

龙涎香中龙涎香醇的制备及其含量测定研究

杜佳丽¹, 宋卓悦², 张丹雁¹, 杨丽¹ (1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学针灸康复临床医学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 制备龙涎香醇对照品, 建立龙涎香醇含量测定方法。 **方法** 龙涎香醇通过石油醚超声提取、硅胶柱层析、丙酮洗涤、半制备液相色谱的方法制备。采用气相-质谱联用(GC-MS)法测定龙涎香醇的纯度, 采用核磁共振(NMR)及超高液相-质谱联用(UPLC-MS)法, 对龙涎香醇的结构进行确证。采用高效液相-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法, 建立龙涎香醇的检测方法并评价龙涎香的质量。 **结果** 所制备的龙涎香醇纯度为 95.12%, 符合国家对对照品标准要求。13 批龙涎香样品中龙涎香醇的含量介于 29.2%~63.6%之间。 **结论** 建立了龙涎香醇对照品制备方法及龙涎香醇含量测定方法, 可为龙涎香的真伪鉴别提供准确、可量化的方法。

关键词: 龙涎香; 龙涎香醇; 高效液相-蒸发光散射法; 含量测定

中图分类号: R284.1; R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1353-05

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.09.016

Study on the Preparation and Content Determination of Ambrein in Ambergris

DU Jiali¹, SONG Zhuoyue², ZHANG Danyan¹, YANG Li¹ (1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Clinical Medical College of Acupuncture Moxibustion and Rehabilitation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** The purpose was to prepare ambrein standard substance and establish detection method for ambrein. **Methods** Ambrein was prepared by ultrasonic extraction using petroleum ether, silica gel column chromatography, acetone washing, and semi-preparative high performance liquid chromatography. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was used to determine the purity of ambrein. Nuclear magnetic resonance (NMR) and ultra-high liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) methods were used to confirm the chemical structure of ambrein. The high performance liquid phase-evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) method was used to establish detection method for ambrein and evaluate the quality of ambergris. **Results** The purity of the obtained ambrein was 95.12%, which met the requirements of the national reference standard. The ambrein contents in 13 batches of ambergris were between 29.2% and 63.6%. **Conclusion** The ambrein standard preparation method and ambrein content determination method were established, which provided accurate and quantifiable method for the authenticity of ambergris.

Keywords: Ambergris; ambrein; high performance liquid chromatography evaporative light scattering detection; content determination

龙涎香 (Ambergris) 为抹香鲸科动物抹香鲸 *Physeter catodon* Linnaeus 的肠道分泌物干燥品, 主要分布于热带、亚热带的温暖海洋中, 在中国东海、

南海、台湾偶有发现^[1-2]。龙涎香药用历史悠久, 为我国卫生部颁药品标准《维药分册》所收载^[3], 具有调心通滞, 助消和胃, 解毒消肿, 开窍, 活血, 行

收稿日期: 2021-05-19

作者简介: 杜佳丽, 女, 硕士, 研究方向: 中药鉴定。Email: dujiali8888@163.com。通信作者: 张丹雁, 女, 硕士, 教授, 研究方向: 中药鉴定、质量标准及 GAP 研究。Email: danyan64@163.com。

气止痛,止咳化痰,消积利水,软坚散结等功效^[4-8],国外则用作壮阳药^[9]。龙涎香自古为中外名贵香料,是我国四大香料“檀、沉、龙、麝”之一^[10],用于制作高级香水和熏香品,西方国家亦用作食品、奢侈品等^[11]。龙涎香因价格高昂,产量极低,资源稀缺,采集极具偶然性,不易获取,使人们对它的认识具有神秘、玄幻色彩,缺乏正确认知。近几年,市场涌现大量来自我国沿海地区的龙涎香疑似品。而目前有关龙涎香鉴定的文献记载过于简单,仅停留在模棱两可、无专属性的性状及显微特征描述,以及乙醇浸泡、火烧和薄层色谱法等简易理化鉴别^[9],缺乏可量化、准确的测定方法。为澄清龙涎香混伪品,本课题组前期建立了薄层、GC-MS等方法鉴定龙涎香真伪,并验证了龙涎香醇为龙涎香的主要成分兼标志性特征成分^[2,7]。然而因国内外尚无可出售的龙涎香醇对照品,导致无法采用准确、可量化的方法鉴别龙涎香的真伪。因此,本研究拟通过提取、分离、纯化的方法制备龙涎香醇,测定其纯度并对其结构进行表征,建立 HPLC-ELSD 法测定龙涎香醇的含量,为龙涎香的真伪鉴别提供数据及技术支持。

