结合非靶向代谢组学和指纹图谱对通体结香技术产沉香与野生沉香化学成分的比较分析

郁 萌[1,2]，侯文成[1]，冯 剑[1]，陈 兰[1]，杨 云[1]，刘洋洋[1,2*]，魏建和[1,2*]

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所海南分所，海南省南药资源保护与开发重点实验室，国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室，海南 海口 570311
2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所，中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室，濒危药材繁育国家工程实验室，北京 100193

摘 要：目的 系统全面分析比较通体结香技术产沉香（简称通体香）与野生沉香化学成分，为通体结香技术进一步的应用和推广提供科学可靠的依据。**方法** 采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱（UPLC-Q/TOF-MS）和气相色谱-质谱（GC-MS）结合非靶向代谢组学和指纹图谱，对通体香与野生沉香的乙醇提取物和挥发性成分进行分析。**结果** 16 批通体香与 16 批野生沉香的共有成分相同，但通体香指纹图谱相似度较高，且 4 个倍半萜、3 个小分子芳香物质和 8 个 2-(2-苯乙基)色酮等共 17 个共有成分在通体香中含量较高。**结论** 通体香和野生沉香主要化学成分组成相同，但不同批次间通体香的质量更稳定。

关键词：沉香；通体结香技术；2-(2-苯乙基)色酮；非靶向代谢组学；指纹图谱；2,4-二叔丁基苯酚；6,7-二甲基-1,2,3,5,8,8a-六氢萘；去氢蜂斗菜酮

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2022)18 - 5625 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.005

Comparative analysis of chemical constituents between the agarwood produced by Whole-tree agarwood-inducing technique and natural agarwood based on the combination of non-targeted metabolomics and fingerprint

YU Meng[1,2], HOU Wen-cheng[1], FENG Jian[1], CHEN Lan[1], YANG Yun[1], LIU Yang-yang[1,2], WEI Jian-he[1,2]

1. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China
2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To provide scientific basis for the advanced application and popularization of agarwood produced by Whole-tree agarwood-inducing technique (Agar-Wit), the compositional differences between agarwood induced by Agar-Wit and natural agarwood were analyzed and compared in the study. **Methods** The ethanol extracts and volatile components of samples were analyzed by ultra-performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q/TOF-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with non-targeted metabolomics and fingerprint in this study. **Results** The common components of agarwood induced by Agar-Wit were consistent with natural agarwood. The similarity coefficients among Agar-Wit agarwood were higher than that in natural agarwood. In addition, the content

收稿日期：2022-02-20

基金项目：国家重点研发计划项目（2018YFC1706403）；海南省自然科学基金高层次人才项目（2019RC340）；现代农业产业技术体系建设专项（CARS-21）；中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目（2016-I2M-2-003）；2021 年国家药品标准提高课题（2021Z14）

作者简介：郁 萌，硕士研究生，研究方向为沉香质量分析。E-mail: jokeryml@163.com

***通信作者：**刘洋洋，研究员，硕士生导师，研究方向为中药质量控制技术及其应用。Tel/Fax: (0898)31589000 E-mail: eadchris@163.com

魏建和，研究员，博士生导师，研究方向为药用植物基因资源、分子育种及次生代谢产物调控研究。

Tel: (010)57833016 E-mail: wjianh@263.net

of three low-molecular-weight aromatic compounds, four kinds of sesquiterpenes and eight 2-(2-phenylethyl)chromones were richer in agarwood induced by Agar-Wit. **Conclusion** The main chemical composition of agarwood induced by Agar-Wit, which is more stable, is proved to be in accordance with wild agarwood.

Key words: agarwood; whole-tree agarwood-inducing technique (Agar-Wit); wild agarwood; non-targeted metabolomics; fingerprint

沉香为名贵香药，《中国药典》2020 年版规定其为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 含有树脂的木材[1]。自然情况下，白木香树须受到外界伤害后，在其生长过程中缓慢形成沉香[2]。为了减少对野生沉香资源的依赖，我国从 20 世纪 90 年代就开始大力发展白木香种植，并探索人工结香方法。其中，魏建和等[3]发明的通体结香技术已成为目前我国乃至全世界范围内主要沉香产区应用最广泛的沉香结香技术。李浩洋等[4]对 10 批通体结香技术所产沉香（简称通体香）的质量进行评价，认为通体香的质量符合《中国药典》的规定，可代替野生沉香入药。相关研究证明通体香对实验动物的止呕[5]、保肝[6]、抗心肌缺血[7]、抗胃溃疡[8]和抗结肠炎[9]等作用与野生沉香相当或优于野生沉香。Li 等[10]采用 UPLC-Q/TOF-MS 结合多元变量统计分析初步发现通体香和野生沉香中 6,7-二甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮等 14 个 2-(2-苯乙基)色酮类成分在含量上存在一定差异。而刘洋洋[11]研究发现通体香乙醇提取物中主要成分为 2-(2-苯乙基)色酮类化合物（图 1），其挥发性成分主要为倍半萜类化合物和小分子芳香物质。已有研究尚未从全化学组成角度分析比较通体香与野生沉香化学成分的差异。

为了系统全面地分析和评价通体香药材质量，本研究收集我国沉香 2 大主要产区海南和广东的具有代表性的通体香和野生沉香样品，采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱（UPLC-Q/TOF-MS）和气相色谱质谱（GC-MS）分析沉香化学成分，基于中药指纹图谱相似度评价方法和非靶向代谢组学方法对通体香与野生沉香的化学成分进行比较分析，从而评价通体香与野生沉香化学成分的组成差异，以期为通体结香技术的推广以及通体香在医药和大健康产业中的应用提供依据。

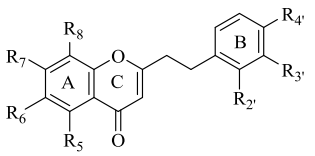


图 1　2-(2-苯乙基)色酮类化合物结构

Fig. 1　Structure of 2-(2-phenylethyl)chromones

1　材料、仪器与试剂

1.1　材料

32 批沉香样品详细信息见表 1。其中 16 批为通体香样品，16 批为野生沉香样品，所有样品经中国医学科学院药用植物研究所海南分所刘洋洋研究员鉴定为瑞香科植物白木香 *A. sinensis* (Lour.) Gilg 含有树脂的木材。

