

HPLC同时测定沉香中5种色酮含量

杜海芳, 熊礼燕, 林励*, 帅欧, 祁龙凯
(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:通过对沉香中5种色酮的含量测定,建立沉香质量控制方法。方法:采用HPLC法测定沉香中5种色酮含量,采用Waters C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),流速1 mL·min⁻¹,检测波长252 nm,柱温30 ℃,进样量10 μL。结果:色酮A,色酮B,色酮C,色酮D,色酮E{(5S,6R,7R,8S)-2-[2-(4-甲氧基-苯基)乙基]-5,6,7,8-四羟基-5,6,7,8-四氢色酮}分别在7.15~358.00,0.88~44.20,1.54~76.80,1.26~63.20,1.54~77.00 μg与峰面积之间线性关系良好($r > 0.999 0$);精密密度、重复性、稳定性的RSD均<2%,平均加样回收率95.56%~98.82%。结论:该HPLC法可简单、快速、有效测定沉香中5种色酮的含量,可作为沉香质量控制方法。

[关键词] 沉香; 色酮; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0087-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200087

Simultaneous Determination of Five Kinds of Chromone in Aguilariae Lignum Resinatum by HPLC

DU Hai-fang, XIONG Li-yan, LIN Li*, SHUAI Ou, QI Long-kai (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** Through the content determination of the five kinds of chromone in Aguilariae Lignum Resinatum, to establish a method to control Aguilariae Lignum Resinatum quality. **Method:** Determinate five kinds of chromone content by HPLC method, by the Waters C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase was acetonitrile- (A) -0.1% phosphoric acid (B), flow rate was 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 252 nm, the column temperature was 30 ℃, the sample volume was 10 μL. **Result:** The linear ranges of aquilarone B, aquilarone C, aquilarone D, aquilarone E { (5S, 6R, 7R, 8S) -2- [2- (4-methoxy phenyl) ethyl] -5, 6, 7, 8- four hydrox-y-5, 6, 7, 8-four hydrogen chromone } were 7.15-358.00, 0.88-44.20, 1.54-76.80, 1.26-63.20, 1.54-77.00 μg respectively. The RSD of precision, reproducibility and stability tests were less than 2%, the average recoveries were ranged from 95.56% to 98.82%. **Conclusion:** The determination of five kinds of chromone content in Aguilariae Lignum Resinatum by HPLC method is simple and fast, effective. Established a method to determinate five kinds of chromone content in Aguilariae Lignum Resinatum successful. It is provided a reference for Aguilariae Lignum Resinatum quality control.

[Key words] Aguilariae Lignum Resinatum; chromone; content determination; HPLC

沉香具行气止痛、温中止呕、纳气平喘的功效^[1],用治胸腹胀闷疼痛、胃寒呕吐呃逆、肾虚气逆喘急。目前,市场上的沉香伪劣品很多^[2],现行《中国药典》评价沉香质量的定量方法仅见醇浸出物法^[3-4],然而沉香药效成分复杂,仅对醇溶性浸出物含量进行测定,并不能全面的反应沉香的质量情况。

目前,多指标的质量控制模式广泛应用在中药材的质量评价方面。该方法已成功应用于三七、人参等药材的质量控制^[5],目前未见应用于沉香质量控制的研究报道。沉香色酮化合物^[6]具有行气止痛和抗氧化损伤活性,为沉香的特征性成分。为准确评价沉香的质量,本研究拟采用多指标质量控制模式

[收稿日期] 20150305(014)

[基金项目] 国家发改委高新技术产业化项目(国办发2011-51);惠州市科技计划项目(2010B020010005)

[第一作者] 杜海芳,在读硕士,从事中药资源利用与新药开发研究,Tel:18826402465,E-mail:misa2014vip@163.com

[通讯作者] *林励,研究员,博士生导师,从事中药资源利用与新药开发研究,Tel:13802914007,E-mail:LL76611@126.com

对其进行质量控制。建立了同时测定沉香药材中 5 种色酮^[7]含量的测定方法,并对市面上不同来源的沉香药材质量进行考察,以期为沉香药材的质量控制^[8]提供实验依据。