1 材料、仪器及试剂

1.1 材料 14 批样品,分别来源于香港(编号:1~6)、新加坡(编号:7~9)、印度尼西亚(编号:10~11)、广东省药检所馈赠(编号:12)、迪拜(编号:13~14),经广州中医药大学张丹雁教授鉴定为龙涎香(抹香鲸 *Physeter catodon* Linnaeus 的肠道分泌物干燥品)。选取 5 号样品制备龙涎香醇;其余 13 批龙涎香样品均取适量,用铜臼捣碎过 60 目筛,用于龙涎香醇含量测定。

1.2 仪器与试剂 KQ-250B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);METTLER TLE204 型电子天平[托利多(上海)有限公司];IKA RV8 旋转蒸发器(德国艾卡公司);东京理化 EYELA CA-1111 冷却循环装置(上海爱朗仪器有限公司);紫外分光光度计(美国安捷伦公司);岛津 LC-20A 液相色谱仪、SIL-20A UV-VIS 检测器(日本岛津公司);伍丰 LC-100 高效液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司);Ascend Aeon900 超导磁体核磁共振谱仪(布鲁克科技有限公司);FA-1004N 分析天平(0.1 mg,上海菁海仪器有限公司);7693 自动进样器、7890B 气相色谱仪、5977 质谱仪(美国安捷伦公司);LC-30AD 高效液相色谱仪、SIL-30AC 自动进样器、SPD-M20A 检测器(日本岛津公司);Triple TOF™ 5600+型三重四级杆

飞行时间质谱(美国 AB SCIEX 公司);SIL-20A 自动进样器、Sedex75 ELSD 检测器(日本岛津公司);ELSD 6000 检测器(美国奥特公司)。

甲醇(批号:15651125)购自瑞典欧普森公司;乙腈(批号:1636707217)购自美国默克公司;甲基叔丁基醚(批号:11712068)购自阿拉丁生化科技股份有限公司;石油醚(批号:20170518)购自天津科密欧化学试剂有限公司;二氯甲烷(批号:20161101)、正己烷(批号:20160618)、异丙醇(批号:20170619)购自天津天正试剂厂,上述试剂均为色谱级。

2 方法与结果

2.1 龙涎香醇的提取 龙涎香醇制备流程图如图 1 所示。精密称取龙涎香样品 5.0 g,粉碎后加入 20 mL 石油醚,室温下超声提取 40 min,过滤后滤渣中加入 15 mL 石油醚重复提取 2 次,每次 40 min。过滤,合并滤液,减压浓缩,得到黄棕色浸膏 4.41 g,提取率为 88.2%,对其进行 GC-MS 检测。

