

氮气诱导土沉香结香及挥发性成分分析

刘高峰^{1,2}, 周再知^{1*}, 黄桂华¹, 赵威威¹, 张青青¹, 宋晓琛^{1,3}

1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东广州 510520; 2. 菏泽学院, 山东菏泽 274015; 3. 江西省林业科学院, 江西南昌 330032

摘要: 以 10 年生土沉香树为材料, 采用树干填充高压氮气方式, 每隔 7 d 和 15 d 处理 1 次, 连续处理 3 个月。分别在处理后 7 个月和 10 个月时取样, 观察树干外部变色面积, 测量树干木质部变色范围, 检测醇溶性提取物和沉香四醇含量, 并应用 GC-MS 分析所结沉香的化学成分及相对含量, 探讨树干填充氮气对诱导土沉香的结香效应, 为人工诱导土沉香结香提供可行的诱导方法。结果表明, 氮气填充处理显著提高了土沉香木质部纵向变色长度和横向变色宽度, 且每隔 7 d 填充 1 次气体 (N₇) 的效果好于每隔 15 d 填充 1 次 (N₁₅)。处理结束后 10 个月时, N₇ 处理树干变色面积最大, 且在纵向和横向上木质部沉香区和总变色长度均明显高于 N₁₅ 和只打孔不充气处理 (CK₁)。氮气处理显著提高了土沉香醇溶性提取物和沉香四醇含量, 且各处理沉香区含量均高于过渡区。处理结束后 7 个月时, N₇ 沉香区醇溶性提取物含量分别比 N₁₅ 和 CK₁ 高 14.04% 和 28.47%, 沉香四醇含量达 0.12%, 显著高于 N₁₅ 和 CK₁。随着处理时间的延长, 各处理沉香区醇溶性提取物和沉香四醇含量均逐渐升高。处理结束后 10 个月时, N₇ 处理的沉香区醇溶性提取物和沉香四醇含量分别为 19.37% 和 0.30%, 明显高于 N₁₅ 和 CK₁; N₁₅ 处理的醇溶性提取物和沉香四醇含量也高于 CK₁, 分别比 CK₁ 提高 9.42% 和 51.50%。N₇ 处理的沉香区挥发物成分较多, 富含 25 种萜烯类化合物、5 种色酮类化合物以及 8 种其他类化合物, 其中萜烯类和色酮类化合物总相对含量达 66.09%, 明显高于 N₁₅ 和 CK₁。

关键词: 土沉香; 氮气; 人工诱导; 挥发性成分

中图分类号: Q949.761.1; R284.1 文献标识码: A

Analysis of Agarwood Formation and Volatile Components of *Aquilaria sinensis* Induced by Nitrogen Gas

LIU Gaofeng^{1,2}, ZHOU Zaizhi^{1*}, HUANG Guihua¹, ZHAO Weiwei¹, ZHANG Qingqing¹,
SONG Xiaochen^{1,3}

1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China; 2. Heze University, Heze, Shandong 274015, China; 3. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang, Jiangxi 330032, China

Abstract: The trunks of ten-year-old *Aquilaria sinensis* trees were filled with high-pressure nitrogen gas and treated every 7 and 15 days for 3 consecutive months. The wood discoloration area was observed and measured, the content of alcohol-soluble substances was detected, and the chemical composition and relative content of the agarwood were analyzed by GC-MS at 7 and 10 months after treatment. The effect of nitrogen gas filled on the agarwood formation was discussed, which would provide a feasible induction method for artificial agarwood formation. The results showed that nitrogen treatment significantly increased the longitudinal discoloration length and transverse discoloration width of wood trunks, and the results of the treatment filled with nitrogen gas every 7 days (N₇) were better than that of the treatment filled with nitrogen every 15 days (N₁₅). Ten months after N₇ treatment, the discoloration area was the largest, and the length of agarwood zone and total discoloration zone in both longitudinal and transverse direction were significantly longer than those of N₁₅ and CK₁. Inflating nitrogen treatment could significantly increase the content of alco-

收稿日期 2022-04-02; 修回日期 2022-07-02

基金项目 广东省林业科技创新项目 (No. 2017KJCX001)。

作者简介 刘高峰 (1979—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 珍贵树种培育。*通信作者 (Corresponding author): 周再知 (ZHOU Zaizhi), E-mail: zzzhoucn@126.com。

hol-soluble substances and agarotetrol, and the content of agarwood zone was higher than that of transition zone. The content of alcohol-soluble substances and agarotetrol in agarwood area increased by 14.04% and 28.47% compared with that of N₁₅ and CK₁, respectively, and the content of agarotetrol was 0.12%, which significantly higher than that of N₁₅ and CK₁, seven months after N₇ treatment. The content of alcohol-soluble substances and agarotetrol in each treatment increased with the increase of treatment time. Ten months after N₇ treatment, the content of alcohol-soluble substances and agarotetrol in agarwood zone was 19.37% and 0.30% respectively, which was noticeably higher than that of N₁₅ and CK₁. The content of alcohol-soluble substances and agarotetrol in N₁₅ treatment increased by 9.42% and 51.50% respectively, compared with CK₁. The volatile component of agarwood in N₇ treatment was the highest, which was rich in 25 terpenes, 5 chromones and 8 other compounds, and the total relative content of terpenes and chromones reached 66.09%, significantly higher than that of N₁₅ and CK₁.

