

文章编号: 1674-7054(2014)04-0400-05

紫外-可见分光光度法测定沉香中 色酮成分的含量

杨锦玲^{1,2} 梅文莉¹ 余海谦¹ 左文健¹ 戴好富¹

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/海南省沉香工程技术研究中心, 海南 海口 571101;

2. 海南大学 园艺园林学院, 海南 海口 570228)

摘要: 建立沉香中色酮类化合物总含量测定方法, 首次利用紫外分光光度计对 11 批沉香乙醇提取物进行测定。结果表明, 该方法精密性、重复性、稳定性和加样回收率均达到要求, 11 批沉香样品中色酮含量范围为 4.5% ~ 27.1%, 根据色酮成分百分含量, 将其分成 3 个等级。该方法简便快速, 为沉香中色酮类成分含量测定和质量评价提供了科学方法。

关键词: 沉香; 色酮类化合物; 紫外分光光度法; 含量测定

中图分类号: R 284.1

文献标志码: A

国产沉香为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 含有树脂的木材, 主产于我国海南、广东等地, 是我国传统的名贵药材^[1-2]。沉香中的特征性成分为 2-(2-苯乙基)色酮类化合物和倍半萜类化合物, 目前已发现了 86 个 2-(2-苯乙基)色酮类化合物, 其中有 42 个 flidersia 类型的色酮, 27 个 5,6,7,8,-四氢-2-(2-苯乙基)色酮, 3 个单环氧-四氢-2-(2-苯乙基)色酮, 3 个双环氧-四氢-2-(2-苯乙基)色酮和 11 个多聚 2-(2-苯乙基)色酮^[3-8]。近年来, 2-(2-苯乙基)色酮类化合物作为沉香真伪鉴别及其质量评价的诊断性成分, 被国内外学者广泛关注, 多种分析方法均被用于分析 2-(2-苯乙基)色酮类化合物, 例如: 梅文莉等根据 flidersia 类型色酮化合物的 EI 质谱数据, 总结出了此类化合物的 EI 质谱特征及裂解规律, 从而可以利用 GC-MS 对样品中的 flidersia 类型 2-(2-苯乙基)色酮化合物的结构进行初步鉴定^[3]; 屠鹏飞等利用 HPLC-MS 总结出了 ESI 源四氢-2-(2-苯乙基)色酮类化合物裂解规律^[9]; Edgard O. Espinoza 等^[10-11]报道了利用 DART-TOFMS 技术, 通过检测样品中是否含有相对分子质量为 349 或 319 的四氢-2-(2-苯乙基)色酮类化合物的离子, 从而达到鉴定沉香真伪的目的, 以及通过检测色酮类化合物的质谱数据特征来区分野生和栽培沉香; 杨德兰等报道奇楠沉香中化合物 2-(2-苯乙基)色酮与 2-[2-(4-甲氧基苯乙基)]色酮的相对含量之和高达 37.30% ~ 84.71%, 建议将这两个 flidersia 类型色酮的相对含量之和作为沉香品质评价的重要参考指标^[12]。笔者首次利用紫外分光光度法测定沉香中色酮类化合物的含量, 以为沉香的质量评价提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料来源 11 批沉香药材收集于海南(表 1), 均由中国热带农业科学院热带生物技术研究所戴好富研究员鉴定, 其沉香原植物均为瑞香科沉香属白木香 *Aquilaria sinensis*。

收稿日期: 2014-08-14

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303117); 海南省重大科技项目(ZDXZ2013013); 海南省自然科学基金项目(313080)

作者简介: 杨锦玲(1990-), 女, 2012 级硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: jinlyang@126.com

通信作者: 戴好富, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 天然产物化学, Tel: (0898) 66961869, Fax: (0898) 66961869, E-mail: daihaofu@itbb.org.cn

