨鑫, 龙滢, 等. 黔东南产青钱柳黄酮类成分的含量测定研究[J]. 贵州科学, 2016, 34(4): 77-81.
- [14] 楚秀丽, 杨万霞, 方升佐, 等. 不同种源青钱柳叶黄酮类物质含量的动态变化[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(2): 130-133.
- [15] 易醒, 谢明勇, 王远兴, 等. 反相高效液相色谱法测定青钱柳中黄酮化合物含量[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2001, 25(2): 161-164.
- [16] 李富民, 谭杰, 聂少平, 等. 青钱柳总黄酮测定方法研究[J]. 江西食品工业, 2006(4): 34-37.
- [17] 谢建华, 谢明勇, 聂少平, 等. 苯酚-硫酸法测定青钱柳中多糖含量[J]. 食品工业, 2010(4): 93-95.
- [18] 陈金华, 黄建安, 刘仲华. 青钱柳叶的化学成分分析[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 159-160, 278.
- [19] 周鹏, 谢明勇, 傅博强. 多糖的结构研究[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2001, 25(2): 197-204.
- [20] 杨大坚, 钟焜昌, 谢昭明. 甜茶树甜味成分研究[J]. 药学报, 1992, 27(11): 841-844.
- [21] 舒任庚, 徐昌瑞, 黎莲娘. 青钱柳甜味成分的研究[J]. 药学报, 1995, 30(10): 757-761.