

6 种代表性沉香精油的化学成分及抗氧化、抗炎活性比较分析

陈细钦^{1,2}, 王灿红², 冯 剑², 陈德力², 魏建和^{1,2}, 刘洋洋^{2*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193
2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室, 海南 海口 570311

摘要: 目的 比较不同来源、不同提取方式的 6 种沉香精油化合物组成、抗氧化能力及抗炎活性的差异。方法 采用气相色谱-飞行时间质谱联用仪 (gas chromatography-time of flight mass spectrometry, GC-TOF MS) 对 6 种沉香精油的化学成分进行分析, 并测定其清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH) 与 2,2-氮杂双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 [2,2-azabis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS] 自由基的能力, 考察其对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 活力的影响。结果 从通体香水蒸气蒸馏精油 (TTS)、通体香超临界萃取精油 (TTC)、板头香水蒸气蒸馏精油 (BTS)、板头香超临界萃取精油 (BTC)、奇楠沉香蒸气蒸馏精油 (QNS) 和奇楠沉香超临界萃取精油 (QNC) 中鉴定出的化合物数量分别为 48、55、59、71、72 和 35 种, 所含香味物质小分子芳香物质及倍半萜类成分相对含量之和分别为 81.42%、87.84%、89.03%、62.05%、63.83% 和 28.36%, 所含 2-(2-苯乙基)色酮类化合物相对含量分别为 0、0、0.25%、22.42%、17.48%、60.42%。6 种沉香精油均具有清除 DPPH 和 ABTS 自由基能力, 且质量浓度在 0.5~5 mg/mL 与自由基清除能力均呈正相关。3 种水蒸气蒸馏沉香精油 (BTS、TTS、QNS) 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 18.61、30.30、18.05 μg/mL, 而 3 种超临界 CO₂ 萃取沉香精油 (BTC、TTC、QNC) 的 IC₅₀ 值分别为 41.98、38.45、24.50 μg/mL。结论 超临界萃取沉香精油同水蒸气蒸馏沉香精油化合物组成相差较大, 其能够提取出更多的脂肪酸类和色酮类化合物; 板头香和通体香采用同一提取方法所得精油化学成分相似, 而奇楠沉香中含有更多含量的香味物质和 2-(2-苯乙基)色酮类化合物。3 种超临界萃取沉香精油清除 DPPH 自由基能力均强于水蒸气蒸馏沉香精油, 而抗炎活性则相反, 且 3 种沉香来源中, 奇楠沉香精油抗炎能力最佳。

关键词: 沉香; 奇楠; 精油; 化学成分; 抗氧化能力; 抗炎活性; 2-(2-苯乙基)色酮

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)18-5720-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.015

Comparative analysis of chemical constituents and anti-oxidant and anti-inflammatory activities of six representative agarwood essential oils

CHEN Xi-qin^{1,2}, WANG Can-hong², FENG Jian², CHEN De-li², WEI Jian-he^{1,2}, LIU Yang-yang²

1. National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Ministry of Education of Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
2. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Hainan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China

Abstract: Objective To compare the compounds composition, antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of six kinds of agarwood essential oils from different sources and different extraction methods. **Methods** The chemical constituents of six agarwood

收稿日期: 2022-04-21

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1706403); 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2020163, ZDYF2020111); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-J2M-1-032); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-21)

作者简介: 陈细钦, 在读硕士, 从事中药质量控制研究。E-mail: 18359033886@163.com

***通信作者:** 刘洋洋, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础和质量评价研究。Tel: (0898)31589000 E-mail: eadchris@163.com

essential oils were analyzed by gas chromatography-time of flight mass spectrometry (GC-TOF MS), their free radical scavenging abilities against 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and 2,2-azabis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) were detected, and effect of six agarwood essential oils on lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 cells viabilities were detected. **Results** The number of compounds identified from BTS (essential oil extracted by hydrodistillation from ordinary agarwood of trunk-pruning), TTS (essential oil extracted by hydrodistillation from ordinary agarwood of Agar-Wit), QNS (essential oil extracted by hydrodistillation from Chi-Nan agarwood of drilling), BTC (agarwood essential oil extracted by supercritical fluid from ordinary agarwood of trunk-pruning), TTC (agarwood essential oil extracted by supercritical fluid from ordinary agarwood of Agar-Wit), QNC (agarwood essential oil extracted by supercritical fluid from Chi-Nan agarwood of drilling) were 48, 55, 59, 71, 72 and 35, respectively; Total contents of aromatic compounds were 81.42%, 87.84%, 89.03%, 62.05%, 63.83% and 28.36%, respectively; Contents of 2-(2-phenylethyl) chromones were 0, 0, 0.25%, 22.42%, 17.48% and 60.42% respectively. Six agarwood essential oils all had the ability to scavenge DPPH and ABTS free radicals, and the essential oils were positively correlated with the free radical scavenging ability between 0.5—5 mg/mL. Half inhibition concentration (IC_{50}) of agarwood essential oils extracted by hydrodistillation (BTS, TTS, QNS) on LPS-induced RAW264.7 cells were 18.61, 30.30, 18.05 $\mu\text{g/mL}$, and IC_{50} values of three agarwood essential oils extracted by supercritical fluid (BTC, TTC, QNC) were 41.98, 38.45, 24.50 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** Agarwood essential oils extracted by supercritical fluid contains more fatty acids and chromones, which is quite different from that of hydrodistillation. The chemical constituents of essential oil obtained by same extraction method of BT and TT are similar, while Chi-Nan contains more aroma substances and 2-(2-phenylethyl) chromones. DPPH radical scavenging ability of essential oils extracted by supercritical fluid is stronger than that extracted by hydrodistillation, but the anti-inflammatory activity was the opposite. Among the three sources of agarwood, Chi-Nan agarwood essential oil has the best anti-inflammatory ability.

Key words: *Aquilariae Lignum Resinatum*; Chi-Nan; essential oil; chemical constituents; anti-oxidant; anti-inflammatory; 2-(2-phenylethyl) chromones

沉香为瑞香科沉香属 *Aquilaria* Lam.和拟沉香属 *Gyrinops* Gaertn.植物含有树脂的木材。正常生长的沉香树无法生成沉香，只有在沉香树受到物理、生物或化学等外部伤害后，沉香树启动防御反应，在其内部生成黑褐色的树脂，含有这些树脂的木材便称为沉香^[1-2]。因沉香珍贵难得，目前全球野生沉香资源濒危，沉香属报道的 21 个种均列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 II 中^[3]。如今大面积的沉香种植、高产优质结香方法的发明，使得市场上的沉香供应得以持续^[2]。目前市场上较为常见的沉香有采用全断杆法所结沉香（简称板头香）、采用通体结香技术所结沉香（简称通体香）以及采用打孔法所结沉香（简称奇楠沉香）等^[4-6]。《中国药典》2020 年版记载沉香具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘的功效^[7]，可用于治疗胃肠道疾病、咳嗽、风湿病及各种疼痛^[8-10]。其沉香制品，如沉香精油、沉香香粉、沉香线香等物，常用于熏蒸燃烧，起到舒缓身心、安神解郁的作用^[11-12]。

沉香精油主要成分有倍半萜类、2-(2-苯乙基)色酮类、小分子芳香物质及脂肪酸类化合物等，作为芳香疗法常用的精油之一，其具有抗氧化、抑菌、镇静、抗炎、抗癌等药理活性^[6,13]。沉香精油有多种提取方式，如水蒸气蒸馏提取法、超临界萃

