

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.06

9 个产地 6 种杨树花中水杨苷含量测定方法的优化及其分布研究

邱天宝¹, 郝哲^{2*}, 李华岑¹, 刘素梅¹, 韩立¹

(1.河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008; 2.解放军第九八八医院, 郑州 450042)

[收稿日期] 2018-10-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0034-07 [中图分类号] S853.7

[摘要] 建立 HPLC 法测定不同品种不同产地杨树花中水杨苷含量的方法, 并对其分布进行研究。采用 Waters XBrige™ C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为水-甲醇-乙腈(92:4:4); 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 267 nm。并对水杨苷含量进行分析。水杨苷的线性范围为 0.04208~0.4208 mg/mL ($r=0.9996$), 平均回收率为 101.6% ($RSD=1.4%$)。毛白杨中的水杨苷含量均高于其他品种, 其中山东和陕西的含量最高, 加拿大杨、黑杨和川杨中水杨苷含量最低。该法快速、简便、准确, 可用于测定杨树花中水杨苷的含量; 不同地域不同品种杨树花中的水杨苷含量有较大差异, 可为制定杨树花质量标准提供科学依据。

[关键词] 杨树花; 水杨苷; 含量测定; HPLC

Study on the Determination Method and Distribution of Salicylate in Six Poplar Flowers from 9 Habitats

QIU Tian-bao¹, HAO Zhe^{2*}, LI Hua-cen¹, LIU Su-mei¹, HAN Li¹

(1. Henan Institute of Veterinary Medicine and Feed, Zhengzhou 450008, China;

2. Dept. of Pharmacy, No. 153 Center Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China)

Corresponding author: HAO Zhe, E-mail: qtb2006@126.com

Abstract: A HPLC method was established to determine the content of salicylate in poplar flower from different varieties and different habitats and its distribution was studied. The mobile phase is water-methanol-acetonitrile (92:4:4) with Waters XBrige™ C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) at 30 ℃; The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 267 nm. The content of salicylate was analyzed. The linear range of salicylate was 0.04208 mg/mL~0.4208 mg/mL ($r=0.9996$) and the average recovery was 101.6% ($RSD=1.4%$). The content of salicylate in *Populus tomentosa* was higher than that in other varieties, the highest in Shandong and Shanxi, and the lowest in Canadian poplar, black poplar and Sichuan poplar. The method is rapid, simple and accurate, and can be used to determine the content of salicylate in poplar flower, and the content of

基金项目: 国家重点研发计划资助(2017YFD0501500)

作者简介: 邱天宝, 硕士, 从事中药新药及质量标准研究。

通讯作者: 郝哲。E-mail: qtb2006@126.com

salicylate in poplar flower is different in different regions, which can provide scientific basis for establishing the quality standard of poplar flower.

Key words: poplar flower; salicylate; content determination; HPLC

杨树花收载于《中国兽药典》2015 年版二部,具有清热解毒,化湿止痢^[1-3]的功效,主治湿热下痢,幼畜泄泻。杨树花的水煮液治疗人和家畜的各类细菌性病疾和肠炎^[4],对多种肠道细菌都有杀灭或抑制作用^[5],临床效果良好,同时具有明显的抗肿瘤、解热镇痛和抗风湿作用^[6-7]。其中以水杨苷为代表的苷类化合物具有解热、镇痛作用^[8-9],药用开发价值较高。杨树花是常用兽药,具有分布广泛,价格低廉,疗效确切等优点,深受养殖户青睐,有广阔的市场开发前景。目前杨树花药材的质量控制仅有理化鉴别和薄层鉴别,缺少对其品质的评价标准,本试验对 9 个产地 6 种杨树花中水杨苷的含量测定方法进行了系统研究,为杨树花质量标准的提升及品质评价提供了科学依据,具有很高的参考价值。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters2695 高效液相色谱仪,2998PDA 检测器(美国 Waters 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);METTLER-AE240 型电子分析天平;移液器(德国 Eppendorf 公司)。超纯水系统 Mili-Q Advantage A10 (美国 MILLIPORE 密理博)。

1.2 试剂与对照品 水杨苷对照品(含量 98.0%,批号 4.530013.0001, ANPEL Scientific instrument Co. .Ltd.),乙腈为色谱纯(默克股份两合公司),甲醇为色谱纯(默克股份两合公司),水为娃哈哈纯净水经超纯水系统制备,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材 杨树花于 2018 年 4-6 月采集,品种经河南省林科院鉴定,结果见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XBrigeTMC18 柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相为水-甲醇-乙腈(92:4:4);流速 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;检测波长 267 nm;进样体积 10 μL。