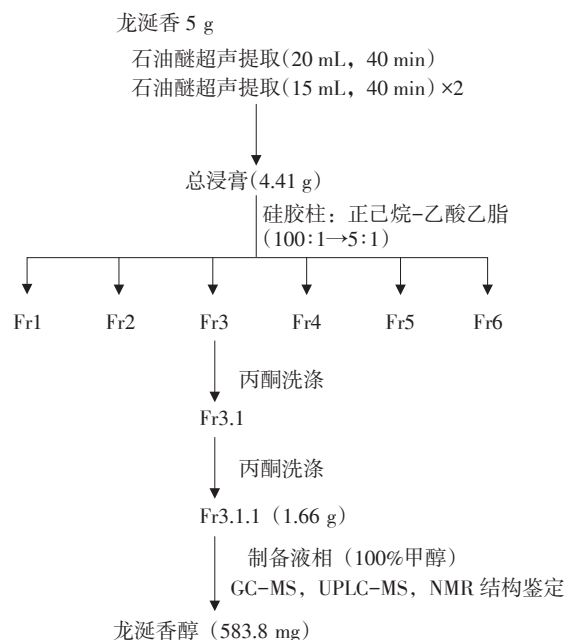


图 1 龙涎香醇制备流程图

Figure 1 Flow chart of preparation of amberin

GC-MS 色谱条件: 色谱柱为 INNOWAX(60 mm×0.25 mm×0.15 μm)色谱柱; 升温程序: 初始温度为 80 ℃, 以 20 ℃·min⁻¹ 升至 150 ℃, 保留 2 min; 以 5 ℃·min⁻¹ 升至 220 ℃, 保留 1 min; 再以 20 ℃·min⁻¹ 升至 250 ℃, 最后以 2 ℃·min⁻¹ 升至 280 ℃; 进样量 1 μL。质谱条件: 电子轰击源 EI(70 eV), 扫描范围(*m/z*)35~400。其 GC-MS 图(见图 2)中, 龙涎香醇出峰时间为 31.737 min, 表明选用的提取方法可行。

取上述浸膏,采用柱层析法(300~400 目柱层析硅胶湿法装柱,干法上样),用正己烷-乙酸乙酯(100:1、80:1、50:1、40:1、20:1、10:1、5:1)进行梯度洗脱,联合 GC-MS 法收集龙涎香醇。丙酮多次洗涤,采用半制备液相进行纯化,以获得龙涎香醇纯化物。柱层析分离得到 6 个组分(Fr1~Fr6),其中 Fr3 为龙涎香醇(浅黄白色膏状)。丙酮洗涤后得到附着微量淡黄色的白色片状结晶(Fr3.1),再次洗涤后得到乳白色膏状成分 Fr3.1.1(1.66 g)。制备液相分离得到龙涎香醇纯化物,共 583.8 mg。

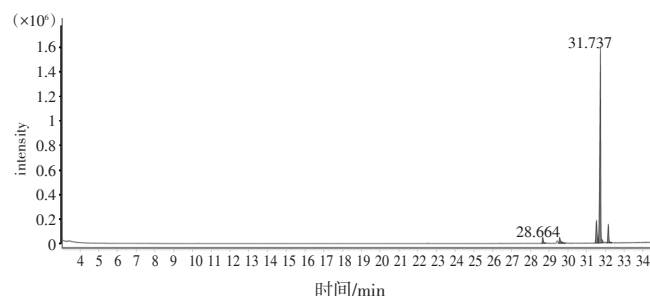


图 2 龙涎香醇粗提物的气相-质谱联用图

Figure 2 GC-MS graph of crude extract of Ambergris

2.2 龙涎香醇纯化物纯度测定 龙涎香醇纯化物的 GC-MS 图见图 3,初步确定该纯化物为龙涎香醇,依据其峰面积相对百分含量可知,其纯度为 95.12%,符合国家标准中对照品的纯度要求。