取法、亚临界提取、微波辅助提取法、酶辅助提取法、溶剂提取法等^[14-16]，其中水蒸气蒸馏提取法和超临界 CO_2 萃取法较为常见。水蒸气蒸馏提取法是一种传统的提取方法，提取方法简单、设备价格低廉，但提取率低，通常仅有 0.1%~0.5%，且长时间高温所致的芳香类物质的损失和 2-(2-苯乙基)色酮类化合物的分解，易造成沉香中有效成分的破坏^[16]。超临界 CO_2 萃取法条件温和，芳香类物质损失和 2-(2-苯乙基)色酮类化合物破坏较少，且提取率高，通常可达 0.8%~5%^[17]。采用不同来源的沉香以及不同提取方法所得沉香精油的颜色、香味特点以及使用效果存在较大差异^[18]。目前，对沉香精油化学成分的研究大多为对采取某一种提取方法从普通沉香中提取的沉香精油进行化学成分分析，且沉香精油活性研究主要集中于抗氧化、抗炎活性方面，而对几种代表性的沉香采用不同提取方法所得沉香精油化学成分及活性比较研究报道少见。因此，本研究选择了板头香、通体香和奇楠沉香 3 种代表性沉香，并采用水蒸气蒸馏和超临界 CO_2 萃取 2 种常用的精油提取方式提取得到 6 种沉香精油，对其化学组成、抗氧化能力及抗炎活性进行系统对比分析，以期为沉香精油的质量评价和深度开发提供依据。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自上海赛百康生物技术有限公司。

1.2 药品与试剂

6 种沉香精油信息见表 1 和图 1, 其中水蒸气蒸馏精油为实验室自制, 超临界 CO₂ 萃取精油由瑜丰沉香汇(广东)科技有限公司提取, 且 2 种提取方法所用通体香为同一批(批号 CXT20161009-1), 所用市售板头香为同一批(批号 BT20210421), 所用市售奇楠沉香为同一批(批号 QN20210421)。以上沉香均购自广东茂名, 经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所海南分所刘洋洋研究员鉴定, 3 种沉香基原均为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg。

表 1 6 种沉香精油
Table 1 Six agarwood essential oils

编号	提取方式	来源
TTS	水蒸气蒸馏提取	通体香
TTC	超临界 CO ₂ 萃取	
BTS	水蒸气蒸馏提取	板头香
BTC	超临界 CO ₂ 萃取	
QNS	水蒸气蒸馏提取	奇楠沉香
QNC	超临界 CO ₂ 萃取	

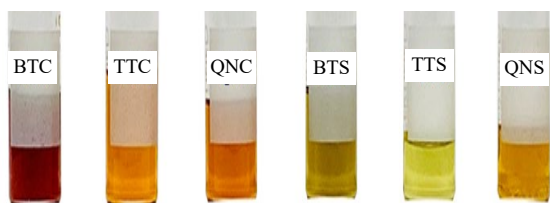


图 1 6 种沉香精油图片

Fig. 1 Pictures of six agarwood essential oils

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 CL31203820)、吡啶美辛(批号 Y18M10C83262) 购自上海源叶生物科技有限公司; DMEM 培养基(批号 70080110) 购自 Biosharp 公司; 胰酶消化液(批号 21144688)、青霉素-链霉素(批号 69070500)、2,6-二叔丁基对甲酚 (butylated hydroxytoluene, BHT, 批号 20160415) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 胎牛血清(批号 070219191026) 购自美国 CLARK 公司; CCK-8(批号 031521210520) 购自碧云天生物技术有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH, 批号 20210120) 购自福州飞净生物科技有限公司;

2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azabis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS, 批号 C12467440]、过硫酸钾(批号 C10279335) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 正构烷烃 (C₈~C₄₀) 对照品(批号 220101504) 购自美国 AccuStandard 公司; 二甲基亚砜、无水乙醇及其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

7890B/7200 型气相色谱-飞行时间质谱联用仪 (gas chromatography-time of flight mass spectrometry, GC-TOF MS, 美国安捷伦科技有限公司); CKX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); UV-1900 型紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); Galaxy 170S 型 CO₂ 恒温培养箱 (德国 Eppendorf 公司); Multiskan GO 型微孔板分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HWS-26 型电热恒温水浴箱 (上海益恒实验仪器有限公司); TGL-16M 型台式高速冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); XS105DU 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 沉香精油成分分析

采用 GC-TOF MS 对 6 种沉香精油进行分析。

2.1.1 气相条件 HP-5 MS 弹性石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 载气为高纯氮气, 体积流量 1 mL/min, 分流比 2:1, 进样量 1 μL, 进样口温度 255 °C。程序升温: 柱温 80 °C, 保持 5 min; 以 10 °C/min 升至 130 °C, 保持 5 min; 以 1 °C/min 升至 140 °C, 保持 10 min; 以 0.5 °C/min 升至 160 °C, 再以 10 °C/min 升至 230 °C, 再以 5 °C/min 升至 300 °C, 保持 3 min。

2.1.2 质谱条件 电子轰击 (EI) 能量 70 eV; 离子源温度 230 °C, 接口温度 250 °C, 溶剂延迟 5 min, 扫描范围 *m/z* 50~550。正构烷烃 (C₈~C₄₀) 对照品 1 μL 单独进样。

2.2 沉香精油抗氧化活性测定

2.2.1 沉香精油清除 DPPH 自由基能力的测定 取 DPPH 乙醇溶液 (100 μmol/L), 沉香精油 (5 mg/mL) 用量为 500、400、300、200、100、50 μL, 用无水乙醇补足至 1 mL, 室温避光放置 30 min, 采用紫外可见分光光度计测定 517 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 记为 *A*₁; 以无水乙醇代替 DPPH, 同法测定 *A*, 记为 *A*₂; 以样品溶剂代替样品, 同法测定 *A*, 记为 *A*₀。

每个样品测定 3 次。以 BHT (0.5 mg/mL) 为阳性对照, 同法测定, 计算清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = A_0 - (A_1 - A_2) / A_0$$

2.2.2 沉香精油清除 ABTS 自由基能力的测定 取 7 mmol/L 的 ABTS 与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液等体积混合均匀, 避光放置 12 h, 临用前用乙醇溶液稀释 ABTS 预备液至 734 nm 处的 A 值为 0.70 ± 0.02 , 得 ABTS 工作液。分别取 500、400、300、200、100、50 μL 沉香精油溶液 (2 mg/mL) 与 1.5 mL ABTS 工作液混匀, 无水乙醇补足至 2 mL, 反应 20 min 后于 734 nm 波长处测定 A 值, 记为 A_1 ; 以溶剂代替样品, 同法测定 A , 记为 A_0 ; 以乙醇代替 ABTS, 同法测得各样品对照组的 A , 记为 A_2 。每个样品测定 3 次。以 BHT (0.5 mg/mL) 为阳性对照, 计算清除率。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = A_0 - (A_1 - A_2) / A_0$$

2.3 沉香精油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞存活率的影响

RAW264.7 细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板中, 100 μL /孔, 于倒置显微镜下观察细胞是否铺板均匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。设置对照组、模型组及不同沉香精油样品 (100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$) 组和吡喹啉美辛 (10、5、2.5、1.25 $\mu\text{g/mL}$)

组, 除对照组外, 其余各组加入 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), 各给药组再加入相应药物, 设置 3 个复孔。继续培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8, 孵育 1 h 后, 采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值, 计算细胞存活率。采用回归分析计算半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50})。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{模型}} - A_{\text{对照}})$$

