

国产沉香 HPLC-MS 研究

杨锦玲, 梅文莉, 董文化, 王 军, 戴好富*

中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南省沉香工程技术研究中心, 海南 海口 571101

摘要: 目的 采用 HPLC-MS 分析国产沉香的特征成分, 为国产沉香质量评价体系的建立提供依据。方法 Dionex-Acclaim 120 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.5%甲酸水溶液梯度洗脱; 体积流量 0.4 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 26 °C; ESI 源; 二级质谱; 阳离子模式。利用 SPSS 软件分别对 10 批国产沉香进行聚类分析。结果 10 批国产沉香经 HPLC-MS 分析确定 14 个 flindersia 类型色酮的共有峰, 并与对照品的保留时间和质谱数据进行比对, 鉴定了其中 7 个共有峰。聚类分析将 10 批样品分为 5 类, 结果表明, 生结沉香与熟结沉香的成分差异较大; 黄熟香的成分与产地关系明显。结论 建立的对 flindersia 类型色酮的分析方法可用于沉香样品的质量评价。

关键词: 沉香; HPLC-MS; 聚类分析; 色酮; 质量评价体系

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)15-3583-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.017

HPLC-MS study of *Aquilariae Lignum Resinatum*

YANG Jin-Ling, MEI Wen-Li, DONG Wen-Hua, WANG Jun, DAI Hao-Fu

Hainan Engineering Research Center of Agarwood, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: Objective HPLC-MS was used to analyze the characteristic constituent of *Aquilariae Lignum Resinatum*, providing basis for the establishment of quality evaluation system of agarwood. **Methods** The analysis was carried out on a Dionex-Acclaim 120 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and water-acetic acid (100 : 0.5) with the flow rate of 0.4 mL/min at 254 nm, and the separation was performed at 26 °C. MS experiments were performed using an electrospray ionization tandem mass spectrometry mainly in positive-ion mode. The cluster analysis was performed by SPSS software. **Results** A total of 14 common peaks of flindersia chromones were characterized by HPLC-MS analysis, and seven of them were identified by comparing their retention times and MS spectra with reference compounds. The 10 batch of samples were divided into five categories by cluster analysis. The result indicated that great difference existed between agarwood produced from living tree and dead tree, and the relationship between constituent and production place of “Huang-Shu” agarwood was obvious. **Conclusion** The analytical method for common flindersia chromones established in this paper could be used to evaluate the quality of agarwood.

Key words: agarwood; HPLC-MS; cluster analysis; chromones; quality evaluation system

国产沉香产自瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg, 是含有油脂的木材^[1], 主产于我国海南、广东等地, 是我国传统的名贵药材和珍贵香料^[2-3]。沉香具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘功能, 用于胸腹胀闷疼痛、胃寒呕吐呃逆、肾虚气逆喘急^[4]。化学研究表明沉香中的特征性成分为 2-(2-苯乙基) 色酮类化合物 (41%) 和倍半萜类化

合物 (52%)^[3]。2-(2-苯乙基) 色酮类化合物包括四氢色酮、双环氧色酮、单环氧色酮和 flindersia 类型色酮, 前 3 种类型的色酮母核通常具有较多含氧取代。

目前, 沉香中特征性成分的分析方法很多, 例如紫外分光光度法、气相色谱法、气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS) 等。2012 年, Lancaster 等^[5]采用 DART-

收稿日期: 2017-10-15

基金项目: 海南省自然科学基金创新研究团队项目 (2017CXTD020); 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2016004-03); 中国热带农业科学院级创新团队 (17CXTD-15); 现代农业产业技术体系建设专项基金资助项目 (CARS-21)

作者简介: 杨锦玲 (1990—), 女, 硕士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: jinlyang@126.com

*通信作者 戴好富, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然产物化学研究。Tel/Fax: (0898)66961869 E-mail: daihaofu@itbb.org.cn

TOF-MS 检测沉香中的 2-(2-苯乙基) 色酮类成分, 通过检测是否出现 m/z 319 或 m/z 349 的分子离子峰, 以及其他 10 个色酮类成分来鉴定沉香的真伪。2013 年, Li 等^[6]采用 HPLC-MS 分析方法总结了 5,6,7,8-四氢-2-(2-苯乙基) 色酮类成分的三级质谱裂解规律。2014 年, Xia 等^[7]采用 SFC-MS 初步鉴定了奇楠沉香中 29 个 flidersia 类型的 2-(2-苯乙基) 色酮类成分。2014 年, Espinoza 等^[8]采用 DART-TOF-MS 法结合主成分分析法辨别野生沉香和人工沉香。

上述质谱相关分析方法对沉香的鉴定和质量评价有一定的参考, 但均未对沉香中的 4 种色酮类成分进行具体的鉴定。本研究组前期采用 HPLC-MS 分析了越南产的 3 批不同结香时间的人工沉香, 总结了四氢色酮类、单环氧色酮类、双环氧色酮类和 flidersia 类型色酮类成分的质谱裂解规律和鉴定方法^[9]。同时, 采用 HPLC 分析法对 10 批国产沉香的指纹图谱进行了研究^[1], 本研究将利用 HPLC-MS 和 4 种色酮类成分的鉴定方法继续对该 10 批野生国产沉香的色酮类成分进行鉴定, 并根据共有色酮类成分的相对百分含量进行聚类分析, 以期在质谱条件下可以更准确地分析国产沉香的成分, 并揭示国产沉香中色酮类成分的特征。

