

人工诱导结香技术所产沉香的质量评价

陈媛, 晏婷婷, 尚丽丽, 王茜, 李改云

(中国林科院木材工业研究所, 北京 100091)

摘要: 选取不同产地的10批次偏心灌注法人工沉香样品进行质量评价, 并与利用火钻方式结香4年的人工沉香样品进行对比。结果显示: 所选10批次人工诱导沉香样品均符合LY/T 2904-2017《沉香》的要求, 沉香样品品质稳定, 色酮类化学成分与火钻方式结香4年的人工诱导沉香样品相近。

关键词: 沉香; 偏心灌注法; 结香技术; 气相色谱-质谱(GC-MS)成分分析; 高效液相色谱(HPLC)分析; 质量评价
中图分类号: S781; TS67 文献标识码: A 文章编号: 1001-8654(2018)06-0018-05

Quality Evaluation of Agarwood Produced with Cultivated Agarwood-Inducing Technology

CHEN Yuan, YAN Ting-ting, SHANG Li-li, WANG Qian, LI Gai-yun

(Research Institute of Wood Industry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: To evaluate the quality of agarwood produced with a cultivated agarwood-inducing technique, 10 batches of agarwood from different regions, were induced with an eccentricity perfusion method. They were then tested based on the Chinese Forestry Standard LY/T 2904-2017 Agarwood. The test results were also used to compare with the test data of a cultivated agarwood induced with a flame-jet drill method for four years.

The results showed that agarwood induced with the eccentricity perfusion method could meet the requirements of the LY/T 2904-2017 Agarwood with stable quality regardless of whether or not they were obtained from different regions. Chromone molecules of the agarwood induced with the eccentricity perfusion method were very similar with those of cultivated agarwood induced with the flame-jet drill method for four years.

Key words: Agarwood; eccentricity perfusion; agarwood-inducing technique; gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS); high performance liquid chromatography (HPLC) analysis; quality evaluation

沉香是由瑞香科沉香属(*Aquilaria* spp.)植物木质部组织及其分泌物共同组成的混合物质^[1-3], 主要产于我国广东、海南等地, 是一种传统的名贵香料

和中药^[4-5]。白木香(*Aquilaria sinensis* 土沉香)树在受到外界火烧、雷劈、虫蛀、刀砍等伤害后可产生分泌物, 沉积于木质中形成沉香, 过程复杂且需长期的演变和积累。目前, 市场上的沉香分为野生和人工沉香两类。野生沉香指野外天然树木, 经较长时间自然结香形成的沉香; 人工沉香则是仿照野生沉香结香机理, 经过人为物理、化学或生物等方式干预, 促使白木香树在较短时间内形成的沉香^[6]。

收稿日期: 2018-04-12; 修改日期: 2018-09-27

基金项目: 中国林业科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务专项经费“沉香品质评价和分级技术研究”(CAFYBB2018SY033)。
作者简介: 陈媛(1987—), 女, 中国林科院木材工业研究所助理研究员。

而白木香树是国产沉香的主要植物来源。

随着人们对野生沉香过度采伐,开发殆尽。因此,早在1998年白木香就被列入了《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录II,1999年被列为国家二级保护植物,2000年列入《世界自然保护联盟受威胁植物红色名录》(IUCN)^[7-9]。

为保护野生沉香资源,同时满足国内外市场对于沉香及其产品的需求,广东、海南、广西、云南等地开始大力发展白木香种植产业。同时,研发了多种人工诱导结香技术,包括物理伤害结香(打洞、火钻等)、化学伤害结香法(人工诱导结香等)、细菌结香法等,来促进白木香树结香^[10-11]。这些方法不但能够有效缩短结香时间,而且整个树体和枝干均可结香,大大提高了人工沉香的产量。目前,广东、广西等地广泛使用现代人工促进结香技术中的偏心灌注法结香(化学伤害结香方法)^[12],但该法沉香质量的评价研究未见报道。

