

樱花素标准样品的研制

马玉翠¹, 吴翠¹, 王尉², 王淳¹, 杜宁², 刘海萍¹, 吴晓毅¹, 巢志茂^{1*}

- (1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
2. 北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

[摘要] **目的:**依据 GB/T 15000.3-2008《标准样品工作导则(3)标准样品:定值的一般原则和统计方法》,在国家标准化管理委员会批准立项的基础上,研制樱花素国家标准样品。**方法:**以中药药白杨的干燥茎皮为原料,通过提取、分离,纯化制备了樱花素样品,采用旋光度、元素分析、红外光谱、紫外光谱、高分辨质谱、核磁共振谱和 X-单晶衍射进行了结构鉴定。进行了薄层色谱的鉴别。建立了高效液相色谱紫外检测分析技术。样品分装成 400 瓶(每瓶 5 mg)后,进行了均匀性检验、稳定性检验和联合定值。**结果:**该样品为 DL-5,4'-二羟基-7-甲氧基二氢黄酮,95% 置信区间范围内的均匀性良好,0~8℃条件下 24 个月内稳定性良好,定值结果确定其纯度为 99.97%,相对扩展不确定度为 0.02%,通过了国家标准化管理委员会组织的验收,达到了国家标准样品的技术要求。**结论:**成功地研制了樱花素国家标准样品,可用于樱花素含量测定、检测方法评定、相关产品的检测与质量控制。

[关键词] 樱花素; 标准样品; 均匀性; 稳定性; 定值; 不确定度

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0051-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017090051

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0945.028.html>

[网络出版时间] 2017-02-15 9:45

Preparation of Certified Reference Material of Sakuranetin

MA Yu-cui¹, WU Cui¹, WANG Wei², WANG Chun¹, DU Ning², LIU Hai-ping¹,
WU Xiao-yi¹, CHAO Zhi-mao^{1*}

- (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a certified reference material (CRM) of sakuranetin according to the *Work Guideline for Reference Materials (3): Reference Material-General Principles and Statistical Method for Certification* (GB/T 15000.3-2008) upon the approved by Standardization Administration of China (SAC). **Method:** Sakuranetin was extracted from dried barks of *Populus tomentosa*. The structure of sakuranetin was identified by optical rotation, elemental analysis, IR, UV, high-resolution MS, NMR, and X-ray diffraction analysis. Thin layer chromatography was carried out for the identification. Sakuranetin was divided into 400 bottles, with 5 mg per bottle. The homogeneity test, stability test, and quantitative analysis were carried out by high-performance liquid chromatography-ultra violet detector. **Result:** This CRM is DL-5, 4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone. The homogeneity of the 95% confidence interval was good. The storage period was 24 months at 0-8℃. The certified purity value was 99.97%, with a relative expanded uncertainty of 0.02%. The CRM of sakuranetin reached the technical requirements of CRM, and was accepted by SAC. **Conclusion:** The CRM of

[收稿日期] 20160809(0011)

[基金项目] 国家质量监督检验检疫总局行业科研专项(201210209);国家标准化委员会国家标准样品研制项目(S2012088)

[第一作者] 马玉翠,在读硕士,从事天然产物国家标准样品的研制,Tel:1590126328,E-mail:872018483@qq.com

[通讯作者] *巢志茂,研究员,博士生导师,从事天然产物国家标准样品的研制,Tel:13522705161,E-mail:chaozhimao@163.com

sakuranetin is successfully developed, and can be used for determining content, evaluating test methods, detecting relevant products and controlling quality.

[Key words] sakuranetin; certified reference material; homogeneity; stability; certification; uncertainty

樱花素主要存在于杨柳科植物毛白杨^[1]、山杨的树皮^[2],桦科植物岳桦 *Betula ermanii* 的树皮^[3],无患子科植物车桑子 *Dodonaea viscosa* 的叶中^[4],为二氢黄酮类化合物。具有抗炎活性^[1],干扰平滑肌细胞的钙代谢而使平滑肌松弛^[5],对小鼠耐药肿瘤细胞表达 *p*-糖蛋白或 MRP1 具有有效的调节作用^[6],对哮喘有治疗作用^[7],因其较高的抗氧化活性,能有效对抗黑色素沉积,改善肤色暗沉,起到美白嫩肤的作用,在化妆品市场上备受青睐。