表 1 杨树花产地及品种

Tab 1 Origin and varieties of poplar flowers		
编号	产地	品种
1	四川绵阳	川杨
2	河南郑州	黑杨
3	新疆哈密	黑杨
4	河南郑州	加拿大杨
5	陕西咸阳	毛白杨
6	山西太原	毛白杨
7	山西太原市政府	毛白杨
8	山西农业大学	毛白杨
9	山西太原森林公园	毛白杨
10	河南郑州	毛白杨
11	北京	毛白杨
12	河北秦皇岛	毛白杨
13	山东	毛白杨
14	内蒙古包头	银白杨
15	河南省林科院	沙兰杨
16	河南省林科院	中华红叶杨

2.2 对照品溶液的制备 水杨苷对照品溶液制备:取水杨苷对照品约 10 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末 0.5 g,精密称定,精密加入 50%甲醇 50 mL,称定重量;回流提取 30 min,放至室温,用 50%甲醇补足重量,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 线性范围 取水杨苷对照品约 10 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中加甲醇稀释至刻度作为储备液,分别精密吸取水杨苷对照品储备溶液 1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度。照“2.1”项下色谱条件分别进样,以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度(mg/mL)为横坐标(X)绘制标准曲线,并进行回归,得水杨苷的回归方程分别为: $Y = 2.12e+006X - 9.91e+003$, ($r = 0.9999$),结果表明

水杨苷在 0.04208 mg/mL~0.4208 mg/mL 范围内,线性关系良好。

2.5 精密度试验 分别精密吸取同一份对照品溶液 10 μ L,重复进样 6 次,测定水杨苷峰面积,其 RSD 为 0.4%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性实验 取杨树花药材粉末 5 份,每份 0.5 g,精密称定,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件,测定水杨苷含量,RSD 值为 1.0%,表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 杨树花药材粉末 0.5 g,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于 0,2,4,8,10,12 h 照“2.1”项下方法,测定峰面积,RSD

值为 0.7%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.8 回收率试验 取供试品 0.25 g(平均含量为 5.3 mg/g),精密称定,分别按含水杨苷 80%、100%、120% 加入水杨苷对照品储备液,照“2.1”项下方法测定水杨苷含量,计算平均回收率及 RSD 值,结果见表 2。

2.9 耐用性 试验考察安捷伦 ZORBAX SB-C18 (3.0 \times 250 mm,5-Micron)、博纳艾杰尔 Venusil XBP C18(2) (4.6 \times 150 mm,5 μ m)、Waters Xbridge TM C18,(4.6 \times 150 mm,5 μ m) 三种不同品牌的色谱柱,照“2.1”项下方法测定不同品种杨树花中水杨苷的含量,均能满足要求,结果见表 3。

表 2 水杨苷回收率试验 ($n=9$)

Tab 2 Recovery test of Salicin ($n=9$)

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.2518	1.3345	0.8416	2.1845	100.99		
0.2511	1.3308	0.8416	2.1924	102.37	101.6	0.7
0.2532	1.3420	0.8416	2.1962	101.50		
0.2505	1.3277	1.2648	2.6002	100.61		
0.2562	1.3579	1.2648	2.6225	99.99	100.7	0.8
0.2581	1.3679	1.2648	2.6532	101.62		
0.2526	1.3388	1.6672	2.9821	98.57		
0.2533	1.3425	1.6672	2.9801	98.23	98.6	0.4
0.2516	1.3335	1.6672	2.9856	99.10		

表 3 耐用性试验

Tab 3 durability test

色谱柱品牌	保留时间/min	纯度角度	纯度阈值	理论塔板数
艾杰尔	18.17	0.192	0.27	17926.02
安捷伦	5.649	0.386	1.01	5185.98
waters	5.464	2.289	2.751	3562.75

2.10 含量测定 分别取不同产地,不同品种杨树花样品,各 3 批,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μ L,按上述方法测定样品中水杨苷的含量,结果见表 4;水杨苷含量的分布图见图 1。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察

