

加杨树叶中 3 种黄酮类成分的含量测定

刘影, 梅晰凡^{*} (辽宁医学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 建立同时测定加杨树叶中的槲皮素、高良姜素、白杨素含量的分析方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱 Agilent TC C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.1%甲酸, 梯度洗脱: 0~5 min, 甲醇 25%→55%, 5~25 min, 甲醇 55%→65%, 25~35 min, 甲醇 65%→75%; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 264 nm; 柱温: 30 ℃。结果 加杨树叶中槲皮素、高良姜素、白杨素分离效果良好, 线性范围分别为 3.7~120, 2.5~80 和 3.125~100 μg·mL⁻¹; 平均加样回收率分别为 99.0%, 100.1%, 101.4%。结论 该方法准确可靠、结果稳定、重复性好, 可为评价加杨树叶的质量提供依据。
关键词: 加杨树叶; 槲皮素; 高良姜素; 白杨素; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)07-0857-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.022

Determination of Three Flavonoids in *Populus Canadensis* Moench. Leaves

LIU Ying, MEI Xifan^{*} (Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an analytical method for simultaneous determination of quercetin, galangin and chrysin in *Populus canadensis* Moench. leaves. **METHODS** The determination was performed on Agilent TC C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase consists of methanol-0.1% formic acid at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The following gradient elution was used: the content of methanol was 25% to 55% from 0 to 5 min, 55% to 65% from 5 to 25 min and 65% to 75% from 25 to 35 min. The detection wavelength was set at 264 nm, and the column temperature was 30 ℃. **RESULTS** This method had a good separation performance for quercetin, galangin and chrysin in poplar leaves, and the linear range were 3.7~120, 2.5~80 and 3.125~100 μg·mL⁻¹, respectively; the average recovery rates were 99%, 100.1% and 101.4%, respectively. **CONCLUSION** This method is accurate, reliable with good stability and repeatability which provides the evidence for quality evaluation for poplar leaves.

KEY WORDS: *Populus canadensis* Moench. leaves; quercetin; galangin; chrysin; HPLC

杨属植物在我国分布较广, 资源丰富。该属植物我国古代已作药用, 主要以白杨树皮入药,

《本草纲目》记载其煎汤日饮, 止孕痢; 煎醋含漱, 止牙前; 煎浆水加盐含漱, 治口疮, 煎水酿酒, 消瘿气。加杨(*Populus canadensis* Moench)又称加拿大杨, 在我国主要分布于辽宁、华北、西北、华东等地, 研究发现, 加杨树叶中含有药用

成分黄酮类化合物, 它是杨属植物的主要活性成分之一, 具有降压、解痉、抗炎等生理活性。槲皮素、白杨素、高良姜素属黄酮类化合物。现代药理研究表明, 槲皮素具有促进肝癌细胞^[1]、人骨肉瘤细胞^[2]凋亡, 抑制人肾癌细胞的增殖和侵袭^[3]等作用。白杨素具有明显的抗肿瘤作用^[4], 高良姜素能够促进肝癌细胞^[5]、肺癌细胞^[6]等的凋亡。加

作者简介: 刘影, 女, 硕士, 实验师 Tel: (0416)4673117
硕导 Tel: (0416)4673117 E-mail: 534575061@qq.com

E-mail: ly0924_1979@163.com

***通信作者:** 梅晰凡, 男, 博士, 教授,

杨树叶中黄酮类成分含量很高。对此 3 种成分的含量测定进行方法学研究,能够对加杨叶总黄酮质量研究提供参考,同时能够促进对加杨叶的开发利用。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(日本日立公司), L-2130 四元梯度泵, L-2455 DAD 测器, D-2000 Elite 色谱工作站; AL204 万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ3200DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 甲醇和甲酸均为色谱纯; 重蒸水为自制; 槲皮素对照品、白杨素对照品、高良姜素对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司, 批号分别为: MUST-12072505, MUST-1103007, 和 MUST-11042802, 纯度均>98.0%; 加杨树叶采摘于辽宁医学院, 由辽宁医学院生药学副教授高春华鉴定为加杨树叶, 院内批号分别为 20120501, 20120701, 20120901。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的配制

精密称取槲皮素、白杨素、高良姜素适量, 加甲醇配制成每 1 mL 含有槲皮素 1.2 mg、白杨素 0.8 mg 和高良姜素 1.0 mg 的混合对照品溶液。对照品溶液用甲醇稀释。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取加杨树叶粉末 1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 15 mL, 回流提取 1 h, 放冷, 用甲醇补足重量, 过滤, 滤液过 30 K 离心超滤管, 取滤液减压浓缩至 1 mL, 为供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱 Agilent TC C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%甲酸, 梯度洗脱: 0~5 min, 甲醇 25%→55%, 5~25 min, 甲醇 55%→65%, 25~35 min, 甲醇 65%→75%; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 264 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。色谱图见图 1。

