

沉香 HPLC 指纹图谱研究

邱聪花

[1. 国家燃香类产品质量监督检验中心(福建), 福建泉州 362600; 2. 永春县产品质量检验所, 福建泉州 362600; 3. 福建省香产品质量检验中心, 福建泉州 362600]

摘要: **目的** 建立人工沉香和野生沉香 HPLC 指纹图谱辨别方法。**方法** 通过 HPLC 指纹图谱分析、相似度计算、面积归一法计算共有成分含量、SPSS 聚类分析, 综合评估辨别人工沉香和野生沉香的差异。**结果** 短期人工沉香成分较为简单, 主要为色酮类化合物, 确认 19 种共有成分, 分布于 II ~ III 区, III 区存在 2 个高响应特征峰; 野生沉香成分复杂多样, 但含量都较低, 确认 14 个共有峰, 主要分布在 I ~ II 区, I 区含有 3 个显著特征峰; 结香 3 年及以上的人工沉香包含了短期人工沉香和野生沉香的部分特点。**结论** 该方法简便、高效, 可用于人工沉香和野生沉香的区分辨别。

关键词: 沉香; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R282

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)06-2049-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.052

沉香是瑞香科沉香属植物受外界创伤后, 经自身抵御系统应激反应产生的带有油脂的木材^[1], 具有消炎、抗过敏、抗肿瘤等活性, 极具药用价值^[2-4]。根据集散地的不同, 沉香可划分为莞香系、惠安系、星洲系三大系列, 其中莞香沉多为白木香, 惠安沉属蜜香树或蜜香树与鹰木香树混种, 而星洲沉多属鹰木香树。根据沉香的形成环境又将其分为野生沉香、人工沉香^[5-6], 其中野生沉香树龄大, 结香时间长达几十年甚至上百年, 香气芬芳、复杂多样, 人工沉香则是因受到如刀砍、虫蛀、酸腐等简单“伤害”形成的, 结香环境简单、时间短。野生沉香和人工沉香在化学成分及其含量方面有明显区别, 价格差距悬殊。

野生沉香属植物仅有 7% ~ 10% 能产生沉香^[7-8], 加之人为无节制的开采, 野生沉香资源急剧锐减, 日渐枯竭。反之, 人工沉香悄然兴起, 结香技术日益成熟, 以致不少商家以次充好。现有的《中华人民共和国林业行业标准 LY/T 2904-2017 沉香》^[9]、《海南地方标准 DB46/T 421-2017 沉香鉴定》^[10] 和《DB46/T 422-2017 沉香质量等级》^[11] 尚未能对人工沉香和野生沉香进行区分, 且简单的感官品鉴已无法对两者进行区别, 亟需借助现代分析技术形成一套简便、高效的辨识方法。本研究通过沉香 HPLC 指纹图谱建立、沉香共有成分计算、聚类分析等, 明确人工沉香与野生沉香的具体化差异, 建立系统、快速地识别方法, 为两者的标准化鉴别提供数据支持。

1 材料

1.1 药材 30 批沉香包含莞香系、惠安系、星洲系的人工沉香和野生沉香, 采购于福建省金丰香业股份有限公司,

详细信息见表 1。

1.2 仪器 Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔公司); CPA225D 型电子天平(德国赛多利斯公司); FW-100 型高速粉碎机(上海科恒实业发展有限公司); KQ-500DE 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.3 试剂 沉香四醇、2-(2-苯乙基)色酮、2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮对照品购自成都普思生物科技股份有限公司。95%乙醇(分析纯), 甲酸、甲醇、乙腈(色谱纯), 购自汕头市西陇科学股份有限公司。

2 方法

2.1 供试品溶液制备 取粉碎后的沉香粉末, 经 80 目筛过滤收集。取沉香粉末 0.1 g, 称定质量, 加入 10 mL 95%乙醇溶液, 振荡摇匀室温放置 24 h。取提取液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2 对照品溶液制备 取沉香四醇、2-(2-苯乙基)色酮、2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮对照品适量, 加入 95%乙醇溶解, 即得。