1 仪器与材料

戴安 3000 超高压液相色谱仪 (戴安公司, 美国); 布鲁克 ESI 质谱仪 (布鲁克公司, 德国); Sartorius BP221S 电子天平 (塞多利斯公司, 德国); BRANSONIC-5510E-DTH 超声波清洗仪 (Branson 公司, 美国)。

乙腈、甲醇 (色谱纯, Tedia 公司), 甲酸 (分析纯, 广东光华化学厂有限公司), 超纯水。29 个色酮对照品均为课题组分离鉴定得到, 经 HPLC 检测, 质量分数均大于 98%。

10 批野生国产沉香药材于 2013 年收集, 药材信息见表 1。均由中国热带农业科学院热带生物技术研究戴好富研究员鉴定, 其沉香原植物均为瑞香科沉香属植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件^[1]

Dionex-Acclaim 120 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.5%甲酸水溶液 (B)。洗脱梯度程序: 0~60 min, 25%~55% A; 60~80 min, 55%~80% A; 80~90 min, 80%~100% A; 90~95 min, 100% A。体积流量 0.4 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 26 °C, 进样量 20 μL。

质谱为阳离子采集模式, 采集二级质谱, 质谱扫描范围 m/z 70~2 200, 氮气体积流量 6.0 L/min, 干燥气体温度为 250 °C, 雾化气压力 103.42 kPa, 毛细管压力 4 kV。

2.2 供试品和对照品溶液制备^[1]

2.2.1 供试品溶液制备 采用《中国药典》2015 年版规定的乙醚超声波提取法提取样品。将沉香药材粉碎, 精确称量粉末 1.000 g, 置于三角瓶中, 加乙醚 30 mL, 封口膜密封, 15 °C 超声 (135 W, 42 kHz) 提取 30 min, 滤过, 重复 2 次。待乙醚挥干, 得棕黄色油状物。利用公式 (提取率=提取物质量/药材质量) 计算各沉香药材的提取率。取提取物 5.0 mg

表 1 沉香药材样品信息

Table 1 Information of agarwood samples

编号	俗称	批号	样品描述	产地	提取率/%
S1	板头	20130901	表面黄白色, 凹凸不平, 纵纹理, 散布褐色油脂; 较硬, 气微香	海南	1.25
S2	皮油	20130402	表面灰白色, 散布棕褐色油脂, 树皮; 干而脆, 气香	海南	1.53
S3	黄熟香	20130902	表面黄白色, 纵纹理, 密布褐色油脂; 质硬, 气香	广西	1.67
S4	吊口	20130406	表面灰白色, 密布棕褐色油脂; 较坚硬, 气香	海南	1.27
S5	顶盖	20130408	表面黄棕色, 散布褐色油脂; 干而脆, 气微香	海南	0.76
S6	黄熟香	20130412	表面黄棕色, 散布褐色油脂; 干而脆, 气微香	广东	2.19
S7	虫漏	20130305	表面土黄色, 密布褐色油脂; 干而脆, 气香	云南	0.57
S8	顶盖	20130415	表面黄棕色, 密布黑褐色油脂; 较坚硬, 气香	海南	1.18
S9	黄熟香	20130416	表面黄白色, 凹凸不平, 纵纹理, 散布黄褐色油脂; 质硬, 气微香	海南	1.04
S10	虫漏	20130910	表面黄白色, 散布黑色油脂, 有虫洞; 干而脆, 气香	海南	1.92

于 5 mL 量瓶中用甲醇溶解、定容，并用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 29 个色酮对照品^[10-14] HPLC-MS 特征见表 2。分别精确称取对照品 1.0 mg，溶于甲醇中，分别配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，得对照品溶液。

2.3 4 种色酮的质谱鉴定方法^[9]

沉香中 4 种色酮类成分的色酮母核不同，但取代基相同，目前只报道了 1 个化合物是乙酰氧基取代，其余取代基都是羟基、甲氧基和氯原子。因此，不同类型色酮在质谱裂解时会出现不同的碎片，根据 4 种色酮的质谱特征，具体鉴定步骤如下：(1) MS^2 裂解时，双环氧色酮裂解产生 $[\text{M}+\text{H}-28]^+$ ，单环氧色酮裂解产生 $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ 和 $[\text{M}+\text{H}-28]^+$ ，四氢色酮可裂解产生 $[\text{M}+\text{H}-18]^+$ 和 $[\text{M}+\text{H}-18-18]^+$ ，flindersia 类型色酮则不会出现上述碎片。据此，可以判断色酮的类型。(2) 4 种色酮的母核相对分子质量不同，分别为 268、254、282、250，根据检测到的分子离子峰和上一步判断的色酮类型，可以判断整个化合物的取代基数目和类型。(3) 4 种色

