

# 人工沉香中白木香酸与浸出物含量的相关性

周欣<sup>1</sup>, 樊云飞<sup>1</sup>, 雷智东<sup>1,2</sup>, 潘清灵<sup>3</sup>, 钟兆健<sup>1</sup>, 刘岱琳<sup>2</sup>, 章卫民<sup>3</sup>, 高晓霞<sup>1\*</sup>

(1. 广东药科大学药科学院, 广州 510006; 2. 武警后勤学院, 天津 300309;  
3. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏  
与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070)

**[摘要]** 目的:建立高效液相色谱法测定人工沉香中白木香酸含量的方法,研究其白木香酸与浸出物含量之间的相关性。方法:按 2015 年版《中国药典》一部进行醇溶性浸出物的含量测定;采用 CNW Athena C<sub>18</sub>-WP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(40:60),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 217 nm,柱温 35 °C。结果:白木香酸线性范围 0.24 ~ 24 mg·L<sup>-1</sup>(*r* = 0.999 7),精密度(RSD)0.4%,24 h 内稳定性 RSD 0.9%,白木香酸的平均质量分数为 27.86 μg·g<sup>-1</sup>,平均回收率 96.4%,RSD 2.8%。结论:高效液相法可准确测定人工沉香中白木香酸的含量,所选结香方式中综合法的白木香酸平均含量最高,且白木香酸的含量随着浸出物含量的增加而增加,结合白木香酸与浸出物含量的相关性,可为人工沉香的质量评价提供依据。

**[关键词]** 人工沉香;白木香酸;浸出物;高效液相法;含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0055-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110055

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160415.0946.006.html>

**[网络出版时间]** 2016-04-15 9:46

## Correlation Between Agaropiric Acid and Extract Contents in Artificial Aquilariae Lignum Resinatum

ZHOU Xin<sup>1</sup>, FAN Yun-fei<sup>1</sup>, LEI Zhi-dong<sup>1,2</sup>, PAN Qing-ling<sup>3</sup>, ZHONG Zhao-jian<sup>1</sup>,  
LIU Dai-lin<sup>2</sup>, ZHANG Wei-min<sup>3</sup>, GAO Xiao-xia<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, China;

2. Logistics College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300309, China;

3. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of agaropiric acid in artificial agarwood and study the correlation between agaropiric acid and extract contents. **Method:** The content of ethanol-soluble extract was determined according to those correlative standards of Aquilariae Lignum Resinatum in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 Version); HPLC was done on CNW Athena C<sub>18</sub>-WP column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (40:60) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>.

**[收稿日期]** 20150813(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102418);广东省自然科学基金项目(2014A030313583);广东省科技计划项目(2012A030100014);广东省质量技术监督局标准制修订计划项目(粤质监标函[2012]676号);广东省科学院分析测试基金项目(S212906)

**[第一作者]** 周欣,硕士,实验师,从事药物分析研究,Tel:020-39352136,E-mail:zhouxin0316@163.com

**[通讯作者]** \*高晓霞,博士,副教授,从事中药制剂质量控制研究,Tel:020-39352136,E-mail:gaoxia91@163.com

The detection wavelength was set at 217 nm and the column temperature was 35 °C. **Result:** The linear range of agaropiric acid was 0.24-24 mg · L<sup>-1</sup> ( $r=0.9997$ ). RSD was 0.4% for precision degree and 0.9% for stability within 24 h, the average mass fraction of agaropiric acid was 27.86 μg · g<sup>-1</sup>, and its average recovery rate was 96.4% with RSD of 2.8%. **Conclusion:** This HPLC method is accurate for determination of agaropiric acid content. The average content of agaropiric acid was highest in comprehensive way, and the content of agaropiric acid is increased with the increase of ethanol-soluble extract content. This correlation can provide the relativity of contents between the ethanol-soluble extract and agaropiric acid, and provide a reference for quality evaluation of artificial agarwood.