2.3 色谱条件 Phenomenx luna C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-甲酸水(1:200, B), 梯度洗脱(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; 柱温 26 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 4 μL。

2.4 HPLC 指纹图谱分析 将 30 批沉香的 HPLC 数据导出

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: 福建省市场监督管理局科技项目(FJMS2019051)

作者简介: 邱聪花(1992—), 女, 硕士, 从事燃香类产品原料研究。Tel: (0595) 23865566, E-mail: 695802656@qq.com

表1 样品信息

批号	产地	样品信息	感官评价
SA1	广东	奇楠, 结香 18 个月	白褐色薄片, 香气淡薄冰凉, 质轻松脆, 不腻手
SA2	广东	奇楠, 结香 18 个月	白褐色块状, 香味淡, 质硬, 不腻手
SA3	茂名	奇楠, 冷钻 12 个月	黄褐色片状, 香气清凉舒畅, 稍腻手
SA4	广西	奇楠, 结香 18 个月	黄褐色块状, 香气混杂, 夹带清凉, 质脆
SA5	茂名	奇楠, 结香 18 个月	黑褐色片状, 香气浓郁清新, 清凉提神, 质硬
SA6	惠东	白木香, 结香 18 个月	白褐色块状, 纹路清晰, 气味清凉舒适, 稍腻手
SA7	惠东	结香 18 个月	黑褐色片状, 纹路清晰, 气味清新, 稍腻手
SA8	深圳	奇楠, 结香 18 个月	黄褐色片状, 气味清凉, 细腻粘手
SA9	深圳	白木香, 结香 18 个月	褐色块状, 香味淡, 木质疏松, 质轻, 不腻手
SA10	陆河	白木香, 结香 18 个月	褐色粒状, 香气清新凉爽, 木质疏松, 质轻稍腻手
SA11	广东	白木香, 结香 18 个月	浅褐色块状, 香气较淡, 质地疏松, 不腻手
SW1	香港	白木香(包头)	黑色薄片, 纹路清晰, 香气淡雅, 略带焦香, 颗粒感, 不腻手
SW2	香港	白木香(皮油)	片状树皮, 表皮可见树皮纹路, 内有深褐色油脂, 香气淡雅清爽, 不腻手, 材质韧度大
SW3	香港	白木香(机仔)	褐色块状, 硬度较大, 表面带有粉状颗粒物, 香气淡雅舒适, 带有甜味, 无黏腻感
SW4	香港	白木香(虫漏)	褐色条状, 油脂呈条状分布于木材间, 香气淡雅, 夹带奶香及甜味, 无黏腻感
SW5	海南	绿奇楠	黑褐色薄片, 香气淡, 质地清脆
SW6	柬埔寨	蜜香树	规则块状, 可见油脂较为均匀分布于木间隙, 香气浓郁, 奶香味中夹带清凉的甜味, 稍腻手, 硬度大
SW7	老挝	蜜香树	浅褐色规则块状, 香气淡, 清凉中夹带淡淡木香味, 不腻手, 表皮粗糙松散, 质轻
SW8	芽庄	—	黑褐色块状, 清凉奶香味, 油脂丰富, 质硬
SW9	伊利安	鹰木树	规则块状, 横切可见清晰油脂及木材纹路, 香气浓, 清凉甜味, 带花香, 稍腻手
SW10	加里曼丹	鹰木树	褐色片状, 香气浓郁, 较松软
SW11	马来西亚	—	黑褐色片状, 质硬, 香味淡, 带有奶香味
SW12	达拉干	—	黑褐色块状, 香气清凉, 质硬
SW13	马泥涝	—	黑褐色片状, 味淡, 无黏腻感, 质地坚硬
S1	香港(树心油)	白木香, 结香 3.5 年	白褐色条状, 纹路清晰, 中间为白色木材, 外圈包裹褐色油脂, 香气淡雅, 稍腻手
S2	香港	白木香	黑褐色镂空壳状, 少数油脂溢出泛光, 背面可见木材纹路及少数浅褐色油脂, 香气淡雅, 舒适柔和
S3	广东	白木香	片状树皮, 表皮可见树皮纹路, 内部带有深褐色油脂, 香气淡雅清爽, 无黏腻感, 材质韧度大
S4	江门	白木香, 结香 5 年	黑褐色薄片, 香气清新, 质地疏松
S5	茂名	白木香	白褐色薄片, 香味淡, 质地硬
S6	海南	奇楠, 结香 3 年	黑褐色片状, 香气混杂, 油脂较丰富, 质地疏松