鉴于此,笔者选取10批次不同产地的偏心灌注法沉香^[12],通过和传统的火钻法所结人工沉香进行对比,对其特征化学成分进行分析及质量评价,旨在完善沉香产品的认证和评价体系,促进现代人工结香产业发展提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

10批次偏心灌注法沉香:编号为A1~A10,每批次1个样品。产地:A1、A2老挝;A3广西玉林;A4、A5广东中山,结香一年;A6、A7广东台山;A8广东中山;A9广东化州;A10广东中山。

对照样品S1为火钻结香的人工沉香(结香4年,产地海南),所有沉香样品经中国林科院木材工业研究所鉴定,均为瑞香科沉香属。

试剂:乙腈、甲酸、无水乙醇,三氯甲烷-丙酮,盐酸,香草醛,甲酸,超纯水,沉香四醇对照品,C8-C40正构烷烃混合对照品,薄层板。均为外购。

1.2 仪器设备

LC20A 岛津高效液相色谱仪,GC-MS-QP2010 GC-MS联用机,精密天平。

1.3 试验方法

1) 依据LY/T 2904-2017《沉香》进行。测定乙

醇提取物和沉香四醇含量、显色反应、薄层色谱以及高效液相特征图谱。其中沉香四醇含量,按照高效液相色谱条件,根据沉香四醇标准溶液进行计算。

2) GC-MS成分分析:称取0.5 g沉香粉末,置于离心管,加入25 mL乙醚,密塞,静置1 h,超声1 h,脱水5 h,过0.45 μm 滤膜,进行GC-MS分析。

GC条件:色谱柱(DB-5HT, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.10 μm);升温程序:起始温度为90 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min,以2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至150 $^{\circ}\text{C}$,保持5 min,再以2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至280 $^{\circ}\text{C}$,保持10 min;汽化室温度250 $^{\circ}\text{C}$;接口温度250 $^{\circ}\text{C}$;线速度35 cm/s;载气为 N_2 ,流速为0.5 mL/min;分流比20:1;进样量1 μL 。MS条件:电子轰击(EI)离子源;电离能70 eV;离子源温度230 $^{\circ}\text{C}$;接口温度250 $^{\circ}\text{C}$;质谱扫描范围50~500 m/z;溶剂延迟时间2.5 min。

采用质谱库检索结合保留指数(Retention index, RI)对沉香倍半萜成分进行定性^[13],结合色酮裂解规律,对色酮成分进行定性^[14]。

2 结果与分析

2.1 表观形貌

部分偏心灌注法沉香样品的外观图片,如图1所示。

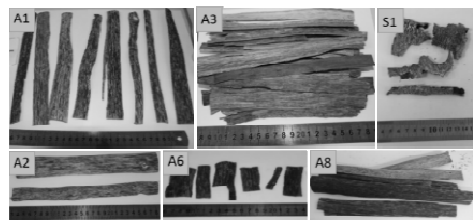


图1 部分沉香样品实物

Fig.1 Agarwood specimens

从样品的整体形貌上看,偏心灌注法沉香呈规则的薄片,表面可见明显的黑褐色树脂。对照样品S1呈现不规则块状,有明显的钻孔受伤的痕迹,表面油脂密集。

2.2 乙醇提取物和沉香四醇含量

偏心灌注法沉香(A1-10)及对照样沉香(S1)的乙醇提取物含量,见图2。

1) LY/T 2904-2017要求,沉香的乙醇提取物含量应不低于10%。图2显示,偏心灌注法沉香A1-10及对照样S1的乙醇提取物含量均在15.22%~23.98%