表 1　样品信息

Table 1　Information of samples

序号	来源	分类	序号	来源	分类
tt1	广东茂名	通体香	ys1	海南五指山	野生沉香
tt2	广东化州	通体香	ys2	海南定安	野生沉香
tt3	广东茂名	通体香	ys3	海南定安	野生沉香
tt4	广东湛江	通体香	ys4	市售（购买地广东江门）	野生沉香
tt5	广东湛江	通体香	ys5	市售（购买地广东江门）	野生沉香
tt6	广东化州	通体香	ys6	市售（购买地广东江门）	野生沉香
tt7	广东化州	通体香	ys7	广东化州	野生沉香
tt8	广东电白	通体香	ys8	广东化州	野生沉香
tt9	广东化州	通体香	ys9	海南定安	野生沉香
tt10	海南琼中	通体香	ys10	海南定安	野生沉香
tt11	海南海口	通体香	ys11	海南定安	野生沉香
tt12	海南海口	通体香	ys12	海南定安	野生沉香
tt13	海南定安	通体香	ys13	市售（购买地广东江门）	野生沉香
tt14	海南琼中	通体香	ys14	海南定安	野生沉香
tt15	海南儋州	通体香	ys15	海南定安	野生沉香
tt16	海南儋州	通体香	ys16	市售（购买地广东江门）	野生沉香

1.2 仪器

ASE 350 型加速溶剂萃取仪（赛默飞世尔科技有限公司）；7890A-5975C 气相色谱质谱联用仪（GC-MS，安捷伦科技有限公司）；Xevo G2-XS 型超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪（美国沃特世科技有限公司）。

1.3 试剂

硅藻土（赛默飞世尔科技有限公司，粒径大于三号筛），乙腈（赛默飞世尔科技有限公司，质谱纯），屈臣氏蒸馏水，其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 UPLC-Q/TOF-MS 分析方法

2.1.1 样品溶液制备 精密称取沉香样品粉末 0.1 g，加 50%乙醇 10 mL，称定质量，超声（40 kHz，600 W）提取 30 min，静置、冷却，称定质量，用 50%乙醇补足质量，取上清液作为 UPLC 分析用样品溶液，待用。从以上 32 个样品溶液中各取 200 μL 混合，制成质控样品[12]。

2.1.2 分析条件 采用 UPLC-Q/TOF-MS 分析 32 个样品溶液，每 6 个样品间插入 1 个质控样品。

（1）UPLC 色谱条件：Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱（100 mm×3 mm，1.7 μm），流动相乙腈（A）-水（B）梯度洗脱（0～20 min，20%～50%A；20～30 min，50%～100%A），体积流量 0.25 mL/min，柱温 30 ℃，检测波长 254 nm，进样量 2 μL。

（2）质谱条件：Q/TOF-MS 采用电喷雾电离源（ESI）在正离子模式下以 MS^E 模式采集，扫描范围 *m*/*z* 100～1500，采用亮氨酸-脑啡肽（*m*/*z* 556.277 1 $[M+H]^+$）实时校正。毛细管电离电压 3.0 kV；锥孔电压 40 V；离子源温度 100 ℃；脱溶剂气温度 350 ℃；脱溶剂 N_2 体积流量 600 L/h；锥孔反吹 N_2 体积流量 50 L/h。低能量扫描无碰撞能，高能量 MS^E 模式扫描碰撞能 35～45 eV，碰撞气为氩气。

2.2 GC-MS 分析方法

2.2.1 样品溶液制备 精密称取 0.1 g 沉香样品粉末，与适量的硅藻土研磨混匀，装入 34 mL 不锈钢萃取池中，以硅藻土填满萃取池，置于加速溶剂萃取仪中。加速溶剂萃取仪以水为提取剂，加热温度 120 ℃，静态时间 5 min，冲洗体积为萃取池体积的 30%，循环 2 次。所得提取液用 5 mL 正己烷萃取，制得 GC-MS 分析用样品溶液，待用。从 32 个样品溶液中各取 200 μL 混合，制成质控样品[12]。

2.2.2 分析条件 采用 GC-MS 以液体进样方式分析 32 个样品溶液，记录 TIC 图。每 6 个样品间插入 1 个质控样品。

（1）色谱条件：色谱柱为 HP-5MS 石英毛细管柱（30 m×250 μm），进样口温度 240 ℃；柱温 50 ℃保持 1 min，以 15 ℃/min 至 140 ℃并保持 8 min；以 1 ℃/min 至 155 ℃并保持 8 min；以 10 ℃/min 至 175 ℃并保持 7.5 min；以 5 ℃/min 至 200 ℃并保持 9.5 min；最后以 20 ℃/min 至 260 ℃并保持 5 min。进样量 1 μL。

（2）质谱条件：EI 离子源，离子阱温度 230 ℃，四级杆温度 150 ℃，接口温度 260 ℃，质量范围 *m*/*z* 50～300。

2.3 共有峰分析

将 16 批通体香和 16 批野生沉香样品的 GC-MS 总离子流和 UPLC-Q/TOF-MS 基峰图（BPC，base peak chromatogram）分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》（2012 版），以质控样品 QC 指纹图谱为参照图谱，时间窗宽度为 0.5 s，经多点校正、自动匹配后，分别生成通体香的 GC-MS、UPLC-Q/TOF-MS 指纹图谱和野生沉香 GC-MS、UPLC-Q/TOF-MS 指纹图谱，并依次提取共有峰。

2.4 多元变量统计分析

采用 MS-DIAL 软件[13]对 GC-MS 原始数据进行峰提取、识别、对齐、归一化、尺度化和缺失值填充等数据预处理，采用 Waters Progenesis QI 软件[14]对 UPLC-Q/TOF-MS 原始数据进行峰提取、识别、对齐、归一化、尺度化和缺失值填充等数据预处理，并分别输出每个样品标准化后得到的保留时间、精确质荷比和峰面积组成的三维数据矩阵，导入至 SIMCA 14.0 软件分别对 GC-MS 和 UPLC-Q/TOF-MS 数据进行多元变量统计分析。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱方法学考察

3.1.1 精密度试验 精密称取质控样品，分别按“2.1.1”和“2.2.1”项下方法制得样品溶液，并分别按“2.1.2”和“2.2.2”项下色谱条件连续进样测定 6 次。UPLC-Q/TOF-MS 以 2 号峰为参照峰、GC-MS 以 3 号峰为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值分别小于 0.59%和 3.30%、0.079%和 2.49%，表明仪器精密度良好。

3.1.2 重复性试验 精密称取质控样品 6 份，分别按“2.1.1”和“2.2.1”项下方法制备样品溶液，并分别按“2.1.2”和“2.2.2”项下色谱条件进样，

UPLC-Q/TOF-MS 以 2 号峰为参照峰、GC-MS 以 3 号峰为参照峰计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值分别小于 0.93%和 3.51%、0.084%和 2.54%，表明该方法重复性良好。

