

液相色谱-质谱结合化学计量学 用于国产沉香品质分析

晏婷婷, 陈媛, 王茜, 尚丽丽, 李改云

(中国林科院木材工业研究所, 北京 100091)

摘要:乙醇提取物含量与沉香品质有一定相关性,为寻找国产沉香品质的指标化合物,以液相色谱质谱联用(LC-MS)分析不同品质国产沉香乙醇提取物的化学组成特征,并用化学计量学方法分析样品间化学组成差异。结果显示,不同品级沉香的主要成分都是色酮类,根据结构可分为四类;通过偏最小二乘法判别法(PLS-DA)确认了三个对差异分析贡献较大的谱峰,通过特征碎片确认指标化合物为2-(2-苯乙基)色酮衍生物,为沉香品质的判别提供科学依据。

关键词: 国产沉香; 品质分级; 液相色谱质谱联用; 化学计量学

中图分类号: S781.42; TS67 文献标识码: A 文章编号: 1001-8654 (2019) 06-0014-05

Quality Analyses of Domestic Agarwood (*Aquilaria sinensis*) in China by LC-MS Combining with Chemometrics

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: Ethanol extractive contents correlate with agarwood quality. To identify characteristics of domestic agarwood for grading, LC-MS combining with chemometrics were used to profile and compare the compositions in ethanol extracts in this study. The main chemicals detected by LC-MS in the agarwood samples were identified as 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives with different structures which could be classified in four grades.

The results of PLS-DA (Partial least squares-discrimination analysis) based on 8~17 minutes of TIC (total ion chromatograph) showed that the agarwood sample loadings corresponded to relevant grades and that three potential chemicals related with agarwood quality were identified by characteristic fragment ion peaks. It was expected that the results could provide scientific reference for agarwood grading.

Key words: domestic agarwood; grading; LC-MS; chemometrics

国产沉香是沉香属(*Aquilaria*)白木香(*Aquilaria*

sinensis) 树木生长过程中, 韧皮部受到伤害刺激或微生物感染后, 分泌的次生代谢产物在木质部中沉积形成的木材和树脂的混合物^[1-3]。树脂中的化合物是其芳香气味和药效的主要贡献者, 也是决定沉香品质的重要因素^[4-5]。

沉香价格昂贵, 不同品级价格悬殊, 以次充好、以假乱真的现象层出不穷。目前市场上沉香的品质

收稿日期: 2018-11-03; 修改日期: 2019-10-25

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@criwi.org.cn。

评判，主要靠人为经验评定外观、气味和树脂（俗称油格）比例等指标^[6]，主观性强，重复性较差，缺乏客观依据。需要寻找并确立沉香中与品质密切相关的指标化合物，建立科学的品质评判依据。

树脂含量是目前广泛认可的沉香品质判别依据之一，多个地区和国家的沉香品质判定体系中，均有相关规定^[7]。沉香树脂的主要成分是倍半萜和色酮衍生物^[8]，其中 2-(2-苯乙基)色酮衍生物，是沉香特有的一类化合物，在不同种类和品质的沉香中的组成及含量不同^[3, 9-10]。这些化学成分易溶于乙醇等有机溶剂，有学者提出，按照乙醇提取物含量划分沉香等级^[11]。由于沉香化成分复杂，质谱数据庞大，为深度挖掘数据寻找品质指标化合物，需要使用化学计量学方法。偏最小二乘法判别分析（Partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA）是化学计量学中常用的有监督分析法，适用于解释样本量少的数据，并能减少变量间自相关的影响。已有液相色谱质谱结合计量学分析的研究发现，沉香形成过程中，乙醇提取物中色酮类化合物种类及含量随时间变化的规律^[12-13]。

笔者在前期研究中，基于大量沉香样本，建立了沉香真伪识别、野生沉香与人工沉香识别的方法体系^[14-15]；本研究通过分析乙醇提取物的含量和 LC-MS 化学成分特征，结合用化学计量学方法，分析判别沉香品质的指标化合物，以期为沉香品质的科学评价提供依据。

1.1 材料与方法

1.1 试验材料

沉香样本：17 个样品，均外购。经鉴定，基源植物为白木香（*A. sinensis*）；并根据 LY/T 2904-2017《沉香》分级，具体信息如下：

样品编号	等级	产地	样品编号	等级	产地
S1~S5	一级	海南	S11	三级	海南
S6~S8	二级	海南	S12~S14	四级	广东
S9~S10	三级	广东	S15~S17	四级	海南