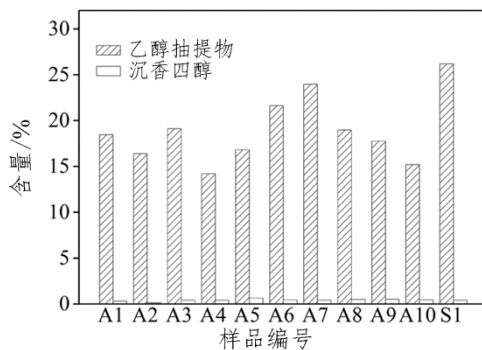


图2 沉香样品的乙醇提取物和沉香四醇含量
Fig.2 Alcohol extract content and agarotetrol content of agarwood specimens

之间,平均含量为18.26%。其中,含量>20%的有2批次,其余含量在10%~20%之间。说明偏心灌注法沉香乙醇提取物含量符合LY/T 2904-2017要求。

相比于对照的S1批次(26.20%),A1~A10批次的乙醇提取物含量较低,这主要是偏心灌注法沉香是在结香1年左右采香,结香时间短于S1沉香样品。

2) 偏心灌注法沉香的四醇含量分布范围在0.14%~0.63%之间,平均含量为0.43%,均高于2015年版《中国药典》对沉香四醇含量(0.1%)的要求。其中,有6批次的偏心灌注法沉香的四醇含量,高于对照的4年结香的火钻沉香(0.42%),说明偏心灌注法沉香具有较强的药用价值。

2.3 显色反应

偏心灌注法沉香(A1~A10)及对照样沉香(S1)的显色反应,见图3。

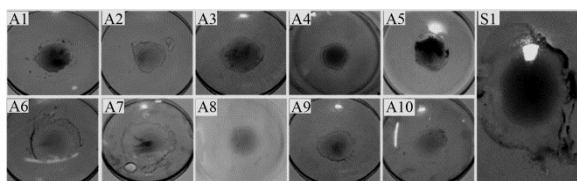


图3 沉香样品的显色反应光学图
Fig.3 Optical images of chromogenic reaction of agarwood specimens

LY/T 2904-2017 规定,沉香显色反应应呈现樱红、紫堇、浅红、浅紫色,不应呈无色或浅黄色。图3显示,偏心灌注法沉香A1~A10和对照样品S1的显色反应,均呈现常见樱红色,符合标准规定。

2.4 薄层色谱

10批次偏心灌注法沉香和S1人工沉香对照样品的薄层色谱图,见图4。

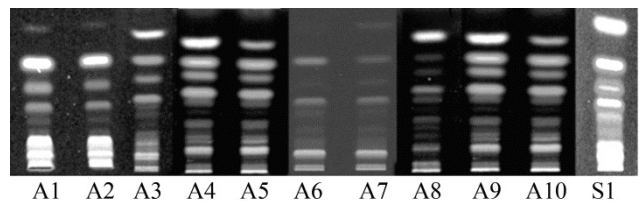


图4 沉香样品的薄层色谱分析
Fig.4 Thin-layer chromatography pictures of agarwood specimens

图4显示,偏心灌注法沉香样品均出现标准规定的荧光斑点,而且荧光斑点清晰,分离效果好。

2.5 高效液相色谱(HPLC)

10批次偏心灌注法沉香的全峰匹配获得25个共有峰(图5),其中包括LY/T 2904-2017规定的6个特征峰,说明偏心灌注法沉香符合标准对于高效液相特征图谱的要求。

