

“砍伤法”所结人工沉香的质量评价[△]

李浩洋*, 杨芳, 刘琼瑜, 张宪臣[#](中山出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东 中山 528400)

中图分类号 R282.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3996-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.29

摘要 目的:对“砍伤法”所结人工沉香进行质量评价,为其科学种植与采摘提供参考。方法:采用气相色谱-质谱联用法和高效液相色谱法,对3批“砍伤法”所结人工沉香(编号为1、2、3号,分别结香5、10、20年)的挥发性成分、液相特征图谱、沉香四醇和醇溶性浸出物含量进行检测。结果:3批人工沉香的挥发性成分主要为芳香族类化合物、倍半萜类化合物、脂肪酸类化合物和色酮类化合物;2、3号样品的液相特征图谱与沉香对照品基本一致;3批样品的沉香四醇含量为0.078%~0.254%,醇溶性浸出物含量为12.4%~20.8%。1号样品的液相特征图谱与沉香四醇含量不符合2015年版《中国药典》(一部)相关规定。结论:“砍伤法”所结人工沉香与天然沉香具有相似的挥发性化学成分,结香10年以上的人工沉香质量符合2015年版《中国药典》(一部)中“沉香”项下的规定,可以代替天然沉香入药。

关键词 砍伤法;人工沉香;质量评价;气相色谱-质谱联用法;高效液相色谱法

Quality Assessment of Artificial *Aquilaria sinensis* by “Cutting Inducing Technique”

LI Haoyang, YANG Fang, LIU Qiongyu, ZHANG Xianchen (Inspection and Quarantine Technology Center, Zhongshan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To conduct the quality assessment of artificial *Aquilaria sinensis* by “cutting inducing technique”, and provide reference for its scientific planting and harvest. METHODS: GC-MS and HPLC were adopted to detect the volatile ingredients, characteristic spectrum, incense tetraol and alcohol-soluble extract contents in 3 batches of artificial *A. sinensis* (Num. 1, 2, 3, respectively for 5, 10, 20 years) by “cutting inducing technique”. RESULTS: The volatile ingredients of 3 batches of artificial *A. sinensis* mainly consisted of aromatic compounds, sesquiterpene compounds, fatty acid compounds and chromone compounds. The characteristic spectrums of samples 2, 3 were basically the same with the reference substance of *A. sinensis*. The incense tetraol contents of 3 batches of samples were 0.078%-0.254%, and alcohol-soluble extract contents were 12.4%-20.8%. The characteristic spectrum and the incense tetraol content of sample 1 were not conformed to the standards in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, part 1). CONCLUSIONS: Artificial *A. sinensis* by “cutting inducing technique” shows similar volatile ingredients to natural *A. sinensis*. The quality of artificial *A. sinensis* for more than 10 years is conformed to the standards in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, part 1), which can be used as medicine, replacing the natural *A. sinensis*.

KEYWORDS Cutting inducing technique; Artificial *Aquilaria sinensis*; Quality assessment; GC-MS; HPLC

国产沉香为瑞香科植物白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg] 含树脂的木材,主产于我国海南、广东等地,是我国传统的名贵药材和天然香料,具行气止痛、温中止呕、纳气平喘之功效^[1]。长期以来由于对沉香资源的过度采伐,白木香植物资源日渐枯竭,现被列为国家二级保护野生植物,并载入《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》^[2]。

在自然界中,只有当白木香受到刺激或损伤时,才会产生沉香,结香过程往往需要几十年甚至上百年的时间,远远不能满足临床用药需求,因此人工结香技术得

到迅速发展。根据结香诱导物质的不同,人工结香技术主要分为三大类:物理法(砍伤法、打钉法和凿洞法)、生物法和化学法,其中砍伤法作为最古老的人工结香技术,自古以来就得到广泛应用,并成为现今主要的人工结香技术之一^[3-4]。

评价沉香质量的主要参数为挥发性成分、液相特征图谱、特征组分沉香四醇和醇溶性浸出物含量。2015年版《中国药典》(一部)对沉香的液相特征图谱、特征组分沉香四醇、醇溶性浸出物含量作了相关的规定^[1],同时挥发性成分作为沉香发挥药效的主要成分,其组成和相对含量与沉香药材的质量直接相关^[5],而目前关于利用挥发性成分、液相特征图谱和沉香四醇含量评价“砍伤法”所结人工沉香质量的研究尚未见文献报道。因此,本研究拟通过测定“砍伤法”所结人工沉香的挥发性成分、液