试剂：色谱纯乙腈和甲酸，分析纯 95%乙醇，沉香四醇等，均外购。

1.2 试验装置

超高效液相色谱质谱仪、粉碎机等。

1.3 试验方法

1.3.1 乙醇提取物含量分析

按照 LY/T 2904-2017 中乙醇提取方法和醇溶性提取物测定方法，用 95%乙醇对样本进行热回流提取，计算乙醇提取物含量^[16]。

1.3.2 液相色谱质谱联用（LC-MS）分析

使用 ACQUITY UPLC® BEH Phenyl 色谱柱（Waters，1.7 μm，2.1X100 mm），分析样本乙醇提取物中的化学成分，流速 0.3 mL/min，柱温 30 ℃，进样量 1 μL。梯度洗脱条件列于表 1。

表 1 液相色谱-质谱流动相 0.1%甲酸水溶液/乙腈梯度洗脱条件

Tab.1 Gradients of mobile phases of 0.1% water-acetic acid/ acetonitrile used in LC-MS

时间/min	0.1%甲酸水体积分数/%	乙腈体积分数/%
0	85	15
1.40	80	20
2.50	77	23
7.50~10.00	67	33
10.20~12.20	65	35
18.00~18.50	5	95

质谱采用电喷雾离子源、正离子模式扫描；毛细管电压 2 000 V，锥孔电压 40 V；除溶剂气体为氦气（900 L/h），除溶剂温度 450 ℃，离子源温度 100 ℃，质荷比（mass-to-charge ratio, m/z）扫描范围 50~500 Da，扫描时间 0.2 s，碰撞气体为氩气，全扫描模式采集总离子流图（total ion chromatography, TIC）。产物离子模式，全扫描模式下每个谱峰中丰度最高分子作为前体离子，在 20~30 eV 的情况下，使前级离子碎裂，获得二级质谱碎片、质荷比 m/z 及丰度信息。

沉香中所含的色酮衍生物具有较为明显的结构特征（图 1），可分为四类：四氢 2-(2-苯乙基)色酮、单环氧 2-(2-苯乙基)色酮、双环氧 2-(2-苯乙基)色酮和 2-(2-苯乙基)色酮，如图 1 A~1 D，母核分子量分别为 254、268、282 和 250。这些色酮的取代基多为 -OH 和 -OCH₃，少数色酮含有 -Cl^[12-13]。电子轰击后，2-(2-苯乙基)色酮类发生苺基解离，产生 A+C 和 B 碎片。因此，能够根据前级离子和二级特征离子的 m/z，用式推导可能的化合物分子式及结构式^[12]。

$$\begin{aligned} & \text{总取代基数目: (准分子离子峰-1)-} \left\{ \begin{array}{l} 254 \\ 268 \\ 282 \\ 250 \end{array} \right\} \\ & = \text{羟基数目} \times 16 + \text{甲氧基数目} \times 30 + \text{C1的数目} \times 34 \quad (1) \\ & \text{B环取代基数目: B环分子量-91=B环羟基数目} \times 16 + \text{B环甲氧基数目} \times 30 \quad (2) \end{aligned}$$