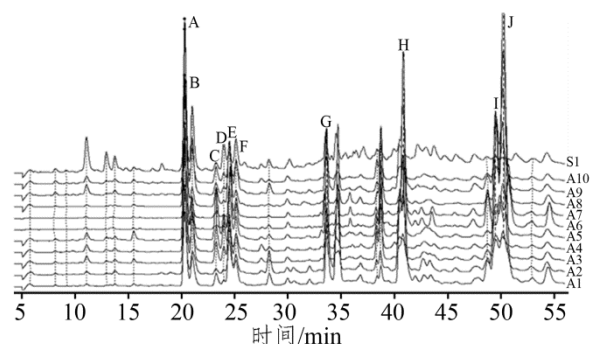


图5 沉香高效液相图谱
Fig.5 HPLC characteristic chromatograms

偏心灌注法沉香和S1对照样品的全峰匹配,具有22个共有峰,相对于HPLC对照指纹图谱的相似度,分别为0.841、0.884、0.902、0.835、0.900、0.435、0.455、0.853、0.973、0.909和0.723,说明偏心灌注法沉香中80%样品的相似度大于0.8;不同产地的沉香出峰的数量极为相似,且质量较为稳定。A6、A7样品的相似度较低,是因为树龄较小。一般白木香树木胸径>6 cm后才开始结香^[12],而样品A6、A7为树木胸径为6 cm左右时所结香。

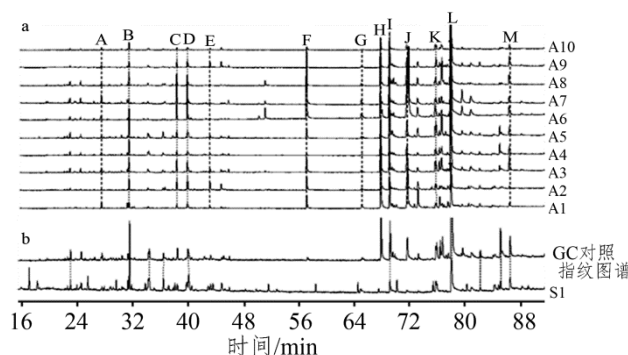
对照样品S1和对照指纹图谱的相似度高达0.723,这说明偏心灌注法沉香与4年结香的人工沉香品质较为接近。

基于文献对沉香色酮成分MS²碎裂行为规律性的分析^[15-18],笔者对偏心灌注法沉香的10个高含量共有峰进行了定性分析(图5中A-J),结果列于表1。

色酮裂解规律及 MS² 数据显示, HPLC 指纹图谱呈现的均为极性较大色酮类分子。根据偏心灌注法沉香和 S1 的 HPLC 色谱图及共有峰定性分析发现, A1~A10 沉香的 5~27 min 出峰面积占总面积的 21.7%~40.4%, 平均为 31.0%, 与 S1 (32.6%) 的非常接近, 说明这 10 批次沉香在色酮类化合物的数量及含量上, 都非常接近 4 年结香的人工沉香样品。

2.6 GC-MS 成分分析

对偏心灌注法沉香样品的 GC-MS 总离子流图 (TIC) 进行全峰匹配, 共获得 13 个共有峰 (图 6a)。根据质谱库检索结合保留指数 (RI)^[13] 和色酮裂解规律^[14], 对 13 个色谱峰进行定性分析, 结果见表 2。



a—10 批次偏心灌注法的 TIC 图;

b—GC-MS 对照指纹图谱和 S1 人工对照样品的比较

图 6 沉香 GC-MS 总离子流图

Fig.6 Total ion current figures of 10 batches of agarwood specimens

表 1 沉香样品的 HPLC 图谱定性分析

Tab.1 Qualitative analysis of high performance liquid chromatography of agarwood specimens

峰号	保留时间/ min	MS/MS 碎片				推荐色酮化合物及分子量 ^[16]
		[M+H] ⁺	[M+H-18] ⁺	[M+H-18-18] ⁺	[M+H-28] ⁺	
A	20.296	319.1173	301.1073	283.0964		沉香四醇
B	20.999	349.1284	331.1173	313.1074		(5S,6R,7R,8S)-四羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮
C	23.263	319.1177	301.1072	283.0963		异沉香四醇 Isogarotetrol
D	23.971	349.1284	331.1173	313.1066		(5S,6R,7S,8R)-四羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮
E	24.503	319.1194	301.1071	283.0956		quilarone B(沉香色酮 B)
F	25.126	349.1273	331.118	313.1069		Aquilarone C(沉香色酮 C)
G	33.542	329.1021			301.1085	Oxidoagarochromone C
H	40.755	301.107	283.0967		255.1018	Tetrahydrochromone K
I	49.481	313.1075			285.1139	Oxidoagarochromone B
J	50.137	283.0962			254.0928	Oxidoagarochromone A