1 仪器与试药

2695 型高效液相色谱仪(包括 2998 型 PDA 检测器,美国 Waters 公司),XS225A 型电子天平($d = 0.0001\text{ g}$,德国 Precisa),BP211D 型电子天平($d = 0.01\text{ mg}$,德国 Sartorius),HH-S4 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),DFY200 型粉碎机(浙江温岭市大德中药机械有限公司),DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),KQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

色酮 A,色酮 B,色酮 C,色酮 D 及色酮 E(5S,6R,7R,8S)-2-[2-(4-甲氧基-苯基)乙基]-5,6,7,8-四羟基-5,6,7,8-四氢色酮对照品均为自制,HPLC 面积归一化法计算,含量均不低于 98.0%。沉香对照药材(S8)购于中国食品药品检定研究院,批号 121222-201102;S1, S2, S6 购于广东广州荔湾区, S3, S11, S12 购于广东茂名电白县, S4, S8 购于北京, S5, S7, S9, S10 分别购于江苏南京玄武区、山西大同新荣区、浙江杭州市、海南海口市。经广州中医药大学中药学院实验中心林励研究员鉴定,均为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* 含有树脂的木材。甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为高纯水。

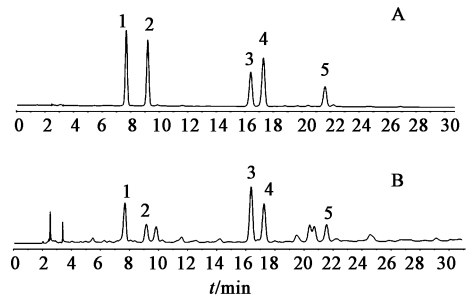
2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液制备 分别精密称取色酮 A,色酮 B,色酮 C,色酮 D 及色酮 E 对照品适量,置于 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀后过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,得质量浓度分别为 358.00,44.20,76.80,63.20,77.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品母液。

2.2 供试品溶液制备 取沉香药材粉末约 2.5 g,精密称定,置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 85% 甲醇 25 mL,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流提取两次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液用甲醇定容至 50 mL,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件及系统适用性 采用 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B),梯度洗脱(0~5 min,13%~22% A;5~7 min,22%~26% A;7~20 min,26%~30% A,20~29 min,30%~13% A),流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 252 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。结果,色酮 A,

色酮 B,色酮 C,色酮 D 及色酮 E 色谱峰均能达到基线分离,分离度 > 1.5 ,拖尾因子均在 0.95~1.05,理论塔板数均 $> 13\ 000$ 。色谱图见图 1。



1. 色酮 D;2. 色酮 C;3. 色酮 A;4. 色酮 E;5. 色酮 B; A. 混合对照品;B. 供试品

图 1 沉香 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Aquilaria sinensis*

2.4 线性关系考察 分别精密量取混合对照品母液 25,12.5,5,2.5,1.25,0.5 mL 置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得系列浓度混合对照品工作液。取工作液,得色酮 A 的质量浓度分别为 7.15,14.30,35.80,71.60,143.20,358.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;色酮 B 的质量浓度分别为 0.88,2.21,4.42,8.84,22.10,44.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;色酮 C 的质量浓度分别为 1.54,3.84,7.68,15.36,38.40,76.80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;色酮 D 的质量浓度分别为 1.26,3.16,6.32,12.64,31.60,63.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;色酮 E 的质量浓度分别为 1.54,3.85,7.70,15.40,38.50,77.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按 2.3 项下的色谱条件进行测定,以各标准品的峰面积积分值(Y)对进样浓度(X, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)进行线性回归,求得回归方程,见表 1。结果表明 5 种色酮在各自浓度范围内线性关系良好。

表 1 5 种色酮的线性关系考察

Table 1 Regression equations with correlation coefficients of five chromones

化合物	回归方程	r	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
色酮 A	$Y = 0.074X + 0.5108$	0.9997	7.15~358.00
色酮 B	$Y = 0.031X + 0.2014$	0.9997	0.88~44.20
色酮 C	$Y = 0.066X - 0.7509$	0.9998	1.54~76.80
色酮 D	$Y = 0.058X - 1.1844$	0.9997	1.26~63.20
色酮 E	$Y = 0.100X + 0.8670$	0.9997	1.54~77.00