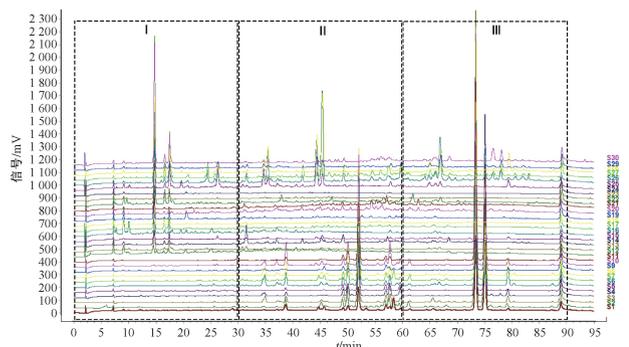
CDF 文件后, 将其导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”软件进行处理, 设定样品 S1 为参照图谱, 选取“时间窗宽度”为 0.2, 经多点校正, 自动匹配, 建立沉香 HPLC 指纹图谱, 以平均数生成对照图谱 R, 并计算不同沉香样品的相似度。

2.5 聚类分析 以沉香共有峰的相对峰面积作为变量, 导入 SPSS 软件, 进行系统聚类分析, 以平方欧式距离进行区间测量, 进行组间联接, 绘制分析图谱。

3 结果

3.1 HPLC 指纹图谱 30 批沉香样品的 HPLC 谱图见图 1。由图 1 可知, 人工沉香与野生沉香的响应峰有显著的区别, 经多点校正, 未能发现两者存在共有成分。因此, 本研究对不同种类的沉香进行单独分析, 且根据响应峰保留时间的差异, 将其划分为 3 个区域^[12], 第 I 区域即保留时间 0~30 min, 第 II 区域 30~60 min, 第 III 区域 60~90 min。

11 批短期人工沉香的 HPLC 色谱图见图 2。该类沉香化学成分较简单, 多为色酮类化合物, 在 51.985、73.376、



注: S1~S11 为短期人工沉香, S12~S24 为野生沉香, S25~S30 为结香 3 年及以上人工沉香。

图 1 沉香 HPLC 色谱图

75.086 min 处存在高响应特征峰, 可用于明显区别野生沉香。11 批沉香样品间差异较小, 未能进行区分辨别, 可能为人工沉香受外界“伤害”后, 在短期时间内应激分泌物才逐渐形成, 尚未参与植株的次生代谢。

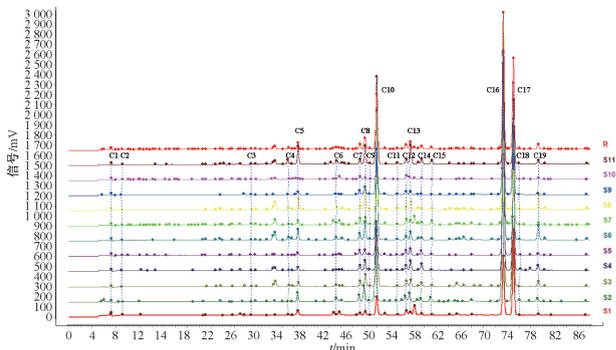


图2 短期人工沉香 HPLC 指纹图谱

13批野生沉香的 HPLC 色谱图见图3。野生沉香成分复杂多样,在全区域中都存在响应峰,但其响应值多较小,这与文献[6, 13]报道的野生沉香特点一致。出现这一现象的原因可能为在自然条件下,最早产生的色酮类化合物参与植物次生代谢,累积形成萜类化合物,而部分色酮在风吹日晒雨淋后,逐渐散发,含量减少^[13-15]。

