

气相色谱-质谱与高效液相色谱分析不同品质沉香化学成分

晏婷婷, 陈媛, 王茜, 尚丽丽, 李改云

(中国林业科学研究院木材工业研究所, 北京 100091)

摘要: 通过分析不同品质星洲系沉香样本的醇提取物含量、密度、气相色谱-质谱 (Gas Chromatography-Mass Spectrometer, GC-MS) 和高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 数据, 结合主成分分析法、线性判别模型和随机森林等多变量分析方法, 筛选与沉香品质密切相关的因素, 建立沉香分级模型。结果表明, 不同品质星洲系沉香的醇提取物含量、色酮类含量、倍半萜种类及含量的差异较大; 以醇提取物含量、倍半萜类总含量、2-(2-苯乙基)色酮含量等5个因素为指标, 可为沉香品质分级体系提供依据。

关键词: GC-MS; HPLC; 沉香; 品质评价

中图分类号: S781.4; TS67

文献标识码: A

文章编号: 1001-8654 (2020) 02-0019-05

Analysis of Chemical Constituents of Agarwood in Different Qualities by GC-MS and HPLC

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

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

Abstract: By analyzing alcohol extractive content, density, GC-MS and HPLC data of agarwood samples in different qualities, agarwood quality factors were determined. Then an agarwood grading model was established by combining multivariate analysis methods, such as principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA) and random forest. The results showed that the contents of alcohol extractive, chromones as well as sesquiterpene type and contents from the Sin Chew system agarwood in different quality were obviously distinct. Therefore, factors including the content of alcohol extractive, the total content of sesquiterpenoids, and the content of 2- (2-phenethyl) chromone could be used for quality classification of agarwood.

Key words: GC-MS; HPLC; agarwood; quality assessment

星洲系沉香 (*Aquilaria*) 产地广泛, 是我国进口沉香主要来源。传统沉香品质评价体系以密度、醇提取物含量结合感官评判为依据, 主观性强且各地

标准不同^[1], 缺乏科学的评判标准, 市场以次充好的现象层出不穷, 如通过提高商品的密度和醇提取物含量, 冒充高质量沉香。

沉香中的次生代谢产物是决定其品质的关键因素^[2-4]。已发现沉香中的化合物主要是倍半萜类和 2-(2-苯乙基)色酮两大类^[2]。倍半萜类具挥发性, 对沉香抗菌效用和独特香气形成有重要作用^[3]; 2-(2-

收稿日期: 2018-12-11; 修改日期: 2020-02-04

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金: 沉香品质评价和分级技术研究(CAFYBB2018SY033)。

作者简介: 晏婷婷 (1979—), 女, 助理研究员。Email: yanttt@criwi.org.cn

责任作者: 李改云, 女, 研究员。Email: ligy@caf.org.cn

苯乙基)色酮是沉香的特征化学组分,对沉香鉴别、镇定、安神及抗炎等药效有主要贡献^[4]。对沉香的特征化学成分进行分析,寻找与品质相关的关键化合物,能够为沉香的分级提供科学依据。

已有研究使用核磁、红外光谱、气相色谱-质谱(GC-MS)等方法分析沉香化学成分,寻找沉香品质关键因素^[5-7],但是只分析比较了宏观化学特征或者某一类成分,存在一定的局限性。本研究结合传统分级方法,采用GC-MS和HPLC分别分析沉香中的挥发性倍半萜类和色酮类化合物,结合主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)、线性判别模型(Linear Discriminant Analysis, LDA)和随机森林等多变量分析方法,综合分析两大类成分的色谱及质谱数据,筛选与星洲系沉香品质密切相关的因素,为其品质评判提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

26批次星洲系沉香均外购,依据LY/T 2904—2017《沉香》鉴定为沉香。沉香四醇标准品(中国食品药品检定研究院),正构烷烃混标(D-2887 Calibration Solution,百灵威)。