表1 沉香样品信息

Tab.1 Description of agarwood samples

样品编号 (No.)	样品描述 (Description of samples)	收集时间 (Collection time)
S1	表面黑褐色, 山峰状, 可见纵向条纹, 密布黑褐色油脂; 较硬, 气香 Black brown surface, peak shaped, longitudinal stripes visible, densely covered with black brown resin, a little bit hard, fragrant	2012-04
S2	表面土黄色, 盔帽状, 密布棕褐色油脂; 干而脆, 气香 Khaki surface, helmet shaped, densely covered with brown resin, dry and fragile, fragrant	2012-04
S3	表面黄白色, 可见纵向条纹, 密布褐色油脂; 质硬, 气香 Yellow white surface, longitudinal stripes visible, densely covered brown resin, hard, fragrant	2012.04
S4	表面黄棕色, 山峰状, 密布棕褐色油脂; 较坚硬, 气香 Yellow brown surface, peak shaped, densely covered with brown resin; a little bit hard, fragrant	2012-04
S5	表面黑褐色, 宽薄片, 密布黑褐色油脂; 干而脆, 气香 Black brown surface, wide slice, densely covered with black brown resin; dry and fragile, fragrant	2012-04
S6	表面黄褐色, 密布褐色油脂; 干而硬, 气香 Yellow brown surface, densely covered with brown resin; dry and hard, fragrant	2012-04
S7	表面土黄色, 散布褐色油脂; 干而硬, 气微香 Khaki surface, sparsely covered with brown resin; dry and hard, a little fragrant	2012-04
S8	表面土黄色, 散布褐色油脂, 树皮; 质轻, 气微香 Khaki of surface, sparsely covered with brown resin, cortex; light, a little fragrant	2012-04
S9	表面土黄色, 斜峰状, 可见纵向条纹, 散布褐色油脂; 较脆, 气微香 Khaki surface, oblique peak shaped, longitudinal stripes visible, sparsely covered with brown resin; a little bit fragile, a little fragrant	2013-04
S10	表面土黄色, 凹凸不平, 密布黑褐色油脂; 干而脆, 气香 Khaki and uneven surface, densely covered with black brown resin; dry and fragile, fragrant	2013-04
S11	表面土黄色, 散布黑褐色油脂, 有虫洞, 中空; 干而脆, 气微香 Khaki surface, sparsely covered with black brown resin, insect bored holes, hollow; dry and fragile, a little fragrant	2013-04

1.2 仪器与试剂 Shimadzu UV-2550 紫外可见分光光度计(Beckman 公司, 美国), Sartorius BP221S 电子天平(塞多利斯公司, 德国), 数显控温电热套(泰斯特仪器有限公司, 天津), N-1000 (2L) 立式旋转蒸发仪(爱朗仪器有限公司, 上海), SHZ-D (III) 循环真空泵(隆拓仪器设备有限公司, 上海), DX-2015 低温循环机(长流科学仪器有限公司, 北京)。乙醇、甲醇均为国产分析纯, 标准品 2-(2-苯乙基) 色酮为本课题组分离, 经 MS 和 NMR 鉴定, HPLC 分析其纯度达到 98%。

1.3 标准品溶液与样品溶液的配制

1.3.1 标准溶液的制备 精确称取 2-(2-苯乙基) 色酮适量, 用甲醇溶液稀释至 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别准确量取 80, 50, 40, 25, 10, 5 μL 于 1 mL 离心管中, 加甲醇至 1 mL, 混匀, 配制成浓度分别为 80, 50, 40, 25, 10, 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液; 再取 100 μL 浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 加甲醇至 1 mL, 混匀, 配制成浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。

1.3.2 样品溶液的制备 取适量药材, 粉碎, 过 40 目筛, 精确称取 1.000 g, 乙醇加热回流提取 2 h, 冷却至室温, 过滤, 浓缩, 重复 2 次, 得到沉香乙醇提取物。将提取物完全溶解于 10 mL 色谱甲醇中, 再取其中 10 μL 溶液稀释至 10 mL 甲醇溶剂中, 配制成沉香粗样浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的待测溶液。