2.5 精密度试验 取同一对照品溶液,连续进样 6 次,测定峰面积,结果色酮 A,色酮 B,色酮 C,色酮 D 及色酮 E 的 RSD 分别为 0.5%,0.8%,0.4%,0.6%,0.6%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批次(S5)药材粉末,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,以 2.3 项下的色谱条件进行样品的含量测定,测量峰面积并计算色酮 A、色酮 B、色酮 C、色酮 D 及色酮 E 的含量,得质量分数分别为 1.36,0.10,0.07,0.04,0.87 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.0%,0.5%,1.3%,1.0%,1.6%。表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(S5),分别在 0,2,4,8,16,32 h 进行测定,结果色酮 A,色酮 B,色酮 C,色酮 D 及色酮 E 的 RSD 分别为 1.0%,0.4%,1.2%,1.2%,1.7%,表明供试品溶液在 32 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知 5 种色酮含量的南京药材(S5)约 1.0 g,精密称定,每组平行称定 6 份,并分别精密加入混合对照品溶液 2 mL,按供试品溶液制备方法制备,按 2.3 项下的色谱条件进行测定。并计算 5 种色酮的加样回收率,结果见表 2。

2.9 样品含量测定 按 2.2 项下方法制备 12 批药材的供试品溶液,按 2.3 项下的色谱方法进行测定,结果见表 3。

3 讨论

3.1 样品制备方法考察 对水、纯甲醇和不同浓度甲醇(55%,65%,75%,85%,95%)等不同提取溶剂,不同水浴温度(60,70,80,90,100 $^{\circ}\text{C}$),不同水浴回流时间(0.5,1,1.5,2,2.5 h)进行了考察,结果表明,85%甲醇,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温度,回流 1.5 h,对 5 种色酮的提取率最高,各成分色谱峰峰面积达最大。

3.2 色谱条件考察 考察了 200~400 nm 全波长扫描下色谱图。不同波长下的色谱行为,发现 5 种色酮在 252 nm 下均有很好的吸收,并且基本没有杂质成分干扰,因此,选择 252 nm 作为 5 种色酮的检测波长。经多次试验研究,筛选了适宜的流动相,建立了梯度洗脱方法,大大缩短了分析时间,并可同时定量 5 种色酮。

本研究在预实验的基础上,简化前处理过程,首次使用同一种流动相体系,对 5 种色酮采用梯度洗脱方式,使在同一色谱条件下能够有效分离。通过检测器对样品液相色谱图进行紫外全波长扫描,确定最佳的检测波长;在该检测波长下,5 种色酮均表现出一定的吸收强度。该方法操作简单,避免了多波长检测繁琐操作等难题,精密度、重复性、回收率均达到定量分析要求,为沉香提供了更全面的质控方法。此方法对同一样品中不同的成分同时定量,对中药药材质量评价具有一定的参考意义。

表 2 沉香中 5 种色酮的加样回收率

Table 2 Recoveries for 5 constituents in *Aquilaria sinensis*

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
色酮 A	1.063 5	1.446 4	0.716 0	2.158 7	99.48	98.37	1.3
	1.084 9	1.475 5	0.716 0	2.186 3	99.27		
	0.986 1	1.341 1	0.716 0	2.039 3	97.51		
	0.981 6	1.335 0	0.716 0	2.040 0	98.46		
	1.043 8	1.419 6	0.716 0	2.129 8	99.19		
色酮 B	1.018 7	1.385 4	0.716 0	2.075 1	96.33		
	1.079 6	0.108 0	0.088 4	0.193 5	96.72	97.53	1.5
	1.048 6	0.104 9	0.088 4	0.190 9	97.29		
	0.976 3	0.097 6	0.088 4	0.182 0	95.48		
	0.984 2	0.098 4	0.088 4	0.186 5	99.66		
色酮 C	1.057 3	0.105 7	0.088 4	0.191 6	97.17		
	1.048 2	0.104 8	0.088 4	0.192 2	98.87		
	0.987 1	0.069 1	0.153 6	0.222 1	99.61	98.82	1.0
	0.990 4	0.069 3	0.153 6	0.222 0	99.41		
	1.015 7	0.071 1	0.153 6	0.221 8	98.11		
色酮 D	1.004 9	0.070 3	0.153 6	0.219 6	97.20		
	1.017 9	0.071 3	0.153 6	0.223 3	98.96		
	0.987 1	0.069 1	0.153 6	0.222 1	99.61		
	1.012 5	0.040 5	0.126 4	0.162 9	96.84	95.56	1.2
	0.987 5	0.039 5	0.126 4	0.160 9	96.04		
色酮 E	1.002 5	0.040 1	0.126 4	0.159 9	94.78		
	0.990 0	0.039 6	0.126 4	0.158 9	94.38		
	0.997 5	0.039 9	0.126 4	0.162 2	96.76		
	1.007 5	0.040 3	0.126 4	0.159 8	94.54		
	0.990 7	0.861 9	0.154 0	1.008 4	95.13	97.82	1.5
	1.002 5	0.8722	0.154 0	1.023 2	98.05		
	1.015 6	0.8836	0.154 0	1.036 7	99.42		
	1.007 3	0.8764	0.154 0	1.027 9	98.38		
	0.994 7	0.8654	0.154 0	1.015 7	97.60		
	1.010 8	0.8794	0.154 0	1.030 8	98.31		