酮的苄基片段和色酮片段都是通过 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 连接，在 MS^2 裂解时， $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 断裂，苄基碎片通常都能被检测到，无取代的苄基片段会出现 m/z 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ 的碎片，最常见的还包括以下碎片 m/z 107 $[\text{C}_7\text{H}_6+\text{OH}]^+$ 、121 $[\text{C}_7\text{H}_6+\text{OCH}_3]^+$ 、137 $[\text{C}_7\text{H}_5+\text{OH}+\text{OCH}_3]^+$ 、151 $[\text{C}_7\text{H}_5+2\text{OCH}_3]^+$ ，根据检测到的苄基离子，可以计算出苄基片段的取代基类型和数目。(4) 根据步骤 2 计算的整个化合物的取代基类型和数目，减去步骤 3 计算的苄基片段的取代基类型和数目，可以得出色酮母核的取代基类型和数目。(5) 根据上述 4 个步骤推导的化学结构，与文献报道的沉香中的色酮进行比对，条件符合，优先考虑鉴定为已知成分，如果推导的与报道的成分条件不符合，则初步鉴定为新化合物。(6) 最后再与对照品的保留时间和质谱进行比对和验证，保留时间和质谱与对照品一致的，鉴定为对照品化合物。

2.4 10 批国产沉香 HPLC-MS 分析结果

分别取 10 批沉香药材样品 (S1~S10) 的乙醚提取物进行检测，得到各样品的总离子流图。利用 Bruker Compass Data Analysis 4.0 软件，根据各色谱峰的保留时间和质谱数据与对照品的数据进行比

表 2 29 个色酮对照品 HPLC-MS 特征

Table 2 Characterization of 29 reference compounds by HPLC-MS

类型	编号	t_{R}/min	$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	$[\text{M}-18]^{+}$	$[\text{M}-18-18]^{+}$	$[\text{M}-28]^{+}$	正离子质谱		化合物	
			(m/z)	(m/z)	(m/z)	(m/z)	碎片 (m/z)			
							CM	BM		
THPECs	F1	12.9	349	331	313		137	(5 <i>S</i> [*] ,6 <i>R</i> [*] ,7 <i>S</i> [*])-5,6,7-三羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮		
	F2	13.2	349	331	313		137	(5 <i>S</i> [*] ,6 <i>R</i> [*] ,7 <i>R</i> [*])-5,6,7-三羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮		
	F3	15.2	349	331	313		121	5 <i>α</i> ,6 <i>β</i> ,7 <i>α</i> ,8 <i>β</i> -四羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮		
	F4	17.3	382	365	347		137	(5 <i>S</i> [*] ,6 <i>S</i> [*] ,7 <i>S</i> [*] ,8 <i>R</i> [*])-8-氯-5,6,7-三羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮		
EPECs	F5	33.1	331	313		285	121	5,6-环氧-7,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮		
	F6	33.8	301	283		255		5,6-环氧-7,8-二羟基-2-(2-苯乙基)色酮		
DEPECs	F13	42.6	313			285	121	oxidoagarochromones B		
	F15	43.5	283			255	91	oxidoagarochromones A		
FTPECs	F7	34.7	283				177	107	6-羟基-2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮	
	F8	36.6	313					137	6-羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮	
	F9	38.3	313				192	121	6,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮	
	F10	39.5	283				192	91	6,8-二羟基-2-(2-苯乙基)色酮	

续表 2

类型	编号	t_R/min	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M-18]^+$ (m/z)	$[M-18-18]^+$ (m/z)	$[M-28]^+$ (m/z)	正离子质谱 碎片 (m/z)		化合物
							CM	BM	
FTPECs	F11	41.5	283				177	107	6-羟基-2-[2-(2-羟基苯)乙基]色酮
	F12	42.4	313					121	6,7-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮
	F14	43.2	357				220	137	6,7-二甲氧基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
	F16	47.5	297				161	137	2-[2-(3-甲氧基-4-羟基苯)乙基]色酮
	F17	49.8	267				176	91	8-羟基-2-(2-苯乙基)色酮
	F18	50.4	296					137	2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
	F19	51.2	327					121	6-甲氧基-7-羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮
	F20	52.3	327				191	137	6-甲氧基-2-[2-(3-甲氧基-4-羟基苯)乙基]色酮
	F21	54.3	327					137	6-甲氧基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
	F22	55.2	267				161	107	2-[2-(2-羟基苯)乙基]色酮
	F23	56.5	297					121	6-羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮
	F24	58.3	267				176	91	6-羟基-2-(2-苯乙基)色酮
	F25	59.1	343					137	5-羟基-6-甲氧基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
	F26	64.9	311				220		6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮
	F27	72.0	281					121	2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮
	F28	73.8	251				160	91	2-(2-苯乙基)色酮
	F29	78.7	326					121	5-羟基-6-甲氧基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮

THPECs-四氢色酮 EPECs-单环氧色酮 DEPECs-双环氧色酮 FTPECs- flidersia 类型色酮 CM-色酮片段 BM-苄基片段, 下同

THPECs-5,6,7,8-tetrahydro-2-(2-phenylethyl)chromones EPECs-5,6-epoxy-2-(2-phenylethyl)chromones DEPECs-5,6,7,8-diepoxy-2-(2-phenylethyl) chromones

FTPECs-2-(2-phenylethyl)chromones of flidersia type CM-chromone moiety BM-benzyl moiety, same as below

对, 以及报道的色酮鉴定方法^[9]进行定性分析。10 批国产沉香乙醚提取物中检测到 76 个色谱峰, 各色谱峰均符合 2-(2-苯乙基)色酮类化合物的质谱规律, 并用峰面积归一化法测定了这些色谱峰在各个样品中的相对百分含量, 前 3 种多含氧取代的色酮鉴定结果见表 3, 表中化合物 17~20 质谱特征一致, 但保留时间不同, 目前已报道的成分只有 1 个色酮符合其质谱特征, 故化合物 17~20 中至少有 3 个属于新双环氧色酮。flidersia 类型色酮的鉴定结果见表 4, 各个色酮成分相对百分含量见表 5, 10 批样品中 4 类成分的总相对百分含量见表 6。