3.1.1 不同提取溶剂的考察 试验考察了水、乙

醇、甲醇、50%乙醇、50%甲醇 5 种不同提取溶剂,比较不同溶剂提取水杨苷含量的差异。

取杨树花粉末 0.5 g,精密称定,分别加水、乙醇、甲醇、50%乙醇、50%甲醇 50 mL,称定重量,加热回流 1 h,放至室温,用相应溶剂补足重量,滤过,取续滤液作为供试品溶液,照“2.1”项下方法测定其峰面积、分离度、峰面积、峰高理论塔板数、峰纯

度等相关参数,结果见表 5,图 2。

表 4 不同产地及品种杨树花水杨苷含量

Tab 4 content of Salicin in poplar from different producing areas and varieties

编号	产地	品种	含量/(mg · g ⁻¹)
1	四川绵阳	川杨	1.4
2	河南郑州	黑杨	1.1
3	新疆哈密	黑杨	1.6
4	河南郑州	加拿大杨	1.7
5	陕西咸阳	毛白杨	5.4
6	山西太原	毛白杨	5.3
7	山西太原市政府	毛白杨	5.2
8	山西农业大学	毛白杨	5.0
9	山西太原森林公园	毛白杨	3.3
10	河南郑州	毛白杨	5.3
11	北京	毛白杨	3.0
12	河北秦皇岛	毛白杨	4.4
13	山东	毛白杨	5.4
14	内蒙古包头	银白杨	3.7
15	河南省林科院	沙兰杨	3.8
16	河南省林科院	中华红叶杨	3.0

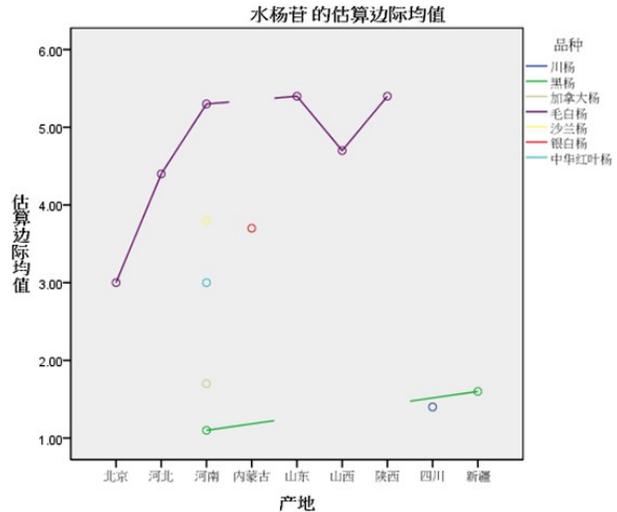


图 1 水杨苷含量分布

Fig 1 Distribution of populin content

通过不同溶剂提取结果比较,水、甲醇、乙醇、50%乙醇、水杨苷峰纯度不够,且前 3 种溶剂提取的样品,分离度均小于 1.5,达不到要求。而 50% 甲醇作为提取溶剂,峰纯度较好,分离度好,无杂质干扰。因此选择 50% 甲醇作为提取溶剂。

表 5 不同提取溶剂考察结果

Tab 5 Investigation results of different extraction solvents

提取溶剂	峰	保留时间/min	纯度 1 角度	纯度 1 阈值	面积(A)	高度(H)	分离度(R)	EP 理论塔板数
水	水杨苷	7.007	4.088	0.525	92687	8213	1.2	8679.568
	杂质峰	7.444	7.351	0.613	96470	5929		5213.885
甲醇	水杨苷	6.361	2.166	0.725	63486	4048	1.2	3682.31
	杂质峰	6.923	5.294	0.671	96697	4885		2616.954
乙醇	水杨苷	6.415	16.512	1.657	49636	2204	1.1	1609.983
	杂质峰	6.948	2.926	1.567	31794	1653		860.256
50%乙醇	水杨苷	6.953	1.054	0.464	80805	4976	2.1	3801.474
	杂质峰	8.007	6.067	0.384	143813	6610		3235.298
50%甲醇	水杨苷	6.968	0.219	0.354	71494	7741	3.9	7882.614

3.1.2 提取方法的考察

3.1.2.1 超声提取法 取杨树花药材粉末 0.5 g,精密称定,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定重量,超声 30 min,取出放至室温,用 50% 甲醇补足重量,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。照“2.1”项下方法测定水杨苷的含量,结果见表 6、图 3。