[△] 基金项目:中山市科技计划项目(No.2014A2FC241)

* 工程师。研究方向:中药质量控制与评价。电话:0760-88887380。E-mail:13590719076@139.com

[#] 通信作者:高级工程师。研究方向:中药质量控制与评价。电话:0760-88887380。E-mail:496758046@qq.com

相特征图谱、沉香四醇和醇溶性浸出物含量,对其质量进行评价,以期为砍伤法所结人工沉香的科学种植与采摘提供参考。

1 材料

1.1 仪器

TSQ Quantum XLS 系列气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪及其工作站(美国赛默飞世尔科技有限公司);1200 高效液相色谱(HPLC)仪,包括二极管阵列(DAD)检测器(美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂

沉香对照品(批号:121222-201203,供鉴定用)、沉香四醇对照品(批号:111980-201501,纯度:96.8%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

“砍伤法”所结人工沉香样品 3 批,由中山市元一沉香产业投资有限公司利用“砍伤法”生产,并由中山市国林沉香科学研究所所长张小花工程师鉴定,其沉香原植物均为瑞香科沉香属白木香[Aquilaria sinensis(Lour.) Gilg]。将样品编号为 1~3 号,其结香时间分别为 5、10、20 年。

2 方法与结果

2.1 挥发性成分的分析

2.1.1 GC-MS 条件 色谱条件为色谱柱:HP-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样方式:不分流进样;进样口温度:250 °C;载气:99.999% He;柱流量:1.2 mL/min;柱温:程序升温(初始温度 40 °C,保持 1 min;以 10 °C/min 升至 190 °C,保持 1 min;再以 2 °C/min 升至 220 °C,保持 1 min;再以 5 °C/min 升至 290 °C,保持 3 min);进样量:1 μL。MS 条件为离子源温度:250 °C;电离模式:电子轰击电离;质谱传输线温度:280 °C;溶剂延迟时间:3.0 min;扫描方式:全扫描监测扫描(SCAN);扫描范围:m/z 30~m/z 500。

2.1.2 挥发性成分的提取 将人工沉香样品用超纯水洗净、晾干,粉碎后过三号筛,精密称取 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加入甲醇 10 mL,冷浸过夜,超声(功率:300 W,频率:40 kHz)50 min,放冷,过滤。滤液置 80 °C 水浴蒸至无醇味,用甲醇溶解并定容至 1 mL 量瓶中,摇匀,即得。

2.1.3 挥发性成分的分析 将“2.1.2”项下提取的挥发性成分,按照“2.1.1”项下条件进样测定。通过 Thermo Xcalib 化学工作站数据分析系统,由峰面积归一化法计算各成分相对含量。以 Nist Ms Search 2.0 系统进行检索,并进行人工谱图解析。沉香样品主要挥发性成分及相对含量见表 1。

表 1 3 批样品的挥发性成分及其相对含量(%)

Tab 1 Volatile ingredients and relative contents of 3 batches of samples (%)