2.4 数据分析

经 GC-TOF MS 分析后, 通过 Qualitative Analysis B.07.00 软件结合 NIST17 质谱库对沉香精油各组分质谱数据进行检索与定性, 并按峰面积归一化法计算出各组分的相对含量。采用 SIMCA 14.1 软件对 6 种沉香精油进行层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)。

抗氧化活性及抗炎活性实验数据用 GraphPad Prism 8.3 软件作图。所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 不同沉香精油成分分析

采用 GC-TOF MS 从 6 种沉香精油样品中共鉴定出 110 种化合物 (表 2)。不同来源的沉香以及不同提取方式所得沉香精油中的化学成分数量、种类及相对质量分数均存在差异。

表 2 6 种沉香精油化学成分

Table 2 Chemical compositions of six agarwood essential oils

序号	化合物	化学式	保留指数	相对质量分数/%					
				BTS	TTS	QNS	BTC	TTC	QNC
1	苣荬酮	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$	1246	3.96	3.75	0.51	2.01	1.88	0.72
2	(5Z)-13,13-dimethyl-11,12-diazatricyclo[8.2.1.0]trideca-5,11-diene	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2$	1398	0.16	0.10	0.18	—	—	—
3	4-(5,5-dimethylspiro[2.5]oct-4-yl)-2-butanone	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}$	1416	—	0.16	—	—	—	—
4	1-(4,7,7-trimethylbicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-yl)ethanone	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}$	1442	—	—	0.27	—	—	—
5	β -广藿香烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	1448	—	—	—	0.14	—	—
6	(1R,3aR,5aR,9aS)-1,4,4,7-tetramethyl-1,2,3,3a,4,5a,8,9-octahydrocyclopenta[c]benzofuran	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	1451	0.48	—	0.26	—	—	—
7	葎草烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	1456	—	—	—	0.13	—	—
8	(4R,4aS,6S)-4,4a-dimethyl-6-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	1472	0.28	0.18	0.34	0.41	0.13	—
9	2-(4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-naphthalen-2-yl)-prop-2-en-1-ol	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	1476	4.91	3.46	1.82	0.17	0.17	—
10	古芸烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	1490	—	0.20	—	—	—	—
11	长叶烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	1500	—	0.23	0.14	0.16	—	—
12	(3R,5aR,9S,9aS)-2,2,5a,9-tetramethyloctahydro-2H-3,9a-methanobenzo[b]joxepine	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	1504	0.43	0.40	0.22	—	—	—
13	delta-guaiene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	1508	—	0.21	0.11	0.24	—	—
14	2,4-di-tert-butylphenol	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$	1512	—	0.20	0.17	—	—	—
15	(1aR,3aR,4R,7R,8aS)-1a,4,9,9-tetramethyloctahydro-3a,7-methanoazuleno[1,8a-b]oxirene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	1519	0.71	0.62	0.62	—	—	—
16	1,4,6-trimethyl-1,2,3,3a,4,7,8,8a-octahydro-4,7-ethanoazulene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	1528	0.48	0.50	0.80	—	—	—
17	alloaromadendrene oxide-(2)	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	1531	0.18	0.12	0.46	—	—	—
18	2-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)cyclopropanecarboxylic acid, methyl ester	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$	1542	—	0.14	—	—	—	—
19	(8R,8aS)-8,8a-dimethyl-2-(propan-2-ylidene)-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalene	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}$	1545	0.37	1.00	0.29	—	—	—
20	4,8,8-trimethyl-2-methylene-4-vinylbicyclo[5.2.0]nonane	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	1547	—	0.16	0.83	0.14	0.15	—
21	2-(4a,8-dimethyl-2,3,4,4a,5,6-hexahydro-naphthalen-2-yl)-prop-2-en-1-ol	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$	1558	3.26	5.73	0.64	—	—	—