2.4 方法学验证

2.4.1 标准曲线的制备 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液稀释至浓度分别为槲皮素 120, 60, 30, 15, 7.5, 3.75 μg·mL⁻¹, 白杨素 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 μg·mL⁻¹, 高良姜素 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μg·mL⁻¹, 各取 10 μL 注入液相色谱仪中, 按“2.3”项下色谱条件测定。分别以浓度 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 计算回归方程, 结果见表 1。

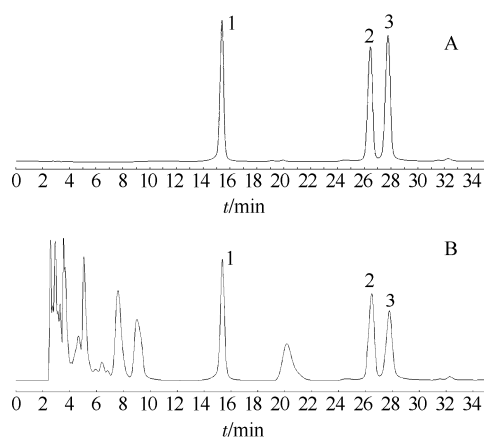


图 1 混合对照品及样品的高效液相色谱图

A—混合对照品; B—样品; 1—槲皮素; 2—白杨素; 3—高良姜素

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance and sample

A—mixed reference substance; B—sample; 1—quercetin; 2—chrysin; 3—galangin

表 1 3 成分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

Tab. 1 Regression equations, correlation coefficients, and linear ranges of three constituents

成分	线性方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
槲皮素	$Y=16\ 174X-4\ 249.9$	0.999 0	3.75~120
白杨素	$Y=7\ 934.3X+3\ 429.8$	0.999 5	2.5~80
高良姜素	$Y=11\ 170X-11\ 778$	0.999 4	3.125~100

2.4.2 精密度考察 分别将低、中、高浓度的混合对照品溶液(槲皮素 120, 30, 3.75 μg·mL⁻¹, 白杨素 80, 20, 2.5 μg·mL⁻¹, 高良姜素 100, 25, 3.125 μg·mL⁻¹)1 d 内重复进样 6 次, 按“2.3”项下色谱条件测定, 计算日内精密度。结果表明, 槲皮素在低、中、高浓度下的 RSD 分别为 1.4%, 1.2%, 0.8%; 白杨素在低、中、高浓度下的 RSD 分别为 0.6%, 1.1%, 0.9%; 高良姜素在低、中、高浓度下的 RSD 分别为 1.2%, 0.8%, 1.3%。分别将相应的低、中、高 3 个浓度的混合对照品溶液在 3 d 内连续进样分析, 按“2.3”项下色谱条件测定, 计算日间精密度。结果表明, 槲皮素在低、中、高浓度下的 RSD 分别为 1.6%, 0.9%, 0.7%; 白杨素在低、中、高浓度下的 RSD 分别为 0.6%, 1.1%, 0.5%; 高良姜素在低、中、高浓度下的 RSD 分别为 0.5%, 1.1%, 0.4%。

2.4.3 重复性考察 取同一批供试品粉末约 1 g, 共 5 份, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μL, 记录峰面积, 计算含量及其 RSD。槲皮素、白杨素、高良姜素的平均含量($n=5$)分别为 0.039 6, 0.044 6, 0.039 3 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.6%, 1.5%, 0.8%。

2.4.4 稳定性考察 精密吸取供试品溶液 10 μL ，室温下分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样测定，槲皮素、白杨素、高良姜素峰面积的 RSD($n=6$)分别为 1.3%, 0.9%, 1.5%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率 取已知含量的样品 0.5 mL，共 9 份，精密称定，分别精密加入含有不同浓度的混合对照品溶液 0.5 mL，按“2.2”项下方法制备供试溶液，进样 10 μL ，计算回收率。结果槲皮素、白杨素、高良姜素平均回收率($n=6$)分别为 99.0%(RSD=2.92%), 101.4%(RSD=2.96%), 100.1%(RSD=2.34%)。结果见表 2。