Keywords: *Aquilaria sinensis*; nitrogen gas; artificial induction; volatile component

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.03.021

沉香, 通常指瑞香科 (Thymelaeaceae) 沉香属 (*Aquilaria* Lam.) 树种所含树脂的木材, 是传统名贵药材和珍稀香料^[1], 在医药、香料、化妆品等领域广泛使用。土沉香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.] 是我国特有的珍贵药源树种^[2], 是国内沉香主要植物来源。近年来, 由于土沉香自然结香率低^[3], 而沉香市场需求持续增长, 探求安全、有效、稳量的人工诱导结香技术, 及研究其结香机理成为国内外研究的热点^[4]。

目前, 人工诱导结香的方法主要有三大类, 即物理法、化学法和生物法, 其中前 2 种是生产经营中常用的诱导方法^[5]。物理法主要是在土沉香树干和枝条上制造创面, 例如烧凿钻孔、斧头砍伤、机械打钉等^[6-7]。化学法则是利用无机盐^[8-9]、激素^[10]等化学试剂液体输入的方式诱导树体结香。而生物法常采用组织接种或菌液输入的方式, 通过不同种类真菌侵染而促进结香^[11-12]。研究表明, 采用化学法、生物法等单一处理时结香效果欠佳, 因此液体输入法诱导结香时, 常通过几种试剂组合处理方法来提高结香质量^[9, 13]。研究发现, 沉香挥发性成分香气浓烈且组成复杂, 多采用气相色谱-质谱联用技术进行成分分析研究^[14], 然而不同结香方法处理下沉香挥发性成分存在明显差异。采用新型诱导方式, 如树干填充气体诱导土沉香结香及其挥发性成分分析均尚无报道。

早期研究表明, 一些气态物质如 CO₂、乙烯等在心材的形成过程中发挥着重要的作用^[15]。NILSSON 等^[16]研究显示, 树干填充氮气能诱导樟子松 (*Pinus sylvestris*) 形成不同于边材的变色木材。刘小金^[17]研究发现, N₂ 树干填充使檀香 (*Santalum album*) 形成的的心材面积最大。鉴于以上研究, 为了探明氮气诱导土沉香结香的效果,

以 10 年生土沉香为材料, 采用树干填充高压氮气方式进行诱导, 检测醇溶性物质含量及对挥发物成分进行分析, 以期为人工诱导土沉香结香提供新技术及新理论。

1 材料与方法

1.1 材料

在广东省惠州市惠城区三栋镇土沉香人工种植基地内, 选用生长健康、长势均匀的 10 年生土沉香树 [平均胸径 (12.94±0.52)cm, 平均树高 (5.41±0.68)m] 为研究材料, 进行人工诱导结香处理。高压氮气纯度为 99.90%。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 采用随机区组试验设计, 设置 4 个处理, 分别为树干打孔后每隔 7 d 和 15 d 填充 1 次气体 (分别以 N₇ 和 N₁₅ 表示), 只打孔不充气 (CK₁) 和无任何处理 (CK₂)。每个小区处理 5 株, 重复 4 次, 试验共计 80 株。

1.2.2 树干充气方法 先将高压瓶中的氮气气体减压至 0.1 MPa, 再经橡胶管充入树孔内。用流量计计量注入气体的体积, 每次以 30 mL/min 速度充气 50 s, 共充入气体 25 cm³。选择晴天进行树干充气, 按试验设计方案, 持续处理 3 个月。

1.2.3 测定方法 (1) 木芯变色范围测定。充气处理后 10 个月时, 沿树干纵向方向, 分别在充气孔上、下方 1 cm 处每隔 2 cm 钻取木芯, 黑色结香区以外, 依次间隔 3 cm 钻取木芯, 直到木芯全为白木。在树干横截面方向上, 分别在充气孔左右 1 cm 处, 每隔 2 cm 钻取木芯, 直到木芯全为白木。将木芯黑色区域称作沉香区, 将含有部分黑色油线的浅褐色区域称作过渡区, 分别测量纵向、横向变色长度。

(2) 提取液制备。分别在处理结束后 7 个月和 10 个月时取样。取样时分别在 N₇、N₁₅ 和 CK₁ 打孔上方 5 cm 处截取 5 cm 厚半圆片, 除去白木部分, 将木芯黑色不腐烂的区域称作沉香区, 将含有部分黑色油线的浅褐色区域称作过渡区。分别将 2 个区的样品置于 40 °C 恒温干燥箱烘至恒重, 粉碎后过 40 目筛; 对 CK₂ 则是在树干 40 cm 处截取 5 cm 厚半圆片, 烘干粉碎过筛。

称取木粉 2.00 g 置于离心管中, 加入 95% 乙醇 20 mL, 在水浴中超声处理 30 min, 取上清液, 加入乙醇, 重复上述操作。汇总 2 次上清液, 过 0.45 μm 滤膜, 定容至 50 mL。

(3) 醇溶性提取物含量测定。参照 2020 年版《中国药典》^[18], 采用乙醇超声波浸提法测定。

(4) 沉香四醇含量测定。采用超高效液相色谱串联三重四级杆质谱仪 (Sciex 4000, SCIEX, USA; Sciex 4000 Qtrap, USA) 测定。

色谱条件: 色谱柱 Kinetex C18 (2.1 mm×100 mm, 2.6 μm); 流动相水, 含 0.1% 甲酸 (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱 0~1 min, 10% B; 1~3.5 min, 10%~70% B; 3.5~4 min, 70%~95% B; 4~5.9 min, 95% B; 5.9~6 min, 10% B; 6~8 min, 10% B。柱温 40 °C, 流速 0.3 mL/min, 进样量 1 μL。

质谱条件: 离子化方式为电喷雾离子化 (ESI), 多反应监测离子扫描模式 (MRM) 测定。主要质谱参数为: 脱溶剂温度为 550 °C, 气帘气为 25 μL/min, 负离子模式下毛细管电压为 5500 V, 喷雾气为 55 psi, 辅助加热气为 55 psi。