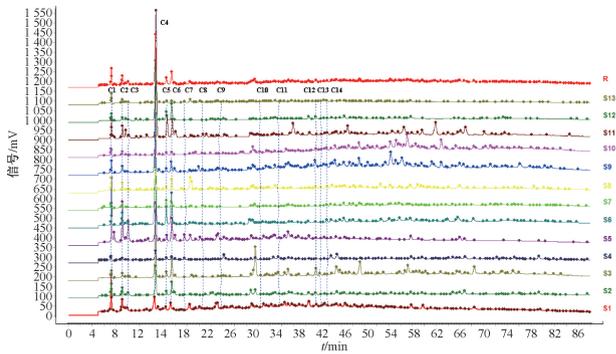


图3 野生沉香 HPLC 指纹图谱

6批3年及以上人工沉香的 HPLC 色谱图见图4。3年及以上人工沉香的化合物则较为均匀地分布在各个区域,且都有较大的响应值,由此可初步窥探人工沉香化学成分的动态变化过程。

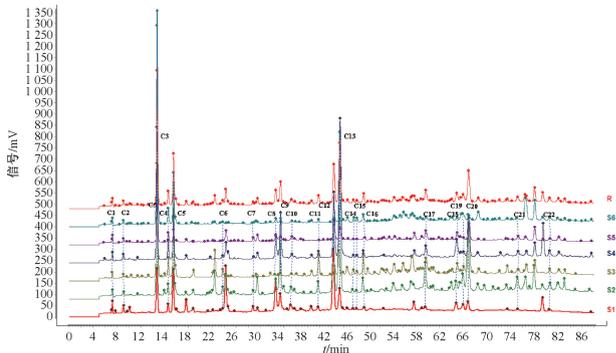


图4 3年及以上人工沉香 HPLC 图谱

经全谱峰匹配,在短期人工沉香中发现19种共有成分,主要集中于Ⅱ区和Ⅲ区,Ⅰ区尚未发现沉香另一特征成分沉香四醇。Ⅲ区存在2个紧邻的显著特征峰C6和C17,经对照品比对,共有峰C17为2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮。在野生沉香中发现14种共有成分,集中分布

于Ⅰ区和Ⅱ区,且在14.644 min处有高响应共有峰C4,其余共有峰响应值都较小。经对照品比对,确认C4为沉香四醇,该峰后存在2个较为显著的特征峰C5和C6,Ⅲ区则尚未发现色酮类共有成分。在结香3年及以上人工沉香中共发现22个共有峰,经对照品比对,共有峰C20为2-(2-苯乙基)色酮。其中5种共有成分与野生沉香的共有成分一致,为共有峰C1、C3~C5、C9,主要分布于Ⅰ区,另有5种共有成分与短期人工沉香一致,为共有峰C1、C2、C7、C10、C21。该类沉香因结香相对较长,所以成分上包含了野生沉香和人工沉香的特征性成分,即沉香四醇、2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮,在结香过程中又转化形成特有的2-(2-苯乙基)色酮类成分,且因人工结香时间较野生沉香的短,其化学成分尚未被破坏流失,所以响应值也较大。

短期人工沉香 SA1~SA11 的相似度分别为 0.920、0.989、0.987、0.985、0.986、0.971、0.991、0.925、0.989、0.732、0.954,该批人工沉香相似度均大于 92%,彼此差异不明显,只有 SA10 相似度为 73.2%。野生沉香 SW1~SW13 的相似度分别为 0.670、0.876、0.800、0.623、0.819、0.856、0.875、0.875、0.672、0.485、0.855、0.886、0.560,差异性大,跨度从 48.5%~88.6% 不等,其结果可能受结香环境、方法、树种等多种因素的影响。结香 3 年及以上人工沉香 S1~S6 的相似度分别为 0.754、0.903、0.852、0.901、0.848、0.779,该沉香一致性较差,很可能为在不同微生物、温湿度的影响下,初期分泌物逐渐参与各类次生代谢,差异拉锯增加。