从表 3 中可以看出,12 批沉香样品中 5 种色酮的含量有差异,其中以色酮 A 含量最高,其次为色酮 E,其他 3 种成分则含量较低;各成分间相对含量差异较大,即使是相同省份的样品中 5 种色酮含量也存在差异,其中色酮 A 各样品间最高相差 18.4 倍、色酮 D 最高相差 26.0 倍;反映了市售沉香质量的复杂性^[9],广东茂名电白产(S12)沉香样品中 5 种色酮总量达 7.74 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,为 12 批样品中 5 种色酮总含量最高者。研究结果表明,所测商品沉香药

表 3 12 批药材 5 种色酮含量

Table 3 Contents of 5 constituents in *Aquilaria sinensis* mg·g⁻¹

No.	色酮 A	色酮 B	色酮 C	色酮 D	色酮 E	总色酮
S1	1.79	0.06	0.30	0.11	0.52	2.78
S2	3.46	0.21	0.17	0.19	1.12	5.15
S3	0.36	0.21	0.25	0.74	1.22	2.78
S4	2.92	0.13	0.26	0.18	0.92	4.41
S5	1.37	0.10	0.07	0.04	0.86	2.44
S6	1.73	0.19	0.60	0.69	1.34	4.55
S7	0.40	0.14	0.27	0.51	0.79	2.11
S8	1.22	0.22	0.46	0.73	1.49	4.12
S9	0.36	0.05	0.27	0.28	0.74	1.70
S10	1.33	0.20	0.70	1.04	1.36	4.63
S11	1.68	0.19	0.20	0.63	1.56	4.26
S12	6.63	0.15	0.06	0.06	0.84	7.74

材中色酮 A, 色酮 C, 色酮 D 等 3 种化学成分含量差别较大, 其主要原因可能是目前沉香商品来源多为栽培资源, 不同的产地、生态环境、采收年限以及贮藏方式等的影响较大, 因此需要建立沉香药材规范化生产基地, 以保证药材的质量。研究表明可通过五个色酮单体^[10]的含量测定来对沉香进行质量控制。本研究建立了同时定量沉香中 5 种色酮的方法, 方法灵敏度高, 简单可行, 对沉香的质控提供了

方法和依据。

[参考文献]

[1] 汪科元, 梅全喜. 沉香的临床应用近况[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 987-988.

[2] 郭桂明. 名贵中药材沉香的资源现状与真伪鉴别[J]. 北京中医药, 2006, 25(5): 293-294.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 172-173.

[4] 江向东, 粟忠蓉. 沉香质量的快速分析[J]. 中药材, 1996, 19(12): 632-633.

[5] 朱晶晶, 王智民, 匡艳辉, 等. 一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量[J]. 药学学报, 2008, 43(12): 1211-1216.

[6] 陈亚, 江滨, 曾元儿. 沉香色酮类化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2011, 13(1): 21-22.

[7] 刘军民, 徐鸿华. 国产沉香研究进展(I) [J]. 中药材, 2005, 28(7): 627-632.

[8] 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.

[9] 谢海, 熊丽, 肖英华, 等. 沉香及其伪品的比较鉴别[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(9): 803-805.

[10] Chen C T, Yeh Y T, Chao D, et al. Chemical Constituents from the Wood of *Aquilaria sinensis* [J]. Chem Nat Comp, 2013, 49(1): 113-114.

[责任编辑 顾雪竹]