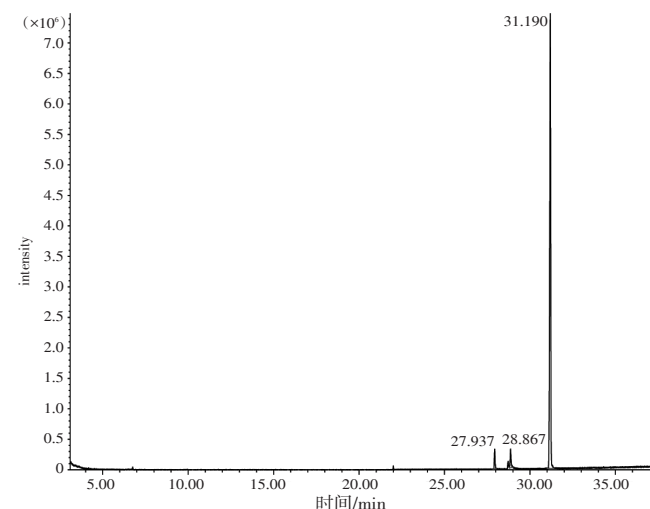


图 3 龙涎香醇纯化物气相-质谱联用图

Figure 3 GC-MS graph of purified amberin

2.3 龙涎香醇纯化物的结构确证

2.3.1 性状及物理常数 观察龙涎香醇纯化物性状,检测其溶解度。结果可知龙涎香醇为白色片状结晶,易溶于石油醚、氯仿等有机溶剂,可溶于甲醇、乙醇,不溶于水。

2.3.2 UPLC-MS 结果 取“2.1”项下龙涎香醇纯化

物 2 mg,用 10 mL 甲醇溶解。取 1 mL,甲醇定容至 2 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,备用。色谱条件:采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);柱温 40 $^{\circ}\text{C}$;流动相为乙腈;流速 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积为 1 μL 。质谱条件:ESI 源正离子模式,扫描范围(m/z)50~1 000,离子源气体 1、2 压力均为 55 psi,气帘气压力为 45 psi,温度为 550 $^{\circ}\text{C}$,离子喷雾电压为 5 500 V,去簇电压为 100 V,碰撞能量为 10 eV。所得龙涎香醇的 UPLC-MS 图见图 4,高分辨电喷雾质谱(HR-ESI-MS)图见图 5。其分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$,分子离子峰为 428.397 2,加 Na 后分子离子峰为 451.392 5,与用 Chemdraw 软件模拟的 $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{NaO}$ 的准确质量相符(451.391 6)。

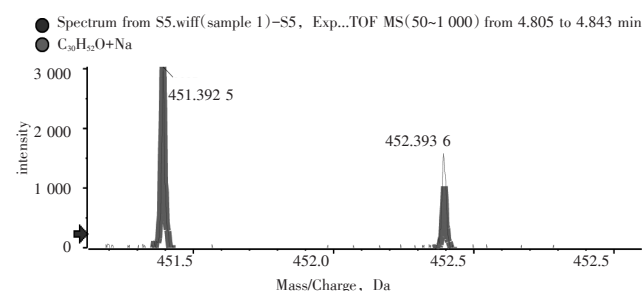
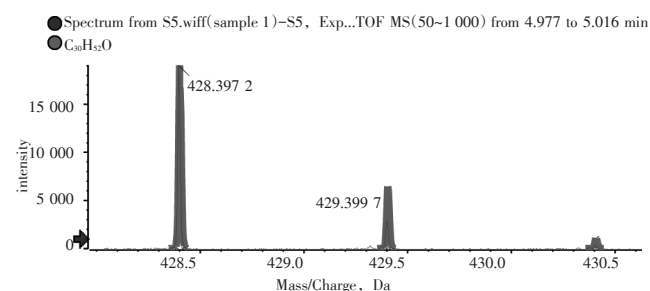


图 4 化合物的分子离子流图

Figure 4 The UPLC-MS molecular ion flow diagram of purified compound

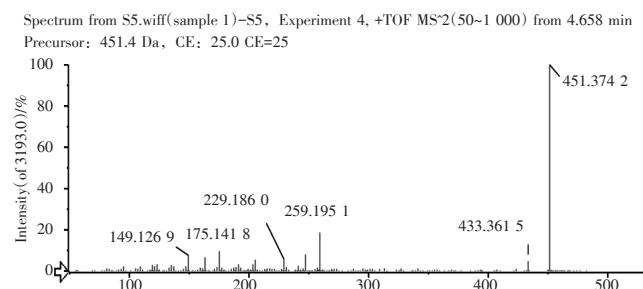


图 5 化合物 HR-ESI-MS 加 Na 谱图

Figure 5 HR-ESI-MS spectrum of purified compound

2.3.3 NMR 检测 取“2.1”项下龙涎香醇纯化物进行 NMR 碳谱及氢谱的检测,碳谱结果见图 6。 ^{13}C -NMR 中有一个氧化季碳 74.26(C-8),一个烯碳 124.82(C-13),一个季烯碳 136.03(C-14)和一个