3.2 沉香共有成分相对含量分析 短期人工沉香 19 个共有峰的相对含量见图 5。由图 5 可知,在 11 批人工沉香中,共有峰 C10、C16、C17 的相对含量较高,这 3 个共有峰含量占沉香总含量的 60% 以上。其中奇楠(冷钻)结香 12 个月的沉香(SA3)共有峰 C10、C16、C17 含量占比高达 78.15%,但不同批沉香间的色酮含量仍存在较大的差异,如 SA3 与 SA9 这 2 批沉香的 3 个高响应特征峰相差 1.4 倍,主要与种植品种和外部环境相关。沉香另一类标志性成分倍半萜类含量都较低,部分样品甚至尚未检出。因此,可初步判定这 3 个化合物为人工沉香结香初期的主要成分,也可将其作为短期人工沉香判定的重要因素。

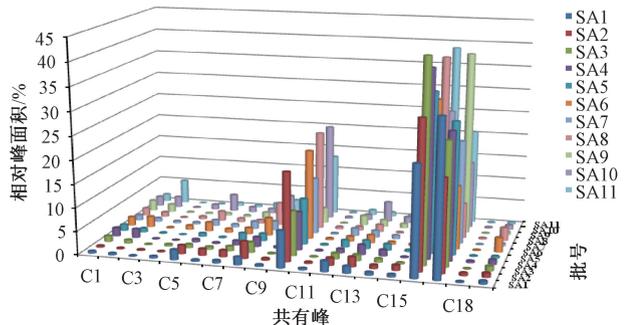


图5 短期人工沉香共有成分相对含量

野生沉香 14 个共有峰的相对含量见图 6。由图 6 可知,

野生沉香的共有峰相对峰面积整体较小，主要都为萜类化合物。其中相对峰面积最大的沉香四醇（C4）相对含量在1.93%~29.44%之间，其后2个共有峰C5、C6相对含量分别为0.42%~4.41%、0.44%~6.28%。这3个共有峰是野生沉香的主要成分，但不同批沉香间的彼此差异较大，其中沉香SW6（柬埔寨的蜜香树）与SW10（加里曼丹）的相差10.7倍，感官可明显发现两者香气的差异。研究表明，野生沉香和人工沉香的差异主要体现在其指纹图谱^[5]，而在指纹图谱的基础上分析沉香四醇含量更具参考意义。在野生沉香中作为代表的沉香四醇在所有共有成分中占据主要地位，而色酮类化合物几乎已参与其他代谢转化，含量已微乎其微。

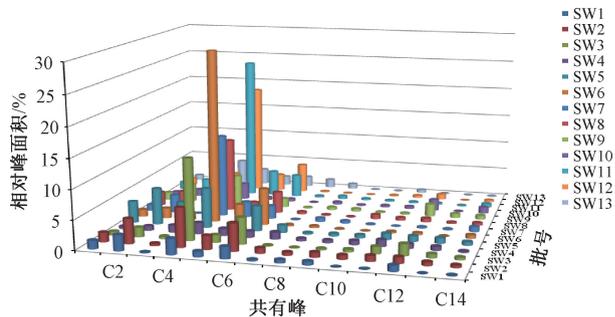


图6 野生沉香共有成分相对含量

3年及以上人工沉香22个共有峰的相对含量见图7。由图7可知，共有峰C3、C5、C12、C13的相对含量较高，该类沉香结合了另两类沉香的特点，即I区以沉香四醇（C3）为代表的萜类化合物和II区的2-（2-苯乙基）色酮类化合物（C20）含量较短期人工沉香都发生从无到有的变化，而III区的2- [2-（4-甲氧基）苯乙基] 类色酮化合物（C21）含量锐减，仅为短期人工沉香的3%，三者呈现

