DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.06.020

HPLC 指纹图谱结合化学计量学方法比较人工诱导法所得不同结香部位沉香的成分差异

李娇[1],喻良文[2,3,4],兰宝恒[1],李张媛[1],王天赐[1],杨洋[1],马蓉[1],吴泽青[1]
(1.新乡医学院药学院,河南 新乡 453003;2.东莞广州中医药大学研究院,广东 东莞 523007;
3.广东云浮中医药职业学院,广东 云浮 527300;4.广州中医药大学科技创新中心,广东 广州 510405)

摘要:目的 通过薄层色谱(Thin layer chromatography,TLC)和高效液相(High performance liquid chromatography,HPLC)对人工诱导法所得不同结香部位沉香进行鉴别、含量测定和特征图谱分析,评价不同结香部位沉香质量。方法 以三氯甲烷-乙醚(10∶1)为展开剂,对该批沉香样品进行薄层色谱鉴别。采用高效液相进行含量测定和特征图谱,色谱条件为:Waters Symmetry Shield ™ RP18 色谱柱(4.6×250 mm,5 μm),以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相;柱温:30 ℃;流速:0.7 mL·min^{-1};检测波长:252 nm;进样量:10 μL。最后运用相似度评价、主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)和正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis,OPLS-DA)筛选出引起不同部位(主干和支干)差异明显的色谱峰。结果 薄层色谱结果显示,沉香样品斑点与对照药材基本一致,在紫外灯 254 nm 下检视供试品,发现 R_f 值为 0.38 时,样品斑点颜色支干较主干更为明显。含量测定结果显示,不同结香部位沉香样品中沉香四醇含量范围在 0.02% ~0.58%,且支干的沉香四醇平均含量高于主干。特征图谱结果显示,沉香样品有 6 个共有特征峰,共有峰 1 沉香四醇的峰面积差异较大,除 4 号、9 号、12 号、13 号之外,其余各组的支干沉香四醇含量均高于主干。沉香主干相似度值在 0.842 ~0.999,沉香支干相似度值在 0.901 ~0.994,支干相似度效果较好。通过化学计量学 PCA,OPLS-DA 分析结果表明峰 4,峰 6 为沉香结香成分差异的标志性成分。结论 本研究通过薄层色谱、含量测定及特征图谱的分析方法,对相同的人工诱导结香方法所得的沉香样品在主干与支干部位的化学成分进行全面有效地分析,除部分样品表现出明显的个体差异外,其余沉香样品的支干部位结香效果更为显著,为后续优化结香方法及深入研究结香机制提供依据。

关键词:沉香;薄层色谱;高效液相;化学计量学;主成分分析;正交偏最小二乘判别分析法
中图分类号:R282.71 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2025)06-0107-10

基金项目:国家自然科学基金项目(82003893);广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金项目(2021B1515140009)
作者简介:李娇(1996-),女,河南周口人,硕士在读,研究方向:中药资源开发与新药。
通讯作者:吴泽青(1988-),女,河南新乡人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药资源开发与新药。E-mail:wuzeqing1218@126.com。