10 批沉香样品检测到的 76 个色酮成分中, 有 15 个成分为沉香中的共有成分, 其中通过与对照品对照得以鉴定的共有成分是 7 个, 分别为 6-甲氧基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基)苯乙基]色酮 (56)、6-羟基-2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮 (59)、6-羟基-2-(2-苯乙基)色酮 (60)、5-羟基-6-甲氧基-2-[2-(4-甲氧基)

苯乙基]色酮 (65)、6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 (70)、2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮 (71)、2-(2-苯乙基)色酮 (73); 根据质谱数据初步鉴定的成分有 3 个: (5S,6S,7S,8R)-8-氯-2-(2-苯乙基)-5,6,7-三羟基-5,6,7,8-四氢色酮 (11)、6-羟基-7-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 (55)、5-羟基-6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮 (66); 未鉴定的 10 批药材中的共有成分有 5 个, 编号分别为 30、36、67、72、76。

2.5 10 批国产沉香 HPLC-MS 聚类分析结果

Flidersia 类型色酮是沉香中最常见、数目和含量最大的一类色酮, 检测到的 15 个共有成分中, 有 14 个属于 flidersia 类型色酮, 以 14 个共有 flidersia 类型色酮的相对百分含量 (表 5) 作为变量, 运用 SAS 9.1.3 数据处理软件对 10 批沉香样品进行系统聚类分析, 聚类方法为最短距离法, 利用欧式距离作为样品的测度, 得到样品的聚类分析树状图, 见图 1。根据树状图结果, 当分类距离为 7 时, 10 批

表 3 10 批沉香样品中多含氧取代色酮类化合物初步鉴定结果

Table 3 Result of characterized chromones with oxygen substitutions from 10 batches of agarwood samples

编号	t_R/min	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-18]^+$	$[\text{M}-18-18]^+$	$[\text{M}-28]^+$	碎片离子 (m/z)		取代基数目			SC	鉴定结果
		(m/z)	(m/z)	(m/z)	(m/z)	CM	BM	OCH_3	OH	Cl		
1	14.1	319	301	283					4			(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-5,6,7-三羟基-2-[2-(2-羟基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮或同分异构体
2	15.9	349	331	313			121	1	4		F3	5,6,7,8-四羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮
3	16.0	319	301	283					4			(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-5,6,7-三羟基-2-[2-(2-羟基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮或同分异构体
4	16.7	349	331	313				1	4		F3	同分异构体
5	16.8	319	301	283					4			(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-5,6,7-三羟基-2-[2-(2-羟基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮或同分异构体
6	20.1	303	285	267					3			rel-(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-5,6,7-三羟基-2-(2-苯乙基)-5,6,7,8-
7	23.7	303	285	267					3			四氢色酮或新四氢色酮
8	24.2	349	331	313			121	1	2			新四氢色酮
9	24.6	287	269	251			91		2			(6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-6,7-二羟基-2-(2-苯乙基)-5,6,7,8-四氢色酮
10	29.4	367	349	331			121	1	3	1		rel-(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-8-氯-5,6,7-三羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]-5,6,7,8-四氢色酮
11	30.1	337	319	301					3	1		(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-8-氯-2-(2-苯乙基)-5,6,7-三羟基-5,6,7,8-四氢色酮
12	36.2	317	299		271		121	1	2			新单环氧色酮
13	18.5	347	329		301		137	1	3			5,6-环氧-7,8-二羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
14	25.0	331	313		285		121	1	2			新单环氧色酮
15	33.0	331	313		285		121	1	2		F5	5,6-环氧-7,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮
16	33.7	301	283		255				2		F6	5,6-环氧-7,8-二羟基-2-(2-苯乙基)色酮
17	21.8	329			301		137	1	1			5,6:7,8-双环氧-5,6,7,8-四氢-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮或新双环氧色酮
18	23.3	329			301		137	1	1			
19	24.2	329			301		137	1	1			
20	24.6	329			301		137	1	1			
21	42.0	313			285		121	1			F13	oxidoagarochromones B

SC-对照品; 化合物 17~20 鉴定结果相同

SC-reference substance; Identification of compound 17—20 is same

表 4 10 批沉香样品中 flidersia 类型色酮初步鉴定结果

Table 4 Result of characterized flidersia chromones from 10 batches of agarwood samples

编号	t_R/min	$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z)	质谱碎片 (m/z)		CM 取代基数		BM 取代基数		SC	鉴定结果
			CM	BM	OCH_3	OH	OCH_3	OH		
22	26.1	329		137		2	1	1		6,8-二羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
23	30.6	313	206	107	1	1		1		6-羟基-7-甲氧基-2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮
24	31.1	343	207	137	1	1	1	1		6-羟基-7-甲氧基-2-[2-(3-甲氧基-4-羟基苯)乙基]色酮或新色酮
25	32.7	343	206	137	1	1	1	1		6-羟基-7-甲氧基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮或 6-甲氧基-7-羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
26	33.3	343	207	137	1	1	1	1		6-羟基-7-甲氧基-2-[2-(3-甲氧基-4-羟基苯)乙基]色酮或新色酮
27	34.2	283	177	107		1		1	F7	6-羟基-2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮
28	35.0	313	177	137		1	1	1	F8	6-羟基-2-[2-(3-甲氧基-4-羟基苯)乙基]色酮
29	36.5	313		137		1	1	1		6-羟基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮