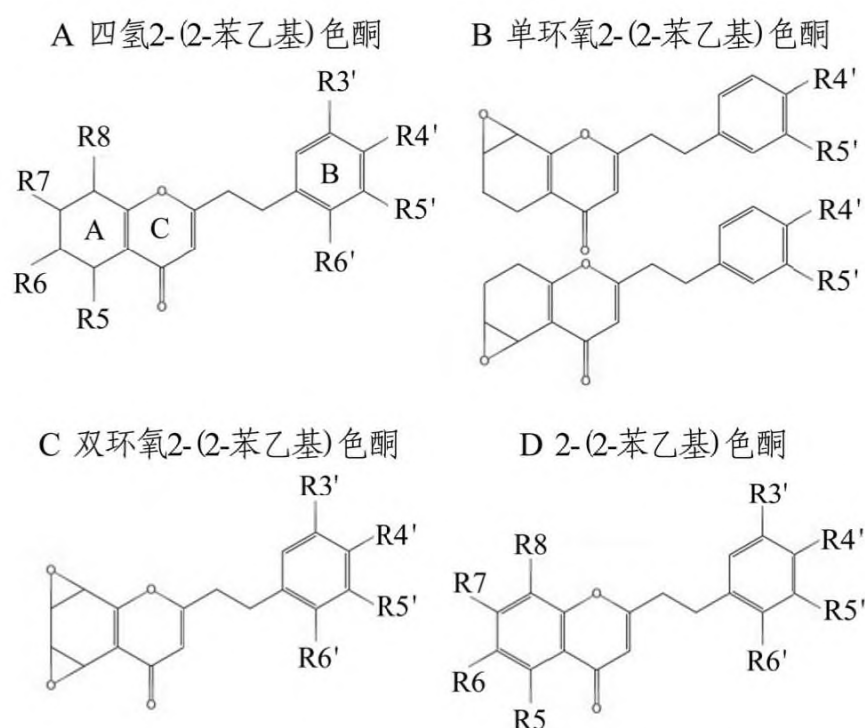


图1 沉香中4种色酮类化合物的结构式

Fig.1 Structural of chromones in agarwood samples

1.3.3 化学计量学方法分析

用 Masslynx 4.1(waters)对样本 TIC(总离子流图)进行积分,获得谱峰面积和保留时间。在同一液相色谱-质谱条件下,以沉香四醇保留时间为基准,对每个谱峰进行校正,并对 TIC 的色谱图进行积分(Masslynx 4.1, waters)。用 Unscrambler 将所有样本的色谱图进行归一化处理,得到新的 TIC 图。以所有样本色谱峰的面积 X 变量,样品等级为 Y 变量,使用 SIMCA 13 优化并建立 PLS-DA 模型,筛选对差异分析贡献较大的谱峰,即 VIP(Variable Importance for the Projection)值 >1 的色谱峰。

2 结果与讨论

2.1 乙醇提取物含量

沉香中乙醇提取物含量随其品质的提高呈现上升趋势。一级样品和四级样品组的醇溶性浸出提取物含量差异明显,二级、三级样本的醇提取物较接近(图2)。由于二级、三级和四级样品组内乙醇提

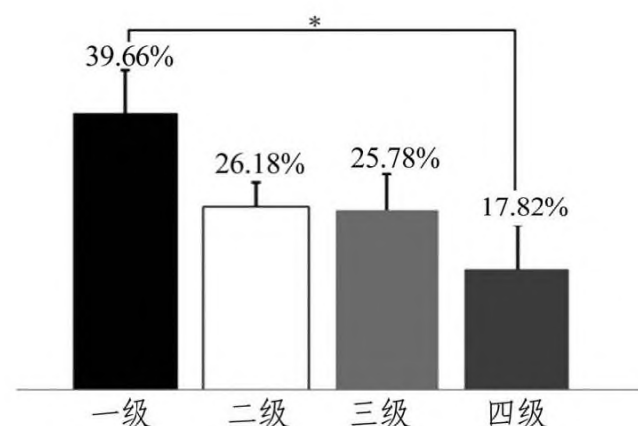


图2 沉香样本乙醇提取物含量

Fig.2 Contents of ethanol extractives of agarwood samples

取物含量差异较大,导致组间没有明显差异($p > 0.05$),说明该方法有一定局限性。

2.2 乙醇提取物 LC-MS 分析

将归一化后的 TIC 图进行相似度比较时发现,不同等级样本在 1~7 min 的 TIC 相似度范围为 0.8~0.9(图3实线框),说明沉香样本中存在共有成分^[1]。根据质谱准离子分子峰及二级特征碎片的 m/z 及丰度,并结合文献^[10]可知,这些化合物属于 4 氢-2-(2-苯乙基)色酮和环氧-2-(2-苯乙基)色酮类(图1A和图1B);TIC 中 8~17 min 区域呈现的差异较大,相似度 0.5~0.7(图3虚线框),质谱分析结果表明,这些化合物多为 2-(2-苯乙基)色酮和环氧 2-(2-苯乙基)色酮类(图1C和图1D)。

以沉香样品共有特征峰都较高的样品色谱图为例(图4),表2中列出了沉香特征化合物保留时间、分子离子峰和特征碎片。由于缺乏标准品和标准谱库,无法确定化合物的结构式及名称,只列出可能的分子式。