续表 2

序号	化合物	化学式	保留 指数	相对质量分数/%					
				BTS	TTS	QNS	BTC	TTC	QNC
22	8 <i>S</i> ,14-cedrandiol	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	1561	0.61	1.07	1.16	0.32	0.66	—
23	(4 <i>aS</i> ,8 <i>R</i>)-4 <i>a</i> ,8-dimethyl-4 <i>a</i> ,5,6,7,8-hexahydronaphthalen-2(3 <i>H</i>)-one	C ₁₂ H ₁₈ O	1568	—	—	—	—	0.10	—
24	heneicosapentaenoic acid methyl ester	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	1572	—	0.17	0.26	0.17	0.18	—
25	(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1,8-dimethyl-4-(prop-1-en-2-yl)spiro[4.5]dec-7-ene	C ₁₅ H ₂₄	1578	1.40	1.68	8.52	1.17	1.28	2.57
26	1,1,7,7-tetramethyl-1 <i>a</i> ,2,6,7,7 <i>a</i> ,7 <i>b</i> -hexahydro-1 <i>H</i> -cyclopropa[<i>a</i>]naphthalene	C ₁₅ H ₂₂	1585	—	0.53	—	—	—	—
27	2-[(2 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,8 <i>aS</i>)-4 <i>a</i> -methyl-8-methylenedecahydronaphthalen-2-yl]prop-2-en-1-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1587	1.92	0.88	3.68	0.37	0.70	—
28	(1 <i>R</i> ,7 <i>S</i> , <i>E</i>)-7-isopropyl-4,10-dimethylenecyclodec-5-enol	C ₁₅ H ₂₄ O	1597	0.22	0.55	—	—	—	—
29	缬草酸	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1601	—	—	0.35	—	—	—
30	eudesma-4(14),7(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄	1605	0.55	0.28	0.62	—	—	—
31	(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-1,4,9,9-tetramethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-4,7-methanoazulene	C ₁₅ H ₂₄	1610	0.22	0.27	0.81	—	—	—
32	2-[(2 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,8 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> ,8-dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -octahydronaphthalen-2-yl]prop-2-en-1-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1613	—	0.29	—	0.23	0.12	—
33	愈创木烯	C ₁₅ H ₂₄	1615	2.70	3.55	1.99	0.84	0.61	—
34	cadinene	C ₁₅ H ₂₄	1625	2.70	7.19	3.22	1.27	0.52	—
35	(1 <i>R</i> ,3 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i>)-7-isopropyl-1,4-dimethyl-1,2,3,3 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -hexahydroazulene	C ₁₅ H ₂₄	1629	1.38	1.75	1.39	1.37	1.01	—
36	β-马榄烯	C ₁₅ H ₂₄	1632	1.46	1.93	2.13	0.86	0.53	—
37	(-)-aristolene	C ₁₅ H ₂₄	1636	2.68	2.66	2.77	1.52	1.52	0.44
38	pethylbrene	C ₁₅ H ₂₄	1642	3.21	4.67	6.56	3.75	3.17	0.56
39	沉香螺旋醇	C ₁₅ H ₂₆ O	1644	8.22	7.78	9.25	6.33	5.30	1.44
40	selina-3,7(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄	1649	—	0.16	—	—	—	—
41	(<i>R</i>)-2-[(4 <i>aS</i> ,8 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> -methyl-8-methylene-1,4,4 <i>a</i> ,5,6,7,8,8 <i>a</i> -octahydronaphthalen-2-yl]propan-1-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1655	0.33	0.61	0.75	—	—	—
42	(<i>E</i>)-2-[(8 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-8,8 <i>a</i> -dimethyl-3,4,6,7,8,8 <i>a</i> -hexahydronaphthalen-2(1 <i>H</i>)-ylidene]propan-1-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1658	—	—	0.31	1.71	0.72	—
43	2-[(2 <i>R</i> ,4 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> ,8-dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,7-octahydronaphthalen-2-yl]prop-2-en-1-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1660	0.26	2.30	2.01	0.63	0.57	—
44	桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	1663	6.96	5.65	3.96	0.32	0.26	0.38
45	4,4-dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2-methylenebicyclo[4.1.0]heptane	C ₁₅ H ₂₂	1668	1.60	1.55	1.60	—	—	—
46	valencene	C ₁₅ H ₂₄	1676	—	—	1.41	—	—	—
47	(<i>E</i>)-3-[(4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-3,7-dimethyl-2,4,5,6,7,7 <i>a</i> -hexahydro-1 <i>H</i> -inden-4-yl]-2-methylacrylaldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O	1678	2.34	0.67	2.39	1.26	0.77	0.71
48	spiro[2.7]dec-4-ene,1,1,5,6,6,9,9-heptamethyl-10-methylene	C ₁₈ H ₃₀	1682	14.5	7.81	5.99	1.00	2.18	0.50
49	aristol-1(10)-en-9-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1688	1.64	1.83	—	—	—	—
50	1(10),11-eremophiladien-9-one	C ₁₅ H ₂₂ O	1689	—	—	1.49	0.24	0.24	0.31
51	doconexent	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	1694	1.06	1.34	1.56	2.85	0.78	0.31
52	tricyclo[5.2.2.0(1,6)]undecan-3-ol,2-methylene-6,8,8-trimethyl	C ₁₅ H ₂₄ O	1706	—	0.94	—	—	—	—
53	(1 <i>aR</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i>)-4 <i>a</i> ,8,8-trimethyl-1,1 <i>a</i> ,4,4 <i>a</i> ,5,6,7,8-octahydrocyclopropa[<i>d</i>]naphthalene-2-carbaldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O	1708	4.54	—	7.77	0.47	1.18	1.45
54	6-(1,3-dimethylbuta-1,3-dienyl)-1,5,5-trimethyl-7-oxa-bicyclo[4.1.0]hept-2-ene	C ₁₅ H ₂₂ O	1713	0.21	—	0.32	—	—	—
55	6-isopropenyl-4,8 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8 <i>a</i> -octahydro-naphthalen-2-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1716	1.28	0.74	1.88	0.54	0.87	0.47
56	<i>cis</i> -thujopsene	C ₁₅ H ₂₄	1723	—	—	—	—	0.12	—
57	6-(1-hydroxymethylvinyl)-4,8 <i>a</i> -dimethyl-3,5,6,7,8,8 <i>a</i> -hexahydro-1 <i>H</i> -naphthalen-2-one	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1723	—	—	0.17	—	—	—
58	4,6,6-trimethyl-2-(3-methylbuta-1,3-dienyl)-3-oxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octane	C ₁₅ H ₂₂ O	1727	—	—	0.91	0.14	0.17	—
59	tricyclo[4.2.1.1(2,5)]deca-3,7-dien-9-one,10-butyl-10-hydroxy-stereoisomer	C ₁₄ H ₁₈ O ₂	1729	3.52	4.19	0.55	—	—	—
60	3- <i>epi</i> -cedrenal	C ₁₅ H ₂₂ O	1736	2.29	1.31	0.24	0.44	0.60	—
61	squamulosone	C ₁₅ H ₂₂ O	1738	5.96	3.74	5.81	2.16	4.44	0.75
62	γ-himachalene	C ₁₅ H ₂₄	1744	0.33	0.38	0.88	0.84	1.17	0.51
63	aristolone	C ₁₅ H ₂₂ O	1748	—	0.14	—	—	—	—
64	9,12-octadecadienoic acid,methyl ester	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	1748	—	—	—	—	0.14	—
65	(<i>E</i>)-2-[(8 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-8,8 <i>a</i> -dimethyl-3,4,6,7,8,8 <i>a</i> -hexahydronaphthalen-2(1 <i>H</i>)-ylidene]propanal	C ₁₅ H ₂₂ O	1753	0.83	0.47	0.44	0.15	0.32	—

续表 2

序号	化合物	化学式	保留 指数	相对质量分数/%					
				BTS	TTS	QNS	BTC	TTC	QNC
66	6-[1-(hydroxymethyl)vinyl]-4,8a-dimethyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-2-(1H)-naphthalenone	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1756	—	—	0.33	—	0.25	—
67	eudesm-4(14)-en-11-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	1760	0.75	0.48	0.37	3.22	2.69	0.74
68	dihydroagarofuran	C ₁₅ H ₂₆ O	1777	—	—	—	0.38	0.26	—
69	愈创木醇	C ₁₅ H ₂₆ O	1780	—	—	—	0.17	0.39	—
70	4a,5-dimethyl-3-(1-methylethylidene)-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-2(3H)-naphthalenone	C ₁₅ H ₂₂ O	1788	4.46	9.40	3.85	1.20	1.42	2.34
71	methyl 2-[(2R,4aR)-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalen-2-yl]acrylate	C ₁₆ H ₂₄ O ₂	1792	0.43	—	0.24	0.15	0.13	—
72	(-)-spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	1796	—	—	—	0.33	0.40	—
73	(2R,3R,4aR,5S,8aS)-2-hydroxy-4a,5-dimethyl-3-(prop-1-en-2-yl)-2,3,4,4a,5,6-hexahydronaphthalen-1(8aH)-one	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1803	—	—	—	0.33	0.29	—
74	(2aS,3aR,5aS,9bR)-2a,5a,9-trimethyl-2a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahydro-2H-naphtho[1,2-b]oxireno[2,3-c]furan	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1805	0.46	0.46	0.38	—	—	—
75	α-kessyl acetate	C ₁₇ H ₂₈ O ₃	1813	—	—	—	1.76	2.54	2.22
76	nootkatone	C ₁₅ H ₂₂ O	1817	0.33	0.23	0.31	5.59	9.42	3.37
77	6-[1-(hydroxymethyl)vinyl]-4,8a-dimethyl-1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-2-naphthalenol	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1824	—	—	—	0.16	0.35	—
78	(4aR,5S)-1-hydroxy-4a,5-dimethyl-3-(propan-2-ylidene)-4,4a,5,6,7,8-hexahydronaphthalen-2(3H)-one	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1829	—	—	0.29	—	—	—
79	propan-2-yl (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenoate	C ₂₃ H ₃₆ O ₂	1831	—	—	—	0.56	0.80	0.68
80	isospathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	1840	—	—	—	1.39	0.95	—
81	4,7,10,13,16,19-docosaheptaenoic acid, methyl ester	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	1855	—	—	—	0.63	0.81	1.12
82	(3R,3aR,4aS,5R,9aS)-3,5,8-trimethyl-3a,4,4a,5,6,7,9,9a-octahydroazuleno[6,5-b]furan-2(3H)-one	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1862	0.25	0.18	—	0.73	0.24	—
83	10,12-tricosadiynoic acid, methyl ester	C ₂₄ H ₄₀ O ₂	1865	—	—	—	3.50	4.33	1.61
84	methyl-4,7,10,13,16-docosapentaenoate	C ₂₃ H ₃₆ O ₂	1876	—	—	—	0.13	0.32	—
85	4-isopropyl-6-methyl-3,4,4a,7,8,8a-hexahydronaphthalene-1-carbaldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O	1900	—	—	—	0.82	1.14	—
86	parthenium	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	1904	—	—	—	0.40	0.43	0.41
87	hydroxyvaleric acid	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	1908	—	—	—	0.39	—	—
88	ylangenal	C ₁₅ H ₂₂ O	1921	—	—	—	1.06	1.92	0.49
89	bohlmann k2631	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	1927	—	—	—	—	0.69	—
90	5,8-dihydroxy-4a-methyl-4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9,10-decahydro-2(3H)-phenanthrenone	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	1933	—	—	—	5.54	5.33	3.22
91	7-isopropenyl-6-methyl-3-methylene-6-vinylhexahydro-1-benzofuran-2(3H)-one	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	1940	—	—	—	0.48	0.47	0.40
92	dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	1956	1.03	—	—	—	—	—
93	(4aR,5S)-1-hydroxy-4a,5-dimethyl-3-(propan-2-ylidene)-4,4a,5,6-tetrahydronaphthalen-2(3H)-one	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	1957	—	—	—	6.48	3.89	4.19
94	methyl 4,7,10,13,16,19-docosaheptaenoate	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	1965	—	—	—	—	0.18	—
95	methyl 9,11-octadecadiynoate	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	1999	—	—	—	0.27	0.22	—
96	n-propyl 5,8,11,14,17-eicosapentaenoate	C ₂₃ H ₃₆ O ₂	2018	—	—	—	0.44	1.73	0.58
97	5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	2032	—	—	—	—	0.33	—
98	1,2,3,4-tetrakis(1-methylethylidene)cyclobutane	C ₁₆ H ₂₄	2054	—	—	—	0.27	1.86	0.70
99	reynosin	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	2061	—	—	—	0.14	—	—
100	dehydrocostuslactone	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	2071	0.16	—	—	0.83	1.17	0.67
101	propanoic acid,2-methyl-(dodecahydro-6a-hydroxy-9a-methyl-3-methylene-2,9-dioxazuleno[4,5-b]furan-6-yl)methyl ester	C ₁₉ H ₂₆ O ₆	2094	—	—	—	—	0.12	—
102	butyl 4,7,10,13,16,19-docosaheptaenoate	C ₂₆ H ₄₀ O ₂	2106	—	—	—	0.22	0.22	—
103	(1E)-1,5-diphenyl-1-penten-3-one	C ₁₇ H ₁₆ O	2159	—	—	—	0.17	0.19	—
104	2-(2-苯乙基)色酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	2239	—	—	0.25	12.01	9.37	30.86
105	6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	2615	—	—	—	5.23	3.71	1.13
106	2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	2620	—	—	—	1.80	2.13	26.78
107	erucylamide	C ₂₂ H ₄₃ NO	2785	—	—	0.19	0.38	0.51	0.40
108	squalene	C ₃₀ H ₅₀	2833	—	—	—	0.21	—	0.61
109	5-methoxy-2-[4-(2-methoxyphenyl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl]phenol	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₃	2856	—	—	—	1.06	0.38	—
110	6,7-二甲氧基-2-(苯乙基)色酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	2895	—	—	—	3.38	2.27	1.65