[12] 张鑫,梁霄,梁泰生,等. 小蓟饮子加减方联合术中温热膀胱冲洗液对前列腺切除术后出血的临床疗效[J]. 中国老年学杂志,2023,43(2):324-327.
[13] 刘良蓉,余咏梅,姚瑞红,等. 明胶海绵颗粒颌内动脉栓塞治疗难治性鼻出血的临床分析[J]. 重庆医学,2019,48(15):2558-2561.
[14] GENG H W,HE P S,ZHENG M C,et al. Traumatic pseudoaneurysms of external carotid artery branch: case series and treatment considerations[J]. Chinese Journal of Traumatology,2021,24(6):368-373.
[15] 肖洋,李正才,曾文娟,等. 复方木芙蓉涂鼻软膏联合辛芩颗粒治疗小儿慢性鼻炎的疗效[J]. 中国现代医生,2021,59(5):100-103.
[16] 王曼,巫梦雪,梁逢奇,等. 五味消毒饮合小蓟饮子加减治疗小儿急性肾小球肾炎(湿热内侵证)的疗效观察[J]. 中国中医急症,2022,31(1):112-114.
[17] 翁剑飞,陈慧军,黄章铖,等. 基于 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路探讨小蓟饮子治疗小鼠放射性膀胱炎作用机制[J]. 福建中医药,2023,54(2):31-33.
[18] ESTEBAN-CASADO S,MARTÍN DE ROSALES CABRERA A M,USARRALDE PÉREZ A,et al. Sclerotherapy and topical nasal propranolol: an effective and safe therapy for HHT-epistaxis[J]. The Laryngoscope,2019,129(10): 2216-2223.
[19] ANDO K,IMAIZUMI Y,KOBAYASHI Y,et al. Bortezomib-and lenalidomide-based treatment of refractory plasmablastic lymphoma[J]. Oncology Research and Treatment,2020,43(3): 112-116.
[20] HWANG S H,KIM S W,KIM S W,et al. Greater palatine canal injections reduce operative bleeding during endoscopic sinus surgery: a systematic review and meta-analysis[J]. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology,2019,276(1): 3-10.
[21] 李蓝轩. 泻黄散合小蓟饮子治疗紫癜性肾炎血热伤络证的临床疗效观察[D]. 成都:成都中医药大学,2022.
[22] 曹峰,徐明安,周汝环,等. 鼻内镜下电凝治疗老年人鼻出血的临床分析[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2021,29(2):109-111,131.
[23] 盛一帆,余琪伟,王省博,等. 琥珀导赤汤联合膀胱药物灌注治疗湿热型间质性膀胱炎/膀胱疼痛综合征 33 例临床研究[J]. 江苏中医药,2023,55(10):32-35.
[24] 夏飞. 周仲瑛教授从瘀热辨治缺血性中风恢复期的用药规律及通瘀凉血方的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2023.
[25] 何亚泳. 瓜蒌瞿麦汤对糖尿病肾病糖脂代谢及血管内皮损伤的影响[J]. 光明中医,2023,38(18):3573-3575.
[26] 陈瑞鑫,梁淞婷,戴忠华,等. 扁蓄化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药,2023,45(6):1929-1936.

Comparison of Component Differences in Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) from Different Formation Parts Obtained by Artificial Induction Method by HPLC Fingerprinting and Chemometrics

LI Jiao[1], YU Liangwen[2,3,4], LAN Baoheng[1], LI Zhangyuan[1], WANG Tianci[1], YANG Yang[1], MA Rong[1], WU Zeqing[1]
(1. School of Pharmacy, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan, China;
2. Research Institute of Dongguan Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523007, Guangdong, China;
3. Guangdong Yunfu Vocational College of Traditional Chinese Medicine, Yunfu 527300, Guangdong, China;
4. Science and Technology Innovation Center of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China)

Abstract: *Objective* Identification, content determination and characteristic spectrum analysis of different Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) components obtained by artificial induction method were carried out using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography(HPLC) to evaluate the quality and quantity of Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum). *Methods* This article used chloroform – ether(10∶1) as the developing agent to perform TLC identification on this batch of Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) samples. Content determination and characteristic spectrum were performed using HPLC under the following chromatographic conditions. Waters Symmetry Shield™ RP18 column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The acetonitrile 0.1% formic acid water was as the mobile phase. The column temperature was 30 ℃. The flow rate was 0.7 mL · min^{-1}. The detection wavelength was 252 nm. The injection volume was 10 μL. Finally, similarity evaluation, Principal Component Analysis(PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis(OPLS – DA) were used to screen for chromatographic peaks that caused significant differences in different parts(trunk and branch). *Results* The results of TLC showed that the spots of the Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) samples were basically the same as those of the control herb. Examining the test product under the UV lamp at 254 nm, it was found that the color of the sample spots was more obvious in the branch than that in the main trunk when the R_f value was 0.38. The content determination results showed that the content of agarotetrol in Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) samples from different aroma forming parts ranged from 0.02% to 0.58%, and the average content of agarotetrol in the branches was higher than that in the stems. The characteristic spectrum results showed that there were 6 common characteristic peaks in the Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) sample, with a significant difference in the peak area of agarotetrol. Except for No. 4, No. 9, No. 12 and No. 13, the content of agarotetrol in the branches of the other groups was higher than that in the trunk. The similarity value of Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) trunk was between 0.842 and 0.999, and the similarity value of Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) branch was between 0.901 and 0.994, indicating a good branch similarity effect. The results of PCA and OPLS – DA analysis by chemometrics showed that peak 4 and peak 6 were the symbolic components of the quality difference of Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) aroma. *Conclusion* The present study comprehensively and effectively analyzed the chemical components of Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) samples obtained from the trunk and branch parts using TLC, content determination and characteristic chromatographic fingerprint analysis methods under the same artificial induction method. Apart from some samples showing significant individual differences, the Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum) samples from the branch parts demonstrated more pronounced aroma effects, which provides a basis for future optimization of methods and in – depth research on aroma mechanisms.