了一个动态变化过程。Gao等^[15]对人工沉香随着结香时间的增加，其色酮含量逐渐减少进行分析。研究表明，在人工沉香中4类色酮衍生规律为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^[16]，倍半萜类化合物则在系列色酮被氧化还原时逐渐累积生成，且随着结香时间的增加，人工沉香逐渐演变成野生沉香，其化学成分最终可能仅剩倍半萜类化合物。

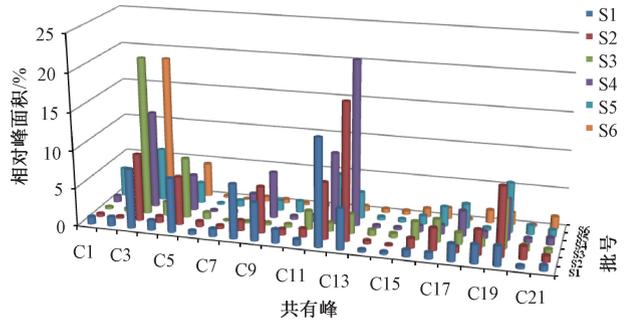


图7 3年及以上人工沉香共有成分相对含量

3.3 聚类分析 不同种类沉香系统聚类分析谱系图见图8。在10个欧式距离条件下，11批短期人工沉香有3个清晰的分支（图8A）。在相似度分析中，样品SA10相似值为0.732，与其余样品有较为明显的区别；而在聚类分析中，将样品SA2和SA6聚为一类，存在一定的差异。在10个欧式距离条件下，13批野生沉香可分为2支（图8B），其中一支为SW6（柬埔寨）和SW11（马来西亚），感官评价这2批沉香香气浓郁，且都夹带了奶香味，沉香四醇的相对含量也较高，因感官评价存在较大的主观差异，只能作为参考。6批3年以上人工沉香差异较大（图8C），这与相似度分析的结果基本一致。

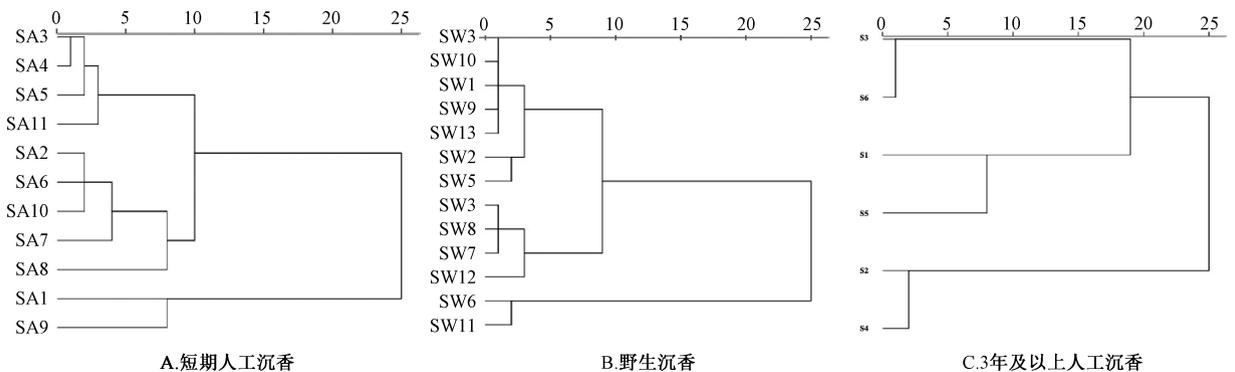


图8 种类沉香谱系图

4 讨论

短期人工沉香化学成分较简单，主要为色酮类化合物，相对含量高，集中分布于II区和III区。该批沉香中发现19种共有成分，I区有2种，响应值小，其余的分布于II区和III区。III区有2个高响应特征峰C16、C17，这2个共有峰相对含量为40.08%~68.59%，尚未在13批野生沉香中发现。经对照品比对分析，共有峰C17为2- [2-（4-甲氧基）苯乙基] 色酮，平均相对峰面积为22.79%。相似度分