1.2 试验设备

GC-MS 2010(岛津);色谱柱:DB-5 HT。HPLC 分析仪:LC-20A(岛津);色谱柱:Phenomenex luna[®] C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

1.3 样品处理

依据LY/T 2904—2017制备沉香样本的乙醇提取物。量取乙醇提取物10 mL,蒸发溶剂后加入乙酸乙酯并定容到2 mL,过滤干燥,用于GC-MS分析。沉香四醇标准品溶液浓度为30 μg/mL。

1.4 样品测试方法及数据处理

用排水法测定样品体积,依据GB/T 1933—2009《木材密度测定方法》测定密度,醇提取物的HPLC分析依据LY/T 2904—2017。沉香四醇测定依据《中国药典》沉香规定^[8]。

1) GC 条件设置 升温程序:90℃保持1 min, 2℃/min升温至150℃,保持5 min, 2℃/min升温至280℃,保持10 min;进样口温度:250℃;载气高纯氮气,流速0.5 mL/min;分流比1:20;进样量1 μL。

2) MS 条件设置 EI 离子源;离子源温度230℃;接口温度250℃;质谱扫描范围50~500 m/z;溶剂延迟时间2.5 min。

3) GC-MS 数据处理 利用GC-MS Postrun Analysis(岛津)软件,根据色谱峰的保留指数和质谱碎片信息检索NIST谱库(2014),确认可能成分。以沉香四醇的保留时间(retention time, RT)为基准,对GC-MS总离子流图(Total Ion Chromatography, TIC)和HPLC中的色谱峰进行保留时间校正,用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,寻找共有峰并计算峰面积。

4) 多变量分析 ① 无监督分析(主成分分析PCA)对样品进行粗分;② 依据PCA分析结果,对所有原始变量即HPLC和GCMS检测的峰面积用PLS-DA算法进行数据降维处理,筛选对分组有贡献的变量;③ 将筛选的变量与用于PCA的变量合并,通过相关性分析,筛除冗余变量,并用随机森林模型,指导选取对分组贡献最大的变量;④ 建立判别模型进行验证。其中,PCA和LDA分析在Origin 9中完成。数据降维、变量相关性分析和随机森林通过R语言(R3.5)编程完成。

2 结果与讨论

2.1 醇提取物含量及密度

26个沉香样本密度(0.45~1.15 g/cm³)和醇提取物含量(13.61%~47.34%)分布区间较大。密度大的样本醇抽出物含量较高,但是样本之间密度和样本醇提取物含量并非完全线性相关。例如S11的醇提取物含量明显高于S14,但是密度比后者低(表1),

表1 沉香样本密度和醇溶性浸出物含量

样品 编号	密度/ (g/cm ³)	醇提取 物/%	样品 编号	密度/ (g/cm ³)	醇提取 物/%	样品 编号	密度/ (g/cm ³)	醇提取 物/%
S1	1.143	47.34	S10	0.792	34.75	S19	0.565	19.59
S2	1.050	41.93	S11	0.608	31.15	S20	0.459	18.91
S3	0.997	41.81	S12	0.633	26.81	S21	0.583	18.79
S4	1.026	39.89	S13	0.562	26.20	S22	0.398	17.64
S5	0.887	39.31	S14	0.714	24.08	S23	0.793	16.28
S6	1.004	36.33	S15	0.474	23.67	S24	0.451	16.21
S7	0.852	36.33	S16	0.757	23.34	S25	0.356	14.54
S8	0.878	35.89	S17	0.442	22.49	S26	0.480	13.62
S9	0.729	34.99	S18	0.525	19.96			