**[Key words]** artificial *Aquilariae Lignum Resinatum*; agaropiric acid; ethanol-soluble extract; HPLC; content determination

国产沉香为瑞香科植物白木香含树脂的木材<sup>[1]</sup>,白木香为我国特有的热带及亚热带常绿乔木,是我国生产沉香的唯一植物资源,现已被列为国家二级濒危保护植物<sup>[2]</sup>,当白木香树干在受到损伤和外界刺激的情况下会在伤口处形成树脂,白色木材逐渐转化为黄褐色或黑褐色,这种含树脂的药材即为沉香<sup>[3]</sup>。沉香作为“十大广药”之一,属道地药材,其具有行气止痛、纳气平喘、温中止呕的功效<sup>[4]</sup>。由于天然沉香的形成具有偶然性且周期较长,为了满足沉香的市场需求,人们尝试采用人工方式诱导白木香产生沉香,应用新的无创伤人工造香技术“小孔滴注法”进行白木香物理法、化学法和生物法的人工造香试验<sup>[5]</sup>。

沉香树脂中的主要化学成分为挥发油和 2-(2-苯乙基)色酮类,其中挥发油中主要含有苜基丙酮、对甲氧基苜基丙酮等芳香族成分和白木香醇、异白木香醇、去氢白木香醇、白木香醛、白木香酸等倍半萜类成分<sup>[6-8]</sup>。2015 年版《中国药典》一部<sup>[1]</sup>中以醇溶性浸出物的含量及指纹图谱作为沉香质量的主要评价指标,已有报道建立了沉香中芳香族化合物苜基丙酮含量的测定方法<sup>[9]</sup>,但其结果与浸出物含量之间无相关性关系,所以苜基丙酮不能作为沉香质量评价的指标性成分<sup>[10]</sup>。倍半萜类成分是沉香中主要的药效成分,药理学实验证明该类化合物对神经系统有明显的生理活性<sup>[11]</sup>。目前几乎所有沉香样品中均能检测出特征性成分白木香醛,且含量较高<sup>[5]</sup>,但由于白木香醛不稳定,在空气中易被氧化生成白木香酸,白木香酸是沉香中倍半萜类成分的代表,故选择沉香中白木香酸的含量作为指标进行测定。本文通过对不同结香方式的人工沉香中白木香酸含量进行测定,探讨白木香人工结香过程中白木香酸与浸出物含量之间的相关性,为全面评价沉香药材质量提供参考。

## 1 材料

CBM-20A 型高效液相色谱仪(包括四元梯度泵,自动进样系统,柱温箱,Chem32 化学工作站,日本 Shimadzu),AUW-220D 型电子分析天平(日本岛津),HH-S4 型数显恒温水浴锅(常州普天仪器制造有限公司),SB-4200DTS 型双频超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),4G010480 型有机相针式过滤器(上海安谱科学仪器有限公司)。

白木香酸对照品为本课题组从国产沉香 *Aquilaria sinensis* 中分离得到,经 HPLC 面积归一化法计算,纯度 98.6%;甲醇和乙腈为色谱纯,磷酸、无水碳酸钠、盐酸、乙酸乙酯等均为分析纯。

人工沉香药材制备包括 4 种方法,①物理法:采用钻洞和灼伤方式;②化学法:采用滴加 1% 甲酸<sup>[5]</sup>和“甲酸 + 磷酸二氢钠”的方式;③生物法<sup>[5]</sup>:采用加入葡萄座腔菌(*Botryosphaeria rhodina* A13)和稻黑孢菌(*Nigrospora oryzae* A8)的方式;④综合法:采用加入“甲酸 + 镰刀菌(*Fusarium* sp. A2)”、“甲酸 + 葡萄座腔菌”、“甲酸 + 稻黑孢菌”、“甲酸 + 红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina* M71)”方式,得到共 24 个样品,样品信息见表 1。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件及系统适应性试验** CNW Athena C<sub>18</sub>-WP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(40:60),流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 217 nm,进样量 20 μL,柱温 35 °C,分析时间 30 min。在上述色谱条件下,理论塔板数按白木香酸峰计算不低于 7 500,白木香酸峰与相邻色谱峰的分离度 > 1.5,结果见图 1。