目前,樱花素在国内外市场未见销售,不能进行相关检测。为了满足市场需求,为国内相关机构和企业开展校准、分析评价、仲裁、产品质量控制、实验室认可、能力验证等工作提供准确、及时、可靠、可溯源的技术保障,国家标准化管理委员会批准了樱花素国家标准样品的研制。同时,作为手性异构体的标准样品示范性研制,得到了质检总局的行业专项资助。笔者参照 ISO Guide 35:2006,按照 GB/T 15000.3 标准样品系列工作导则,研制了樱花素的国家标准样品。

1 材料

X-6 型显微熔点测定仪(温度计未校正),Vario EL cube 型元素分析仪(德国 Elementar 公司),PE Model 343 型旋光仪,FTIR-8400S 型傅立叶红外光谱仪(日本岛津公司),6320 Ion Trap ESI-MS 型质谱仪,Xcalibur-Eos-Gemini CCD 型单晶衍射仪(美国 Agilent 公司);Xevo G2 Q-tof 型高分辨质谱仪(美国 Waters 公司),Avance II 400M 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司,以 TMS 为内标)。LC-20AT 型高效液相色谱仪(CBS-20A 系统,LC-20AT 泵,CTO-10AS vp 柱温箱,SPD-M20A UV-vis 检测器,SIL-20A 自动进样器,DGU-20A₅ 脱气装置,Shimadzu LC 工作站,日本岛津公司),RE-201D 旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司),LD5-10 型离心机(北京金立离心机有限公司),CP225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。薄层色谱和柱色谱用硅胶均由青岛海洋化工厂生产。

甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司),水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。药材经中国中医科学院中药研究所巢志茂研究员鉴定为成年雄株杨柳科植物毛白杨 *Populus tomentosa* 的茎皮,2010 年 3 月

采自北京近郊,样本存放在 1016 号房间。

2 方法与结果

2.1 樱花素的制备 取药材 4.8 kg 粉碎,乙醚脱脂,甲醇回流提取物以蒸馏水悬浮,石油醚脱脂后以乙酸乙酯萃取,硅胶柱色谱分离,石油醚-乙酸乙酯(5:1)洗脱,甲醇重结晶,减压干燥,即得到高纯度的樱花素 2 332 mg^[1]。每瓶 5 mg 密封于 2 mL 棕色玻璃瓶中,共 400 瓶。

2.2 结构鉴定

2.2.1 物理性质 熔点为 mp 151 ~ 153 °C (甲醇)。旋光度 $[\alpha]_D^{25} = -2.4^\circ$ (*c* 0.5, 甲醇)。分子式 C₁₆H₁₄O₅,理论值为 C,67.13%;H,4.90%;测定值为 C,67.00%;H,5.01%,测定值与理论值一致。

2.2.2 UV, IR UV λ_{max} (甲醇):288,330 nm。IR (KBr)解析结果见表 1。

表 1 樱花素的红外光谱数据

Table 1 IR data table of sakuranetin

吸收峰/cm ⁻¹	振动类型	峰强度	基团
3 262	OH 伸缩振动	s	O-H
1 645,1 612,1 501,1 447	C = C 骨架振动	s	C = C
1 310,1 209,1 070	C-O 伸缩振动	s	C-O
839,757	芳氢弯曲振动	m	Ar-H

2.2.3 HRESI-MS *m/z* 285.076 4 [M - H]⁻,与 C₁₆H₁₃O₅,的理论值(285.076 3)一致。

2.2.4 NMR 测定了¹H-NMR,¹H-¹H COSY,¹³C-NMR,DEPT,HMQC,HMBC 等数据,归属结果见表 2,与文献[8-10]数据一致。

2.2.5 XRD 甲醇/甲苯室温中获得了 0.60 mm × 0.80 mm × 0.60 mm 无色针状晶体,经 X-单晶衍射测定认为,该晶体属于单斜晶系,空间群为 *P*2₁/*c*,晶胞参数为 *a* = 12.853 1(12),*b* = 5.714 1(3),*c* = 18.035 5(12) Å, β = 97.333(8)°,*V* = 1 313.77(16) Å³,*Z* = 4,*Mr* = 286.27, μ (MoK α) = 0.108 mm⁻¹,*D_c* = 1.447 g·cm⁻³,*F*(000) = 600,最终的偏离因子为 *R* = 0.035 0,*wR* = 0.085 9,分子内和分子间存在氢键,*D* 构型与 *L* 构型通过分子间较强的 π - π 作用形成了外消旋^[10],见图 1,晶胞堆积见图 2。结构鉴定表明樱花素样品的结构为 *DL*-5,4'-二羟基-7-甲氧基二氢黄酮,见图 3。