续表 4

编号	t_R/min	$[M+H]^+$ (m/z)	质谱碎片 (m/z)		CM 取代基数		BM 取代基数		SC	鉴定结果
			CM	BM	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH		
30	36.8	313		137		1	1	1		新色酮
31	38.4	313		121		2	1		F9	6,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮
32	39.5	283	192	91		2			F10	6,8-二羟基-2-(2-苯乙基)色酮
33	41.3	283	177	107		1		1	F11	6-羟基-2-[2-(2-羟基苯)乙基]色酮
34	42.7	313		121		2	1		F12	6,7-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮
35	43.6	283	192			2				新色酮
36	44.0	283	192	91		2				新色酮
37	57.3	343	207	137	1	1	1	1		新色酮
38	59.1	343		137	1	1	1	1	F25	5-羟基-6-甲氧基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
39	66.3	313		121		2	1			5,8-二羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮
40	68.5	283	192	91		2				5,8-二羟基-2-(2-苯乙基)色酮
41	37.7	327	221		2			1		6,7-二甲氧基-2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮或新色酮
42	40.6	327	221	107	2			1		6,7-二甲氧基-2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮或新色酮
43	40.9	357	221	137	2		1	1		6,7-二甲氧基-2-[2-(3-甲氧基-4-羟基苯)乙基]色酮或新色酮
44	41.2	357	221	137	2		1	1		6,7-二甲氧基-2-[2-(3-甲氧基-4-羟基苯)乙基]色酮或新色酮
45	43.1	357	220	137	2		1	1	F14	6,7-二甲氧基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基苯)乙基]色酮
46	46.8	267	161	107				1		2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮
47	47.5	297	161	137			1	1	F16	2-[2-(3-甲氧基-4-羟基苯)乙基]色酮
48	48.5	297	191	107	1			1		6-甲氧基-2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮或新色酮
49	49.2	267	176	91		1			F17	8-羟基-2-(2-苯乙基)色酮
50	50.3	297		121		1	1			6-羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮或新色酮
51	50.9	327		151		1	2			新色酮
52	51.4	297	191	107	1			1		6-甲氧基-2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮 或 新色酮
53	51.4	327		121	1	1	1		F19	6-甲氧基-7-羟基-2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮
54	52.3	327	191	137	1		1	1	F20	6-甲氧基-2-[2-(3-甲氧基-4-羟基)苯乙基]色酮
55	53.0	297	206		1	1				6-羟基-7-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮
56	54.3	327		137	1		1	1	F21	6-甲氧基-2-[2-(3-羟基-4-甲氧基)苯乙基]色酮
57	54.9	267	161	107				1	F22	2-[2-(2-羟基)苯乙基]色酮
58	55.8	297		121		1	1			6-羟基-2-[2-(4-甲氧基苯)乙基]色酮或新色酮
59	56.3	297		121		1	1		F23	6-羟基-2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮
60	57.6	267	176	91		1			F24	6-羟基-2-(2-苯乙基)色酮
61	58.7	297	191	107	1			1		6-甲氧基-2-[2-(4-羟基苯)乙基]色酮或新色酮
62	78.0	357		121	2	1	1			新色酮
63	78.2	357		121	2	1	1			新色酮
64	78.4	357		121	2	1	1			新色酮
65	78.7	327		121	2	1			F29	5-羟基-6-甲氧基-2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮
66	80.3	297	206	91	1	1				5-羟基-6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮
67	62.5	341		121	2		1			6,7-二甲氧基-2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮或新色酮
68	62.9	341	220	121	2		1			6,7-二甲氧基-2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮或新色酮
69	63.3	341		151	1		2			新色酮
70	64.8	311	220	91	2				F26	6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮
71	71.7	281		121			1		F27	2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮
72	73.2	281	190	91	1					6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮或新色酮
73	73.4	251	160	91					F28	2-(2-苯乙基)色酮
74	74.7	311		121	1		1			6-甲氧基-2-[2-(3-甲氧基)苯乙基]色酮或 6-甲氧基-2-[2-(4-甲
75	75.2	311	190	121	1		1			氧基)苯乙基]色酮
76	76.3	281	190	91	1					6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮或新色酮