3.1.1 6 种沉香精油化学成分数量比较 如表 2 所示, 从 BTS 中鉴定出化合物 48 种, 占精油总含量的 98.01%; 从 BTC 鉴定出化合物 71 种, 占精油总含量的 96.16%; 从 TTS 鉴定出化合物 55 种, 占精油总含量的 96.99%; 从 TTC 鉴定出化合物 72 种, 占精油总含量的 96.41%; 从 QNS 鉴定出化合物 59 种, 占精油总含量的 97.02%; 从 QNC 鉴定出化合物 35 种, 占精油总含量的 95.29%。

奇楠沉香、通体香和板头香 3 种沉香原料所得沉香精油, BTC 和 TTC 中化学成分数量均高于其水蒸气蒸馏精油, 且增加的化合物主要为脂肪酸类和 2-(2-苯乙基)色酮类化合物, 同时, BTC 和 TTC 中的倍半萜类化合物数目并没有减少, 甚至还提取出 BTS 和 TTS 中不存在的倍半萜类化合物, 这说明超临界 CO₂ 萃取法相较于水蒸气蒸馏法, 提取效果更佳。此外, QNS 中鉴定出的化合物数量及其中倍半萜类化合物数量均高于 BTS 和 TTS, 这说明奇楠沉香中具有更加丰富的香气成分。然而, 由于 QNC 中 2-(2-苯乙基)色酮类化合物含量过高, 大大降低了精油中其他化合物含量占比, 以至于面积归一法中积分方法较难对少含量的化合物进行积分鉴定, 故 QNC 中鉴定出的化合物数目仅有 35 种。

综上, 3 种沉香中, 水蒸气蒸馏法提取的精油主要成分均为小分子芳香化合物及倍半萜类化合物, 出峰时间集中在 16~45 min (图 2), 而超临界

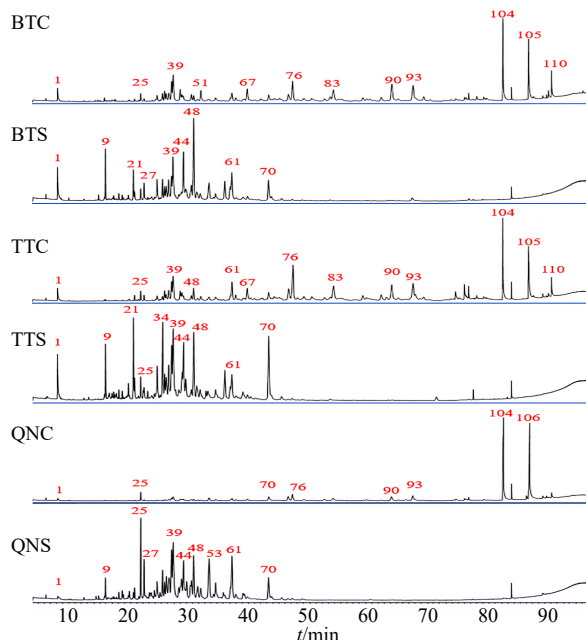


图 2 6 种沉香精油 GC-MS 总离子流图

Fig. 2 GC-MS total ion flow diagram of six agarwood essential oils

CO₂ 萃取法能够提取到更多的化合物, 精油出峰时间较均匀, 且在 75~90 min 出现了水蒸气蒸馏精油中没有的色酮类化合物。

3.1.2 6 种沉香精油化合物种类及其相对含量比较 如图 3 所示, 沉香精油主要由倍半萜类、小分子芳香物质、2-(2-苯乙基)色酮类及脂肪酸类化合物组成, 而不同沉香精油, 其化合物种类相对含量也有明显的不同。可以看出, 不同提取方式对精油不同成分相对含量影响更大。3 种沉香水蒸气蒸馏精油中, 倍半萜类及小分子芳香物质成分含量较多, 而超临界萃取精油中, 则出现了大量水蒸气蒸馏精油中没有的色酮类化合物, 且能得到更多的脂肪酸类化合物。

3 种不同沉香中, 板头香和通体香化合物含量组成相似, 无论是超临界萃取精油还是水蒸气蒸馏精油, 其小分子芳香成分含量均高于奇楠沉香, 但奇楠沉香精油中, 2-(2-苯乙基)色酮类化合物含量极高, 奇楠沉香超临界萃取精油中, 仅 4 种 2-(2-苯乙基)色酮化合物含量之和, 便占总色谱峰面积的 60% 以上, 甚至是在水蒸气蒸馏提取的长时间高温环境下, 也有微量的 2-(2-苯乙基)色酮类化合物提取出来, 这之前文献报道相似^[19-20]。