2.3 PLS-DA 法分析不同品质沉香

由于总离子流图的主要差异在 7 min 后,所以选取 8~17 min 图谱数据进行 PLS-DA 分析,结果如图5所示。

8~17 min 总离子流图对沉香品质鉴别具有一定的贡献,可以作为鉴别指标。存在的问题是,1~3 级样品区分不明显,这可能是因为沉香的化学成分受生长环境和形成时间等多种因素影响,样本化学成分差异较大,而试验样本量较小所致。

根据 PLS-DA 结果,从峰面积最高的 20 个峰中,筛选对差异分析贡献较大的谱峰($VIP > 1$),得到对判别分析起主要作用的三个谱峰(VIP 值分别为 1.11、1.10、1.12),列于表3。

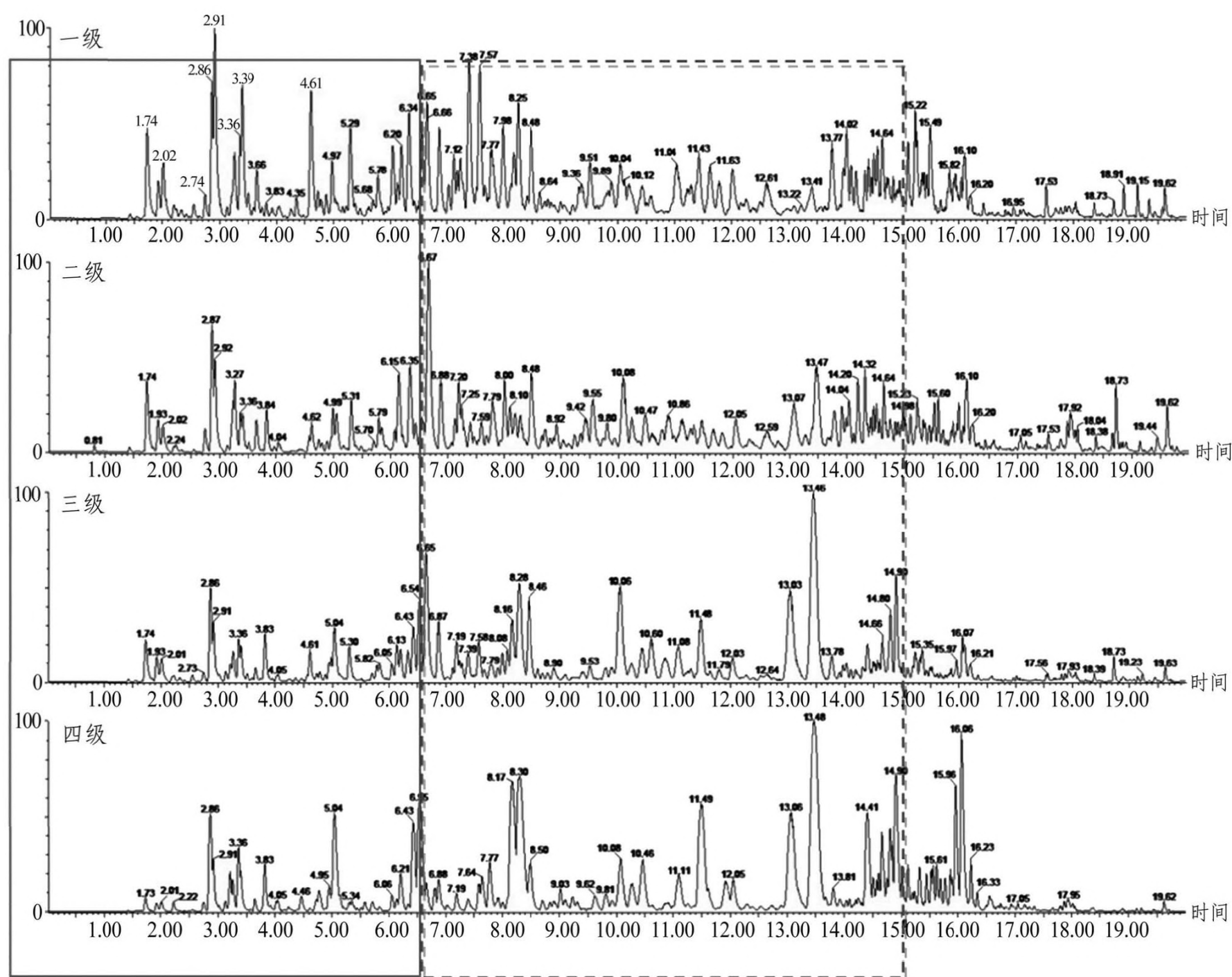


图3 不同品级沉香 LC-MS 总离子流图

Fig.3 TIC of LC-MS for agarwood samples in different grades

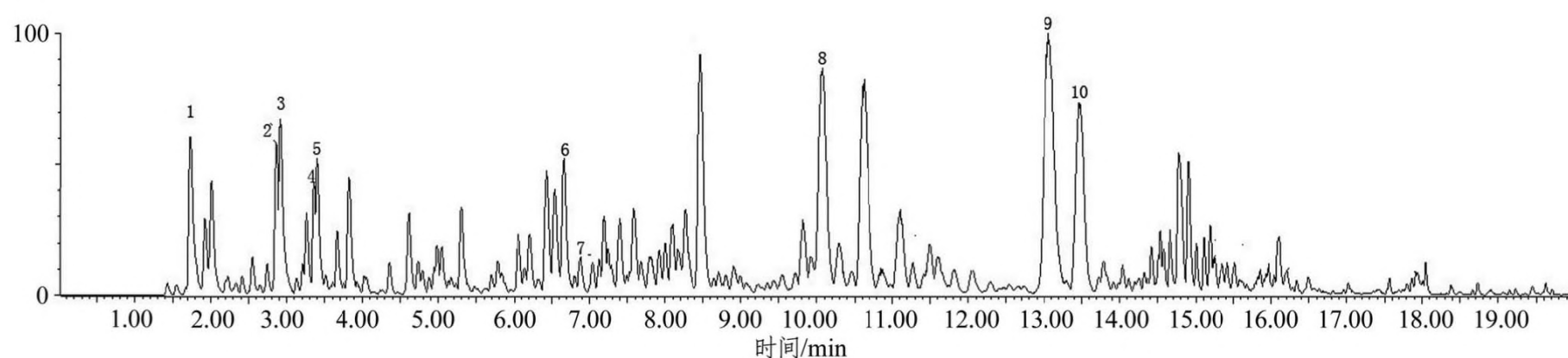


图4 LC-MS 图谱中沉香主要共有峰

Fig.4 Main common peaks of agarwood samples in LC-MS

通过质谱特征碎片,推测三个谱峰代表的化合物成分、二级离子碎片及可能的结构式。沉香中的色酮衍生物以 2-(2-苯乙基)色酮(MW=250)为基本骨架,取代基通常为-OH 和-OCH₃,取代基位点列于表 3。

这些化合物的质谱碎片有较强的规律:首先发生苜基解离,B 环与 C 环间的 C-C 键断裂,形成丰度最高的基峰,因此能够根据基峰的分子量(表 2),确认 B 环是否含有取代基,并计算含有的取代基种类及个数^[12]。

表 2 通过 LC-MS 分析的色酮类结构特征
Tab.2 Characterization of 2-2-phenylethyl-chromones analyzed by LC-MS

序号	保留时间/min	碎片离子						分类	分子式
		[M+H] ⁺	[M+H-18] ⁺	[M+H-18-18] ⁺	[M+H-28] ⁺	[M+H-18-28] ⁺	[M+H-18-18-28] ⁺		
1	1.74	365	347	329			301	137	四氢色酮 C18H21O8
2	2.87	319	301	283			258	91	四氢色酮 C17H18O6*
3	2.92	349	331	313			285	121	四氢色酮 C18H20O7
4	3.37	301	283			255		91	四氢色酮 C17H16O5
5	3.41	349	331	313			285	121	四氢色酮 C18H20O7
6	6.55	329			301			137	双环氧色酮 C18H16O5
7	6.68	331	313					121	四氢色酮 C19H22O5
8	10.47	313						121	色酮 C18H15O5
9	13.06	283						91	色酮 C17H14O4
10	13.46	311						121	色酮 C19H18O4

* 标准品鉴定为沉香四醇。

表 3 对沉香品质分级贡献最大的三个谱峰化学结构
Tab.3 Chemical structure of three peaks contributed to agarwood grading