沉香四醇标准品购自 GLP BIO 公司, 纯度大于 98%。将沉香四醇标准品用质谱 95% 乙醇不同梯度稀释后检测并绘制出标准曲线, 然后取上述处理的沉香区提取液进行测定, 并计算沉香四醇含量。

(5) 挥发性成分测定。取处理后 10 个月 1.2.3 (1) 中沉香区的提取液, 在华南农业大学测试中心进行 GC-MS 检测分析 (美国, 安捷伦 7890B-5977A)。

色谱条件: 色谱柱 HP-5MSZ (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 升温程序: 起始温度 70 °C, 保持 1 min 后, 以 10 °C/min 升至 150 °C, 保持 5 min; 再以 5 °C/min 升至 200 °C, 保持 5 min; 然后以 8 °C/min 升至 280 °C, 保持 1 min。进样口温度 250 °C; 载气为高纯 He (99.999%), 载气流量 1.0 mL/min, 进样量 0.2 μL (不分流), 溶剂延迟 4 min。

质谱条件: 色谱-质谱接口温度 280 °C; 离子源温度 230 °C; 电离方式 EI; 电子能量 70 eV, 质量扫描范围 35~350 amu。

1.3 数据处理

通过 GCMS7890B-5977A 化学工作站积分器自动积分后, 采用峰面积归一化法计算各化合物相对百分含量, 将所得化合物质谱数据通过 NIST14 质谱数据库检索。采用 Excel 软件进行数据处理, 运用 SPSS 19.0 和 Origin 2021 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 结香范围

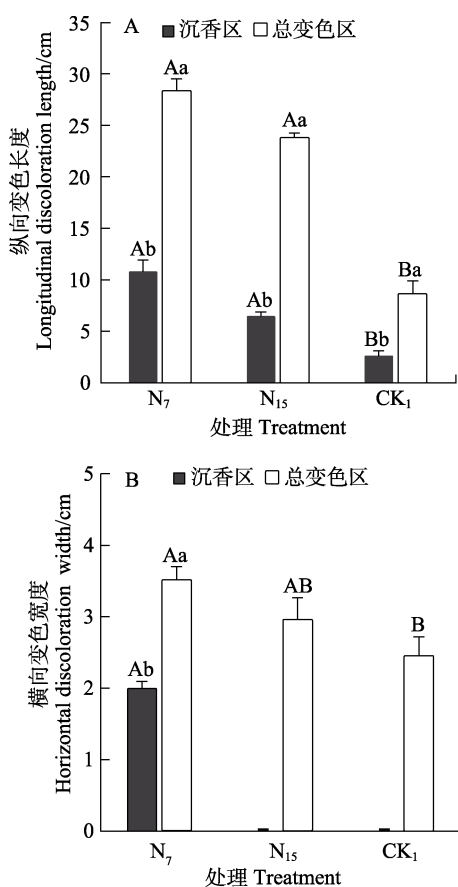
2.1.1 表观变化 7 d 处理 1 次 (N₇)、15 d 处理 1 次 (N₁₅) 和只打孔处理 (CK₁) 后, 树干充气孔周围逐渐变色, 并向四周扩散, 颜色加深, 而后变浅、直至白木。结香区和白木层之间存在明显界限。氮气处理下的变色范围明显大于 CK₁, 且 N₇ 处理的变色面比 N₁₅ 处理的更大。CK₁ 仅在打孔附近有变色发生, 扩展狭小而缓慢。无任何处理 (CK₂) 健康的土沉香则无任何颜色变化。可见, 不同处理的土沉香结香区域颜色和范围均不同 (图 1)。



图 1 处理结束后 10 个月时不同处理充气孔变色区
Fig.1 Discoloration zone of holing under different treatments 10 months after treatments

2.1.2 纵向变色长度和横向变色宽度 氮气处理加速了土沉香木质部纵向、横向变色。从图 2A

可看出，处理后 10 个月时，N₇ 和 N₁₅ 处理的沉香区纵向变色长度差异不显著，但均显著高于 CK₁。N₇ 处理的沉香区、纵向变色总长度均高于 N₁₅ 和 CK₁，分别达 10.64、28.24 cm，分别是 CK₁ 的 4.38 倍、3.35 倍。不同处理的纵向变色长度均高于横向变色宽度。横向变色宽度上（图 2B），N₇ 处理的充气孔左、右 1 cm 处均检测到黑色结香区，而 N₁₅ 和 CK₁ 处理均未发现。N₇ 处理的横向变色总宽度达 3.52 cm，分别比 N₁₅ 和 CK₁ 提高 18.53% 和 43.09%，由此可见高频次（7 d 处理 1 次）填充氮气比低频次（15 d 处理 1 次）处理诱导变色效果更好。



不同大写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)，不同小写字母表示相同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different capital letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$), different lowercase letters indicate significant difference among the same treatments ($P < 0.05$).