3.1.3　稳定性试验　精密称质控样品，分别按“2.1.1”和“2.2.1”项下方法制得样品溶液，并分别按“2.1.1”和“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、12、24 h 进样，UPLC-Q/TOF-MS 以 2 号峰为参照峰、GC-MS 以 3 号峰为参照峰计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值分别小于 0.76%和 3.74%、0.05%和 2.33%，表明 24 h 内样品溶液在室温下的稳定性良好。

3.2　指纹图谱的建立及共有峰分析

采用 UPLC-Q/TOF-MS 对 16 批通体香和 16 批野生沉香 50%乙醇提取物的化学成分指纹图谱进行分析，见图 2。结果表明 16 批通体香样品之间相似度为 0.598～0.869，而 16 批野生沉香样品间的相似度仅为 0.092～0.815，可见 16 批通体香醇提物化学成分的相似度较 16 批野生沉香醇提物化学成分相似度大。同时，基于 MS^E 质谱采集模式高能量场得到的碎片离子信息，并参考已有文献数据[10, 15-16]确认了 2-(2-苯乙基)色酮类化合物色酮部分（A 环）和苯乙基部分（B 环）取代基的类型和数目，进而指认了 32 个 2-(2-苯乙基)色酮类化合物，见表 2。

根据指纹图谱共有峰分析结果可知，通体香的 UPLC-Q/TOF-MS 指纹图谱共有峰（$R_{LC\text{-}tt}$，图 3-A）和野生沉香的 UPLC-Q/TOF-MS 指纹图谱共有峰（$R_{LC\text{-}ys}$，图 3-B）均为 24 个。可见，通体香和野生沉香 50%乙醇提取物的主要化学成分一致，均为 2-(2-苯乙基)色酮类成分，且根据分子离子峰的相对丰度比较，各成分在通体香中的含量均高于野生沉香。

采用 GC-MS 分析 16 批通体香和 16 批野生沉

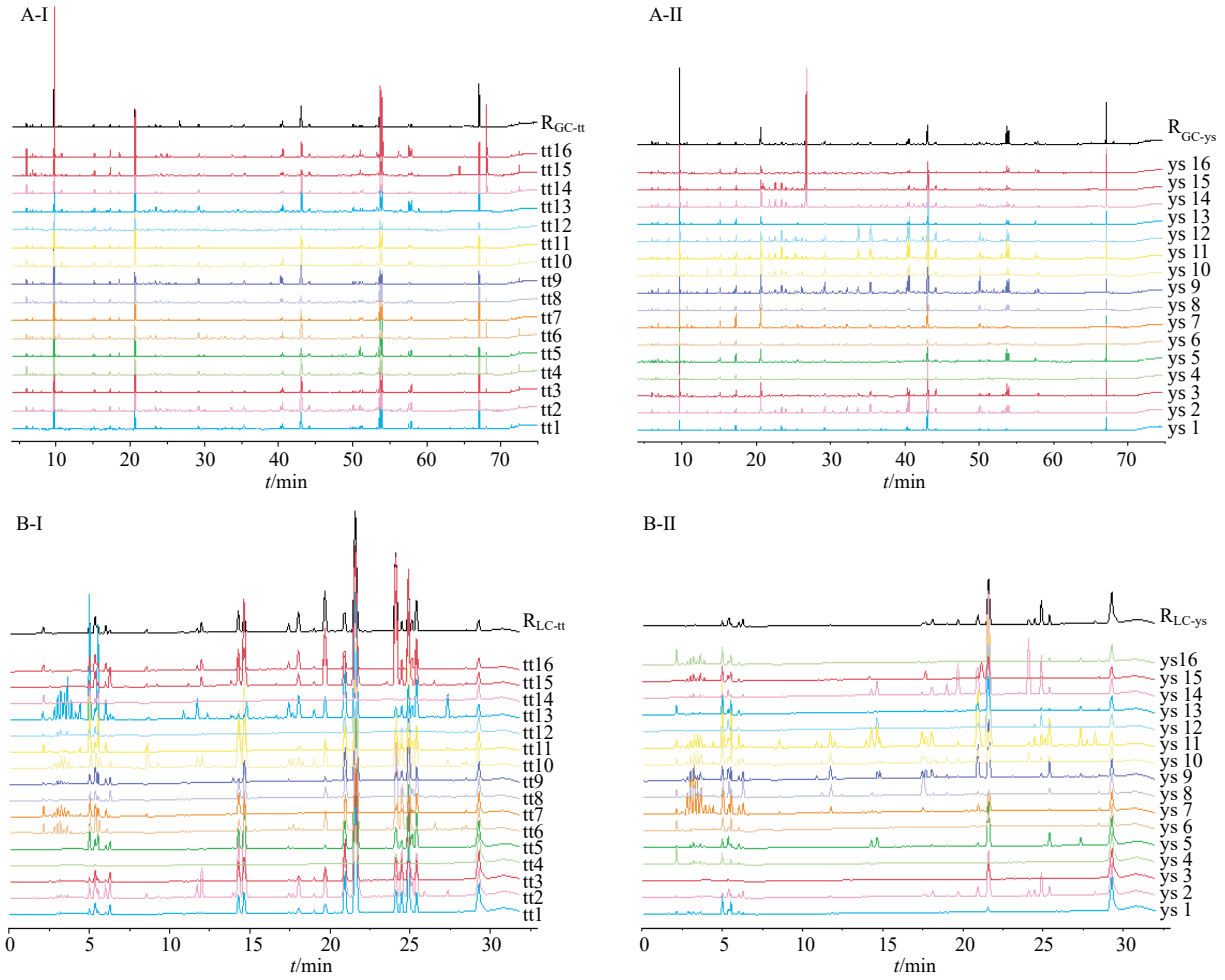


图 2　通体香 (I) 和野生沉香 (II) 的 GC-MS (A) 和 UPLC-Q/TOF-MS (B) 指纹图谱

Fig. 2　GC-MS (A) and UPLC-Q/TOF-MS (B) fingerprints of Agar-Wit (I) and natural agarwood (II)

表 2 通体香和野生沉香 UPLC-Q/TOF-MS 共有成分及差异化合物信息

Table 2 Overview of common compounds and potential markers from agarwood induced by Agar-Wit and natural agarwood analyzed in UPLC-Q/TOF-MS total ion chromatograms common models fingerprint