表 2 樱花素的核磁共振数据 (400 MHz, CDCl₃)

Table 2 NMR data of sakuranetin (400 MHz, CDCl₃)

位置	δ_C	δ_H	DEPT	COSY	HMQC (H→C)	HMBC (C→H)
2	79.0	5.35 dd (2.8, 13.2)	CH	3.10	C-2	3.10, 7.33
3	43.2	2.79 dd (2.8, 17.2) 3.10 dd (13.2, 17.2)	CH ₂	3.10 5.35, 2.79	C-3	-
4	196.2	-	C	-	-	3.10, 2.79
5	164.1	-	C	-	-	12.03, 6.05
6	95.1	6.05 d (2.0)	CH	-	C-6	12.03, 6.08
7	168.1	-	C	-	-	12.03, 3.81
8	94.3	6.08 d (2.0)	CH	-	C-8	6.05
9	163.0	-	C	-	-	6.08
10	103.1	-	C	-	-	12.03, 6.08, 6.05, 2.79
1'	130.5	-	C	-	-	6.89
2'	128.0	7.33 d (8.4)	CH	7.33	C-2'	7.33
3'	115.7	6.89 d (8.4)	CH	6.89	C-3'	6.89, 5.35
4'	156.2	-	C	-	-	7.33, 6.89
5'	115.7	6.89 d (8.4)	CH	6.89	C-5'	7.33, 6.89
6'	128.0	7.33 d (8.4)	CH	7.33	C-6'	7.33
7-OCH ₃	55.7	3.81 s	CH ₃	-	7-OCH ₃	3.81
5-OH	-	12.03 s	-	-	-	-
4'-OH	-	5.53 s	-	-	-	7.33

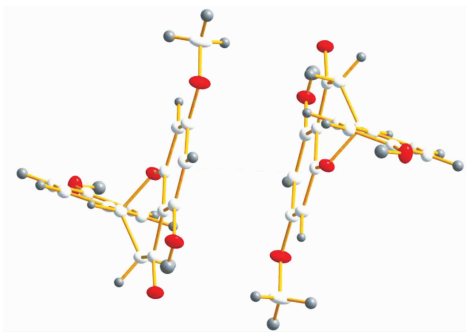


图 1 樱花素 π - π 作用结构

Fig. 1 π - π reaction of sakuranetin

2.3 色谱条件 迪马 Diamonsil-C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m), 流动相 甲醇-水 (60:40), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 288 nm, 进样量 10 μ L。

2.4 样品配制 精密称取樱花素样品 5 mg, 加甲醇溶解, 并定容于 5 mL 量瓶中, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 得到 1 g·L⁻¹ 的样品溶液。按照 2.3 项下色谱条件进行纯度检测。

2.5 薄层鉴别 精密称取样品 5 mg, 加甲醇 0.25 mL 溶解, 制成 20 g·L⁻¹ 的样品溶液。以定量毛

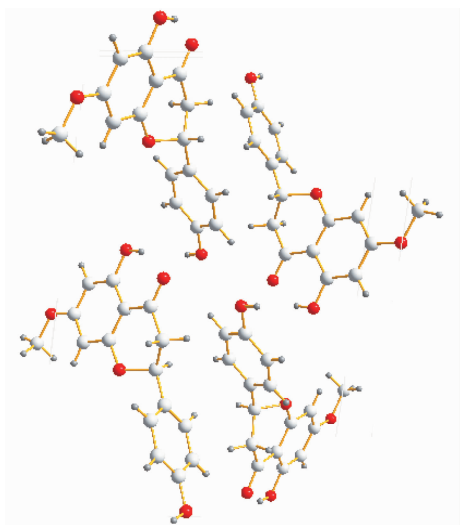


图 2 樱花素的晶胞堆积

Fig. 2 Crystal stacking diagram of sakuranetin

细管吸取 20, 40, 60, 80, 100 μ g 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-三氯甲烷-丙酮-甲酸 (10:8:2:0.1), 甲苯-乙酸乙酯-甲酸 (10:2:1), 石油醚-乙酸乙酯 (2:1) 为展开剂, 分别展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 磷钼酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。样品溶液在薄层色谱板上, 仅显示唯一的灰黄色斑点,