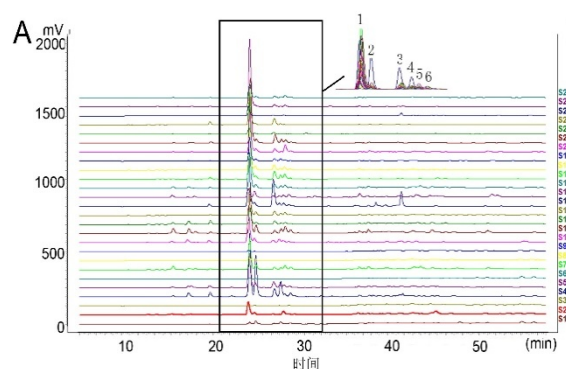
说明传统的品质评判依据不完善。密度和醇提取物含量只是表征沉香中树脂含量,要对沉香品质进行更准确的评价,需要寻找与沉香品质相关的标志化合物。

2.2 HPLC 特征图谱

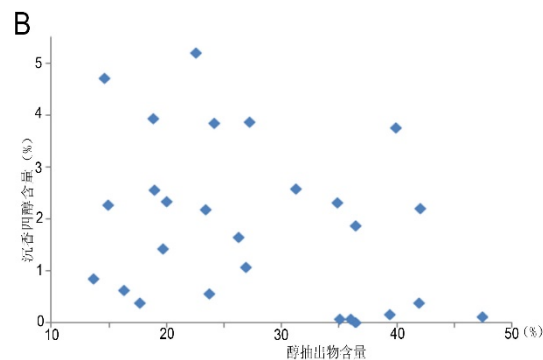
样本醇提取物中色酮类成分 HPLC 特征图谱如图 1A 所示。所有样品都含有 LY/T 2904—2017 规定的六个特征峰,其中 1#为标志化合物沉香四醇。醇提取物含量和沉香四醇(1#峰)含量没有明显的相关性,醇提取物含量接近的样品中沉香四醇含量差异较大,反之亦然(图 1B)。醇提取物主要含色酮和倍半萜类两大类化合物,多数倍半萜类在 252 nm 无紫外吸收,因此 HPLC 图谱反应的主要是色酮类的成分和含量,倍半萜类成分需要结合 GC-MS 分析。

2.3 GC-MS 分析

色谱的 TIC 如图 2 所示,保留时间 RT 在 15~50 min 的色谱峰多为倍半萜,所有样本 GC-MS 倍半萜类仅有 1 个共有峰,质谱库检索和文献查证确认,该峰为 Jinkohol (C₁₅H₂₆O, CAS 66512-57-0); RT 在 55~90 min 的化合物多为色酮类,根据 2-(2-苯乙基)色酮的裂解规律、特征碎片及相关文献列出色酮类共有峰可能的名称,列于表 2^[9-12]。



A 26 批次沉香 HPLC 图谱



B 样品醇提取物含量与沉香四醇含量

图 1 26 批次星洲系沉香的 HPLC 特征图谱
Fig.1 HPLC chromatographs of 26 Sin Chew agarwood samples