exomethylene 碳 108.96(C-30)。龙涎香醇氢谱图见图 7。在 $^1\text{H-NMR}$ 中有 7 个明显的甲基信号, 还有一个双键的烯氢信号 δ : 5.15(1H, t, $J=7$ Hz, H-13) 和两个 exomethylene 信号 δ : 4.53 和 4.73(H2-30)。

结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-NMR}$ 与文献[11-12]对比, 该化合物与龙涎香醇波谱数据基本一致, 进一步确定其为龙涎香醇, 结构式(见图 8)与文献报道^[12]一致。

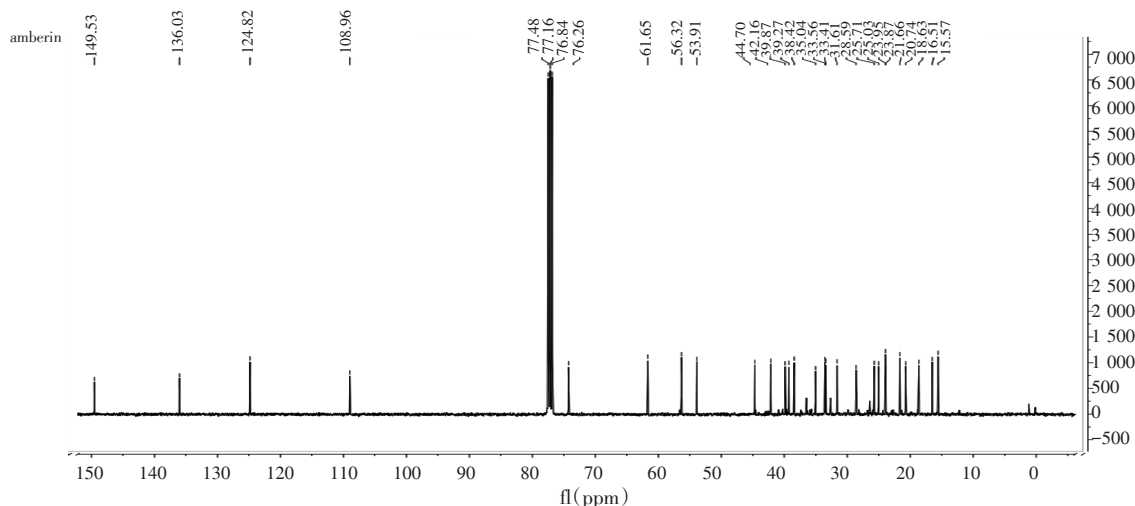


图 6 $^{13}\text{C-NMR}$ 图(101 MHz)

Figure 6 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum graph of purified compound(101 MHz)