表 2 偏心灌注法人工沉香共有峰的 GC-MS 定性分析

Tab.2 Qualitative analysis of GC-MS common peaks of 10 batches of agarwood induced with the eccentricity perfusion method

峰号	保留时间/ min	标准保留 指数	计算保留 指数	特征离子 碎片	分子式	化学式名称
A	27.562	1592	1726		C ₁₅ H ₂₆ O	1,2,5,5,8a-Pentamethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1-naphthalenol
B	31.535	1756	1806		C ₁₅ H ₂₂ O	1(2H)-Naphthalenone, 3,4,4a,5,6,7-hexahydro-4a,5-dimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [3S-(3.alpha.,4a.alpha.,5.alpha.)]-
C	38.444	1904	1921		C ₁₅ H ₂₄ O ₂	6-[1-(Hydroxymethyl)vinyl]-4,8a-dimethyl-1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2-naphthalenol
D	39.946	1888	1942		C ₁₅ H ₂₂ O ₂	6-[1-(Hydroxymethyl)vinyl]-4,8a-dimethyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-2(1H)-naphthalenone
E	43.221	1963	1993		C ₂₀ H ₃₂ O	17.alpha.-Methyl-(5.alpha.)-.delta.(sup 2)-androstene-17.beta.-o
F	57.173			91/250	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	2-(2-Phenylethyl)chromone
G	65.123			91/282	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	Agarotetrol Isomeride
H	67.899			91/280	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	6-Methoxy-2-(2-Phenylethyl)chromone
I	69.167			91/282	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	Agarotetrol
J	71.654			266/91	C ₁₇ H ₁₄ O ₃	2-[2-(3-Hydroxyphenyl)ethyl]chromone
K	75.826			91/314	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	5, 6-Epoxy-7β-hydroxy-8β-methoxy-2- (2-Phenylethyl)chromone
L	78.064			91/310/219	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	6,7-Dimethoxy-2-(2-Phenylethyl)chromone
M	86.461			121/340/191	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	Oxidoagarochromone B

图6显示,保留时间在15~55 min时,沉香化学成分主要以倍半萜类为主;55 min之后,主要是色酮类化合物。

图6a中的13个共有峰中,5个峰归属于倍半萜,其余归属于色酮,10批次偏心灌注法沉香样共获得9个共有峰,其中4个共有峰归属于倍半萜,其余归属于色酮,说明10批次偏心灌注法沉香样品的色酮类成分与4年结香的人工样品很接近。

10批次偏心灌注法沉香样品与对照样品,相对于TIC照指纹图谱的相似度,分别为:0.895、0.924、0.952、0.940、0.922、0.724、0.751、0.952、0.932、0.938和0.421。80%的偏心灌注法沉香样品的相似度>0.8,与HPLC结果一致,说明不同产地的偏心灌注法沉香质量非常稳定。S1样品和对照指纹图谱的相似度只有0.421,低于HPLC色谱图的相似度,进一步说明偏心灌注法沉香与4年结香的人工沉香的倍半萜类化学成分差异较大,与早期的研究结果一致^[18]。

对比偏心灌注法沉香和S1样品发现:在55 min之前,偏心灌注法沉香的出峰面积占总面积的6.6%~21.7%,平均为12.9%;S1对照样品的出峰面积占总面积的62.4%;55 min之后,偏心灌注法沉香的出峰面积占总面积的78.3%~93.4%,平均87.1%;S1对照样品的出峰面积占总面积的37.6%。

由此可见,对照样品S1倍半萜类成分含量明显高于偏心灌注法沉香,这也与前期研究结果一致^[6],倍半萜类化合物含量随结香时间的延长逐渐增加,而色酮类化合物含量则呈先升后降的趋势^[18]。沉香中色酮类成分和倍半萜类成分所占比例,对于沉香的质量分级、香体组成及变化以及沉香药理研究,具有重大的意义^[19]。