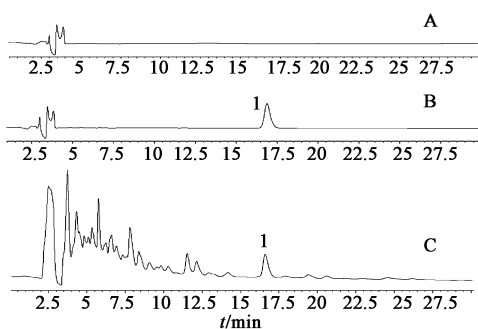
### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液** 精密称取白木香酸对照品适量,用甲醇制成质量浓度为 120 mg · L<sup>-1</sup> 的白木香酸储备液。

表 1 人工沉香样品信息及质量分数测定 (n=3)

Table 1 Information of Aquilariae Lignum Resinatum agarwood samples and results of determination (n=3)

No.	结香方式		收集时间	造香时间 /d	样品量 /g	浸出物 /%	白木香酸 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
1	物理法	钻洞	2007-12-03	-	0.200 2	7.7	2.85	
2			2008-12-01	-	0.201 0	11.7	3.86	
3		灼伤	2008-12-01	-	0.200 5	4.8	7.04	
4			2010-12-15	-	0.201 1	5.3	8.4	
5	化学法	甲酸 1%	2010-12-15	-	0.201 0	10.3	7.41	
6			2011-12-16	-	0.203 1	20.3	18.48	
7		甲酸 + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2011-12-16	-	0.200 5	6.1	4.27	
8			2011-01-09	-	0.200 4	8.6	3.22	
9		生物法	A13	2010-06-12	12	0.201 2	15.1	27.86
10				2011-12-16	30	0.201 0	44.9	4.22
11			A8	2010-06-12	12	0.201 2	5	6.24
12				2011-12-16	30	0.200 2	12.3	2.2
13	综合法	甲酸 + A2	2010-06-12	12	0.199 9	10.1	3.83	
14			2010-12-15	18	0.202 0	14.2	19.87	
15		2011-12-16	30	0.202 0	15	53.36		
16		甲酸 + A13	2010-06-12	12	0.199 8	5.5	6.74	
17			2010-12-15	18	0.199 8	10.2	7.27	
18		2011-12-16	30	0.199 7	19.7	34.3		
19		甲酸 + A8	2010-06-12	12	0.200 0	11.1	6.36	
20			2010-12-15	18	0.206 6	17.2	8.62	
21	2011-12-16		30	0.200 3	19.9	16.29		
22	甲酸 + M71		2010-6-12	12	0.201 5	5.2	2.64	
23		2010-12-15	18	0.199 8	6.4	5.66		
24	2011-12-16	30	0.201 1	12.7	8.25			



A 空白溶剂; B 对照品; C 样品; 1. 白木香酸

图 1 沉香 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of artificia Aquilariae Lignum Resinatum sample

**2.2.2 供试品溶液** 取沉香药材粉末(过 40 目筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙酸乙酯 10 mL,密塞,摇匀,精密称定,超声处理

(功率 200 W,频率 40 kHz) 90 min,放冷,用乙酸乙酯补足减失的质量,摇匀,滤过,滤液置分液漏斗中,取 5% 碳酸钠溶液振摇提取 3 次,每次 10 mL,合并碳酸钠溶液;加入适量 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸调节 pH 至 9.0 后置于分液漏斗中,取乙酸乙酯振摇萃取 2 次,每次 20 mL,合并乙酸乙酯溶液;再次加入适量 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸调节 pH 至 1.0,取乙酸乙酯振摇萃取 3 次,每次 15 mL,合并乙酸乙酯液;置 80 °C 水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 1 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

**2.3 方法学考察**

**2.3.1 线性关系的考察** 精密量取 2.2.1 项下对照品储备液适量,用甲醇制成质量浓度分别为 0.24,1.2,6.0,12,24 mg·L<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液,按