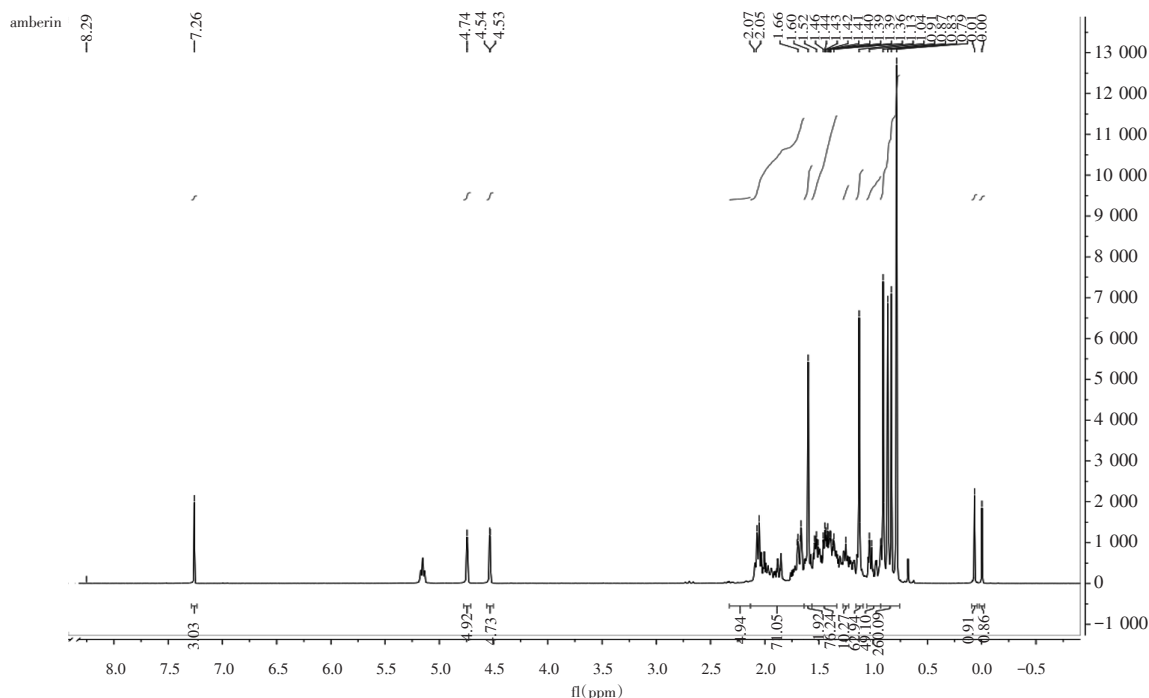


图 7 $^1\text{H-NMR}$ 图(400 MHz)

Figure 7 $^1\text{H-NMR}$ spectrum graph(400 MHz)

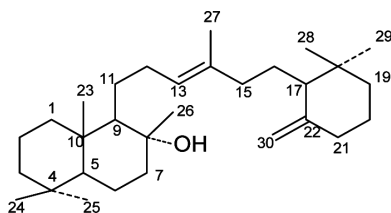


图 8 龙涎香醇结构式

Figure 8 Structure of amberin

2.4 HPLC-ELSD 法测定龙涎香醇含量

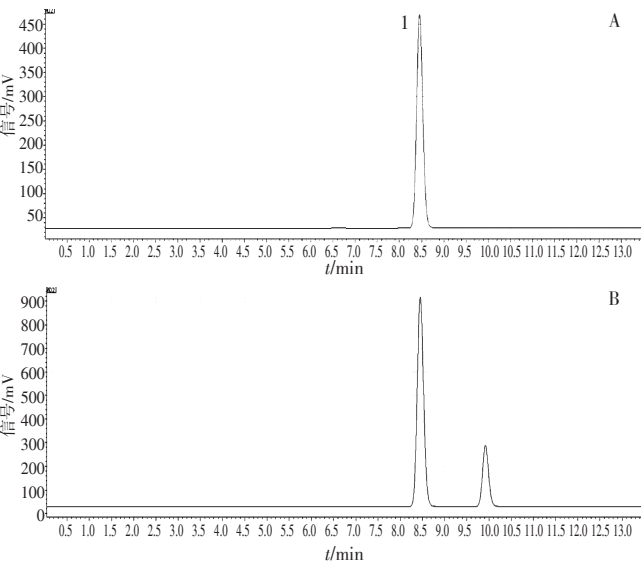
2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Cosmosil Cholester(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱; 流动相为甲基叔丁基醚-甲醇, 梯度洗脱程序见表 1; 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 6 μL 。ELSD 检测条件: 漂移管温度 75 $^{\circ}\text{C}$; 载气流速: 2.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 放大系数: 1。

2.4.2 供试品及对照品溶液的制备 按“2.1”项下方

法超声提取样品，过滤。取 0.2 mL 提取液，乙醇定容至 2 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜，备用。每批样品平行制备 3 份。称取对照品 10 mg，乙醇定容至 10 mL。取 0.6 mL，乙醇定容至 2 mL，过滤备用。龙涎香醇及龙涎香样品色谱图见图 9。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	甲基叔丁基醚/%	甲醇/%
0	0	100
5	15	85
12	33	67
13	90	10
19	90	10