从 6 种沉香精油的 HCA 图 (图 4) 也可看出, 沉香水蒸气蒸馏精油和超临界萃取精油分为 2 组,

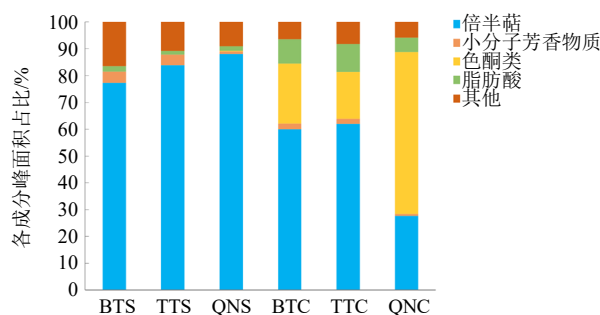


图 3 6 种沉香精油中化合物含量

Fig. 3 Contents of compound in six agarwood essential oils

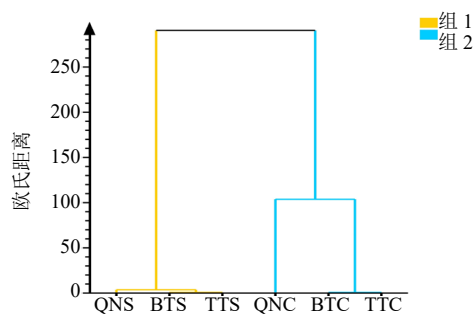


图 4 6 种沉香精油 HCA 图

Fig. 4 HCA of six kinds of agarwood essential oils

通体香和板头香无论是水蒸气蒸馏精油还是超临界萃取精油,二者精油成分及含量十分相似,而奇楠沉香相差较大,特别是 QNC,这是由于 QNC 中含有大量的 2-(2-苯乙基)色酮类化合物造成的差异。根据有监督的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)模型分析筛选这 2 组之间的差异代谢物,变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)较高的化合物有 2-(2-苯乙基)色酮(VIP 3.74)、spiro[2.7]dec-4-ene,1,1,5,6,6,9,9-heptamethyl-10-methylene(VIP 2.68)、2-(4-methoxyphenethyl)-4H-chromen-4-one(VIP 2.34)、nootkatone(VIP 2.27)等,说明以上化合物对不同提取方式所得沉香精油的分类影响较为显著。可以看出,水蒸气蒸馏沉香精油与超临界萃取沉香精油能够明显区分,这说明不同的精油提取方式所得到的沉香精油化合物成分有所不同。

综上,通过 6 种沉香精油化合物种类含量比较可知,板头香和通体香精油化合物成分种类和含量相似,而奇楠沉香精油中含有更多的色酮类化合物,特别是 QNC,2-(2-苯乙基)色酮化合物总质量分数高达 60%以上。水蒸气蒸馏提取法无法提出色酮类成分,精油中小分子芳香物质及倍半萜类化合物含量较多,而超临界 CO₂ 萃取法精油中则出现了大量水蒸气精油中没有的色酮类化合物,且能够提取出更多的脂肪酸类化合物。

3.2 沉香精油抗氧化活性测定

3.2.1 不同沉香精油清除 DPPH 自由基活性 如图 5 所示,6 种沉香精油清除 DPPH 自由基能力不同,在 0.5~5 mg/mL 的质量浓度中,6 种沉香精油的 DPPH 自由基清除能力与质量浓度呈不同程度的正相关。在这些精油中,DPPH 自由基清除能力最强

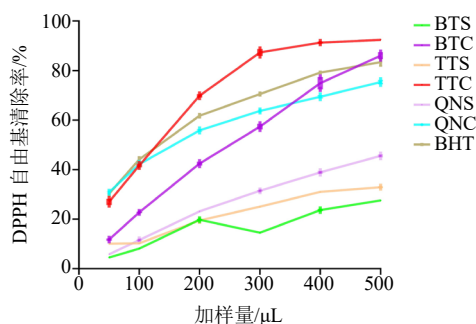


图 5 沉香精油清除 DPPH 自由基活性

Fig. 5 DPPH free radical scavenging activity of agarwood essential oil

的是 TTC 精油,最弱的是 BTS 精油。3 种超临界萃取沉香精油,在 5 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率均在 50%以上,而 3 种水蒸气蒸馏沉香精油,同等质量浓度下,清除率均在 50%以下,可以看出,无论是何种沉香,超临界萃取精油 DPPH 自由基清除能力均比水蒸气蒸馏提取精油强。而不同来源沉香,同种提取方式的沉香精油 DPPH 自由基清除能力虽有不同,但差距较小,抗氧化活性相似。6 种沉香精油的 DPPH 自由基清除能力强弱与其化合物组成结果十分相似,这说明沉香精油的 DPPH 自由基清除能力与这些沉香精油不同提取方式所致化学成分的不同有关。不同提取方式所致的精油氧化能力的不同,可能是由于水蒸气蒸馏提取精油长时间与空气在热环境下接触,致使部分化合物被氧化,其抗氧化能力降低,而超临界萃取精油能够保留一些热敏性强,容易氧化分解破坏的成分,故抗氧化能力较高。

3.2.2 不同沉香精油清除 ABTS 自由基活性 如图 6 所示,6 种沉香精油 ABTS 自由基清除能力与质量浓度呈不同程度的正相关。在本实验中,同 DPPH 自由基清除能力相反,通体香和板头香的水蒸气蒸馏精油的 ABTS 自由基清除能力整体要强于超临界萃取精油,QNC 的 ABTS 自由基清除能力则强于 QNS。在这些精油中,TTS 的 ABTS 自由基清除能力最强,在 2 mg/mL 时,其 ABTS 自由基清除率高达 83.26%;QNS 的 ABTS 自由基清除能力最弱,在 2 mg/mL 时,其 ABTS 自由基清除率最高仅为 53.03%。总体上,6 种沉香精油的 ABTS 自由基清除能力差距较 DPPH 自由基清除能力差距小。

2 个自由基清除实验中,阳性对照 BHT 在 0.05~0.50 mg/mL,其 ABTS 自由基清除清除率均在 99%以上,自由基清除能力远高于沉香精油,但

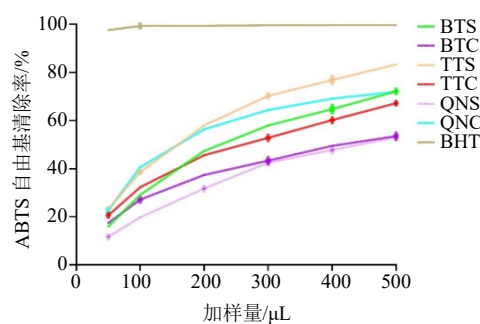


图 6 沉香精油清除 ABTS 自由基活性

Fig. 6 ABTS free radical scavenging activity of agarwood essential oil

同等质量浓度下, BHT 的 DPPH 自由基清除能力较弱, 表明 BHT 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力有所不同。同样, 虽然趋势并不明显, 但普通沉香的超临界萃取精油和水蒸气蒸馏精油在 ABTS 自由基清除实验中与 DPPH 自由基清除实验呈现相反的结果, 推测沉香精油抗氧化活性的差异是由于不同氧化体系的自由基清除原理不同造成的。并且在 ABTS 自由基清除实验中, 奇楠沉香又同普通沉香的实验结果相反, 这可能与奇楠沉香中色酮类化合物含量较高有关。