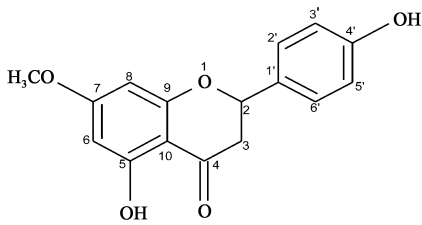


图 3 樱花素结构

Fig. 3 Structure of sakuranetin

Rf 值分别为 0.58, 0.65, 0.56, 未见其他杂质的斑点, 说明该样品的纯度较高。

2.6 均匀性检验 按照 GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3) 标准样品《定值的一般原则和统计方法》第 7 章均匀性研究^[8]的要求进行。采用的是随机顺序重复测量的方法, 从分装后的 400 瓶样品中随机抽取 15 瓶样品 ($> 1.5 \sqrt[3]{N}$), 按 3 种程序分别从每瓶中称取 3 份 1.0 mg 的样品, 每份样品加甲醇溶解, 并定容至 5 mL 量瓶中, 进行 HPLC 分析。第 1 次抽样 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 号瓶; 第 2 次抽样 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 号瓶; 第 3 次抽样 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 号瓶。按照 2.3 项下色谱条件对每个样品进行测定, 用峰面积归一化法计算纯度, 然后用方差分析法进行均匀性检验。结果见表 3, 4。

表 3 樱花素标准样品的均匀性检验

瓶号	第 1 份	第 2 份	第 3 份	平均值	总平均值
1	99.98	99.98	99.97	99.98	
2	99.97	99.97	99.97	99.97	
3	99.97	99.98	99.98	99.98	
4	99.98	99.98	99.98	99.98	
5	99.96	99.97	99.96	99.97	
6	99.97	99.97	99.97	99.97	
7	99.97	99.97	99.96	99.97	
8	99.96	99.98	99.97	99.97	99.97
9	99.97	99.97	99.97	99.97	
10	99.98	99.97	99.97	99.97	
11	99.98	99.97	99.98	99.98	
12	99.97	99.98	99.97	99.97	
13	99.97	99.98	99.98	99.98	
14	99.97	99.97	99.97	99.97	
15	99.97	99.97	99.98	99.97	

表 4 樱花素样品均匀性检验的方差分析

Table 4 Variance analysis of homogeneity test of CRM of sakuranetin

变差源	SS	f	MS
瓶间	0.000 564 4	14	0.000 040 32
瓶内	0.001 067	30	0.000 035 66
总和	0.001 631	44	

采用 F 检验确定樱花素的均匀性数据符合正态分布, 从方差分析数据可见, 以 v_1 (即组间) = 14 及 v_2 (即组内) = 30 查 F 界值表, 得 $F_{0.05}(14, 30) = 2.037$, 由于 $F = MS_{\text{间}}/MS_{\text{内}} = 1.134 < F_{0.05}(14, 30)$, 所以在 95% 的置信区间内, 样品的均匀性良好。

瓶间方差用下式计算:

$$s_A^2 = \frac{MS_{\text{间}} - MS_{\text{内}}}{n_0} = \frac{0.000 040 32 - 0.000 0356 6}{3} = \frac{0.000 004 66}{3} = 0.000 001 6$$

瓶间标准偏差 $u_{bb} = s_{bb}$:

$$s_{bb} = \sqrt{0.000 001 6} = 0.001 \%$$

2.7 稳定性检验 标准样品的稳定性是用来描述标准样品的特性值随时间的变化。取本标准样品模拟市售包装, 进行 0 ~ 8 °C 的条件下放置 24 个月的稳定性检验, 分别于 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24 个月时随意抽取 3 个样品, 按照 2.3 项下色谱条件进样测定, 用峰面积归一化法求出纯度。结果见表 5。