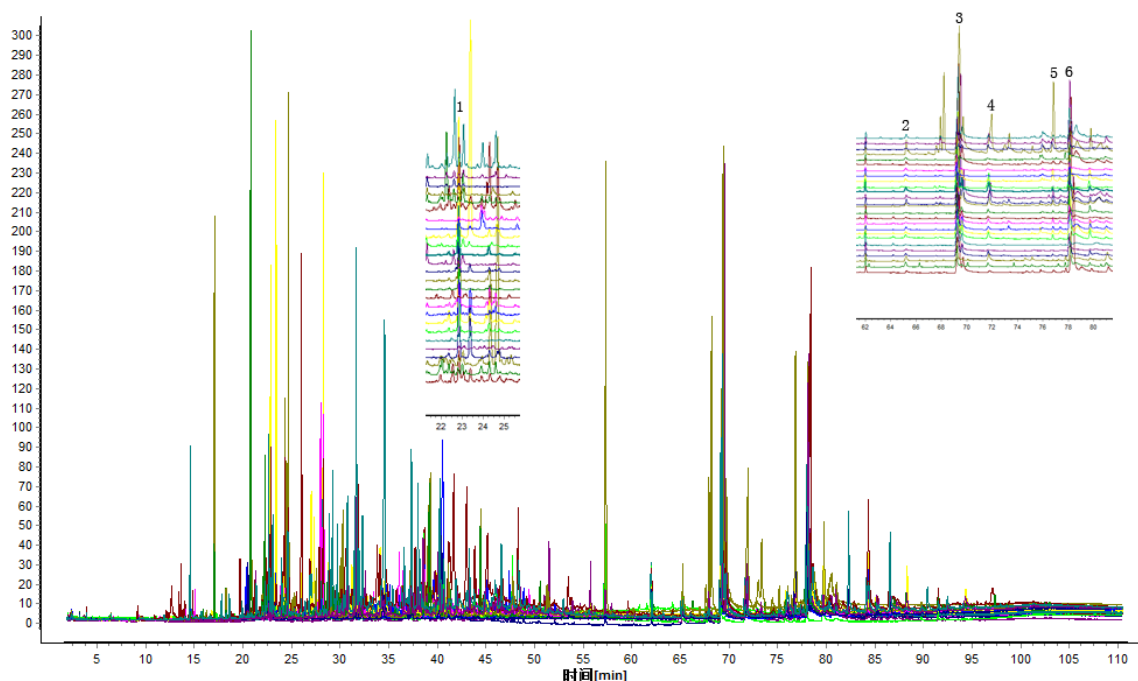


图 2 26 批次沉香样品 GC-MS 总离子流图

Fig.2 TIC of 26 agarwood samples

表2 GC-MS 鉴别沉香样品的共有化合物
Tab.2 Chemicals constituents of agarwood samples detected by GC-MS

序号	保留时间/min	相似度/%	分子式	名称
1	22.906	90	C15H26O	Jinkohol
2	65.367	90	C17H14O3	6-羟基-2-(2-苯乙基)色酮
3	69.342	/	C17H18O6	沉香四醇*
4	71.802	95	C17H14O3	7-羟基-2-(2-苯乙基)色酮
5	76.875	95	C18H16O5	5,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯基)乙基]色酮
6	78.392	90	C18H16O4	6-羟基-7-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮

*根据标准品比对。

2.4 多变量分析

以醇提取物、密度、GC-MS 检测 Jinkohol、沉香螺醇、倍半萜总量和色酮类总面积百分比、HPLC 色谱中峰面积最大的 10 个峰的面积百分比等 20 个变量,建立 PCA 模型,PC1 和 PC2 的贡献率 50.12%。

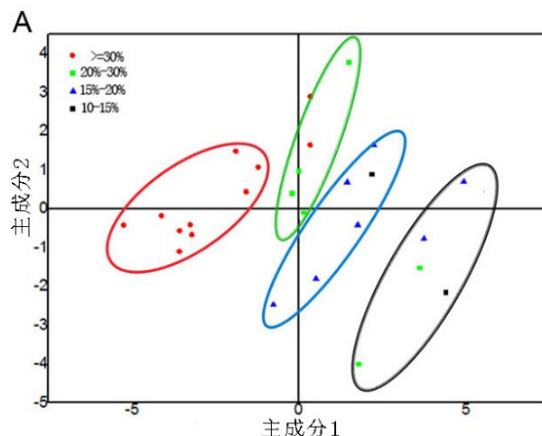
样品按照醇提取物含量分组显示,荷载因子>1 的主成分有 6 个,对样品贡献率为 79.5%。如图 3A 所示,样品分为 4 组,醇提取物≥30%的样品与其他样品能够较好分开,说明传统以醇提取物含量为分级依据有一定说服力。但是醇提取物在 15%~30%的样本中没有很好的聚类,说明这些样品化学组成存在较大变化,需要增加变量进一步加以区分。