表 5 10 批沉香样品中色酮类化合物相对含量

Table 5 Relative amount of chromones from 10 batches of agarwood samples

编号	t_R/min	相对含量/%									
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	14.1	1.29				3.82	1.13	5.88	5.63	0.10	3.66
2	15.9	0.26	0.02		1.23	1.23			1.63		0.54
3	16.0	0.04		0.23	0.05					0.20	
4	16.7	0.76			0.81	0.99	0.31		1.01		1.39
5	16.8			1.55			0.14				
6	20.1			0.24						0.10	
7	23.7			1.10							
8	24.2	0.19		0.20		0.04			0.17	0.08	
9	24.6			0.02							
10	29.4	0.55	1.34	0.04	1.11	1.19			0.11	0.18	0.14
11 ⁺	30.1	1.48	8.88	1.36	2.14	1.68	2.28	0.82	0.34	1.53	0.52
12	36.2						0.35				
13	18.5			0.18						0.08	0.49
14	25.0									0.10	
15	33.0									0.50	4.75
16	33.7		0.23	1.47			0.20			0.60	4.89
17	21.8			0.29							
18	23.3								1.25	0.21	
19	24.2			0.18							
20	24.6			0.02							
21	42.0								0.10	0.10	0.02
22	26.1	0.01		0.17	0.13			0.18	1.22	0.18	0.04
23	30.6				0.05		0.47		0.09		0.06
24	31.1	0.10		0.46	0.63	0.14					0.14
25	32.7		0.22		0.16	2.05	0.47	1.61	1.98	0.36	
26	33.3			0.93	0.30		0.11			0.17	
27	34.2	0.31	0.08	0.09	0.55	0.19	0.12	0.09	0.33	0.04	
28	35.0	0.87		5.12	5.75	3.51	0.33	3.30	3.19	1.67	4.44
29	36.1									0.93	
30 ⁺	36.8	0.56	0.14	0.21	0.77	0.61	0.21	0.49	1.20	2.41	0.21
31	38.4	0.87	0.14	1.00	2.12	0.09		0.17	0.74		0.73
32	39.5	1.10	0.46	6.06	1.67		0.29	0.21	0.86	0.12	1.03
33	41.3					0.35	0.07			0.43	
34	42.7	0.07	1.02		1.38			0.51		0.22	0.01
35	43.6			3.43							
36 ⁺	44.0	1.82	2.12	9.09	1.06	0.50	0.71	1.69	1.12	0.53	0.10
37	57.3									0.15	
38	59.1	0.05	0.29	0.55	0.09		0.12		1.75	0.88	
39	66.3		0.20	0.42	0.22	0.66		1.70	1.15		1.10
40	68.5		0.38	1.04	0.90		2.05	0.27	0.74		0.21
41	37.7						0.13			0.35	
42	40.6	0.10		0.62		0.08	0.35		0.05	0.11	
43	40.9	0.06	0.40	0.51				0.21	0.05		
44	41.2	0.25			0.04	0.07			0.22		
45	43.1	1.55	2.23	3.43	1.06	0.99	0.72	0.29	2.87	2.42	
46	46.8	0.87		0.09	0.56		0.81	0.13	0.77	0.96	0.10
47	47.5	0.28	0.35	0.66		0.37	0.11	0.07	0.15	0.11	

续表 5

编号	t_R/min	相对含量/%									
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
48	48.5		0.15	0.12	0.09		0.07		0.13	0.17	0.06
49	49.2	0.14		0.32			0.21	0.14	0.08	0.20	0.12
50	50.3			0.03			0.05			0.10	
51	50.9	1.87	0.41		1.62	4.33		1.02			
52	51.4	0.33	0.94				0.57		0.35	0.30	
53	51.4	2.42		1.52	0.72	0.05	0.23	0.29	1.24	1.98	0.09
54	52.3	1.70	3.48	1.21	0.18		1.05	1.22	0.35	2.68	
55 ⁺	53.0	0.17	0.29	3.63	0.88	1.13	0.38	0.44	0.12	1.22	1.12
56 ⁺	54.3	0.02	2.51	0.14	0.92	0.04	0.05	0.10	1.94	1.96	0.05
57	54.9	0.39					0.12			0.74	
58	55.8			0.30			1.69			1.30	
59 ⁺	56.3	5.94	2.37	0.30	6.44	2.66	0.24	3.52	3.76	2.59	2.14
60 ⁺	57.6	7.42	2.61	2.61	2.88	2.86	13.48	2.37	2.48	4.81	1.75
61	58.7						0.04			0.82	
62	78.0			0.16							
63	78.2	0.11	0.38	0.17	0.26	0.66		0.12	0.15		0.11
64	78.4			0.11							
65 ⁺	78.7	0.46	1.38	0.58	0.12	0.31	0.38	0.38	1.62	2.69	0.15
66 ⁺	80.3	1.06	0.82	1.36	1.29	1.58	3.24	0.41	0.81	2.00	0.06
67 ⁺	62.5	4.85	3.25	0.93	1.20	10.11	2.55	4.74	8.26	5.55	6.78
68	62.9	8.51		2.72							11.41
69	63.3		0.91						0.28	0.51	
70 ⁺	64.8	10.99	13.2	22.84	10.61	17.43	18.92	8.03	13.95	19.42	9.76
71 ⁺	71.7	1.73	2.48	0.10	1.33	1.91	1.61	0.66	0.39	2.74	0.51
72 ⁺	73.2	0.83	2.73	0.08	0.06	0.89	0.80	0.40	0.20	1.30	0.79
73 ⁺	73.4	2.00	0.20	1.46	0.39	2.07	12.95	0.77	0.10	2.90	0.55
74	74.7	3.28	4.94	0.14	1.70	0.13		0.47	0.83	0.57	0.15
75	75.2	5.33				0.48	1.47			2.77	
76 ⁺	76.3	1.20	2.86	0.43	0.05	1.37	7.27	0.63	0.96	4.65	0.23
合计		74.19	64.41	82.02	53.52	66.57	78.85	43.33	66.72	79.79	60.40
(化合物数)		(45)	(36)	(54)	(41)	(36)	(44)	(35)	(46)	(54)	(39)