表 5 樱花素样品稳定性检验

时间/月	第 1 份	第 2 份	第 3 份	平均值	标准偏差
0	99.98	99.98	99.97	99.98	0.01
1	99.96	99.97	99.96	99.96	0.01
2	99.97	99.98	99.97	99.97	0.01
3	99.98	99.98	99.98	99.98	0.00
6	99.98	99.98	99.97	99.98	0.01
9	99.98	99.97	99.97	99.97	0.01
12	99.98	99.98	99.98	99.98	0.00
18	99.98	99.98	99.96	99.97	0.01
24	99.98	99.96	99.97	99.97	0.01

注: 性状均为无色针状结晶。

从数据看出, 每次测得的平均值在测定时间内没有随时间的变化而明显的升高或降低, 同时根据 GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3)《标准样品定值的一般原则和统计方法》的规定, 笔者以直线模型作为经验模型, 采用 t 检验和 F 检验对稳定性检验获得的数据进行分析。

t 检验:

$$\text{斜率: } b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{-0.05}{550} = -0.000\ 090\ 9\%$$

式中: $\bar{Y} = 99.97\%$, $\bar{X} = 8.33$

截距由下式计算:

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} = 99.97\%$$

直线上的点的标准偏差可由下式计算:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n - 2} = \frac{0.000\ 546}{7} = 0.000\ 078$$

取其平方根 $s = 0.008\ 831\%$, 与斜率相关的不确定度用下式计算:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = \frac{0.008\ 831}{\sqrt{550}} = 0.000\ 377\%$$

自由度为 $n - 2$ 和 $P = 0.95$ (95% 置信水平) 的 *t* 因子等于 2.37。

$$|b_1| = 0.000\ 090\ 9\% < t_{0.95, n-2} \times s(b_1) = 0.000\ 89\%$$

故斜率是不显著的, 说明该标准样品在 24 个月内未观测到不稳定性。

F 检验: 稳定性检验数据 (0 ~ 24 个月) 经线性拟合, 得到表 6 的结论。

表 6 线性回归的方差分析

Table 6 Variance analysis of linear regression

差异来源	SS	<i>f</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
回归分析	0.000 005	1	0.000 005	0.080	0.784 8
残差	0.000 395	7	0.000 056		
总计	0.000 4	8			

从表 6 数据看, 在测定时间内 (24 个月) 直线回归方程的拟合度较好。经直线回归的方差分析得到 $F = 0.080$ 小于方差分析临界值 $F_{0.05}(1, 7) = 5.59$ 。稳定性检验的不确定度: $u_{11s} = s_b \times t = 0.000\ 377\% \times 24 = 0.01\%$, 表明在 0 ~ 8 °C 的条件下保存 2 年仍稳定。

2.8 定值分析 按照 GB/T 15000.3-2008 规定, 采用多个实验室协作定值, 选择获得国家或者部门认可、具备资质的 8 家实验室进行定值。随机抽取 16 瓶样品, 每个实验室送 2 瓶, 按照 2.3 项下色谱条件, 每瓶重复测定 3 次, 共 6 次, 应用峰面积归一化法进行定量, 结果见表 7。

表 7 8 家实验室定值数据汇总

Table 7 Eight laboratories certification data

实验室编号	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次	平均值	标准偏差	RSD
1 ¹⁾	99.978	99.966	99.967	99.970	99.970	99.966	99.97	0.005	0.005
2	99.98	99.99	100.00	99.96	94.94	99.94	99.97	0.026	0.026
3	99.93	99.94	99.96	99.94	99.95	99.94	99.94	0.010	0.010
4 ²⁾	99.978	99.980	99.982	99.978	99.981	99.982	99.98	0.002	0.002
5	99.94	99.95	99.95	99.96	99.94	99.95	99.95	0.008	0.008
6	99.95	99.95	99.97	99.98	99.98	99.96	99.97	0.014	0.014
7	99.96	99.98	99.98	99.97	99.97	99.97	99.97	0.008	0.008
8	99.97	99.98	99.98	99.97	99.98	99.98	99.98	0.005	0.005

注: 1, 4 号实验室测定样品取小数点后三位, 是为了使定值结果通过检验。

表 7 中, 8 家实验室的数据, 采用格拉布斯 (Grubb's) 检验法进行检验, 各实验室的数据均未发现异常值, 呈正态分布, 符合 GB/T 15000.3-2008 统计计算的规定。采用峰度法检验各家实验室数据的正态性, 均没有检出异常值。然后再用 Grubb's 法对每家实验室的平均值进行检验, 将其看成一组测定值进行异常值检验, 结果无异常值, 因此将各家实验室的数据作为无偏估计值, 对表 7 的数据进行方差分析, 结果见表 8。计算加权平均值作为定值结果, 总平均值为 $\bar{x} = 99.97\%$ 。