2.1 项下色谱条件测得峰面积,并以峰面积为纵坐标,对照品溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $Y=40\ 767X-6\ 903.4$  ( $r=0.999\ 7$ ),白木香酸在  $0.24\sim 24\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  线性关系良好。

2.3.2 精密度试验 取同一批沉香样品粉末(编号 9) 0.2 g,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,白木香酸峰面积精密度(RSD) 0.4% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取 2.3.2 项下同一批沉香样品(编号 9),按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,6,8,12,24 h 按 2.1 项下色谱条件进样测定,白木香酸峰面积的 RSD 0.9%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批沉香样品粉末(编号 9) 6 份,每份约 0.2 g,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,白木香酸的平均质量分数为  $27.86\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD 3.0%。

2.3.5 加样回收率试验 取已知含量的同一批沉香样品 6 份(编号 9),每份约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入对照品溶液(含白木香酸  $3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1.0 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 人工沉香中白木香酸的加样回收试验

Table 2 Recovery test results of agaropiric acid in agawood

称样量 /g	样品中量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.094 8	2.641	5.576	97.8		
0.102 5	2.856	5.704	94.9		
0.100 6	2.803	5.783	99.3	96.4	2.8
0.097 9	2.727	5.598	95.7		
0.104 2	2.903	5.855	98.4		
0.102 7	2.861	5.623	92.1		

注:加入量均为  $3.000\ \mu\text{g}$ 。

2.4 样品测定 取各批沉香样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液。按 2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,计算各样品中白木香酸的含量,结果见表 1。

### 3 讨论

3.1 提取方法和流动相的选择 分别考察了不同溶剂提取样品中的白木香酸,三氯甲烷提取效果最好,乙酸乙酯其次,然后是乙腈和石油醚。综合考虑

提取效率及试剂毒性,选择乙酸乙酯作为提取溶剂。另外白木香酸分子结构中含有一个羧基,故尝试用“碱溶酸沉”法提取。流动相分别考察了甲醇-水,乙腈-水,甲醇-水(0.5% 甲酸),甲醇-水(0.1% 磷酸),乙腈-水(0.1% 磷酸),乙腈-水(0.1% 三氟乙酸)等流动相系统的分离效果。结果表明,采用乙腈-水(0.1% 磷酸)作为流动相出峰时间较短,且峰形较好。同时还考察了乙腈-水(0.1% 磷酸)不同体积比流动相的出峰情况,最终确定乙腈-水(0.1% 磷酸)(40:60)作为流动相。

3.2 不同结香方式人工沉香中浸出物和白木香酸含量相关性分析 24 批人工沉香的浸出物按照 2015 年版《中国药典》一部要求,物理法中 1,3,4 号样品,化学法中 7,8 号样品,生物法中 11 号样品,综合法中 16,22,23 不符合浸出物含量不得低于 10% 的要求,这主要跟结香时间较短及造香方法选择有关。

人工沉香中白木香酸含量总体变化范围较大( $2.64\sim 53.36\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),对不同结香方式的人工沉香中白木香酸的含量进行分析,结果显示,其平均含量由高到底排列依次为综合法、生物法、化学法、物理法,见图 2,说明采用综合法的方式进行人工结香最优。比较分析 4 种综合法人工沉香样品中白木香酸含量和醇溶性浸出物的关系发现,甲酸 + A2,甲酸 + A13,甲酸 + A8,甲酸 + M71 的模式图较接近,浸出物与白木香酸含量都呈现相同趋势变化,见图 3,说明不管采用综合法中哪种方法进行造香,都能保持白木香酸含量与浸出物呈正比关系,且白木香酸含量随着浸出物含量的增加而增加。同时再对综合法中 4 种方法得到的浸出物与白木香酸含量分别进行比较发现,4 种方法得到的人工沉香浸出物平均含量比较接近,但是甲酸 + A2 此方法得到的白木香酸含量要高于其他 3 种方法,说明该方法可广泛应用于人工沉香的栽培中,见图 4。上述分析表明,白木香酸含量和浸出物含量等考察指标可用于评价人工沉香质量。