1.4 标准曲线的绘制 制备好的标准溶液用分光光度计于 250 nm 处测定吸光度。以甲醇试剂作为参比, 以质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.5 方法学考察

1.5.1 精密度考察 取同一标准品溶液 在同一条件下连续测定 5 次 250 nm 处吸光值 测得 5 次吸光值分别为 0.984 4 ,0.976 6 ,0.975 2 ,0.982 7 ,0.983 6 ,计算其 RSD 小于 1% ,表明仪器精密度良好 ,符合要求。

1.5.2 稳定性考察 取同一样品溶液 ,分别在 0 ,1 ,2 ,3 ,5 h 测定 250 nm 处吸光值 测得 5 次紫外吸收值分别为 0.986 8 ,0.998 1 ,1.003 8 ,1.018 6 ,1.009 9 ,计算出 5 次吸收值的 RSD 小于 2% ,表明供试品溶液在 5 h 内稳定。

1.5.3 重复性考察 称取同一样品 5 份 ,按 1.3.2 项的方法制备样品 ,测定 250 nm 处吸光值分别为 0.986 8 ,1.028 1 ,1.018 6 ,1.034 9 ,1.003 9 ,计算出 5 次紫外吸收值的 RSD 小于 2% ,符合要求。

1.5.4 回收率试验 分别量取同一沉香样品 5 份 ,按 1.3.2 项的方法制备样品 ,测定其甲醇溶液的紫外吸收值 ;将标准品浓度为 25 μg · mL⁻¹ 的 1 mL 溶液加入到离心管中 ,待溶剂挥干后 ,将测定吸光值后的 1 mL 沉香甲醇溶液转移至离心管中 ,混匀。再测定 250 nm 波长处吸光度 ,并计算回收率。

1.6 样品中色酮类化合物含量测定 制备好的样品溶液用分光光度计于 250 nm 处测定吸光度 ,根据绘制的标准曲线 ,测定样品中色酮类化合物的浓度。

2 结果与分析

2.1 色酮类化合物标准曲线 根据上述不同浓度 2-(2-苯乙基)色酮溶液紫外吸收的测定 ,计算得回归方程为 $Y = 31.407X + 0.263$, $R = 0.999 0$ 。结果表明 ,色酮类化合物浓度在 1 ~ 80 μg · mL⁻¹ 范围内有良好的线性关系(如图 1)。

2.2 回收率试验结果 将已知色酮浓度的样品与已知含量的标样混合后测定 ,计算平均回收率为 98.40% ,RSD 为 2.78% (见表 2)。

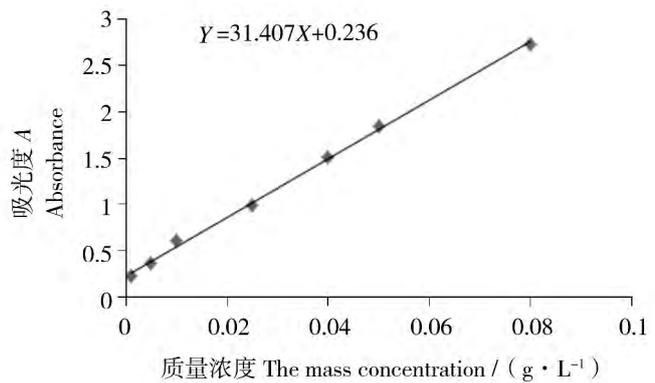


图 1 色酮类化合物标准曲线
Fig.1 The standard curve for chromones

表 2 回收率试验结果
Tab.2 The result of recovery test

序号 No.	样品量 / mg Sample weight	含量 / mg Content	加入量 / mg Amount added	测定量 / mg Amount measured	回收率 / % Recovery	平均值 / % Average value	RSD / %
1	0.100 0	0.026 1	0.025 0	0.0509	99.24		
2	0.1000	0.027 1	0.025 0	0.050 9	95.24		
3	0.100 0	0.026 9	0.025 0	0.051 0	96.52	98.40	2.78
4	0.100 0	0.027 3	0.025 0	0.052 0	98.64		
5	0.100 0	0.026 5	0.025 0	0.052 1	102.36		