3 结论

1) 在本试验条件下,10批次偏心灌注法沉香的乙醇提取物含量、沉香四醇含量、显色反应、薄层色谱和HPLC特征图谱,均符合LY/T 2904-2017《沉香》的相关要求,其中乙醇提取物含量明显高于标准的要求。

2) HPLC色谱图分析和GC-MS成分分析表明,不同产地的偏心灌注法沉香样品品质稳定;偏心灌

注法沉香色酮类化学成分,较接近4年结香的人工诱导沉香样品。

参考文献:

- [1] 董梦好,焦立超,姜笑梅,等. 沉香的资源分布、识别与贸易现状[J]. 木材工业, 2016, 30(4): 20-24.
- [2] 中华人民共和国濒危物种进出口管理办公室. 濒危野生动植物种国际贸易公约附录II[Z], 2007.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 185-186.
- [4] 杨锦玲,梅文莉,余海谦,等. 国产沉香HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2014, 45(23): 3456-3461.
- [5] Chen H Q, Wei J H, Yang J S, et al. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants[J]. *ChemBiodivers*, 2012, 9(2): 236-250.
- [6] Yang J, Dong W, Kong F, et al. Characterization and analysis of 2-(2-phenylethyl)-chromone derivatives from agarwood (*aquilaria crassna*) by artificial holing for different times[J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 911.
- [7] 陈媛,邹献武,李改云,等. 野生沉香的鉴别方法[J]. 林业科学, 2017, 53(9): 91-96.
- [8] 陈媛,邹献武,黄洛华,等. 10批次伪品沉香鉴别方法的相关性[J]. 林业科学, 2017, 53(4): 113-120.
- [9] Chen Y, Yan T, Shang L, et al. Distinguish the wild from cultivated agarwood by using HPLC combined with PCA[J]. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2017, 7(2): 23-32.
- [10] Inagaki S, Sakanaka M, Shiosaka S, et al. Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: Immunohistochemical analysis I. Forebrain and upper brain stem[J]. *Neuroscience*, 1982, 7(1): 251-277.
- [11] 黄俊卿,魏建和,张争,等. 沉香结香方法的历史记载、现代研究及通体结香技术[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 302-306.
- [12] 蓝均焱,李汉超. 偏心灌注法在沉香属植物上生产沉香的方法及香腺激活剂[P]. 申请号: 201210174337.5.
- [13] 黄欣佩,樊云飞,陈晓东,等. 天然沉香香气成分的SHS-GC-MS指纹图谱研究[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(6): 737-744.
- [14] Mei W, Yang D, Wang H, et al. Characterization and determination of 2-(2-Phenylethyl)chromones in agarwood by GC-MS[J]. *Molecules* 2013, 18: 12324-12345.
- [15] Yoon J S, Lee M K, Sung S H, et al. Neuroprotective 2-(2-phenylethyl) chromones of *Imperata cylindrica*. [J]. *Journal of Natural Products*, 2006, 69(2): 290.
- [16] Wang T, Li L F, Zhang K, et al. New 2-(2-phenylethyl) chromones from *Bothriochloa ischaemum*[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2001, 3(2): 145-149.
- [17] Ibrahim S R. New 2-(2-phenylethyl)chromone derivatives from the seeds of *Cucumis melo* L var. *reticulatus*[J]. *Natural Product Communications*, 2010, 5(5): 403-406.
- [18] 陈晓颖,高英,李卫民. 不同结香方法与国产沉香挥发性化学成分的相关性研究[J]. 中国药房, 2012(11): 1017-1020.
- [19] Hashim H Y, Kerr P G, Abbas P, et al. *Aquilaria* spp. (agarwood) as source of health beneficial compounds: A review of traditional use, phytochemistry and pharmacology[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 189: 331-360.

(责任编辑 孟凡丹、向琴)