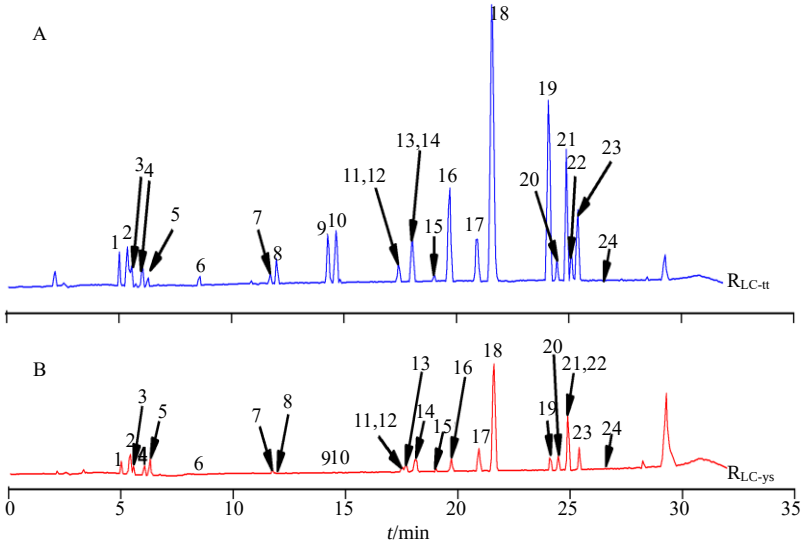
序号	t_R/min	$[M+H]^+$	误差 ($\times10^{-6}$)	MS^E 碎片离子峰	取代基		分子式	类型	名称	差异成分
					A 环	B 环				
1*	5.06	340.259 0		未鉴定						
2*	5.37	319.118 2	0	301.108 0, 283.096 8, 255.102 0	4×OH		$C_{17}H_{18}O_6$	THPEC	2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone（isomer）	
3*	5.55	407.790 8		未鉴定						
4*	6.04	319.118 0	−0.6	301.108 9, 283.096 8, 255.105 4	4×OH		$C_{17}H_{18}O_6$	THPEC	2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone（isomer）	
5*	6.30	319.118 0	−0.6	301.108 4, 283.096 5, 255.101 9	4×OH		$C_{17}H_{18}O_6$	THPEC	2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone（isomer）	
6*	8.58	329.102 3	−0.6	301.107 8, 301.107 8, 137.059 8	2×-O-	OH; OCH_3	$C_{18}H_{16}O_6$	DEPEC	oxidoagarochromone C（isomer）	
7*	11.81	331.117 2	−3.0	313.107 3, 285.112 0, 121.064 9	2×OH; -O-	OCH_3	$C_{18}H_{18}O_6$	EPEC	2-[2-(4'-methoxyphenyl)ethyl]-6,7-epoxy-5,8-dihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone（isomer）	
8*	12.04	301.109 0	4.6	283.097 8, 255.103 8, 227.109 1	2×OH; -O-		$C_{17}H_{16}O_5$	EPEC	2-(2-phenylethyl)-6,7-epoxy-5,8-dihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone（isomer）	
9*	14.33	313.107 6	0	283.112 5, 257.120 1, 121.068 5	2×-O-	OCH_3	$C_{18}H_{16}O_5$	DEPEC	oxidoagarochromone B（isomer）	L1
10*	14.69	283.097 1	0.3	255.102 0, 227.107 1, 192.042 0	2×-O-		$C_{17}H_{14}O_4$	DEPEC	oxidoagarochromone A（isomer）	L2
11*	17.47	297.113 8	3.7	137.060 0		OH; OCH_3	$C_{18}H_{16}O_4$	FTPEC	2-[2-(2′-hydroxy-4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	
12*	17.47	327.123 2	0	191.071 0, 137.059 9	OCH_3	OH; OCH_3	$C_{19}H_{18}O_5$	FTPEC	6-methoxy-2-[2-(3′-hydroxy-4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	
13*	17.72	327.123 4	0.6	191.070 6, 137.060 2	OCH_3	OH; OCH_3	$C_{19}H_{18}O_5$	FTPEC	6-methoxy-2-[2-(3′-hydroxy-4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	
14*	18.08	297.113 8	3.7	137.060 0		OH; OCH_3	$C_{18}H_{16}O_4$	FTPEC	2-[2-(2′-hydroxy-4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	
15*	19.06	297.112 7	0	137.060 6		OH; OCH_3	$C_{18}H_{16}O_4$	FTPEC	2-[2-(2′-hydroxy-4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	
16*	19.71	267.102 7	2.2	137.023 9, 176.047 4	OH		$C_{17}H_{14}O_3$	FTPEC	2-[2-(4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	L3
17*	20.94	341.139 1	0.6	121.069 1	2×OCH_3	OCH_3	$C_{20}H_{20}O_5$	FTPEC	6,7-dimethoxy-2-[2-(4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	L4
18*	21.61	311.128 5	0.6	121.067 8	OCH_3	OCH_3	$C_{19}H_{18}O_4$	FTPEC	6-methoxy-2-[2-(4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	L5
19*	24.16	251.107 6	1.6	173.060 1, 121.029 3			$C_{17}H_{14}O_2$	FTPEC	2-(2-phenylethyl)chromone	L6
20*	24.47	311.128 1	0.6	121.065 0	OCH_3	OCH_3	$C_{19}H_{18}O_4$	FTPEC	6-methoxy-2-[2-(4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	L7
21*	24.88	281.117 9	0.3	121.069 2		OCH_3	$C_{18}H_{16}O_3$	FTPEC	2-[2-(4'-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	L8
22*	25.14	233.154 5		未鉴定						
23*	25.40	255.154 6		未鉴定						L9
24*	26.55	549.191 1	−0.3	531.183 4, 458.136 8, 440.126 0; 283.097 5			$C_{34}H_{28}O_7$	PEC dimers		
25	9.26	301.107 6	0	283.097 4, 255.102 5	2×OH; -O-		$C_{18}H_{16}O_5$	DEPEC	2-(2-phenylethyl)-6,7-epoxy-5,8-dihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone（isomer）	
26	10.93	367.094 5	−0.8	349.084 2, 331.118 2, 313.107 6	3×OH; Cl	OCH_3	$C_{18}H_{20}ClO_6$	THPEC	8-chloro-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-2-[2-(4′-methoxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	