表 8 8 家实验室测定数据方差分析

Table 8 Analysis of variance of 8 laboratories certification data

变源差	SS	<i>f</i>	MS
组间	0.007 128	7	0.001 018
组内	0.005 587	40	0.000 14
总和	0.012 72	47	

2.9 定值结果的不确定度评定 根据 GB/T 15000.3-2008 规定, 定值结果由标准值和不确定度组成。标准样品特性标准值的测量不确定度 u_{CRM} 由测定得到的标准值的不确定度 $u(\bar{x})$, 均匀性检验的

不确定度 u_{bb} 和稳定性检验的不确定度 u_{lis} 组成。

依据全部测定结果,计算樱花素标准样品的特性标准值: $S(\bar{x})$ (总平均值的标准偏差) 为 0.02%, S_r (实验室内重复性标准偏差) 为 0.07%, S_L (实验室间再现性标准偏差) 为 0.06%, $u(\bar{x})$ (总平均值的不确定度值) 为 0.004%。

3 结论与讨论

按照加权法计算得到标准样品 8 家实验室定值结果的不确定度 $u(\bar{x}) = 0.004%$; 根据 GB/T 15000-94 标准样品工作导则(5)《化学成分标准样品技术通则》中“固体化学成分标准样品技术通则”^[11] 规定,均匀性检验引起的标准不确定度为瓶间标准偏差 $u_{bb} = 0.001%$; 24 个月稳定性检验数据的不确定度为 $u_{lis} = 0.01%$ 。取包含因子 $k = 2$, 则标准样品定值的相对扩展不确定度:

$$\begin{aligned} u_{CRM} &= k \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lis}^2} \\ &= 2 \sqrt{(0.004)^2 + (0.001)^2 + (0.01)^2} \\ &= 0.02\% \end{aligned}$$

所以,樱花素标准样品的纯度为 99.97%, 相对扩展不确定度为 0.02%。

研制的樱花素标准样品经实验考察,均匀性,24 个月的稳定性均符合要求,定值结果为 99.97%, 不确定度为 0.02%, 达到了天然产物国家标准样品的研制要求,已通过了专业工作组的专家验收。本标准样品可用于樱花素含量测定、检测方法评定、相关产品的检测与质量控制,对樱花素相关产品等方面的检测和科学研究提供了技术支撑和量值溯源保证,研制的樱花素国家标准样品,具有创新性。

[参考文献]

[1] 刘海萍, 巢志茂, 吴晓毅, 等. 毛白杨化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10):1422-1425.
[2] 陈佩东, 梁敬钰. 山杨的化学成分研究[J]. 中草药, 2006, 37(6):816-818.

[3] Wollenweber E, Egger K. Flavonoid-aglikone im knospen-exkret von betula ermani [J]. Z Pflanzenphysiol, 1971, 65(5):427-431.
[4] Mata R, Crisanto D, Pereda-Miranda R, et al. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, X VIII. New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa* [J]. J Nat Prod, 1991, 54(3):913-917.
[5] Rojas A, Cruz S, Ponce-Monter H. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa* [J]. Planta Medica, 1996, 162(2):154-159.
[6] Molnar J, Engi H, Hohmann J. Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants [J]. Curr Top Med Chem, 2010, 10(17):1757-1768.
[7] Periniil A, Grecco S, Prado C M, et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model [J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(7):1736-1749.
[8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 国家技术监督局. GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3) 标准样品定值的一般原则和统计方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
[9] ZHANG X F, HUNG T M, Phuong P T, et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana* [J]. Arch Pharm Res, 2006, 29(12):1102-1108.
[10] LIU H P, CHAO Z M, WU X Y, et al. Isolation, crystal structure, and anti-inflammatory activity of sakuranetin from *Populus tomentosa* [J]. Chin J Struct Chem, 2013, 32(2):173-178.
[11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 国家技术监督局. GB/T 15000-94 标准样品工作导则(5) 化学成分标准样品技术通则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[责任编辑 顾雪竹]