序号	保留时间/min	准分子离子峰 [M+H]	特征碎片离子峰 (苯基解离碎片)		分子式	可能的结构式							
			B 环	A+C 环		R5	R6	R7	R8	R2'	R3'	R4'	R7'
1	8.27	313.1023	[C8H9O] ⁺	[C9H7O3] ⁺	C18H16O5 [8, 17]	H	OH	OH	H	H	H	H	OCH3
						H	OH	OH	OH	H	H	H	OCH3
2	10.47	297.1093	[C7H7] ⁺	[C11H10O4] ⁺	C18H16O4 [3, 18]	H	OH	OCH3	H	H	H	H	H
						H	OCH3	OH	H	H	H	H	H
3	13.48	311.1226	[C8H9O] ⁺	[C11H10O3] ⁺	C19H18O4 [4, 11]	H	OCH3	H	H	H	H	H	OCH3
						H	OCH3	H	H	H	H	OCH3	H

由于液相色谱无法很好地区分同分异构体，因此，只能根据碎片确认取代基的种类和数量，无法推导出准确的结构式。表 3 列出的是已有文献报道的结构式，其中 1 和 2 峰不是所有样品的共有峰。

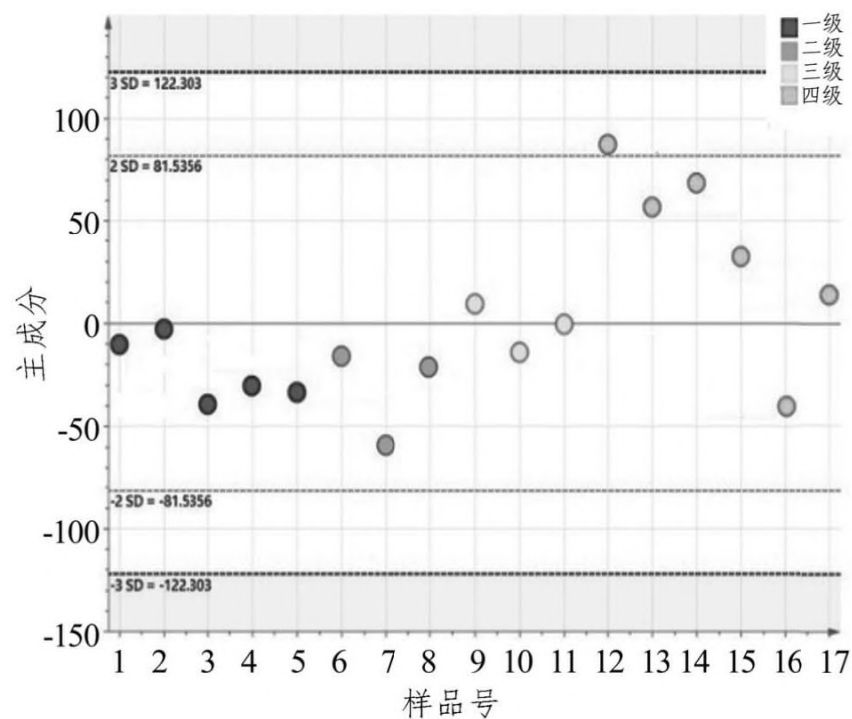


图 5 PLS-DA 分析不同品级沉香总离子流图
Fig.5 PLS-DA on TIC of agarwood samples in different grades

3 结论

- 1) 沉香乙醇提取物含量与其品质有一定的关系，但是仅依据乙醇提取物含量，不能完全把不同品质的沉香区分开。
- 2) 通过 PLS-DA 方法筛选出了对品质分级贡献最大的三个谱峰。根据质谱信息确认了三个 2-(2-苯乙基) 色酮衍生物，可以作为沉香品质分级的指标化合物。

参考文献:

[1] Kristanti AN, Tanjung M, Aminah NS. Review: Secondary metabolites of Aquilaria, a thymelaeaceae genus[J]. Mini Rev Org Chem, 2018, 15(1): 36-55.
[2] LI W, CAI C H, DONG W H, et al. 2-(2-phenylethyl)chromone derivatives from Chinese agarwood induced by artificial holing[J]. Fitoterapia, 2014, 98: 117-123.