续表 2

序号	t_R/min	[M+H]$^+$	误差 (×10^{-6})	MS^E 碎片离子峰	取代基 A 环	取代基 B 环	分子式	类型	名称	差异成分
27	9.82	361.129 7	2.8	137.060 7	-O-; OH; OCH_3	OH; OCH_3	$C_{19}H_{21}O_7$	EPEC	2-[2-(3′-hydroxy-4′-methoxyphenyl)ethyl]-7,8-epoxy-5-methoxy-6-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone（isomer）	
28	11.24	337.084 1	−0.6	319.073 7, 301.062 6, 283.096 7	3×OH; Cl		$C_{17}H_{18}ClO_5$	THPEC	8-chloro-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-2-(2-phenylethyl)chromone（isomer）	
29	12.42	313.107 7	0.3	285.112 8		OCH_3	$C_{18}H_{16}O_5$	DEPEC	oxidoagarochromone B（isomer）	
30	16.75	267.102 5	1.5	189.073 3, 176.047 5	OH		$C_{17}H_{14}O_3$	FTPEC	2-[2-hydroxy-2-(2-phenylethyl)]chromone（isomer）	
31	16.05	267.102 1	0	173.056 2, 161.059 9		OH	$C_{17}H_{14}O_3$	FTPEC	2-[2-(3′-hydroxyphenyl)ethyl]chromone（isomer）	
32	16.69	297.113 0	1.0	137.060 5		OH; OCH_3	$C_{18}H_{16}O_4$	FTPEC	2-[2-(2′-hydroxy-4′-methoxyphenyl)ethyl] chromone（isomer）	
33	17.11	297.112 9	0.7	137.059 6		OH; OCH_3	$C_{18}H_{16}O_4$	FTPEC	2-[2-(2′-hydroxy-4′-methoxyphenyl)ethyl] chromone（isomer）	
34	18.34	327.125 7	7.6	137.059 3	OCH_3	OH; OCH_3	$C_{19}H_{18}O_5$	FTPEC	6-methoxy-2-[2-(3′-hydroxy-4′-methoxyphenyl) ethyl]chromone（isomer）	
35	23.57	281.117 4	−1.4	151.039 3	OCH_3		$C_{18}H_{16}O_3$	FTPEC	6-methoxy-2-(2-phenylethyl)chromone（isomer）	
36	25.88	297.112 9	0.7	206.057 5, 191.034 5, 167.034 6	OH; OCH_3		$C_{18}H_{16}O_4$	FTPEC	6-hydroxy-7-methoxy-2-(2-phenylethyl) chromone（isomer）	

DEPEC-双氧环四氢色酮　EPEC-单氧环四氢色酮　THPEC-四羟基四氢 2-(2-苯乙基)色酮　FTPEC-简单 2-(2-苯乙基)色酮　PEC dimers-2-(2-苯乙基)色酮二聚体；“*”为指纹图谱共有成分；L1～L9 代表显著差异性成分

DEPEC-diepoxy-2-(2-phenylethyl)chromones　EPEC-epoxy-2-(2-phenylethyl)chromones　THPEC-5,6,7,8-tetrahydro-2-(2-phenylethyl)chromones　FTPEC-flindersia type 2-(2-phenylethyl)chromones　PEC dimers 2-(2-phenylethyl)chromone dimers；“*”the common components in the fingerprint；L1—L9 represent significantly different components



图中编号与表 2 对应

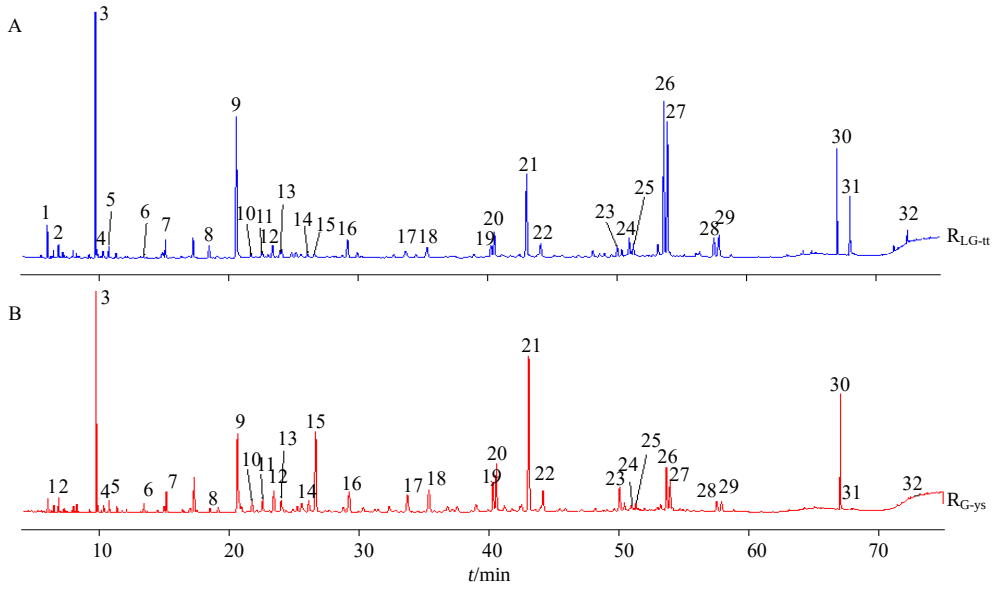
The numbers in the figure correspond to those in Table 2

图 3　通体香 (R_{LC-tt}) 和野生沉香 (R_{LC-ys}) UPLC-Q/TOF-MS BPC 指纹图谱共有模式图

Fig. 3　UPLC-Q/TOF-MS total ion chromatograms common models fingerprint of agarwood induced by Agar-Wit and natural agarwood

香的挥发性成分，结果发现 16 批通体香样品之间相似度为 0.846～0.995，16 批野生沉香样品间的相似度仅为 0.393～0.974，可见 16 批通体香挥发性成分的相似度较 16 批野生沉香挥发性成分相似度大。

根据指纹图谱共有峰分析结果可知，通体香的 GC-MS 指纹图谱共有峰（$R_{GC\text{-}tt}$，图 4-A）和野生沉香的 GC-MS 指纹图谱共有峰（$R_{GC\text{-}ys}$，图 4-B）均为 32 个。通过检索 NIST17 谱库并结合已有文献对共有峰进行解析，指认了其中 20 个共有成分，见表 3。包括 9 个倍半萜类化合物、8 个小分子芳香化合物、2 个 2-(2-苯乙基)色酮类化合物以及 1 个酚酸类化合物。由此可见，通体香和野生沉香含有的主要挥发性成分一致。



图中编号与表 3 对应

The numbers in the figure correspond to those in Table 3

图 4　通体香（$R_{GC\text{-}tt}$）和野生沉香（$R_{GC\text{-}ys}$）GC-MS TIC 指纹图谱共有模式图

Fig. 4　GC-MS total ion chromatograms common models fingerprint of agarwood induced by Agar-Wit and natural agarwood