图 2 不同处理对木质部纵向变色长度与横向变色宽度的影响

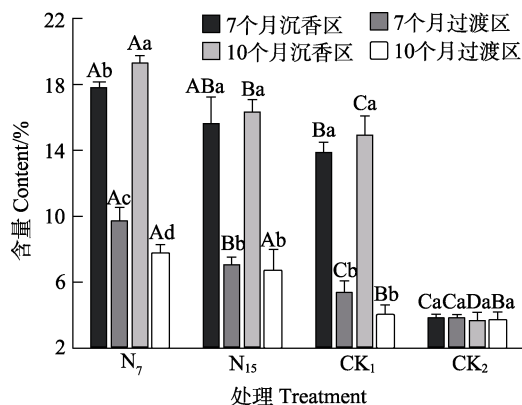
Fig. 2 Effects of treatments on longitudinal discoloration length and horizontal discoloration width

2.2 醇溶性提取物含量

树干填充氮气可显著提高土沉香的沉香区和过渡区中醇溶性提取物的含量。处理后 7 个月时，

N₇ 处理的沉香区和过渡区的醇溶性提取物含量均明显高于其他处理，其中沉香区的醇溶性提取物含量为 17.87%，分别比 N₁₅、CK₁ 提高 14.04% 和 28.47%；过渡区的醇溶性提取物含量为 9.73%，分别比 N₁₅、CK₁ 提高 38.21% 和 82.21%。此外 N₁₅ 处理的沉香区和过渡区的醇溶性提取物含量分别比 CK₁ 提高 12.65% 和 31.84%（图 3）。

从图 3 可以看出，沉香区的醇溶性提取物含量随诱导时间的延长而逐渐增加，处理后 10 个月时，N₇ 处理的沉香区醇溶性提取物含量达 19.17%，比处理后 7 个月的含量提高 8.39%，且显著高于 N₁₅、CK₁ 和 CK₂ 处理；处理后 10 个月时，过渡区醇溶性物质含量均有所下降，其中 N₇ 比处理后 7 个月时含量下降 20.86%，但仍明显高于 CK₁，比 CK₁ 高 95.11%。



不同大写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)，不同小写字母表示相同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

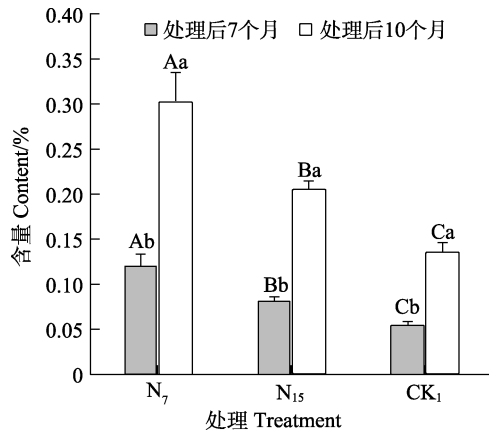
Different capital letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$), different lowercase letters indicate significant difference among the same treatments ($P < 0.05$).

图 3 不同处理对醇溶性提取物含量

Fig. 3 Effect of treatments on content of alcohol soluble extract

2.3 沉香四醇含量

如图 4 所示，除空白对照（CK₂）未检测到沉香四醇外，树干填充氮气（N₇、N₁₅）和打孔对照（CK₁）均促进结香区沉香四醇的合成，且充气处理效果更好。处理后 7 个月时 N₇、N₁₅ 沉香四醇含量显著高于 CK₁，分别是 CK₁ 的 2.23 倍、1.52 倍。处理后 10 个月时充气处理和 CK₁ 结香区沉香四醇含量均高于处理后 7 个月时的含量。N₇ 处理的沉香四醇含量最高，达 0.30%，比 N₁₅ 高 42.86%，是 CK₁ 的 2.14 倍。N₁₅ 处理的沉香四醇含量也明显高于 CK₁，比 CK₁ 高 51.49%，差异显著。CK₁ 处理后 10 个月时的沉香四醇含量为 0.14%，高于《中国药典》规定标准。



不同大写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示相同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different capital letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$), different lowercase letters indicate significant difference among the same treatments ($P < 0.05$).

图 4 不同处理对沉香四醇含量的影响

Fig. 4 Effect of different treatments on content of agarotretrol

2.4 挥发性成分分析

处理后 10 个月时, 充气处理 (N_7 、 N_{15}) 和打孔对照 (CK_1) 结香区以及无任何处理 (CK_2) 样品的乙醇提取物总离子流图 (TIC) 见图 5。由图 5 可见, 氮气处理的 TIC 色谱图较为复杂, 表明化合物种类较多。而 CK_2 的化合物种类最少。 N_7 处理的最大吸收峰为 6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙

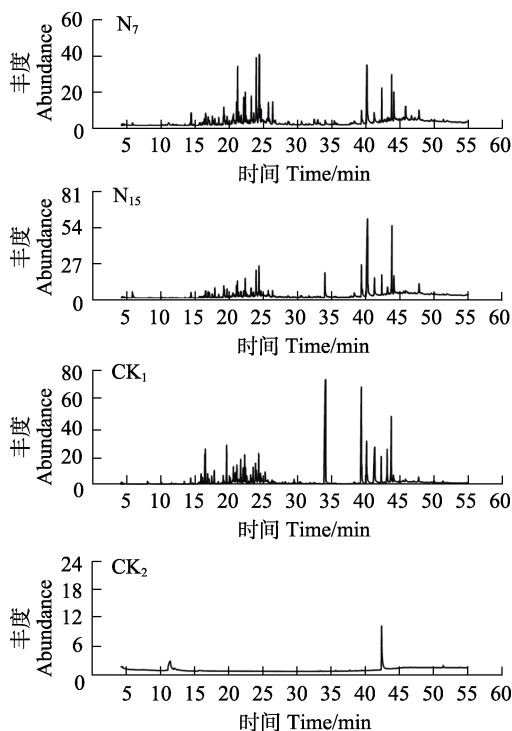


图 5 处理结束后 10 个月时各处理的 GC-MS 离子流图

Fig. 5 Total ion current figures of GC-MS under treatments 10 months after treatment

基)色酮 (相似度 96%), N_{15} 处理的最大吸收峰为 6-苄氧基-3,4-二氢-4,4-二甲基香豆素 (相似度 81%), CK_1 则为 2-(2-苯乙基)色酮 (相似度 97%), CK_2 样品不含倍半萜和色酮类物质, 但油酸酰胺 (相似度 94%) 相对含量最高。