序号	化合物名称	相对含量		
		1号	2号	3号
1	苯乙酮 [▲]	0.49	0.54	0.14
2	邻羟基苯甲醛 [▲]	-	-	0.08
3	苯基丙酮 [▲]	0.06	0.15	0.54
4	辛酸 [■]	-	0.51	0.29
5	沉香螺醇 [●]	2.68	2.08	1.56
6	沉香螺醇 [●]	0.84	1.57	1.20
7	白木香醛 [●]	2.19	2.41	2.48
8	沉香螺醇 [●]	2.20	2.67	2.98
9	γ-桉叶油醇 [●]	2.88	3.00	5.35
10	沉香醇 [●]	5.93	5.70	6.80
11	十四烷酸 [■]	4.18	1.47	1.09
12	十五烷酸 [■]	4.71	4.12	3.89
13	十六烷酸 [■]	4.92	3.72	3.19
14	十八烷酸 [■]	2.28	1.48	1.95
15	十八烯酸 [■]	2.75	1.54	1.33
16	二十九烷 [■]	1.63	1.67	1.04
17	1,5-二苯基-1-戊烯-3-酮 [▲]	-	-	0.60
18	苯丙酸苯乙酮 [▲]	-	-	1.80
19	2-(2-苯乙基)色酮 [★]	0.31	2.90	7.48
20	A 环带 1 个羟基的 2-(2-苯乙基)色酮 [★]	-	-	0.53
21	6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 [★]	0.44	4.61	5.01
22	沉香四醇 [●]	2.92	3.44	4.81
23	6-羟基-2-(2-苯乙基)色酮 [★]	0.34	1.60	1.22
24	B 环带 1 个羟基、1 个甲氧基的 2-(2-苯乙基)色酮 [★]	-	0.30	0.63
25	A 环带 1 个甲氧基、B 环带 1 个甲氧基的 2-(2-苯乙基)色酮 [★]	0.60	2.16	2.92
26	6-甲氧基-2-[2-(3'-甲氧基苯基)乙基]色酮 [★]	4.90	9.49	5.85
27	5,8-二羟基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮 [★]	2.61	2.92	3.11
28	6-羟基-7-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 [★]	-	0.41	0.36
29	6-羟基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮 [★]	-	1.60	1.77
30	A 环带 1 个甲氧基、B 环带 1 个羟基、1 个甲氧基的 2-(2-苯乙基)色酮 [★]	0.60	4.66	2.30
31	6-甲氧基-2-[2-(3'-甲氧基-4'-羟基苯基)乙基]色酮 [★]	2.06	1.65	1.25
32	A 环带 1 个羟基、1 个甲氧基、B 环带 1 个甲氧基的 2-(2-苯乙基)色酮 [★]	3.09	-	0.48
33	A 环带 2 个甲氧基、B 环带 1 个羟基、1 个甲氧基的 2-(2-苯乙基)色酮 [★]	4.89	-	0.60
34	6,7-二甲氧基-2-[2-(4'-甲氧基苯基)乙基]色酮 [★]	4.00	3.16	1.51
35	豆甾醇 [●]	-	-	0.36
36	谷甾醇 [●]	0.69	0.53	0.30

注:▲表示芳香族类;●表示倍半萜类;■表示脂肪酸类;★表示色酮类;“-”表示未检出

Note: ▲ indicates aromatics; ● indicates sesquiterpenes; ■ indicates fatty acids; ★ indicates chromones; “-” indicates not detected

由表 1 可知,1 号样品共鉴定出 27 个化合物,其中芳香族类化合物 2 个,相对含量 0.55%;倍半萜类化合物 6 个,相对含量 16.72%;脂肪酸类化合物 6 个,相对含量 20.47%;色酮类化合物 12 个,相对含量 26.76%。2 号样品共鉴定出 29 个化合物,其中芳香族类化合物 2 个,相对含量 0.69%;倍半萜类化合物 6 个,相对含量 17.43%;脂肪酸类化合物 7 个,相对含量 14.51%;色酮类化合物 13 个,相对含量 38.90%。3 号样品共鉴定出 36 个化合物,其中芳香族类化合物 5 个,相对含量 3.16%;倍半萜类化合物 6 个,相对含量 20.37%;脂肪酸类化合物 7 个,相对含量 12.78%;色酮类化合物 16 个,相对含量 39.83%。

2.2 特征图谱的测定

参照2015年版《中国药典》(一部)“沉香”项下方法进行测定。

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 15%~20% A; 10~19 min, 20%~23% A; 19~21 min, 23%~33% A; 21~39 min, 33% A; 39~40 min, 33%~35% A; 40~45 min, 35% A; 45~50 min, 95% A; 50~60 min, 15% A);流速:0.7 mL/min;检测波长:252 nm;柱温:30 ℃,进样量:10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 称取沉香对照品(过三号筛)约0.2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入乙醇10 mL,称定质量,浸泡30 min,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)1 h,放冷,用乙醇补足损失的质量,摇匀,静置,取上层清液过滤,取滤液,即得。

2.2.3 样品溶液的制备 称取3批人工沉香样品,其余操作同“2.2.2”项下,制得样品溶液。

2.2.4 样品的测定 分别精密吸取“2.2.2”“2.2.3”项下溶液各10 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录其特征图谱,结果见图1。