3.3 不同沉香精油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞存活率的影响

炎症是机体对各种刺激产生的一种自我防御, 通常情况下, 炎症是有益的, 但是过度的炎症反应却会引起组织损伤和诱发疾病。LPS 是细菌感染性炎症反应中最主要的促炎因子, 可诱导单核巨噬细胞等炎症细胞合成并释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、IL-8 等多种炎症因子^[21]。研究表明, 沉香挥发油具有较强的体内外抗炎活性^[22-24], 但不同来源、不同提取方式得到的沉香精油的抗炎差异却少有研究。

因此, 本实验测定了不同质量浓度的 6 种沉香精油对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞活力的影响, 其中, BTS、TTS、QNS、BTC、TTC、QNC 精油抑制细胞活性的 IC₅₀ 值分别为 18.61、30.30、18.05、41.98、38.45、24.50 $\mu\text{g/mL}$, 阳性对照吲哚美辛的 IC₅₀ 值为

10.24 $\mu\text{g/mL}$ 。如图 7 所示, 6 种沉香精油在 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$, 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞存活率均有显著的抑制作用 ($P < 0.001$)。6 种沉香精油抗炎活性相近, QNS 抗炎活性最佳, BTS 次之, BTC 最弱。由于不同提取方式得到的沉香精油抗炎活性具有明显差异, 且 3 种沉香的水蒸气蒸馏提取精油作用均优于超临界 CO₂ 萃取精油。

4 讨论

4.1 2 种普通沉香精油化合物成分相似

本研究对 6 种沉香精油的化合物数目和相对含量进行比较分析, 结果表明, 从 BTS、TTS 和 BTC、TTC 精油中鉴定出的化合物成分数目分别为 48、55 及 71、72; 且精油中主要成分小分子芳香类及倍半萜类成分质量分数之和分别为 81.42%、87.84%、62.05%、63.83%。这些数据表明, 通体香和板头香 2 种普通沉香, 无论是超临界萃取还是水蒸气蒸馏, 所得的精油化学成分相似。但沉香水蒸气蒸馏精油同超临界萃取精油化学成分具有较大的差异, 板头香及通体香的水蒸气蒸馏精油与超临界萃取精油相比, 化合物数量较少, 仅有小分子芳香物质、倍半萜类化合物及少量脂肪酸成分, 超临界萃取精油中除脂肪酸类及倍半萜类化合物数目增多外, 还提取了大量的 2-(2-苯乙基)色酮类化合物, 占其精油总成分相对含量的 17% 以上。

4.2 奇楠沉香与普通沉香所提精油化学成分差异较大

QNS 中共鉴定出化合物 59 种, 倍半萜类化合

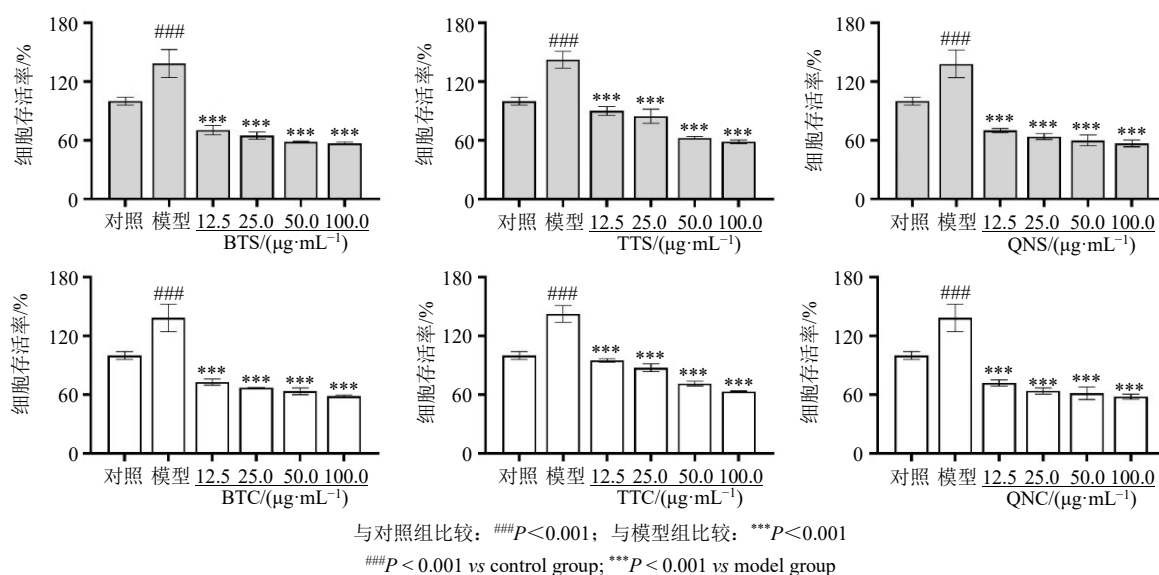


图 7 6 种沉香精油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响

Fig. 7 Effect of six agarwood essential oils on RAW264.7 cells viability

物 53 种, 占相对质量分数的 88.07%, 其倍半萜化合物数量和含量均较 BTS (43 种, 77.3%) 和 TTS (50 种, 83.83%) 2 种精油多。而在 QNC 中鉴定的化合物仅有 35 种, 且小分子芳香物质及倍半萜成分质量分数之和仅为 28.36%, 远低于 BTC 和 TTC, 但其色酮类成分质量分数高达 60.42%, 远高于 BTC (22.42%) 和 TTC (17.48%)。可见, 相较于板头香和通体香, 水蒸气蒸馏精油中, QNS 具有更丰富的香气成分 (小分子芳香物质和倍半萜类成分); 而超临界萃取精油中, QNC 中含有更多的色酮类成分含量, 可能是奇楠沉香优于普通沉香的原因之一。

4.3 不同提取方式所得沉香精油抗氧化、抗炎活性各有优劣

不同提取方式所得沉香精油的活性差异较大。其中, 同批沉香采用超临界萃取法所得沉香精油抗氧化能力一般强于其水蒸气蒸馏精油, 推测可能是由于水蒸气蒸馏精油长时间处于高温环境中, 加速部分化合物氧化, 导致其抗氧化能力降低^[25]。但其水蒸气蒸馏精油抗炎能力普遍优于超临界萃取精油。由结果可知, 超临界 CO₂ 萃取所得沉香精油中色酮类化合物的含量远高于倍半萜成分。石小翠等^[26]认为精油抗炎的物质基础可能是其化合物中的醛分子。而 Takamatsu 等^[27]发现色酮类成分受热可裂解成一些相对分子质量较低的芳香类化合物, 如苯甲醛、苄基丙酮等, 这些小分子芳香类成分在水蒸气蒸馏精油中含量较多。沉香精油中小分子芳香物质及倍半萜类化合物中有大量的萜醛类化合物, 如 spiro[2.7]dec-4-ene, 1,1,5,6,6,9,9-heptamethyl-10-methylene、4a,5-dimethyl-3-(1-methylethylidene)-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-2(3H)-naphthalenone、沉香螺旋醇等化合物, 这可能是水蒸气蒸馏所得沉香精油抗炎活性均优于超临界萃取精油的主要原因。

同时, 不同来源精油在抗氧化实验中虽未表现出明显趋势, 但 QNS 和 QNC 在水蒸气蒸馏和超临界萃取中均显示出最佳的炎症细胞抑制活性, 这表明奇楠沉香精油抗炎活性优于板头香和通体香这 2 种普通沉香, 其在抗炎方面具有独特的药理优势。