从处理后 10 个月时的结香区样品中共鉴定出 55 种化合物种类 (表 1)。这些化合物包括 30 种萜烯类化合物、6 种色酮类化合物、2 种甾醇化合物以及 17 种芳香族、烷烃类、脂肪酸类等其他化合物。30 种萜类物质为 7 种单萜、22 种倍半萜和 1 种三萜类化合物。色酮类化合物中, 主要有 2 种类型。一种是 5、6、7、8 位无取代基的色酮, 主要为 2-(2-苯乙基)色酮、6,7-二甲氧基-(2-苯乙基)色酮; 另外一种是 5、6、7、8 位有取代基的色酮, 主要为 6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮、6,7-二甲氧基-(2-苯乙基)色酮、2,5-二甲基-7-羟基色酮、6,7-二甲氧基-2-[2-(4-甲氧基苯乙基)]色酮。

从 N_7 处理的结香区样品中检测到 5 种单萜类 (无环 1 种、单环 2 种、双环 2 种)、19 种倍半萜类 (单环 4 种、双环 7 种、三环 8 种) 和 1 种三萜类物质。倍半萜类物质种类最丰富, 包括没药烷萜类环氧化红没药烯、蛇麻烷类蛇麻烯、榄香烷类榄香烯等单环倍半萜, 菖蒲烷萜类白菖烯、檀香烷萜类檀香烯、愈创烷萜类蓝桉醇、石竹烷萜类石竹烯等双环倍半萜, 毕澄茄烷萜类香木兰烷、香树烯及其衍生物, 花侧柏烷萜类柏木烯等三环倍半萜等。不同处理样品中的萜烯类化合物的相对含量差异较大 (表 1)。 N_7 处理的倍半萜和萜烯类种类和相对含量均明显高于 N_{15} 和 CK_1 , 其中倍半萜类化合物的总相对含量占总萜烯类的 84.48%, 萜烯类相对含量达 49.61%。 N_{15} 处理中, 检测到 16 种萜烯化合物, 包括 3 种单萜、12 种倍半萜和 1 种三萜, 其中倍半萜占总检测物质的 11.87%。在 N_7 和 N_{15} 处理中均检测到角鲨烯 (三萜类), 但 CK_1 中未检测到。

各处理结香区样品中的色酮类物质种类和相对含量也存有明显差异。 N_7 处理中检测到 5 种色酮类物质, 5、6、7、8 位有取代基的色酮含量占总色酮含量的 92.18%, 其中 6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮占总色酮的 47.99%; 而 N_{15} 处理中只检测到 4 种色酮, 其中 5、6、7、8 位有取代基的色酮含量占总色酮的 77.91%。 CK_1 处理中也检测到 5 种色酮类化合物, 其中 5、6、7、8 位有取代基的色酮含量占总色酮相对含量的 55.98%, 但 5、

表1 处理后10个月不同处理沉香挥发油成分及相对含量

Tab. 1 Constituents and relative amount of agarwood oils under different treatments 10 months after treatment

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子量 Mw	相对含量 Relative content/%			
				N ₇	N ₁₅	CK ₁	CK ₂
1	benzaldehyde 苯甲醛*	C ₇ H ₆ O	106	-	1.78	0.75	-
2	2-oxo-butanolic acid 2-氧代丁酸 [◇]	C ₄ H ₆ O ₃	102	-	-	-	18.79
3	4-phenyl-2-butanone 苯基丙酮*	C ₁₀ H ₁₂ O	148	-	-	0.77	-
4	terpinen-4-ol 4-萜品醇*	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.40	-	0.67	-
5	(1R,3R,5S)-6,8-dioxabicyclo<3.2.1>octan-3-ol (1R,3R,5S)-6,8-二氧双环<3.2.1>辛烷-3-醇 [◇]	C ₆ H ₁₀ O ₃	130	-	-	-	9.06
6	α-cedrene 柏木烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	0.62	0.58	0.13	-
7	camphene 菝烯*	C ₁₀ H ₁₆	136	-	-	0.18	-
8	santalol 檀香醇**	C ₁₅ H ₂₄ O	220	2.80	0.95	-	-
9	2-((2S,4aR)-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalen-2-yl) pan-2-ol 2-((2S,4aR)-4a,8-二甲基-1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢萘-2-基)丙二醇*	pro-C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.50	0.65	0.28	-
10	5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2-methylcyclohex-2-en-1-ol 1-对孟烯-6,8-二醇*	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	0.64	-	-	-
11	1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-4a,8-tetramethyl-2-naphthalenemethanol 1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢-4a,8-四甲基-2-萘甲醇*	C ₁₅ H ₂₆ O	222	3.12	0.39	8.91	-
12	agarospirol 沉香螺醇**	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.52	0.22	0.48	-
13	hinesol 茅苍术醇**	C ₁₅ H ₂₆ O	222	-	-	0.95	-
14	aromadendrene 香橙烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	3.92	0.68	1.20	-
15	calarene 白菖烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	4.89	-	-	-
16	elemene 榄香烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	1.12	-	-	-
17	α-humulene α-蛇麻烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	1.17	-	0.09	-
18	santolina triene 薰衣草三烯**	C ₁₀ H ₁₆	136	-	1.00	-	-
19	α-selinene 芹子烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	3.38	0.68	0.33	-
20	(+)-2-α-isopropenyl-3-carene α-异丙烯基-萹烯*	C ₁₃ H ₂₀	176	0.78	0.23	-	-
21	β-ocimene 罗勒烯*	C ₁₀ H ₁₆	136	-	1.61	1.82	-
22	isoaromadendrene epoxide 异香树烯环氧化物**	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.35	1.02	-	-
23	alloaromadendrene oxide-(1) 别香橙烯氧化物(1)**	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.40	3.24	-	-
24	β-caryophyllene 石竹烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	0.67	-	0.11	-
25	longipinocarvone 长叶松香芹酮*	C ₁₅ H ₂₂ O	218	1.49	-	-	-
26	2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol 异百里香酚*	C ₁₀ H ₁₄ O	150	3.76	2.35	-	-
27	1,1,4,7-tetramethyldecahydro-1H-cyclopropa [e]azulene 香木兰烷**	C ₁₅ H ₂₆	206	8.76	-	0.56	-
28	(4S)-trans-(Z)-bizabolene epoxide 环氧化红没药烯**	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.93	1.45	-	-
29	1,2,4-triethyl-benzene 1,2,4-三乙基苯*	C ₁₂ H ₁₈	162	-	0.20	-	-
30	(1S,6R,9S)-5,5,9,10-tetramethyl-tricyclo[7.3.0.0(1,6)]dodec-10(11)-ene(1S,6R, 9S)-5,5,9,10-四甲基三环[7.3.0.0(1,6)]十二烷基-10(11)-烯 [◇]	C ₁₆ H ₂₄ O	232	-	0.29	-	-
31	cyperenone 香附烯酮**	C ₁₅ H ₂₂ O	218	-	-	0.21	-
32	longifolenaldehyde 长叶醛**	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.45	0.26	-	-
33	4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4a,5-dimethyl-3-(1-methylethylidene)-2(3H)-naphthalen one 4,4a,5,6,7,8-六氢-4a,5-二甲基-3-(1-甲基亚乙基)-2(3H)-萘醌*	C ₁₅ H ₂₄	204	2.79	0.65	0.52	-
34	valerena-4,7(11)-diene 缬草-4,7(11)二烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	-	-	0.48	-
35	alloaromadendrene 别香橙烯**	C ₁₅ H ₂₄	204	0.63	0.61	-	-
36	1-ethenyl-1-methyl-4-methylidene-2-(2-methylprop-1-enyl)cycloheptane 1-乙烯基-1-甲基-4-亚甲基-2-(2-甲基丙-1-烯基)环庚烷 [◇]	C ₁₅ H ₂₄	204	1.45	0.29	-	-
37	(-)-globulolol 蓝桉醇**	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1.48	-	0.56	-
38	methyleugenol 甲基丁香酚*	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178	4.83	0.43	1.18	-
39	aromadendrene oxide-(2) 香橙烯氧化物(2)**	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1.03	0.87	-	-
40	1,5-diphenylpentan-3-one 1,5-二苯基-3-戊酮*	C ₁₇ H ₁₈ O	238	-	-	1.07	-