3.1.2.2 回流提取法 取杨树花药材粉末 0.5 g,精密称定,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定重量,回流 30 min,取出放至室温,用 50% 甲醇补足重量,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。照“2.1”项下方法测定水杨苷的含量。结果见表 6、图 4。

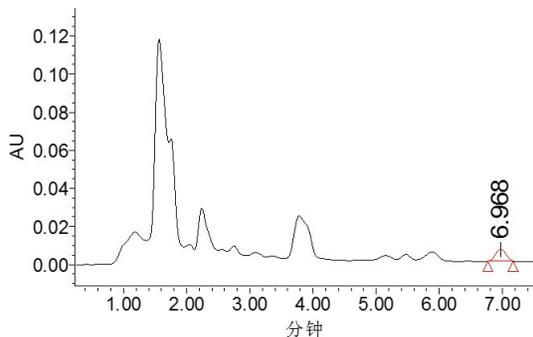


图 2 50%甲醇提取水杨苷 HPLC 色谱图

Fig 2 50% methanol extraction Salicin HPLC chromatogram

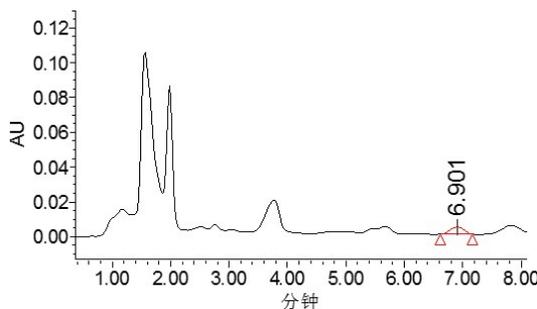


图 3 超声提取法水杨苷 HPLC 色谱图

Fig 3 determination chromatogram of Salicin content extracted by ultrasound

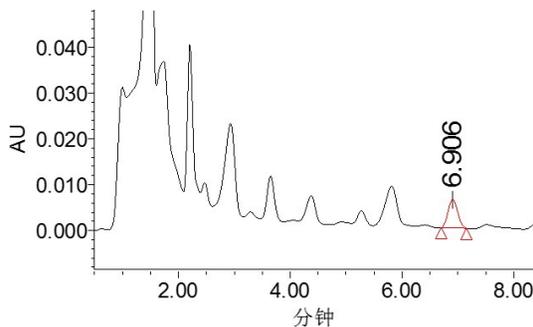


图 4 回流提取法水杨苷 HPLC 色谱图

Fig 4 chromatographic diagram for the determination of Salicin content extracted by reflux extraction

表 6 不同提取方法水杨苷色谱峰参数比较

提取方法	保留时间/min	纯度角度	纯度阈值	理论塔板数	峰面积(A)
超声法	6.901	0.172	0.462	3474.485	68593
回流法	6.906	0.46	2.001	7362.251	73874

由上表可知,两种提取方法,峰纯度都比较好,但超声提取法的峰面积和理论塔板数较回流提取法低。因此,选择回流提取法作为样品的提取方法。

3.1.3 不同取样量的考察 分别取杨树花药材粉末 0.5、1、2、5 g,精密称定,分别精密加入 50% 甲醇 50 mL,称定重量,分别回流 30 min,取出放至室温,用 50% 甲醇补足重量,滤过,取续滤液,作为供试品

溶液。照“2.1”项下方法测定水杨苷的光谱纯度。结果表 7。

表 7 不同取样量水杨苷光谱纯度

Tab 7 Purity of Salicin peak in different sampling quantities

取样量/g	纯度角	纯度阈值
0.5	0.128	0.357
1	13.059	0.276
2	3.117	0.307
5	26.839	0.369

表 8 不同提取时间水杨苷峰参数

Tab 8 Effects of different extraction time on Salicin Peak parameters

提取时间/min	保留时间/min	面积(A)	高度(H)	分离度(R)	含量/(mg·g ⁻¹)
30	6.89	106647	8749	3.6	5.44
60	6.922	96889	8349	2.7	4.98
120	6.912	98348	8754	1.3	5.05

由上表可知,提取时间为 30 min 时,杨树花中水杨苷含量最高,且峰分离度好。因此,选择提取时间为 30 min。

综上,最终确定文中所述供试品的制备方法。

试验比较了甲醇-水,乙腈-水,甲醇-乙腈-水系统对水杨苷洗脱的效果,发现乙腈-水系统对水杨苷洗脱能力最强,出峰时间快,但在样品中,分离度不好,不容易与杂质峰分开;甲醇-水系统理论塔板数太低,出峰时间晚;相比甲醇-乙腈-水系统理论塔板数较高,分离度较好。