3.3　差异性分析

为了进一步探究通体香和野生沉香化学组成的差异，采用有监督的正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）模型分析数据。结合 OPLS-DA 模型与独立样本 *t* 检验，根据 VIP 值、S-Plot（即 PC1 方差贡献率（p[1]）和变量相关系数（p(corr)[1]）以及 *P* 值（阈值 0.05）筛选差异变量。

根据 32 批沉香样品的 UPLC-Q/TOF-MS 分析结果，以 VIP 值＞8、分布在 S-plot 左下角（p[1]＜−0.1 且 p(corr)[1]＜−0.5）以及 *P*＜0.05 为筛选条件（图 5-A），得到 9 个显著差异性成分 L1～L9，其中，L1 和 L2 属于三元氧环四氢色酮（DEPECs），L3、L4、L5、L6、L7 以及 L8 属于 2-(2-苯乙基)色酮（FTPECs）。但是由表 2 可知，该 9 个成分均为通体香和野生沉香 UPLC-Q/TOF-MS 指纹图谱中的共有成分，且从 S-plot 图（图 5）可发现，L1～L9 等 9 个差异成分均位于 X 轴负半轴，表明其在通体香中的含量均显著高于野生沉香。根据 32 批沉香样品的 GC-MS 分析结果，以 VIP 值＞1 且分布在 S-plot 左下角（p[1]＜−0.07 且 p(corr)[1]＜−0.15）和右上角（p[1]＞0.045 且 p(corr)[1]＞0.5）以及 *p*＜0.05 为筛选条件（图 5-B），得到 12 个显著差异性成分 G1～G12，包括 3 个小分子芳香化合物（G1、G2、G5）、5 个倍半萜类化合物（G4、G7～G10）、2 个 2-(2-苯乙基)色酮类化合物（G11、G12）、1 个烯烃类（G6）以及 1 个酚酸类化合物（G3），其中显著差异性成分 2-(2-苯乙基)色酮（G15）与 UPLC-Q/TOF-MS 分析所得显著差异性成分 2-(2-苯乙基)色酮（L6）相同。但是由表 3 可知，该 12 个成分均为通体香和野生沉香 GC 指纹图谱中的共有成分，且从 S-plot 图（图 5）可发现，2,4-二叔丁基苯酚（G3）、6,7-二甲基-1,2,3,5,8,8a-六氢萘（G6）、以及去氢蜂斗菜酮（G7）等 3 个成分在野生沉香中的含量显著高于通体香，其余 9 个成分在通体香中的含量均显著高于野生沉香。

表 3　通体香和野生沉香 GC-MS 指纹图谱已鉴定共有成分及差异化合物信息

Table 3　Overview of identified common compounds and potential markers from agarwood induced by Agar-Wit and natural agarwood analyzed in GC-MS total ion chromatograms common models' fingerprint

峰号	t_R/min	化合物名称	碎片离子 (*m/z*)	匹配度	分子式	差异成分
1	6.02	苯甲醛	105.1, 77.1, 51.1	98.3	C_7H_6O	G1
3	9.75	苄基丙酮	148.1, 105.1, 91.1, 43.1	99.3	$C_{10}H_{12}O$	G2
5	10.74	4-甲氧基苯甲醛	135.0, 77.0, 63.0	96.0	$C_8H_8O_2$	
7	15.15	2,4-二叔丁基苯酚	206.0, 191.0, 57.0	95.5	$C_{14}H_{22}O$	G3
8	18.51	α-檀香醇	206.0, 191.0, 57.0	80.1	$C_{15}H_{24}O$	G4
9	20.62	4-(4-甲氧基苯基)-2-丁酮	178.0, 121.0, 43.0	93.8	$C_{11}H_{14}O_2$	G5
10	21.75	沉香螺旋醇	204.2, 161.1, 119.1, 59.1	93.1	$C_{15}H_{26}O$	
11	22.57	(–)-马兜铃烯	161.1, 105.191.1	90.1	$C_{15}H_{24}$	
12	23.42	2-((2*R*,8*R*,8a*S*)-8,8a-二甲基-1,2,3,4,6,7,8,8a-八氢萘-2-甲基)异丙基-2-醇	204.2, 161.1, 59.1	90.7	$C_{15}H_{26}O$	
13	23.96	(4a*S*,8*R*)-4a,8-二甲氧基-4,4a,5,6,7,8-六氢萘-2(3*H*)-酮	136.1, 121.0, 107.1	85.5	$C_{12}H_{18}O$	
14	26.12	1,3-二(1-甲基乙基)苯	162.0, 147.0, 105.0, 59.0	80.9	$C_{12}H_{18}$	
15	26.65	6,7-二甲基-1,2,3,5,8,8a-六氢萘	162.2, 147.1, 59.1	96.4	$C_{12}H_{14}O_4$	G6
19	40.32	(4a*R*-*cis*)-4,4a,5,6,7,8-六氢-4a,5-二甲基-3-(1-甲基亚乙基)-2(3H)-萘	175.0, 161.0, 147.0	89.0	$C_{15}H_{22}O$	
21	43.08	[3*S*-(3α,4aα,5α)]-3,4,4a,5,6,7-六氢-4a,5-二甲基-3-(1-甲基乙烯基)-1(2*H*)-萘	177.1, 147.0, 91.1	79.9	$C_{15}H_{22}O$	G7
26	53.68	(4a*R*,5*S*)-1-羟基-4a,5-二甲基-3-亚丙基-4,4a,5,6-四氢萘-2(3*H*)-酮	232.2, 217.0, 91.1, 77.1	83.1	$C_{15}H_{20}O_2$	G8
27	53.94	5,8-二羟基-4a-甲基-4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9,10-十氢-2(3*H*)-菲酮	185.2, 105.1, 91.1	82.0	$C_{15}H_{22}O_3$	G9
29	57.88	(2a*S*,3a*R*,5a*S*,9b*R*)-2a,5a,9-三甲基-2a,4,5,5a,6,7,8,9b-八氢-2*H*-萘并[1,2-b]环氧基[2,3-c]呋喃	261.0, 105.0, 91.0	67.9	$C_{15}H_{22}O_2$	G10
30	67.02	2,2′-亚甲基双[6-(1,1-二甲基乙基)-4-甲基苯酚	340.0, 177.0, 161.0	97.0	$C_{23}H_{32}O_2$	
31	68.02	2-(2-苯乙基)色酮	250.1, 91.1	94.7	$C_{17}H_{14}O_2$	G11
32	72.43	6-甲氧基-2-(2-苯乙基)色酮	280.0, 91.0	83.4	$C_{18}H_{16}O_3$	G12