析与聚类分析显示该类沉香彼此差异较小。根据共有峰的分布和2个高响应特征峰及其相对峰面积可作为人工沉香的判定因素之一。

野生沉香研究表明，该类沉香化学成分丰富多样，但含量都较小。野生沉香中发现14个共有峰，都分布于I区和II区。I区含有3个显著特征峰C4~C6，在短期人工沉香中尚未发现，经比对确认共有峰C4为沉香四醇，其相对含量最高为1.93%~29.44%。II区含有5个共有峰，相对

含量都很低。相似度分析显示野生沉香彼此差异较大,但在10个欧氏距离的聚类分析中,可将其分为2支。

3年及以上的人工沉香研究表明,该类沉香化学成分较为丰富,在I~III区均有分布,响应值也较高。该类沉香中发现22种共有成分,I区发现与野生沉香一致的共有峰C4~C6。II区的2-(2-苯乙基)色酮是人工沉香向野生沉香过渡的中间产物,且尚未在野生沉香和人工沉香的共有峰中发下。III区发现与人工沉香一样的共有成分2-[2-(4-甲氧基)苯乙基]色酮,但其相对峰面积较小为0.83%,野生沉香的为3.64%。相似度分析及聚类分析显示此类沉香彼此的差异大。由此可知,随着结香时间的增长人工沉香的化学成分逐渐由III区向I和II区转变,色酮含量逐渐减少,倍半萜类化合物逐渐累积增加。

综上所述,本研究对人工沉香和野生沉香的HPLC数据分析、相似度计算、聚类分析等,建立起人工沉香和野生沉香的HPLC指纹图谱,该指纹图谱有助于对未知沉香的辨别分类,同时计算出野生沉香和人工沉香共有成分的相对含量,可进一步直观、量化人工沉香和野生沉香在本质上的差异,为沉香质量等级评估提供数据支持。

参考文献:

[1] 梅文莉,左文健,杨德兰,等.沉香结香机理、人工结香及其化学成分研究进展[J].热带作物学报,2013,34(12):2513-2520.

[2] Cui J L, Guo S X, Xiao P G. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011, 12(5): 385-392.

[3] Chen H Q, Wei J H, Yang J S, et al. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. *Chem Biodivers*, 2012, 9(2): 236-250.

[4] Hashim Y Z, Kerr P G, Abbas P, et al. *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] 许凌雯,杨思惠,陈晓颖,等.天然沉香和人工沉香的HPLC指纹图谱分析及比较[J].中国药学杂志,2019,54(23):1980-1987.

[6] 尚丽丽,陈媛,晏婷婷,等.HPLC结合多变量统计建立野生与人工沉香的识别模型[J].林产化学与工业,2018,38(6):33-41.

[7] Azren P D, Lee S Y, Emang D, et al. History and perspectives of induction technology for agarwood production from cultivated *Aquilaria* in Asia; a review[J]. *J Forestry Res*, 2018, 30(1): 1-11.

[8] Wang M R, Li W, Luo S, et al. GC-MS study of the chemical components of different *Aquilaria sinensis* (Lour.) gilgorgans and agarwood from different Asian countries[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2168.

[9] LY/T 2904-2017, 沉香[S].

[10] DB46/T 421-2017, 沉香鉴定[S].

[11] DB46/T 422-2017, 沉香质量等级[S].

[12] 杨锦玲,梅文莉,董文化,等.沉香GC-MS指纹图谱分析[J].中成药,2016,38(8):1765-1770.

[13] 陈媛,尚丽丽,杨锦玲,等.野生沉香的鉴别方法[J].林业科学,2017,53(9):90-96.

[14] Naef R, The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species: a review [J]. *Flavour Fragr J*, 2011, 26(2): 73-87.

[15] 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.

[16] 廖格.人工沉香中2-(2-苯乙基)色酮类化合物的分离鉴定与动态变化规律[D].海口:海南大学,2016.