通过不同品种杨树花中水杨苷的测定比较发现,毛白杨中的水杨苷含量最高,其次沙兰杨、银白杨、中华红叶杨,加杨、黑杨和川杨中水杨苷含量最低。原因可能与不同品种杨树雄花序盛开掉落形态结构有关,毛白杨雄花序花苞片和雄蕊丰满完整,中华红叶杨雄花序掉落只剩下雄蕊和花干,而加杨、黑杨掉落只剩下花干。这也间接证明杨树花的化学成分主要集中在苞片上,因此毛白杨中水杨苷含量最高。

对于同一品种毛白杨来说,不同地域也有较大差异性,山东>陕西>河南>山西>河北>北京。

由上表可知,取样量为 0.5 g 时,水杨苷光谱纯度最佳。其他取样量水杨苷色谱峰纯度角大于纯度阈值,纯度均不纯,因此,选择取样量为 0.5 g。

3.1.4 不同提取时间的考察 取杨树花药材粉末 0.5 g,精密称定,分别精密加入 50%甲醇 50 mL,称定重量,分别回流 30、60、120 min,取出放至室温,用 50%甲醇补足重量,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。照“2.1”项下方法测定水杨苷,结果见表 8。

对于同一产地同一品种山西来说,山西太原、市政府、农业大学三者含量基本相当,均高于森林公园的杨树花中水杨苷含量。

参考文献:

- [1] 潘继兰. 杨树花防治羔羊痢疾[J]. 当代畜禽养殖业, 2005 (4): 22.
Pan J L. Prevention and control of lamb dysentery of poplar flower [J].
- [2] 马景梅. 杨树花治疗羔羊痢疾的诊疗效果[J]. 今日畜牧兽医, 2014(11): 58.
Ma J M. Effect of poplar flower on the diagnosis and treatment of lamb dysentery [J]. Veterinary Animal Husbandry, 2014 (11): 58.
- [3] 潘立辉, 孟广章. 杨树花、叶、皮治疗羊腹泻效果好[J]. 当代农业, 2002(4): 29.
Pan L H, Meng G Z. Poplar flower, leaf and skin are effective in treating sheep diarrhea [J]. Contemporary Agriculture, 2002 (4): 29.
- [4] 房春林, 杨光友, 杨海涵, 等. 杨树花提取物及其复方制剂的药理学试验[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(02): 205-209.
Fang C L, Yang G Y, Yang H H, et al. Experiments on pharmacology of Populus tomentosa extracts and their compound preparations [J]. Chinese Veterinary Science, 2010, 40 (02): 205-

- 209.
- [5] 张玉果, 郝智松. 杨树花口服液在治疗猪肠炎中的临床应用 [J]. 畜药应用, 2013, (8): 37.
Zhang Y G, Hao Z S. Clinical application of Yangshuhua oral liquid in the treatment of pig enteritis [J]. Animal medicine application, 2013, (8): 37.
- [6] 李福伟. 毛白杨雄花序化学成分研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2005: 5-6.
LI F W. Study on compounds of Populus tomentosa carr [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2005: 5-6.
- [7] 侯勇, 张广杰, 崔慧敏, 等. 毛白杨雄花序的化学成分研究 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(12): 1131-1136.
Hou Y, Zhang G J, Cui H M, *et al.* Chemical constituents from the male anthotaxy of Populus tomentosa Carr. [J]. J Int Pharm Res, 2017, 44(12): 1131-1136.
- [8] Akao T, Yoshino T, Kobashi K, *et al.* Evaluation of Salicin as an Antipyretic Prodrug that does not Cause Gastric Injury [J]. Planta medica, 2002, 68(8): 714-718.
- [9] 段红, 翟科峰, 高贵珍, 等. RP-HPLC 测定八角枫药材中的水杨苷 [J]. 光谱实验室, 2012, (29): 1065-1068.
Duan H, Zhai K F, Gao G Z, *et al.* Determination of Salicin in Alangium Chinese (Lour.) Harms Medicinal Materials by RP-HPLC [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2012, (29): 1065-1068.

(编辑: 陈希)