(下转第 28 页)

措施。今后在继续加强进口环节监管的同时,在核发允许进口证明书之前,除了对出口国签发的出口许可证进行确认外,还应对木材的来源进行严格的审查,确保进口的木材是合法获得的。同时,加强管理机构、执法机构和科学机构间互相协调,形成工作合力,严厉打击濒危木材走私等非法贸易活动,进一步提升我国积极履约的国际形象。

2) 积极开展国际交流与合作。

我国应加强与木材原产国的交流与合作,通过提供资金、技术,帮助原产国提升管理水平和执法打击能力建设,从源头上遏制木材非法采伐及相关贸易的发生,建立原产国、中转国和消费国协同一致的监管体系,对非法走私活动开展全链条打击。

同时,还应在木材鉴定技术和标准样本交换共享等方面,开展国际交流合作,不断提升濒危木材及其相似木材的鉴定水平,为进一步提升 CITES 履

约能力,提供技术支撑。

3) 广泛开展宣传教育。

通过举办培训班、研讨会或在电视、网络等媒体平台,广泛宣传 CITES 公约规定和我国对濒危木材树种进口贸易的管理政策,加强公众对濒危珍贵树种资源的保护意识,引导企业遵纪守法地开展经营活动。

参考文献:

- [1] 姜笑梅,殷亚方,刘波.《濒危野生动植物种国际贸易公约》保护与管制木材种类的诠释[J].木材工业,2010,24(5):36-38.
JIANG X M, YIN Y F, LIU B. The List of Wood Species Protected and Controlled by the CITES[J]. China Wood Industry, 2010, 24(5): 36-38.
- [2] The Plant List Version 1.1 (2013)[EB/OL]. <http://www.theplantlist.org/>.
- [3] Muellner AN, Pennington TD, Koecke AV, Renner SS. Biogeography of *Cedrela* (Meliaceae, Sapindales) in Central and South America[J]. American Journal of Botany, 2010, 97(3): 511-518.

(责任编辑 姜征、向琴)

(上接第18页)

- [3] YANG DL, MEI WL, ZENG YB, et al. 2-(2-phenylethyl)chromone derivatives in Chinese agarwood "Qi-Nan" from *Aquilaria sinensis*[J]. Planta Med, 2013, 79(14):1329-1334.
- [4] Hashim YZ, Kerr PG, Abbas P, Mohd Salleh H. *Aquilaria* spp. (agarwood) as source of health beneficial compounds: A review of traditional use, phytochemistry and pharmacology[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189:331-360.
- [5] Hidayat W SA, Ahmad MN, Adom AH. Classification of agarwood oil using an electronic nose[J]. Sensors (Basel), 2010, 10(5): 4675-4685.
- [6] 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,2014,33(2):1-4.
- [7] Mohamed R. Agarwood[M]. Singapore: Springer Science+Business Media, 2016: 153-160. [8] WANG S, Yu Z, WANG C, WU C, et al. Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and *aquilaria* plants[J]. Molecules, 2018, 23(2): 342-356.
- [9] LIU Y, CHEN H, 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.
- [10] Kalra R, Kaushik N. A review of chemistry, quality and analysis of infected agarwood tree (*Aquilaria* sp.) [J]. Phytochem. Rev. 2017, 16: 1045-1079.
- [11] Nor Azah MA, Saidatul Husni S, Mailina J, et al. Classification of agarwood (gaharu) by resin content[J]. J Trop Forest Sci., 2013, 25(2): 213-219.
- [12] 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): 911-927.
- [13] YANG M, SUN J, Lu Z, et al. Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11): 2045-2062.
- [14] CHEN Y, YAN T, SHANG 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(2): 23-32.
- [15] 陈媛,邹献武,黄洛华,等.10批次伪品沉香鉴别方法的相关性[J].林业科学,2017,53(4):113-120.
CHEN Y, ZOU X W, HUANG L H, et al. Correlation of identification method for 10 batches falsified agarwood[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(4): 113-120.
- [16] LY/T 2904-2017, 沉香[S].
- [17] CHEN H Q, WEI JH, YANG JS, et al. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants[J]. Chem Biodivers, 2012; 9(2): 236-250.
- [18] YANG D L, WANG H, GUO Z K, DONG W H, MEI W L, DAI H F. A new 2-(2-phenylethyl)chromone derivative in Chinese agarwood 'Qi-Nan' from *Aquilaria sinensis*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(7): 770-776.

(责任编辑 张鹏、向琴)

本刊微信公众号: mucaigongye 微信扫码(见封面)订阅更便捷、更优惠
全国各地邮局办理订阅(邮发代号: 2-311) 投稿请认准本刊唯一官网: mcgy.criwi.org.cn