2.3 样品中色酮含量测定结果 根据测得的标准曲线 ,分别测定 11 批沉香样品提取物的紫外吸收值 紫外分光光度仪自动计算出样品中色酮类化合物的浓度 ,再手动计算色酮类化合物的百分含量 ,即色酮类化合物的百分含量 = 色酮化合物浓度 / 沉香粗样浓度 × 100% ,其中沉香粗样浓度均为 0.1 g · L⁻¹ ,结果见表 3。根据结果可知 ,11 批沉香样品中色酮类化合物含量在 4.5% ~ 27.1% ,差别较大 ,7 号样品含量最低 ,5 号样品含量最高(见表 3)。根据色酮百分含量 ,可以将 11 个样品相对分为 3 个等级 I ~ III ,1 ~ 5 号和 10 号百分含量 > 20% ,设为 I 等;6、8、9 号和 11 号百分含量为 10% ~ 20% ,设为 II 等;7 号 < 10% ,设为 III 等。

表3 沉香样品中色酮类化合物百分含量的结果
Tab.3 Chromones content of Agarwood samples.

样品 Sample	紫外吸收值 Absorbance of UV	测得色酮浓度/(g·L ⁻¹) Tested concentrations of chromones	色酮百分含量/% Chromones content
1	0.986 8	0.026 0	26.0
2	0.785 5	0.020 7	20.7
3	0.775 5	0.020 5	20.5
4	0.823 0	0.021 7	21.7
5	1.027 8	0.027 1	27.1
6	0.683 3	0.018 0	18.0
7	0.170 6	0.004 5	4.5
8	0.646 9	0.017 1	17.1
9	0.638 4	0.016 9	16.9
10	0.871 6	0.023 0	23.0
11	0.519 0	0.013 7	13.7

3 讨论

笔者通过对7个 *flidersia* 类型色酮 4 个 5,6,7,8,-四氢-2-(2-苯乙基)色酮 2 个单环氧-四氢-2-(2-苯乙基)色酮 以及 2 个双环氧-四氢-2-(2-苯乙基)色酮 进行全波长扫描,发现 4 类色酮总体在 250 nm 处的吸收较好,与文献[9]报道的检测波长接近,故选择 250 nm 作为检测波长。

Fidiersia 类型色酮是沉香 4 类色酮中数量最多的,2-(2-苯乙基)色酮是这类色酮的母核,这类色酮都具有 2-(2-苯乙基)色酮母核的特征,故选择 2-(2-苯乙基)色酮作为标准品进行测定。

2-(2-苯乙基)色酮类化合物的极性属于中等,其中含羟基较多的 5,6,7,8,-四氢-2-(2-苯乙基)色酮极性偏大,乙醚等极性偏低的溶剂不容易将沉香中的色酮类化合物提取完全,而乙醇属于比较广谱的溶剂,且药典^[13]中也规定,沉香浸出物测定法中所用溶剂为乙醇,故选择乙醇作为提取溶剂。

本实验结果表明,紫外分光光度法精密度、稳定性、重复性、加样回收率良好,达到测定要求。2-(2-苯乙基)色酮类成分为沉香中的一类特征性成分,此类化合物具有神经保护等药理活性,也是形成沉香特有香气必不可少的成分。沉香的产地、结香时间和结香方法均会导致其色酮类化合物种类和含量上的差异。通常认为色酮类化合物的含量越高,沉香的质量越好。目前虽然已有一些测定沉香中 2-(2-苯乙基)色酮类成分含量的报道^[9,14],但都是测定其中某类色酮或其中某几个色酮的含量,还未见测定沉香中总色酮含量的报道。紫外分光光度法具有简便快速的特点,所需样品量不大,而且可直接对沉香提取物进行测定,不需要气质联用、液质联用等大型的仪器设备,具有良好的应用前景。笔者采用紫外分光光度法对沉香中的 2-(2-苯乙基)色酮类成分进行含量测定,为沉香中色酮类成分含量测定和质量评价提供了科学方法。