以 PCA 分析结果(图 3A)为依据,以 GC-MS 和 HPLC 所有色谱峰面积为变量,用 PLS-DA 算法进行数据降维处理,找到对品质分级有贡献的 11 个色谱峰(GC-MS 峰 5 个,HPLC 峰 6 个)。选取平均面积大、分离度好的 8 个峰,与用于 PCA 分析的变量(即醇提取物含量、密度、GC-MS 的特征峰及 HPLC 的共有峰面积百分比)进行相关性分析。

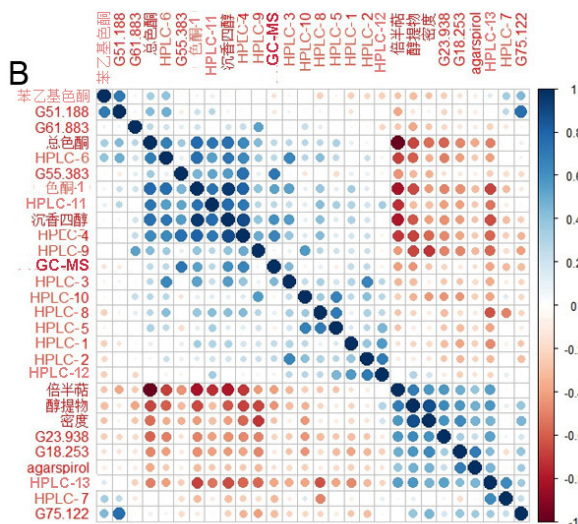
实验发现,醇提取物含量与倍半萜类总含量、密度、GC-MS 检测中 RT 18.253 min 和 RT 23.938 min 的两个峰面积正相关。经 NIST 检索,RT 18.253 min 物质为菖蒲醇(α -acorenol),RT 23.938 min 物质为环氧愈创烯(epoxyguaiane),均为沉香中的芳香物质^[11,12]。

色酮类化合物中与醇提取物含量正相关的仅有 HPLC -13 (RT 16.659 min)。倍半萜类与色酮类的总

含量及多数色酮类峰面积呈负相关性,沉香四醇含量则与多个色酮含量有较强的正相关性(图 3B)。说明色酮类的种类及含量,与倍半萜类的种类及含量呈负相关。由于两者对沉香品质都有重要贡献,需要综合评估色酮及倍半萜类两大成分对沉香进行品质评价。



A. 以醇提取物、密度等共 20 个变量,建立 PCA 模型



B. 以 PCA 分析的 20 变量与经过降维筛选的 8 个谱峰面积为变量,进行变量相关性分析

图3 PCA 分析和变量相关性分析

Fig.3 PCA and correlation analysis of all variables

2.5 沉香品质分级

随机森林判别模型中 IncNodePurity>1.5 的变量有 6 个,分别对应图 4A 中:

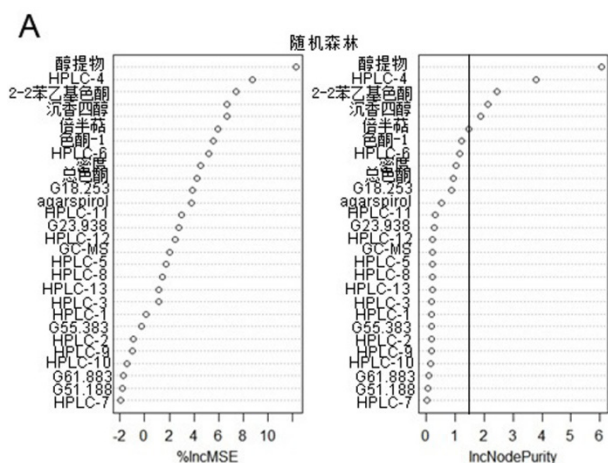
- 1) 醇提取物(醇提取物含量);
- 2) HPLC4 (HPLC 测定的(5S, 6R, 7R, 8S)5, 6, 7, 8-四羟基-2-(4-(甲氧基)乙基) 5,6,7,8-四氢色酮峰面积);