续表 1 处理后 10 个月不同处理沉香挥发油成分及相对含量

Tab. 1 Constituents and relative amount of agarwood oils under different treatments 10 months after treatment (continued)

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子量 Mw	相对含量 Relative content/%			
				N ₇	N ₁₅	CK ₁	CK ₂
41	valerenic acid 缬草烯酸**	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234	5.41	1.31	-	-
42	2-(2-phenylethyl) chromone 2-(2-苯乙基)色酮 [△]	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	250	1.94	6.49	20.41	-
43	docosane 二十二烷 [◇]	C ₂₂ H ₄₆	310	-	1.42	-	-
44	6-methoxy-2-(2-phenethyl) chromone 6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 [△]	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	280	3.99	5.72	18.44	-
45	2-(4-methoxyphenethyl)-chromone 2-(4-甲氧基苯乙基)色酮 [△]	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	280	-	-	3.12	-
46	6-benzyloxy-3,4-dihydro-4,4-dimethyl-coumarin 6-苄氧基-3,4-二氢-4,4-二甲基-香豆素*	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	282	-	27.46	7.06	-
47	N-(4-benzyloxyphenyl)-2-cyano-acetamide N-(4-苄氧基苯基)-2-氰基-乙酰胺*	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204	5.72	7.32	-	-
48	(Z)-9-octadecenamide 油酸酰胺 [◇]	C ₁₈ H ₃₅ NO	246	6.84	-	3.28	59.92
49	squalene 角鲨烯*	C ₃₀ H ₅₀	410	0.62	0.41	0.48	-
50	6,7-dimethoxy-2-(2-phenethyl) chromone 6,7-二甲氧基-(2-苯乙基)色酮 [△]	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	310	11.91	14.59	10.42	-
51	tetracosane 正二十四烷 [◇]	C ₂₄ H ₅₀	338	0.36	-	-	-
52	7-hydroxy-2,5-dimethylchromen-4-one 2,5-二甲基-7-羟基色酮 [△]	C ₁₁ H ₁₀ O ₃	190	3.52	-	-	-
53	6,7-dimethoxy-2-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl] chromone 6,7-二甲氧基-2-[2-(4-甲氧基苯乙基)]色酮 [△]	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	340	3.46	2.58	1.07	-
54	stigmasterol 甾甾醇 [□]	C ₂₉ H ₄₈ O	412	-	0.31	0.36	-
55	sitosterol 谷甾醇 [□]	C ₂₉ H ₅₀ O	414	-	-	0.37	-
倍半萜				41.26	11.87	5.09	0
其他萜烯类				8.35	4.60	3.15	0
色酮				24.82	29.38	53.46	0
其他化合物				23.93	41.19	24.54	87.77
总计				98.36	87.04	86.24	87.77

注: [△]表示色酮; *表示萜烯类; **表示倍半萜; [□]表示甾体; [◇]表示脂肪酸类/烷烃类; *表示芳香族类化合物; -表示未检出。

Notes: [△] indicates chromones; * indicates terpenes; ** indicates sesquiterpenes; [□] indicates steroid; [◇] indicates fatty acids/alkane;

* indicates aromatic compounds; - indicates not detected.