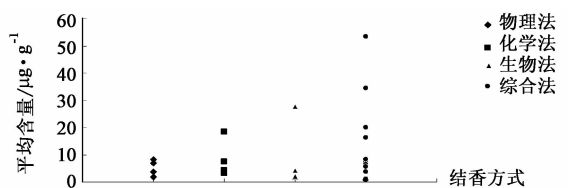
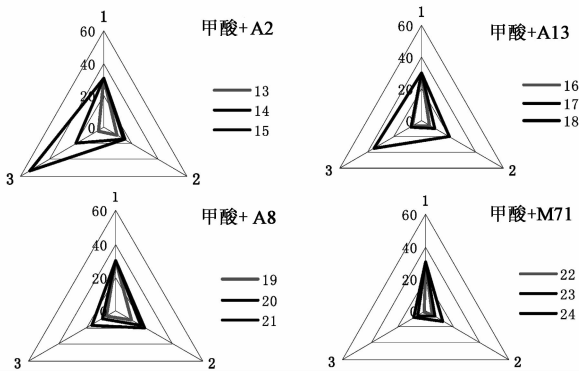


图 2 不同结香方式人工沉香样品中白木香酸含量比较

Fig. 2 Comparison of agaropiric acid content in agawood of different making ways



1. 结香方式;2. 浸出物含量;3. 白木香酸含量

图 3 人工沉香不同综合法中浸出物与白木香酸含量的相关性  
Fig. 3 Pattern of making way, ethanol-soluble extraction and agaropiric acid content in agawood of using comprehensive way

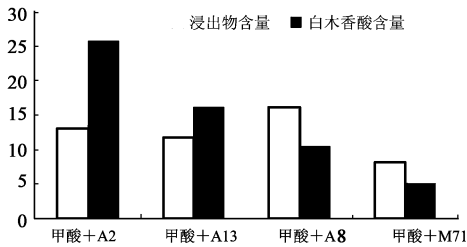


图 4 人工沉香中 4 种综合法浸出物与白木香酸含量比较  
Fig. 4 Comparison of ethanol-soluble extraction and agaropiric acid content in agawood of four methods in comprehensive way

[参考文献]

[ 1 ] 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,2015:185.  
[ 2 ] 中国科学院植物研究所. 中国植物红皮书——稀有濒危植物[M]. 北京:科学出版社,1992:670-671.

[ 3 ] 梅文莉,左文健,杨德兰,等. 沉香结香机理、人工结香及其化学成分研究进展[J]. 热带作物学报,2013, 34(12):2513-2520.  
[ 4 ] 田燕泽,秘效媛,朴香兰. 沉香的化学成分、药理活性与临床应用研究进展[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2010,19(1):77-81.  
[ 5 ] Gao X X, Xie M R, Liu S F, et al. Chromatographic fingerprint analysis of metabolites in natural and artificial agarwood using gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometric methods [ J ]. J Chromatography B,2014,967:264-273.  
[ 6 ] Tian J J, Gao X X, Zhang W M, et al. Molecular identification of endophytic fungi from Aquilariae lignum Resinatum and artificial agarwood induced bu pinholes-infusion technique[J]. Afr J Biotechnol,2013,12(21): 3115-3131.  
[ 7 ] 田佳佳,郭晓玲,赖林城,等. 国产沉香醇浸膏挥发油成分分析[J]. 时珍国医国药,2009,20(10): 2505-2507.  
[ 8 ] 郭晓玲,田佳佳,高晓霞,等. 不同产区沉香药材挥发油成分 GC-MS 分析[J]. 中药材,2009,32(9): 1354-1358.  
[ 9 ] 王凌,季申. 气相色谱法测定进口沉香中苯基丙酮的含量[J]. 中草药,2003,34(3):37-39.  
[ 10 ] 高晓霞,周伟平,钟兆健,等. 沉香中苯基丙酮与浸出物含量相关性研究[J]. 中药材,2012,35(6): 919-924.  
[ 11 ] 李红念,梅全喜,林焕泽,等. 沉香的化学成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药房,2011,22(35):3349-3350.

[责任编辑 顾雪竹]