G1～G12 代表显著差异性成分

G1-G12 represent significantly different components

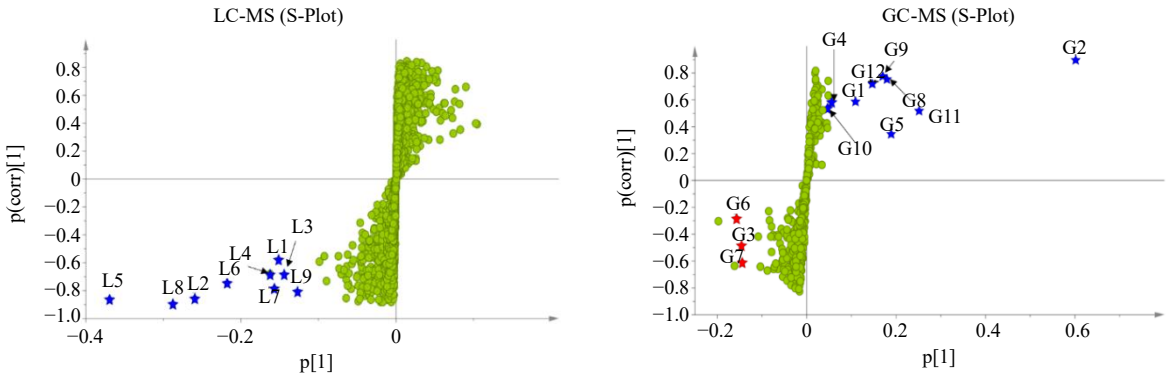


图 5　通体香和野生沉香 UPLC-Q/TOF-MS 和 GC-MS 的 S-Plot 图

Fig. 5　S-plots of agarwood induced by Agar-Wit from natural agarwood analyzed by UPLC-Q/TOF-MS and GC-MS

将以上 20 个差异成分导入到 Metaboanalyst 软件中绘制热图，距离度量方法为皮尔森积矩相关系数，聚类方法为平均连接法，结果见图 6，通体香和野生沉香各聚为一类。可见，20 个差异成分可以区分通体香和野生沉香，即通体香和野生沉香组间化学成分的差异远大于其组内差异。通过热图的颜色变化发现，除了挥发性成分中 G3、G6 和 G7 在野生沉香中的含量显著高于通体香，其余 17 个成分在通体香中的含量均显著高于野生沉香，且具有显著差异的 2-(2-苯乙基)色酮类化合物均在通体香中具有较高的含量。

4 讨论

4.1 样品前处理方法的选择

本研究在 UPLC-Q/TOF-MS 的样品前处理过程中对不同浓度甲醇溶液和乙醇溶液的热回流提取效果进行了比较。结果发现，50%乙醇溶液和无水甲醇的提取效果较好，但采用无水甲醇溶解待测样品时对其极性较大成分有溶剂效应，导致在 UPLC 上分离度较差。因此，本研究选择 50%乙醇溶液进行热回流作为 UPLC-Q/TOF-MS 的样品前处理方式。此外，本研究 GC-MS 的样品前处理采用了加速溶剂萃取法代替水蒸气蒸馏法，以水作为提取溶剂，通过提高温度与压力，在 120 ℃提取沉香挥发性成分，可实现名贵药材沉香的微量取样，及其挥发性成分的高效、标准化提取。

4.2 通体香与野生沉香的主要化学成分相同

中药指纹图谱是采用一定分析手段得到的反应该中药主要化学成分的共有峰图谱，作为一种半定量鉴别手段，常用于中药质量控制[17]。本研究发现，通体香和野生沉香 UPLC-Q/TOF-MS 指纹图谱共有峰均为 24 个，主要为 2-(2-苯乙基)色酮类化合物；而二者 GC-MS 指纹图谱共有峰均为 32 个，主要为小分子芳香化合物和倍半萜。由于倍半萜和 2-(2-苯乙基)色酮类等成分均是因白木香树受到外界伤害产生防御反应后产生的防御性物质[2]。可见，通体香和野生沉香在形成过程中产生的主要化学成分相同，这可能也是通体香乙醇提取物抗胃溃疡[8]、抗结肠炎[9]等作用与野生沉香作用相当的原因。

中药指纹图谱可全面反映中药所含的物质群，其相似度系数反映了不同批次样品间化学组成的整体波动程度，即中药材质量的稳定性[17-18]。沉香化学成分与其结香时间、生长环境和结香原因等因素有关[19]。Gao 等[20]基于 GC-MS 指纹图谱分析发现野生沉香和不同人工结香方法所产沉香的主要挥发

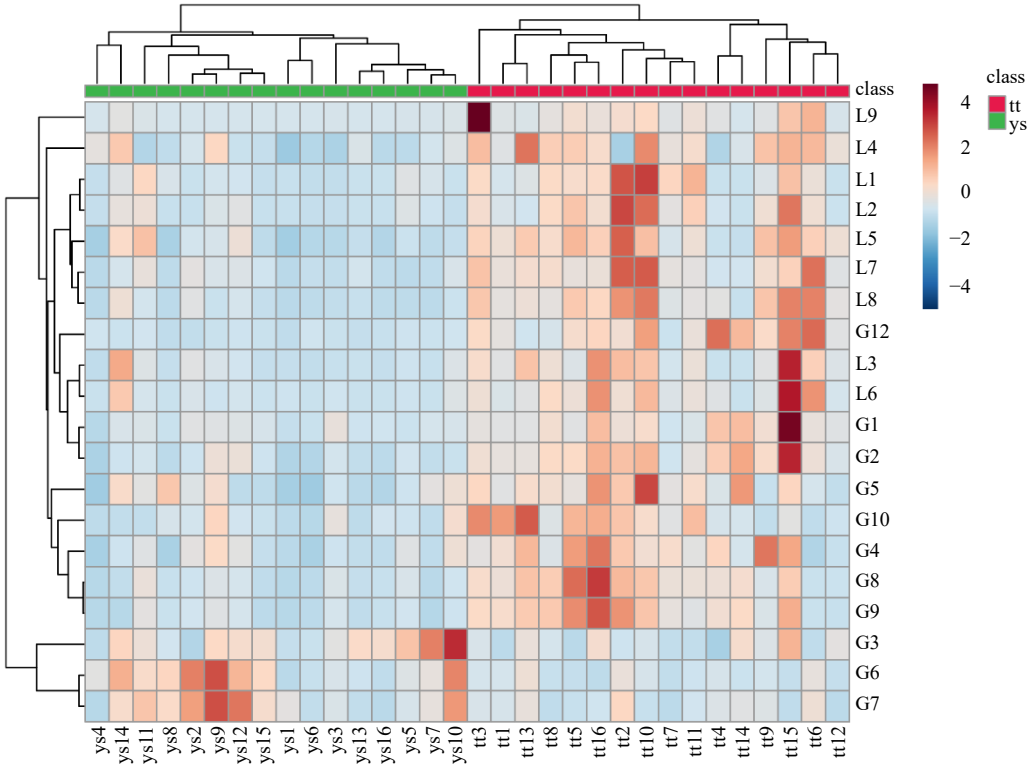


图 6 通体香和野生沉香差异成分热图分析

Fig. 6 Heatmap of 20 potential markers between agarwood induced by Agar-Wit and natural agarwood