6、7、8 位无取代基的 2-(2-苯乙基)色酮相对含量最高, 占总色酮含量的 38.18%。在 CK₂ 样品中, 主要成分以脂肪酸类为主, 未检测到萜烯类和色酮类化合物。

3 讨论

3.1 氮气对沉香醇溶性物质和沉香四醇含量的影响

不同诱导方法所产沉香的挥发性成分不同, 质量也不同且不稳定^[19]。林峰等^[20]比较了打钉法、砍伤法、凿洞法 3 种物理方法以及化学方法诱导土沉香的结香效果, 发现 3 种物理法处理 2 a 后的醇溶性物质含量分别为 9.7%、18.0% 和 29.0%。本研究中, 每隔 7 d 填充 1 次氮气, 处理后 10 个月时沉香区醇溶性提取物含量为 19.37%, 高于 2020 版《中国药典》的要求, 也高于上述 2 种物理方法, 但低于化学诱导方法, 这可能与检测时间较短有关。此外, 氮气处理可以显著诱导

土沉香中沉香四醇的合成, 其含量远远高于《中国药典》的标准, 进一步说明高压填充氮气可显著诱导土沉香次生代谢物质的合成, 从而明显促进土沉香结香。

3.2 氮气对沉香挥发性成分的影响

通常认为, 天然沉香中的倍半萜类成分种类较多、含量较高, 而人工诱导的沉香则是 2-(2-苯乙基)色酮类化合物的种类和含量较高^[21]。不同诱导方法所产沉香往往因油脂含量、比重、颜色和气味的不同, 其质量也有差异^[22]。此外, 也受诱导方式及结香年限等多种因素的影响^[23]。YAN 等^[24]研究发现, 斧伤诱导法所结沉香的倍半萜类化合物占主导地位, 而生物和化学诱导法所结沉香中 2-(2-苯乙基)色酮占 60% 以上。本研究中 N₇ 处理后 10 个月时所结沉香中, 富含倍半萜、萜烯类和色酮类化合物。倍半萜类化合物总相对含量达 41.93%, 占总萜烯的 84.52%。相比化学和生物诱导方法^[25], 氮气处理诱导结香的质量更接近斧

伤诱导方法,这可能是由于频繁填充氮气对土沉香木质部产生高压胁迫,一方面造成高强度的物理损伤,另一方面氮气参与生理代谢过程,从而激发萜烯类次生代谢物质的合成。有关树干填充高压氮气诱导土沉香的结香机理,待进一步深入研究。

本研究中,发现 N_7 和 CK_1 处理的样品中,尽管均检测到富含 5 种色酮类化合物,但 N_7 处理的 5、6、7、8 位有取代基的色酮相对含量高于 CK_1 ,而 CK_1 中,仅 5、6、7、8 位无取代基的 2-(2-苯乙基)色酮相对含量最高。相比之下,氮气诱导下,所产色酮类物质的结构更复杂。由于 NIST 和 WILEY 质谱库中化合物的质谱数据有限,尤其是色酮类物质,可能导致 GC-MS 方法检测到的色酮类成分不全面^[24]。目前利用紫外分光光度法^[25]、高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS) 等方法均可进行沉香特征性成分的检测^[26],但不同方法之间检测出的物质也有差异。YANG 等^[27]采用高效液相色谱-电喷雾电离质谱法对沉香中 2-(2-苯乙基)色酮衍生物进行鉴定,通过质谱特征裂解区分四氢色酮、双环氧色酮、单环氧色酮和 flidersia 类型色酮等 4 类色酮。随着检测方法的提升,沉香中更多的物质成分会被检测出来。因此,采用 GC-MS 和 HPLC-MS 双重方法鉴定沉香的主要化合物成分及相对含量,更有利于全面了解结香效果。

参考文献

- [1] 刘洋洋, 杨云, 魏建和, 张争, 陈波. 不同产地通体香沉香药材的质量分析[J]. 中国现代中药, 2014, 16(3): 183-186.
LIU Y Y, YANG Y, WEI J H, ZHANG Z, CHEN B. Analysis on the quality of agarwood produced via the whole-tree agarwood-inducing technique in different area[J]. Modern Chinese Medicine, 2014, 16(3): 183-186. (in Chinese)
- [2] 戴好富, 梅文莉. 沉香实用栽培和人工结香技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 2-6.
DAI H F, MEI W L. Technology of agarwood trees cultivation and agarwood artificial formation[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 2-6. (in Chinese)
- [3] CUI J L, GUO S X, FU S B, XIAO P G, WANG M L. Effects of inoculating fungi on agarwood formation in *Aquilaria sinensis*[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(26): 3280-3287.
- [4] MOHAMED R, JONG L P, KAMZIAH A K. Fungal inoculation induces agarwood in young *Aquilaria malaccensis* trees in the nursery[J]. Journal of Forestry Research, 2014, 25(1): 201-204.
- [5] 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, 23(11): 1017-1020.
CHEN X Y, GAO Y, LI W M. Study on the correlation between the volatile constituents of *Aquilaria sinensis* and the inducing methods[J]. China Pharmacy, 2012, 23(11): 1017-1020. (in Chinese)
- [6] LIU Y Y, CHEN H Q, YANG Y, ZHANG Z, WEI J H, MENG H, CHEN W P, FENG J D, GAN B C, CHEN X Y, GAO Z H, HUANG J Q, CHEN B, CHEN H J. 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.
- [7] ZHANG P, LI X F, CUI Z Y, XU D P. Morphological, physiological, biochemical and molecular analyses reveal wounding-induced agarwood formation mechanism in two types of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng[J]. Industrial Crops Products, 2022, 178: 114603.
- [8] BLANCHETTE R A, HEUVELING V B H. Cultivated agarwood: US7638145 B2[P]. 2009-12-29.
- [9] THANH L V, DO T V, SON N H, SATO T, KOZAN O. Impacts of biological, chemical and mechanical treatments on sesquiterpene content in stems of planted *Aquilaria crassna* trees[J]. Agroforestry Systems, 2015, 89(6): 973-981.
- [10] WIJITPHAN P. Method to stimulate resin formation by wounding on the *Aquilaria*'s trunk: US7485309 B1[P]. 2009-02-03.
- [11] 王东光, 张宁南, 杨曾奖, 刘小金, 洪舟, 徐大平. 20 种真菌对白木香挥发油成分的影响[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(5): 77-83.
WANG D G, ZHANG N N, YANG Z J, LIU X J, HONG Z, XU D P. Effects of 20 fungal species on compositions of essential oils from *Aquilaria sinensis* tree[J]. Journal of South China Agricultural University, 2016, 37(5): 77-83. (in Chinese)
- [12] KARLINASARI L, INDAH SUARY N, KUSUMO H T. Sonic and ultrasonic waves in agarwood trees (*Aquilaria microcarpa*) inoculated with *Fusarium solani*[J]. Journal of Tropical Forest Science, 2015, 27(3): 351-356.
- [13] 宋晓琛, 王西洋, 杨光, 黄桂华, 周再知, 梁坤南, 张青青. 无机盐与激素混合对土沉香结香的诱导[J]. 林业科学, 2020, 56(8): 121-130.
SONG X C, WANG X Y, YANG G, HUANG G H, ZHOU Z Z, LIANG K N, ZHANG Q Q. Mechanism of agarwood formation under the induction of both inorganic salts and