注：1. 龙涎香醇

图 9 龙涎香醇对照品(A)及样品(B)的 HPLC-ELSD 图

Figure 9 HPLC- ELSD chromatograms of standard (A) and sample of Ambergris(B)

2.4.3 方法学验证

- (1)线性关系考察：取龙涎香醇对照品溶液 0.6、1、4、6、8、9、10、15、20 μL 进行测定，以对照品质量对数(X)与峰面积对数(Y)绘制龙涎香醇的线性方程。龙涎香醇线性回归方程为 $Y=1.687X+5.879\ 7$ ， $r=0.999\ 8$ ，表明龙涎香醇在 0.28~4.21 μg 范围内与峰面积的对数线性关系良好。
- (2)精密度试验：取龙涎香醇对照品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，计算 RSD。龙涎香醇峰面积的 RSD 为 3.73%，小于 5%，说明方法精密度良好。
- (3)重复性试验：取龙涎香样品，平行制备 6 份供试品溶液，记录峰面积，计算 RSD。龙涎香醇峰面积的 RSD 为 1.53%，小于 3%，说明方法的重复性良好。
- (4)稳定性试验：取供试品溶液，分别于 0、2、

- 4、12、24、48 h 进样，记录龙涎香醇峰面积，计算 RSD。龙涎香醇的峰面积 RSD 值为 2.59%，小于 3%，说明 48 h 内供试品稳定性良好。
- (5)加样回收率试验：取已测定含量的样品粉末 6 份，每份精密称定 25 mg，加入等同于样品量的对照品，制备供试品溶液，进样测定。计算加样回收率。结果龙涎香醇的加样回收率为 98.33%，RSD<5%，表明方法回收率良好。见表 2。
- 表 2 龙涎香醇加样回收率试验结果
- | 编号 | 取样量 /mg | 样品含量 /μg | 加入量 /μg | 测得量 /μg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|----|---------|----------|---------|---------|--------|--------|--------|
| 1 | 25.002 | 1.391 | 1.403 | 2.735 | 95.79 | 98.55 | 3.59 |
| 2 | 24.992 | 1.391 | 1.403 | 2.846 | 103.71 | | |
| 3 | 25.006 | 1.391 | 1.403 | 2.815 | 101.50 | | |
| 4 | 25.008 | 1.391 | 1.403 | 2.781 | 99.07 | | |
| 5 | 24.997 | 1.391 | 1.403 | 2.718 | 94.58 | | |
| 6 | 25.006 | 1.391 | 1.403 | 2.747 | 96.65 | | |
- 2.4.5 龙涎香醇含量测定 取 13 批次样品制备供试品溶液，按 2.4.1 项下色谱条件进行检测。根据线性回归方程及样品峰面积，分别计算得到 13 批样品中龙涎香醇的含量，见表 3。
- 表 3 13 批龙涎香样品中龙涎香醇的测定结果
- | 批次 | 龙涎香醇/% | 批次 | 龙涎香醇/% |
|----|--------|----|--------|
| 1 | 60.860 | 8 | 62.308 |
| 2 | 35.204 | 9 | 51.256 |
| 3 | 61.698 | 10 | 48.847 |
| 4 | 60.310 | 11 | 45.284 |
| 5 | 50.854 | 12 | 63.553 |
| 6 | 29.208 | 13 | 52.491 |
| 7 | 52.545 | | |
- 4 讨论
- 本研究以石油醚为溶剂超声提取龙涎香样品，龙涎香醇粗提物提取率为 88.2%。通过柱层析、半制备液相色谱法分离、纯化龙涎香醇粗提物，经 GC-MS 法检测，龙涎香醇纯化物的纯度为 95.12%。再通过 UPLC-MS、NMR 法对龙涎香醇纯化物进行结构表征，进一步确定其为龙涎香醇，制备出符合国家标准的龙涎香醇对照品。因龙涎香醇无紫外吸收，无法使用常规的紫外检测器，且龙涎香主含脂溶性成分，常用的反向色谱柱，如 C₁₈、C₈ 等，很难有响应值。因此选择胆固醇色谱柱，采用 HPLC-ELSD 法测定龙涎香中龙涎香醇的含量，方法操作简易，准确