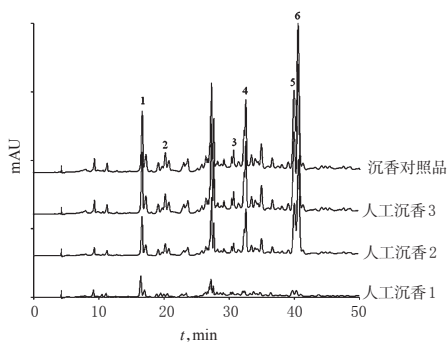


图1 HPLC特征图谱

Fig 1 HPLC chromatogram overlays

由图1可知,沉香对照品共有6个特征峰,与2015年版《中国药典》(一部)中沉香对照特征图谱整体相似,表明本研究采用的沉香对照品满足《中国药典》中的要求。1号样品仅显示出1个特征峰(峰1),不符合《中国药典》规定;2、3号样品的6个特征峰与沉香对照品一一对应,且峰1的保留时间约为16.4 min,与沉香对照品中峰1的保留时间基本一致,说明2、3号样品的特征图谱符合2015年版《中国药典》(一部)中“沉香”项的规定。

2.3 沉香四醇的测定

参照2015年版《中国药典》(一部)“沉香”项下方法进行测定。

2.3.1 对照品溶液的制备 精确称取沉香四醇对照品,用乙醇配制质量浓度为1 000 mg/L的对照品贮备液,4 ℃保存备用。临用时用乙醇逐级配制为质量浓度分别

为20.0、40.0、60.0、100.0、140.0、200.0 mg/L的系列对照品溶液。

2.3.2 系统适用性试验 精密量取“2.3.1”项下对照品溶液、“2.2.3”项下样品溶液各10 μL,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,沉香四醇峰理论板数均大于6 000,且峰形良好,保留时间稳定,符合2015年版《中国药典》(一部)相关规定。

2.3.3 标准曲线的绘制 取“2.3.1”项下系列对照品溶液,按“2.2.1”项下方法进样测定,以沉香四醇的质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程 $y=36.11x-22.20$ ($r=0.9998$)。结果表明,沉香四醇在质量浓度为20~200 mg/L内线性关系良好。

2.3.4 方法学考察 按照相关要求进行操作。结果,精密密度试验、稳定性试验、重复性试验中沉香四醇峰面积的RSD均不大于2%($n=6$),加样回收率在98.6%~104.7%之间(RSD=10.3%, $n=9$),符合方法学要求。

2.3.5 样品含量的测定 取人工沉香样品各3份,按“2.2.3”项方法制备样品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果,1、2、3号样品中沉香四醇的含量分别为0.078%、0.155%、0.254%,RSD分别为1.67%、1.95%、1.34%($n=3$)。其中2、3号样品符合2015年版《中国药典》(一部)规定的沉香四醇含量不低于0.10%的要求。

2.4 醇溶性浸出物含量的测定

按照2015年版《中国药典》(四部)中“浸出物测定法(醇溶性浸出物)”测定。取人工沉香样品各3份,每份约3 g,精密称定,置于100 mL锥形瓶中,精密加入乙醇50 mL,密塞,称定质量,静置1 h后,连接回流冷凝管,于80~85 ℃加热至沸腾,并保持微沸1 h。放冷后,取下锥形瓶,密塞,再称定质量,用乙醇补足,摇匀,用干燥滤器滤过。精密量取滤液25 mL,置于已干燥至恒质量的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于105 ℃干燥3 h,再置于干燥器中冷却30 min,迅速称定质量。计算醇溶性浸出物的含量(干燥品质量/人工沉香样品质量×100%)。结果表明,1、2、3号样品中醇溶性浸出物的含量分别为12.4%、17.4%、20.8%,RSD分别为1.52%、1.03%、1.21%($n=3$),均符合2015年版《中国药典》(一部)规定的醇溶性浸出物含量不低于10.0%的要求。

3 讨论

天然沉香的挥发性成分主要为芳香族类化合物、倍半萜类化合物、脂肪酸类化合物和色酮类化合物等^[6-7],且芳香族类化合物苜基丙酮和倍半萜类化合物白木香醛与沉香的结香机制有关^[8-9],而色酮类化合物沉香四醇是沉香的特征成分^[1]。因此,这3个化合物在沉香真伪鉴定中具有极其重要的作用。本试验中3批“砍伤法”所结