参考文献:

- [1] 梅文莉,杨德兰,左文健,等. 奇楠沉香中 2-(2-苯乙基)色酮的 GC-MS 分析鉴定 [J]. 热带作物学报,2013,34(9): 1819-1824.
- [2] CHEN H Q, WEI J H, YANG J S, et al. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. Chem Biodivers, 2012, 9(2): 236-250.
- [3] MEI W L, YANG D L, WANG H, et al. Characterization and determination of 2-(2-phenylethyl) chromones in Agarwood by GC-MS [J]. Molecules, 2013, 18(10): 12324-12345.
- [4] NAEF R. The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review [J].

- Flavour and Fragrance Journal ,2011 ,26(2) : 73 – 87.
- [5] CHEN H Q , WEI J H , YANG J S , et al. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. Chemistry & biodiversity ,2012 ,9(2) : 236 – 250.
- [6] WU B , KWON S W , HWANG G S , et al. Eight New 2-(2-Phenylethyl) chromone (2-(2-Phenylethyl) -4H-1-benzopyran-4-one) Derivatives from *Aquilaria malaccensis* Agarwood [J]. Helvetica Chimica Acta ,2012 ,95(9) : 1657 – 1665.
- [7] DAI H F , LIU J , ZENG Y B , et al. A new 2-(2-phenylethyl) chromone from Chinese eaglewood [J]. Molecules ,2009 ,14(12) : 5165 – 5168.
- [8] CHEN D , XU Z R , CHAI X Y , et al. Nine 2-(2-Phenylethyl) chromone Derivatives from the Resinous Wood of *Aquilaria sinensis* and Their Inhibition of LPS-Induced NO Production in RAW 264.7 Cells [J]. European Journal of Organic Chemistry ,2012 ,2012(27) : 5389 – 5397.
- [9] LI J , CHEN D , JIANG Y , et al. Identification and quantification of 5 β 7 β -tetrahydro-2-(2-phenylethyl) chromones in Chinese eaglewood by HPLC with diode array detection and MS [J]. J. Sep. Sci. 2013 ,36 ,3733 – 3740.
- [10] LANCASTER C , ESPINOZA E. Evaluating agarwood products for 2-(2-phenylethyl) chromones using direct analysis in real time time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2012 ,26 ,2649 – 2656.
- [11] ESPINOZA E O , LANCASTER C A , KREITZ N M , et al. Distinguishing wild from cultivated agarwood (*Aquilaria spp.*) using direct analysis in real time and time of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2014 ,28:281 – 289.
- [12] 杨德兰,梅文莉,杨锦玲,等. GC-MS 分析四种奇楠沉香中致香的倍半萜和 2-(2-苯乙基)色酮类成分 [J]. 热带作物学报,2014 ,35(6) : 1235 – 1243.
- [13] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010: 172 – 173.
- [14] 陈亚,江滨,曾元儿. 高效液相色谱法测定沉香药材中两种活性成分的含量 [J]. 时珍国医国药,2007 ,18(7) : 1697 – 1698.

Determination of Chromones Content in Agarwood by Using UV Spectrophotometry

YANG Jinling^{1,2} , MEI Wenli¹ , YU Haiqian¹ , ZUO Wenjian¹ , DAI Haofu¹

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Engineering Research Center of Agarwood , Haikou 571101 , China; 2. College of Horticulture and Landscape Architecture , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: A new method for quantitative determination of chromones in Agarwood (*Aquilaria sinensis*) was established by using ultraviolet (UV) spectrophotometry to detect ethanol extracts of 11 Agarwood samples. This method is precise , repeatable and stable and has a good recovery rate for the amount added. The eleven Agarwood samples were divided into three groups based on their chromones content of from 4.5% to 27.1%. The method is simple and quick , and provides a scientific method for determination of chromones content and for quality evaluation of Agarwood.

Key words: Agarwood; chromones; UV spectrophotometry; quantitative determination