2.5 样品含量测定

取不同采摘时期的杨树叶，按“2.2”项下方法制备，按“2.3”项下色谱条件测定。结果见表 3。

表 2 3 个成分回收率考察

Tab. 2 Results of recovery tests of three constituents

成分	供试品 含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
槲皮素	19.70	15	35.0	102.0	99.0	2.92
	19.60	15	34.9	102.0		
	19.80	15	34.2	96.0		
	19.90	20	38.6	93.5		
	20.05	20	40.2	100.7		
	19.75	20	39.5	98.8		
	20.05	25	44.8	99.0		
	19.45	25	43.9	97.8		
白杨素	19.60	25	44.9	101.2	101.4	2.96
	22.25	15	36.8	97.0		
	22.30	15	37.6	102.0		
	22.25	15	37.5	101.7		
	22.15	20	41.3	95.6		
	22.45	20	42.9	102.3		
	22.25	20	43.1	104.3		
	22.35	25	47.8	101.8		
高良姜素	22.45	25	48.4	103.8	100.1	2.34
	21.95	25	47.9	103.8		
	19.20	15	34.1	99.3		
	19.45	15	34.9	103.0		
	19.55	15	34.1	97.0		
	19.80	20	39.7	99.5		
	19.45	20	39.9	102.3		
	20.05	20	39.5	97.3		
高良姜素	20.10	25	44.9	99.2	100.1	2.34
	19.75	25	45.6	103.4		
	19.95	25	44.8	99.4		

表 3 3 种成分含量测定结果($n=3$)

Tab. 3 Analytical results of three constituents($n=3$)

批 次	槲皮素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	白杨素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	高良姜素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
20120501	0.039 2 $\pm$ 0.001 2	0.044 9 $\pm$ 0.001 6	0.039 6 $\pm$ 0.001 3
20120701	0.040 1 $\pm$ 0.000 9	0.045 3 $\pm$ 0.001 1	0.040 1 $\pm$ 0.001 5
20120901	0.038 6 $\pm$ 0.001 5	0.043 6 $\pm$ 0.001 5	0.039 1 $\pm$ 0.000 9

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

采用 DAD 检测器结果显示，槲皮素有 2 个吸收峰分别为 372 nm 和 256 nm，而高良姜素和白杨素在 267 nm 处有最大吸收峰，综合考虑选择 264 nm 为检测波长。对于流动相的选择，在查阅文献[7-8]的基础上进行了改进，选择了梯度洗脱条件，使槲皮素、白杨素、高良姜素和其他成分得到很好的分离。

3.2 样品处理条件的筛选

醇提后的样品进行石油醚萃取、氯仿萃取，但氯仿层还是含有大量的叶绿素，进样分析后目标成分很难与其他成分分离，之后本课题组又采用了醇提样品直接用 30 K 超滤离心管离心，离心后样品溶液呈黄色，进样分析分离效果很好。

本课题组在研究加杨叶醇提取物时发现其具有抗肿瘤活性，通过查阅文献[9]了解杨属植物醇提取物部分含有槲皮素、高良姜素、白杨素，通过本试验确定了 3 种黄酮类化合物的含量，为后续试验提供参考。该方法操作简单，测定结果准确，重复性好，精密度高，适合加杨树叶中槲皮素、白杨素、高良姜素的含量测定，为杨树资源的开发利用提供了分析方法。

REFERENCES

- [1] SUN J, ZHAO D G, WANG M Y, et al. Influence of quercetin on PI3K/AKT signal pathway of SMMC-7721 hepatic cancer cells [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(18): 223-226.
- [2] YIN J Q, XIE X B, JIA Q E, et al. Effect and mechanism of quercetin on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cell U-2OS/MTX300 [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(5): 611-614.
- [3] FAN Z R, ZHANG Z Q, YU D, et al. Effects of quercetin on proliferation, invasion and VEGF protein expression on human renal cell cancer of ACHN cell line [J]. Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报), 2012, 47(8): 887-890.
- [4] HU K, WANG W, REN J. Synthesis and antitumor activities of mannich basederivatives of chrysin [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2010, 27(6): 448-452.
- [5] WU J, WEN M, ZHANG H T. Galangin induces apoptosis on lung cancer A549 cells [J]. Cancer Res Prev Treat(肿瘤防治研

究), 2011, 38(11): 1228-1231.

- [6] LUO H, MA C, WANG Y J. Study on apoptosis of BEL-7402 cells induced by galangin [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2008, 31(8): 1204-1207.
- [7] DIY H, SHENG X L. Determination of galangin and chrysin in volatile oil of propolis [J]. Anti Infect Pharm(抗感染药), 2011, 8(3): 188-190.

- [8] CAO W, FU J F, SUO Z R, et al. HPLC analysis of chrysin and galangin in propolis [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(4): 522-524.
- [9] ZHOU S, LIN M, WANG Y H, et al. Study on the chemical constituents of *Populus davidiana* dode [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2002, 14(5): 43-45.

收稿日期: 2013-08-25