性成分一致，但是不同人工结香方法所产沉香的指纹图谱相似度较低，仅为 0.180～0.811。而本研究发现 16 批采用通体结香技术诱导白木香树所产沉香 UPLC-Q/TOF-MS 指纹图谱和 GC-MS 指纹图谱相似度较高，分别为 0.598～0.869 和 0.846～0.995，且相似度高于野生沉香。可见，不同批次通体香的化学组成相对于野生沉香更稳定，可能与通体结香技术所采用的标准化结香、种植方式有关[21]。而 16 批野生沉香化学成分的相似度较 16 批通体香化学成分相似度小，可能与野生沉香生长环境、结香原因和产地加工等复杂因素有关，且其结香时间通常为数年至数十年不等[22-23]。

4.3 通体香中部分主要化学成分的含量高于野生沉香

中药材化学成分是其质量优劣和药理活性的物质基础[24-25]。本研究基于 UPLC-Q/TOF-MS 和 GC-MS 并采用多元变量统计分析方法，从通体香和野生沉香中找出 20 个差异成分，但该 20 个成分均为二者的共有成分，在通体香和野生沉香中的含量存在差异。其中 α-santalol 等 5 个倍半萜和 5 个小分子芳香物质以及 8 个 2-(2-苯乙基)色酮类成分在通体香中的含量均显著高于野生沉香。这可能是通体香乙醇提取物对家鸽的止呕作用[5]、对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[26]和改善异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌缺血作用[7]优于野生沉香的主要原因。其中，沉香乙醇提取物可通过降低多巴胺 D2 和 5-羟色胺 2A 发挥止呕作用[5]。α-santalol 是多巴胺 D2 和 5-羟色胺 2A 受体拮抗剂[27]，而本研究发现通体香中的 α-santalol 比野生沉香高，可进一步解释通体香止呕作用优于野生沉香。但是通体香中其他含量较高的化学成分及其药理作用与机制还有待开展深入研究。

此外，以本研究筛选出的 20 个差异成分通过聚类分析可将通体香和野生沉香各自聚为一类，可见 20 个主要成分在通体香和野生沉香组间的差异远大于其组内差异，因此可作为通体香和野生沉香的鉴定依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部 2020: 192-193.

[2] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 156-159.

[3] Liu Y Y, Chen H Q, 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.

[4] 李浩洋, 张宪臣, 张小花, 等. “通体结香技术”所结人工沉香的质量评价 [J]. 理化检验: 化学分册, 2017, 53(4): 470-473.

[5] 王灿红, 彭德乾, 刘洋洋, 等. 沉香醇提物对顺铂诱导家鸽呕吐的止呕作用研究 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(10): 1611-1617.

[6] 王灿红, 王帅, 彭德乾, 等. 通体沉香醇提物对氟尿嘧啶致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(3): 187-197.

[7] 王灿红, 彭德乾, 刘洋洋, 等. 沉香醇提物对大鼠气滞血瘀心肌缺血的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(7): 1279-1285.

[8] 刘洋洋, 王帅, 周岳, 等. “通体结香技术”所产沉香提取物对胃肠动力及胃溃疡的作用 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(6): 1076-1081.

[9] Wang C H, Wang S, Peng D Q, *et al*. Agarwood extract mitigates intestinal injury in fluorouracil-induced mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(7): 1112-1119.

[10] Li Y B, Sheng N, Wang L L, *et al*. Analysis of 2-(2-phenylethyl)chromones by UPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate statistical methods in wild and cultivated agarwood [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 771.

[11] 刘洋洋. 通体结香技术产沉香的质量特征研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.

[12] Want E J, Masson P, Michopoulos F, *et al*. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(1): 17-32.

[13] Tsugawa H, Cajka T, Kind T, *et al*. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(6): 523-526.

[14] Zhang J, Yang W, Li S, *et al*. An intelligentized strategy for endogenous small molecules characterization and quality evaluation of earthworm from two geographic origins by ultra-high performance HILIC/QTOF MS(E) and Progenesis QI [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(14): 3881-3890.

[15] 张倩, 霍会霞, 孙慧, 等. LC-IT-TOF-MS^n 快速鉴别沉香中 2-(2-苯乙基)色酮类成分 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(7): 869-877.

[16] 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): E911.

[17] 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 135-140.

[18] 于燕乔, 史大卓, 曲华, 等. 定性研究方法在中医药领域的应用与思考 [J]. 世界中医药, 2021, 16(13): 2058-2060.

[19] Naziz P S, Das R, Sen S. The scent of stress: Evidence from the unique fragrance of agarwood [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 840.

[20] Gao X X, Xie M R, Liu S F, *et al*. Chromatographic fingerprint analysis of metabolites in natural and artificial agarwood using gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometric methods [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 967: 264-273.

[21] 周亚非, 魏建和, 孙佩文, 等. 中国沉香科技创新与产业发展的现状及思考 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(8): 1051-1056.

[22] Tan C S, Isa N M, Ismail I, *et al*. Agarwood induction: Current developments and future perspectives [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 122.

[23] 黄俊卿, 魏建和, 张争, 等. 沉香结香方法的历史记载、现代研究及通体结香技术 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 302-306.

[24] 张铁军, 许浚, 申秀萍, 等. 基于中药质量标志物(Q-Marker)的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2199-2211.

[25] 张萌, 封亮, 贾晓斌. 基于生物活性与效应基准的中药质量评价技术发展现状与展望 [J]. 世界中医药, 2020, 15(15): 2234-2239.

[26] 王灿红, 王帅, 彭德乾, 等. 沉香醇提物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(8): 1091-1096.

[27] Okugawa H, Ueda R, Matsumoto K, *et al*. Effects of sesquiterpenoids from “Oriental incenses” on acetic acid-induced writhing and D2 and 5-HT2A receptors in rat brain [J]. *Phytomedicine*, 2000, 7(5): 417-422.

[责任编辑 王文倩]