- hormones[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(8): 121-130. (in Chinese)
- [14] 姚诚, 钟芙蓉, 廖海浪, 马云桐. 沉香挥发油化学成分及药理活性研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32: 1943-1953.
- YAO C, ZHONG F R, LIAO H L, MA Y T. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of agarwood volatile oil[J]. *Natural Product Research and Development*, 2020, 32: 1943-1953. (in Chinese)
- [15] CARRODUS B B. Carbon dioxide and the formation of heartwood[J]. *New Phytologist*, 1971, 70(5): 939-943.
- [16] NILSSON M, WIKMAN S, EKLUND L. Induction of discolored wood in scots pine (*Pinus sylvestris*)[J]. *Tree Physiology*, 2002, 22(5): 331-338.
- [17] 刘小金. 檀香精油成分组成、分布及人工促成心材形成的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.
- LIU X J. Studies on essential oil composition, distribution and inducing heartwood formation of sandal (*Santalum album*)[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2012. (in Chinese)
- [18] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 192.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 192. (in Chinese)
- [19] 樊云飞, 董雷, 周欣, 陈晓颖, 钟兆健, 李浩华, 章卫民, 高晓霞. 甲酸结合不同真菌诱导形成的人工沉香质量评价研究[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(9): 1544-1554.
- FAN Y F, DONG L, ZHOU X, CHEN X Y, ZHONG Z J, LI H H, ZHANG W M, GAO X X. Quality evaluation of artificial agarwood induced by formic acid stimulation combined with different fungal inoculation[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, 36(9): 1544-1554. (in Chinese)
- [20] 林峰, 梅文莉, 吴娇, 戴好富. 人工结香法所产沉香挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. *中草药*, 2010, 33(2): 222-225.
- LIN F, MEI W L, WU J, DAI H F. GC-MS analysis of volatile constituents from Chinese eaglewood produced by artificial methods[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2010, 33(2): 222-225. (in Chinese)
- [21] 杨友宝, 宁德山. 中药沉香挥发油成分分析[J]. *湖南中医杂志*, 2004, 20(5): 48-49.
- YANG Y B, NING D S. Analysis of volatile oil from Chinese traditional agarwood[J]. *Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2004, 20(5): 48-49. (in Chinese)
- [22] NAEF R. The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2011, 26(2): 73-87.
- [23] 廖格, 赵美丽, 宋希强, 梅文莉, 杨锦玲, 戴好富. 整树结香法所产沉香的 GC-MS 分析[J]. *热带作物学报*, 2016, 37(2): 411-417.
- LIAO G, ZHAO M L, SONG X Q, MEI W L, YANG J L, DAI H F. GC-MS analysis of the agarwood produced by whole-tree agarwood-inducing technology[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(2): 411-417. (in Chinese)
- [24] YAN T T, YANG S, CHEN Y, WANG Q, LI G Y. Chemical profiles of cultivated agarwood induced by different techniques[J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1990.
- [25] 刘洋洋, 杨云, 林波, 黄俊卿. 紫外分光光度法测定沉香药材中 2-(2-苯乙基)色酮类化合物总含量[J]. *化学与生物工程*, 2014, 31(3): 71-74.
- LIU Y Y, YANG Y, LIN B, HUANG J Q. Determination of total content of 2-(2-phenylethyl) chromones in agarwood by UV spectrophotometry[J]. *Chemistry Bioengineering*, 2014, 31(3): 71-74. (in Chinese)
- [26] 杨锦玲, 梅文莉, 董文化, 王军, 戴好富. 国产沉香 HPLC-MS 研究[J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3583-3592.
- YANG J L, MEI W L, DONG W H, WANG J, DAI H F. HPLC-MS study of *Aquilariae lignum Resinatum*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(15): 3583-3592. (in Chinese)
- [27] YANG J L, DONG W H, KONG F D, LIAO G, WANG J, LI W, MEI W L, DAI H F. 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.