沉香作为一种名贵香料, 民间多以熏、烧等加热的方式使用, 除了能够更好地扩散沉香的香味之外, 是否因沉香中某些成分需受热裂解后才能发挥其药效尚未有相关研究报道。水蒸气蒸馏法是经典的沉香精油提取方法, 其认可度高, 但提取率极低; 超临界萃取方式提取精油的优势在于其提取方式温

和, 能在较低温度下, 更快更好地溶解、提取出更多的精油, 但这种提取方式是否适用于作为药用的沉香尚不明晰。沉香精油价格昂贵, 不同来源、不同提取方式所得沉香精油有所差异, 市场上产品质量良莠不齐。目前沉香精油的研究多数仅停留在精油中化学成分的鉴定, 或是单来源沉香不同提取方法所得精油的初步对比, 关于不同来源、不同提取方式得到沉香精油的系统对比研究几乎没有, 光凭沉香精油化合物的分析对比, 并不足以支撑沉香精油质量评价体系的建立。本研究对市场上具有代表性的 3 种沉香采用 2 种不同提取方式提取得到 6 种沉香精油, 对其化学组成、抗氧化能力及抗炎活性进行比较分析, 并探讨所得沉香精油化学成分及其抗氧化和抗炎活性的异同。实验结果表明, 6 种沉香精油化学成分和活性均有所不同, 超临界 CO₂ 萃取法能够提取到更多的成分, 且超临界 CO₂ 萃取沉香精油的抗氧化能力大于水蒸气蒸馏沉香精油; 而水蒸气蒸馏沉香精油抗炎能力则强于其超临界萃取精油; 同时, 研究发现, 板头香和通体香所得精油化合物组成类似, 而奇楠沉香中则含有更多的香气成分 (倍半萜类和小分子芳香类成分) 和色酮类化合物, 且其抗炎活性优于其他 2 种沉香。精油化学成分的差异造成活性上的差异, 超临界 CO₂ 萃取法条件温和, 精油中保留了更多的抗氧化化合物, 而水蒸气蒸馏沉香精油中含有更多的萜醛类化合物, 这可能是不同提取方式所得沉香精油抗氧化、抗炎活性差异的主要原因。

综上, 本研究发现沉香水蒸气精油抗炎活性优于超临界萃取沉香精油, 同时, 奇楠沉香中除含有更多的香气成分和色酮类化合物外, 其抗炎活性也优于其他 2 种普通沉香, 可为沉香精油的应用、质量评价和产品开发提供一定依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tan C S, Isa N M, Ismail I, *et al.* Agarwood induction: Current developments and future perspectives [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 122.
- [2] Liu Y Y, Chen H Q, 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] Li W, Chen H Q, Wang H, *et al.* Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: Chemistry, biological activities and biosynthesis [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(3): 528-565.

- [4] Yan T T, Yang S, Chen Y, *et al.* Chemical profiles of cultivated agarwood induced by different techniques [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1990.
- [5] 冯剑, 侯文成, 陈兰, 等. 基于《中华人民共和国药典》的奇楠种质产沉香的质量分析与评价 [J]. *中国现代中药*, 2022, 24(3): 432-437.
- [6] Wang M R, Li W, Luo S, *et al.* GC-MS study of the chemical components of different *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilgorgans and agarwood from different Asian countries [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2168.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 192.
- [8] Wang S, Yu Z X, Wang C H, *et al.* Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and *Aquilaria* plants [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 342.
- [9] Wang C H, Wang S, Peng D Q, *et al.* Agarwood extract mitigates intestinal injury in fluorouracil-induced mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(7): 1112-1119.
- [10] Wang C H, Peng D Q, Liu Y Y, *et al.* Agarwood alcohol extract ameliorates isoproterenol-induced myocardial ischemia by inhibiting oxidation and apoptosis [J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, 2020: 3640815.
- [11] Wang S, Wang C H, Yu Z X, *et al.* Agarwood essential oil ameliorates restrain stress-induced anxiety and depression by inhibiting HPA axis hyperactivity [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3468.
- [12] Wang S, Wang C H, Peng D Q *et al.* Agarwood essential oil displays sedative-hypnotic effects through the GABAergic system [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2190.
- [13] Chen H Q, Yang Y, Xue J, *et al.* Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees [J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 4884-4896.
- [14] Samadi M, Zainal Abidin Z, Yoshida H, *et al.* Towards higher oil yield and quality of essential oil extracted from *Aquilaria malaccensis* wood via the subcritical technique [J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 3872.
- [15] Penpun. Chemical constituents and antimicrobial activity of essential oil and extracts of heartwood of *Aquilaria crassna* obtained from water distillation and supercritical fluid carbon dioxide extraction [J]. *Silpakorn Univ Sci Technol J*, 2009, 3(1): 25-33.
- [16] 耿天佑, 罗理勇, 曾亮, 等. 不同提取方法对沉香精油制备的影响 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2020, 45(2): 59-67.
- [17] 韩恰恰, 杨思惠, 陈晓颖, 等. 沉香挥发油化学组成分析及比较 [J]. *中药材*, 2019, 42(7): 1566-1571.
- [18] 郁萌, 侯文成, 冯剑, 等. 结合非靶向代谢组学和指纹图谱对通体结香技术产沉香与野生沉香化学成分的比较分析 [J/OL]. *中草药*, [2022-07-22]. <https://kns-cnki-net.e1.buaa.edu.cn/kcms/detail/12.1108.r.20211029.1445.006.html>.
- [19] 王雅丽, 李薇, 曾军, 等. 栽培奇楠沉香精油中致香成分的 GC-MS 分析 [J]. *中国热带农业*, 2021(1): 90-97.
- [20] Yu M, Liu Y Y, Feng J, *et al.* Remarkable phytochemical characteristics of Chi-Nan agarwood induced from new-found Chi-Nan germplasm of *Aquilaria sinensis* compared with ordinary agarwood [J]. *Int J Anal Chem*, 2021, 2021: 5593730.
- [21] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 490-495.
- [22] Yu Z X, Wang C H, Zheng W, *et al.* Anti-inflammatory 5,6,7,8-tetrahydro-2-(2-phenylethyl)chromones from agarwood of *Aquilaria sinensis* [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 99: 103789.
- [23] Ma C T, Ly T L, Le T H V, *et al.* Sesquiterpene derivatives from the agarwood of *Aquilaria malaccensis* and their anti-inflammatory effects on NO production of macrophage RAW264.7 cells [J]. *Phytochemistry*, 2021, 183: 112630.
- [24] Yadav D K, Mudgal V, Agrawal J, *et al.* Molecular docking and ADME studies of natural compounds of agarwood oil for topical anti-inflammatory activity [J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2013, 9(3): 360-370.
- [25] 田程飘, 宋雅玲, 许海棠, 等. 超临界和水蒸气蒸馏提取沉香精油成分分析及抗氧化、抑菌活性对比研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(18): 4000-4008.
- [26] 石小翠, 曹冬花, 李佳, 等. 三种香茅精油的化学成分及体外抗氧化和抗炎活性评价 [J]. *食品工业科技*, 2021, 42(21): 83-90.
- [27] Takamatsu S, Ito M. Agarotetrol in agarwood: Its use in evaluation of agarwood quality [J]. *J Nat Med*, 2020, 74(1): 98-105.

[责任编辑 李亚楠]