度高,为龙涎香醇的含量测定提供了新思路与新方法。大量研究^[2,13]报道,龙涎香中龙涎香醇的含量大于25%,然而并无相关数据信息。本研究对13批龙涎香中龙涎香醇进行测定含量,其含量介于29.2%~63.6%之间,均大于25%,验证了文献报道中龙涎香醇的含量范围,丰富了龙涎香质量分析数据信息。因龙涎香醇结构稳定,常温降解缓慢,使得龙涎香能长久保存,该特征解释了民间对龙涎香的玄幻记载中所述的“龙涎香与日月同辉、千年不败”^[14]。龙涎香醇并无香气,其沸点495.3℃,经长时间氧化和光降解产生具异丙醇类香气的降龙涎醚及烟草香气的二氢紫罗兰酮等,使得龙涎香具有调香及定香作用^[15]。此外,龙涎香醇具有镇痛、抗炎等功效^[6-8],故龙涎香具香药两用价值。综上所述,龙涎香醇是龙涎香的标志性特征成分,可用于龙涎香的真伪鉴别。

本研究首次制备龙涎香醇对照品,解决了龙涎香真伪鉴别中对照品的来源问题。并建立了龙涎香醇含量测定方法,开发了准确、可量化鉴定龙涎香真伪的方法,为完善龙涎香质量标准增加了科学的数据。

参考文献:

- [1] CHRISTOPHER K. Ambergris: in search of the grey gold[J]. *New Scientist*, 2012, 215: 40-43.
- [2] 《中国民族药志》编委会. 中国民族药志: 第四卷[M]. 成都: 四川民族出版社, 2007: 163-166.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准维药分册[S]. 新疆维吾尔自治区药品检验所, 1998: 20.
- [4] 万秀峰. 宫廷藏香(三)龙涎香[J]. *紫禁城*, 2013, 34(2): 128-135.
- [5] 《全国中草药汇编》编委会. 全国中草药汇编[M]. 北京: 北京人民卫生出版社, 1978: 901.
- [6] 中国人民解放军海军后勤部卫生部. 中国药用海洋生物[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 150-151.
- [7] 叶桔泉. 食物中药与便方[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1973: 248.
- [8] 邓家刚, 侯小涛, 郝二伟, 等. 海洋中药学[M]. 广西: 广西科学技术出版社, 2018: 109.
- [9] 阿木. 可遇不可求的极品香料-神秘龙涎香[J]. *环境与生活*, 2012, 6(12): 80-84.
- [10] RYOICHI K. The fragrance of ambergris[J]. *Journal of Japan Association on Odor Environment*, 2013, 44(2): 141-148.
- [11] SHEN Y, CHENG S, KUO Y, et al. Chemical transformation and biological activities of ambrein, a major product of ambergris from *physeter macrocephalus* (sperm whale)[J]. *Natural Product Research*, 2007, 70(2): 147-153.
- [12] ROWLAND S J, Sutton P A, Wolff G A. Biosynthesis of ambrein in ambergris: evidence from isotopic data and identification of possible intermediates [J]. *Natural Product Research*, 2019, 35(8): 1-7.
- [13] 南京中医药大学. 中药大辞典: I册[M]. 上海: 上海人民出版社, 2006: 1292-1295.
- [14] 鄢敬新. 尚古说香[M]. 青岛: 青岛出版社, 2014: 151-155.
- [15] 可迪. 异源合成龙涎香醇的大肠杆菌构建[D]. 天津: 天津大学, 2018.

(编辑: 梁进权)