⁺为共有成分⁺ was common component

表 6 10 批沉香样品中 4 种色酮的总相对含量

Table 6 Relative amount of four kinds of chromones in 10 batches of agarwood samples

编号	多含氧取代色酮数目 (相对含量/%)				flindersia 类型色酮数目 (相对含量/%)	色酮总数 (相对含量/%)	相对含量比 (总色酮/总多含氧取代色酮)
	双环氧色酮	单环氧色酮	四氢色酮	总计			
S1	0 (0.00)	0 (0.00)	7 (4.57)	7 (4.57)	38 (69.62)	45 (74.19)	16.23
S2	0 (0.00)	1 (0.23)	3 (10.24)	4 (10.47)	32 (53.94)	36 (64.41)	6.15
S3	3 (0.49)	2 (1.65)	8 (4.74)	11 (6.88)	41 (75.14)	54 (82.02)	11.92
S4	0 (0.00)	0 (0.00)	5 (5.34)	5 (5.34)	36 (48.18)	41 (53.52)	10.02
S5	0 (0.00)	0 (0.00)	6 (8.95)	6 (8.95)	30 (57.62)	36 (66.57)	7.44
S6	0 (0.00)	1 (0.20)	5 (4.21)	6 (4.41)	38 (74.44)	44 (78.85)	17.88
S7	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (6.70)	2 (6.70)	33 (36.63)	35 (43.33)	6.47
S8	2 (1.35)	0 (0.00)	6 (8.89)	8 (10.24)	38 (56.48)	46 (66.72)	6.52
S9	2 (0.31)	4 (1.28)	6 (2.19)	12 (3.78)	42 (76.01)	54 (79.79)	21.11
S10	1 (0.02)	3 (10.13)	6 (6.25)	10 (16.40)	30 (44.00)	39 (60.40)	3.68

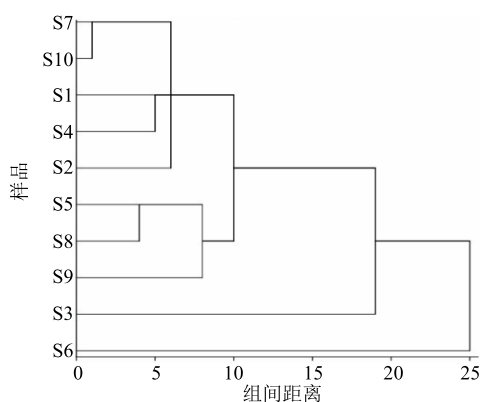


图1 10批沉香样品 HPLC-MS 聚类分析树状图

Fig. 1 Results of hierarchical cluster analysis of 10 batches of agarwood samples by HPLC-MS

样品可以分为5类, 样品S7(云南虫漏)、S10(海南虫漏)、S1(海南板头)、S4(海南吊口)、S2(海南皮油)聚为一类, 样品S5(海南顶盖)和S8(海南顶盖)聚为一类, 样品S9(海南黄熟香)、S3(广西黄熟香)和S6(海南黄熟香)各成一类。

3 分析与讨论

从4种色酮类型上分析, 10批样品中检测到双环氧色酮5个, 各样品中总相对百分含量最大者为1.35%(S8); 单环氧色酮4个, 各样品中总相对百分含量最大者为10.13%(S10); 四氢色酮12个, 各样品中总相对百分含量最大者为10.24%(S2); flidersia类型色酮55个, 各样品中总相对百分含量在36.63%~76.01%(表6)。flidersia类型色酮是沉香中最常见、数目和含量最大的一类色酮, 其次, 四氢色酮的数目和含量较大, 单环氧和双环氧色酮的数目和含量较少。10批样品中, S3、S6和S9中总色酮的相对百分含量较高, 分别为82.02%、78.85%和79.79%, 这3个样品均为黄熟香; 样品S7(云南虫漏)中总色酮相对百分含量偏低(43.33%), 其他非色酮类成分相对百分含量较高。

所有样品中都检测到了 flidersia 类型色酮和四氢色酮, 但单环氧色酮只在S2、S3、S6、S9和S10 5个样品中检测到, 双环氧色酮只在S3、S8、S9和S10 4个样品中检测到。据报道^[10], 沉香中4类色酮成分衍生规律是: 最早形成双环氧色酮, 再形成单环氧色酮, 进而转化为四氢色酮, 最终形成 flidersia 类型色酮。说明在含有双环氧和单环氧色酮的样品中, 色酮类成分还在渐渐形成, 有增加的趋势。前3类多氧取代的色酮相对百分含量越高, 沉香形成时间越短, 或者处于正在结香的过程。结

香时间越长, 色酮总相对百分含量应该越高, 多氧取代的色酮相对百分含量越低, 因此, 总色酮/多氧取代色酮的值更能反映10批沉香的形成时间, 推测其形成时间从短到长依次为S10、S2、S7、S8、S5、S4、S3、S1、S6、S9。

聚类结果表明, S7(云南虫漏)与S10(海南虫漏)中色酮类成分最接近, 海南顶盖(S5和S8)的色酮类成分很接近, 其次海南板头(S1)、海南吊口(S4)和海南皮油(S2)较为接近, 而各地黄熟香样品(S3、S6、S9)中色酮类成分差异较大, 说明该聚类分析方法能有效的将同类沉香聚集起来, 同时又能反映其中的差别, 效果显著。