人工沉香的挥发性成分主要由芳香族类化合物、倍半萜类化合物、脂肪酸类化合物和色酮类化合物组成,虽然所含各类成分组成和含量存在差异,但均与天然沉香具有相似的挥发性成分,且均含有苜基丙酮、白木香醛和沉香四醇,并随着结香时间的延长其含量呈增加的趋势。

由于沉香在白木香植物中的形成是一个长期积累、演变的复杂过程,因此,不同沉香样品的成分组成及含量都会有所不同。本试验发现,随着结香时间的延长,“砍伤法”所结人工沉香的挥发性成分愈加丰富,且芳香族类化合物、倍半萜类化合物和色酮类化合物的含量也随之增长。芳香族类成分苜基丙酮具有止咳作用,沉香螺旋醇等有活性的倍半萜类成分具有中枢抑制性镇静催眠作用和健胃作用,色酮类成分则具有一定的抗癌和抗肿瘤作用^[10-12]。这说明结香时间越长,其所结沉香的药效和质量越好。而白木香植物成分脂肪酸含量的逐步降低,则说明沉香的结香过程就是白木香成分逐渐转化为沉香成分的过程。

2015年版《中国药典》(一部)中规定,沉香的液相特征图谱应呈现6个特征峰,并与沉香对照品特征图谱整体相似,且沉香四醇和醇溶性浸出物含量须大于0.10%和10.0%^[1]。本试验3批“砍伤法”所结人工沉香中,2、3号样品的液相特征图谱、沉香四醇和醇溶性浸出物含量均符合2015年版《中国药典》(一部)的规定;而1号样品的醇溶性浸出物含量虽符合规定,但其液相特征图谱和沉香四醇达不到《中国药典》的要求。由此可知,“砍伤法”所结人工沉香必须经过一定的结香时间,才能生产出合格的产品。这也符合沉香在白木香植物中积累时间越长、品质越佳的规律。

4 结论

本试验通过测定3批“砍伤法”所结人工沉香的挥发性成分、液相特征图谱、沉香四醇和醇溶性浸出物含量,对“砍伤法”所结人工沉香的质量进行了评价。研究表明,经过适当的结香时间,“砍伤法”所结人工沉香与天然沉香具有相似的挥发性化学成分,结香10年以上产品的质量符合2015年版《中国药典》(一部)中“沉香”

项下的规定,可以代替天然沉香入药。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:185-186.
- [2] Liu YY, Chen HQ, Yang Y, *et al.* Whole-tree agarwood-inducing technique: an efficient novel technique for producing high-quality agarwood in cultivated *Aquilaria sinensis* trees[J]. *Molecules*, 2013, 18(3):3086-3106.
- [3] 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.
- [4] 陈晓颖,高英,李卫民,等.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, 23(11):1017-1020.
- [5] 郝兰芳,李慧芬,周焯.沉香挥发油化学成分分析[J]. *中草药*, 2010, 41(2):210-211.
- [6] Chen HQ, Wei JH, Yang JS, *et al.* Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2012, 9(2):236-250.
- [7] 谭丽杰.中药沉香研究进展[J]. *中国药房*, 2011, 22(39):3738-3741.
- [8] 高晓霞,周伟平,钟兆健,等.沉香中苜基丙酮与浸出物含量相关性研究[J]. *中药材*, 2012, 35(6):919-924.
- [9] 戚树源,陆碧瑶,朱亮锋,等.白木香中白木香醛形成的研究:简报[J]. *植物生理学通讯*, 1992, 28(5):336-339.
- [10] 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):3349-3351.
- [11] Liu J, Wu J, Zhao YX, *et al.* A new cytotoxic 2-(2-phenylethyl) chromone from Chinese eaglewood[J]. *Chinese Chem Lett*, 2008, 19(8):934-936.
- [12] Yang L, Qiao LR, Xie D, *et al.* 2-(2-phenylethyl) chromoneS from Chinese eaglewood[J]. *Phytochemistry*, 2012, 76(12):92-97.

(收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-07-30)

(编辑:刘明伟)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