3) HPLC6 (HPLC 测定的(5R, 6R, 7R, 8S)5,6,7,8-四羟基-[2-(4-(甲氧苯基)乙基)] 5,6,7,8-四氢色酮峰面积);

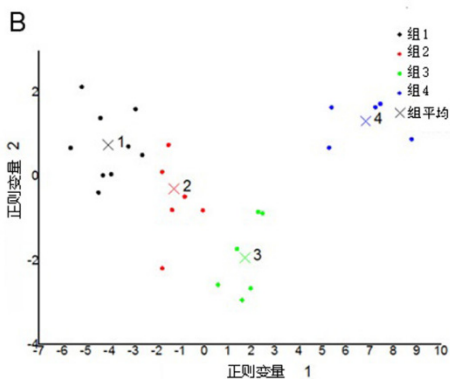
4) 2-(2-苯乙基)色酮 (GC-MS 检测的 2-(2-苯乙基)色酮峰面积);

5) 沉香四醇 (HPLC 测定沉香四醇质量分数);

6) 倍半萜类 (倍半萜类物质 GC-MS 峰面积百分比)。



A RF 模型中变量%IncMSE 和 IncNodePurity



B 基于 RF 模型找出的 6 个变量建立
沉香样品品质分级 DA 模型

图4 随机森林 (RF) 模型和判别分析 (DA) 模型
对沉香进行品质分级

Fig.4 Random forest and discriminate analysis for
agarwood grading

以上述 6 个变量为数据组, 建立 LDA 模型分析结果如图 4B 所示。该模型能够正确分组并对沉香样本进行分级 (误判率为 0)。

通过多变量分析, 确立了 5 个化学指标, 其中 4 个是可能与星洲系沉香品质密切相关的化合物。再

结合传统方法中的醇提取物含量指标, 同其建立科学和实用的沉香分级体系。

3 结论

本研究利用 GC-MS、HPLC 及多变量分析方法, 找到了与星洲系沉香品质密切相关的 5 个因素, 构建了沉香品质分级模型, 可为市场上沉香品质科学评价提供参考依据。

参考文献:

- [1] 安娜贝拉, 陈颖, 许敏, 等. 沉香的质量评价及药理活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2014, 033(002): 1-5.
Annabella, CHEN Y, XU M, et al. Research progress on the quality assessment and pharmacological activities of agarwood (*Aquilaria* spp.) [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2014, 033(002): 1-5.
- [2] Kristanti A N, Tanjung M, Aminah N S, Review: Secondary metabolites of *Aquilaria*, a Thymelaeaceae Genus[J]. Mini-Reviews in Organic Chemistry, 2018, 15(1): 36-55.
- [3] Chen H, 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.
- [4] Wang S L, Tsai Y C, Fu S L, et al. 2-(2-Phenylethyl)-4H-chromen-4-one derivatives from the resinous wood of *Aquilaria sinensis* with Anti-Inflammatory Effects in LPS-Induced Macrophages[J]. Molecules, 2018, 23: 289-296.
- [5] Ismail S N, Maulidiani M, Akhtar M T, et al. Discriminative analysis of different grades of Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) via (1)H-NMR-Based metabolomics using PLS-DA and random forests classification models[J]. Molecules, 2018, 22(10): 12-18.
- [6] Lancaster C, Espinoza E, Evaluating agarwood products for 2-(2-phenylethyl)chromones using direct analysis in real time time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2013, 26(24): 2649-2656.
- [7] Chen Y, Yan T T, Shang L 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: 23-32.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 二部. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [9] H Takemoto, M Ito, T Shiraki, T Yagura, G Honda. Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components[J]. Journal of natural medicines, 2008, 62(1): 41-46.
- [10] 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): 911-919.
- [11] Wang S, Yu Z, Wang C, et al. Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and aquilaria plants[J]. Molecules, 2018, 23(2): 356-365.
- [12] 戴好富. 沉香的现代研究[M]. 北京: 科学出版社, 2017.

(本文编校 张 鹏、姜 征)