沉香的分类方式较多, 根据沉香形成过程中树木的状态分为生结沉香和熟结沉香^[15], 生结沉香是指沉香树在活体状态下所结的沉香, 熟结是指沉香树在死亡后, 所结的沉香在树体倒伏后埋于土中或遗于水中, 多年之后, 去除朽木后所得的沉香。虫漏、吊口、板头、皮油和顶盖沉香均属于生结沉香, 而黄熟香属于熟结沉香。聚类结果表明, 熟结沉香与生结沉香中色酮类成分差别大。熟结沉香(黄熟香)中, S3产于广西、S6产于广东、S9产于海南, 分别聚为一类, S9(海南黄熟香)与海南顶盖(S5和S8)较为接近, 说明黄熟香中色酮类成分与产地关系明显。而生结沉香S7(云南虫漏)、S10(海南虫漏)、S1(海南板头)、S4(海南吊口)、S2(海南皮油)、S5(海南顶盖)和S8(海南顶盖)中, S7产地与其他沉香不同, 但跟海南的生结沉香较为接近, 说明生结沉香中的色酮类成分与产地关系不明显。

海南皮油(S2)属于生结沉香, 为树皮上所结沉香, 也与海南产地的其他生结沉香聚为一类, 但其共有成分(5S,6S,7S,8R)-8-氯-2-(2-苯乙基)-5,6,7-三羟基-5,6,7,8-四氢色酮(**11**)的相对百分含量达到8.88%, 比其他样品中该成分的相对百分含量(最高2.28%)高很多, 该成分经质谱初步鉴定, 属于含氯的四氢色酮, 推测这种差异主要与其结香部位较特殊有关。

在前期工作中, 10批国产沉香采用HPLC分析^[1], 通过保留时间确定24个共有峰, 本研究采用HPLC-MS分析, 通过质谱和保留时间共同确定, 只检测到15个共有成分, 说明HPLC中保留时间一致的成分并不一定是同1个成分, 采用MS等分析方法可以通过色酮类成分的质谱裂解规律和质谱

碎片, 区分4种不同类型的色酮并加以鉴定, 从而使得鉴定结果更加准确、全面。

4 结论

沉香的质量受到形成方式、结香时间和产地等多因素的复杂影响, 很难依据其外观或感官评价等方式给出统一的质量评价标准。但由于不同的沉香都具有共同的化学成分基础, 如 *flidersia* 类型的色酮, 因此通过化学成分的分析, 可以建立起科学统一的评价标准。本实验采用 HPLC-MS 分析方法分析了10批国产野生沉香中4种类型的色酮类成分, 通过计算各类成分的总相对百分含量可以初步判断结香时间, 根据检测到的14个共有 *flidersia* 类型色酮进行聚类分析, 可以判断样品成分的接近程度和差异大小, 并对样品进行聚类。本实验建立的方法和检测到的14个共有 *flidersia* 类型色酮成分可用于沉香样品的质量评价。

参考文献

- [1] 杨锦玲, 梅文莉, 余海谦, 等. 国产沉香 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3456-3461.
- [2] 梅文莉, 杨德兰, 左文健, 等. 奇楠沉香中 2-(2-苯乙基) 色酮的 GC-MS 分析鉴定 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(9): 1819-1824.
- [3] Mei W L, Yang D L, Wang H, *et al.* MS characterization and determination of 2-(2-phenylethyl) chromones in agarwood by GC-MS [J]. *Molecules*, 2013(18): 12324-12345.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [5] 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*, 2012, 26(23): 2649-2656.
- [6] Li J, Chen D, Jiang Y, *et al.* Identification and quantification of 5,6,7,8-hydro-2-(2-phenylethyl) chromones in Chinese eaglewood by HPLC with diode array detection and MS [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(23): 3733-3740.
- [7] Xia B, Li J R, Yang D L, *et al.* A rapid and highly specific method to evaluate the presence of 2-(2-phenylethyl) chromones in agarwood by supercritical fluid chromatography-mass spectrometry [J]. *Eur J Mass Spectrom*, 2014, 20(5): 395-402.
- [8] Espinoza E O, Lancaster C A, Kreitals N M, *et al.* distinguishing wild from cultivated agarwood (*Aquilaria* spp.) using direct analysis in real time and time of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2014, 28(6): 281-289.
- [9] Yang J L, Dong W H, Kong F D, *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): 911-925.
- [10] 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(7): 117-123.
- [11] Yang D L, Mei W L, Zeng Y B, *et al.* 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives in Chinese agarwood “Qi-Nan” from *Aquilaria sinensis* [J]. *Planta Med*, 2013, 79(14): 1329-1334.
- [12] Liu J, Wu J, Zhao Y X, *et al.* A new cytotoxic 2-(2-phenylethyl) chromone from Chinese eaglewood [J]. *Chin Chem Lett*, 2008, 9(8): 934-936.
- [13] Dai H F, Liu J, Han Z, *et al.* Two new 2-(2-phenylethyl) chromones from Chinese eaglewood [J]. *Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(2): 134-137.
- [14] Yang D L, Wang H, Guo Z K, *et al.* A new 2-(2-phenylethyl) chromone derivative in Chinese agarwood ‘Qi-Nan’ from *Aquilaria sinensis* [J]. *Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(7): 770-776.
- [15] 魏希望. 崖香十二状 [J]. 海南沉香, 2014, 2(4): 43.