Keywords: Chenxiang(Aquilariae Lignum Resinatum); TLC; HPLC; chemometrics; PCA; OPLS – DA

沉香属于树脂类药材，是瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis*(Lour.)Gilg 含有树脂的木材[1]。国产沉香主要分布于我国广东、海南等地，是我国传统名贵药材[2]。中医认为其具有行气止痛，温中止呕，纳气平喘之功效，可用于胸腹胀闷疼痛，胃寒呕吐呃逆，肾虚气逆喘急[1]。现代药理学研究发现，沉香具有镇静催眠、改善心肌缺血、抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、降血糖等作用[3-9]。沉香中主要含有 2 –(2 – 苯乙基)色酮类和倍半萜类化合物[10-13]。健康的白木香本身不能产生沉香，需要通过外界伤害诱导才可结香，目前传统结香方法存在效率低、结香过程缓慢及市场供不应求等特点，使沉香属物种曾被列入了《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录Ⅱ[14-15]。由于天然沉香结香时间长且结香偶然性大，亟需高效诱导方法，以期得到高质量沉香。现代人工诱导结香方法在提高产量、缩短生产周期、降低生产成本以及产品质量可控等方面具有明显优势[16]。化学计量学主要研究生物样本的整体变化，尤其适合分析多成分的复杂中药体系，沉香的化学成分复杂，通过化学计量学对数据进行分析，找出引起不同部位沉香结香的差异性标志化合物，为深入研究沉香不同部位结香提供基础[17-20]。

本团队前期研究发现，同一传统结香方法(火烫法)条件下，不同树龄的白木香所得沉香质量差异明显，可见树龄对结香效果有显著影响[21-22]，此外，结香效果与沉香属树种、结香部位、结香方法、生长环境等因素紧密相关[23-24]，目前针对不

同结香部位主干及支干的化学成分研究较少。本实验选取人工诱导方法所得主干及支干结香部位沉香样品,采用高效液相法进行含量测定及特征图谱,并进行薄层色谱鉴别,分析不同结香部位沉香的化学成分差异,以期为后续优化结香方法及深入研究结香机制提供科学依据。

1 仪器与材料

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪:美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Waters Symmetry Shield™ RP18 型高效液相色谱仪:美国 Waters 公司;ZF-7 型暗箱式三用紫外分析仪:上海嘉鹏科技有限公司;KQ-600KDE 型高功率数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;FA2004 型分析天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;AP-01P 真空泵:天津奥特赛恩斯仪器有限公司。

无水乙醇(分析纯):天津市德恩化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯):美国 Sigma-Aldrich 公司;乙醚(分析纯):天津市大茂化学试剂厂;三氯甲烷(分析纯):天津市大茂化学试剂厂;乙腈(色谱纯):上海麦克林生化科技有限公司;甲酸(色谱纯):天津市德恩化学试剂有限公司;水为超纯水;沉香对照药材(批号:ycwkq18050707):四川省维克奇生物科技有限公司;沉香四醇(批号:wkq20020401):四川省维克奇生物科技有限公司;26 批沉香样品采自广东省香务大臣生物科技有限公司阳西市沉香种植基地,经新乡医学院药学院吴泽青副教授鉴定树种为白木香 *Aquilaria sinensis*(Lour.)Gilg。2018 年 5 月—2018 年 12 月采用人工诱导法即输液接菌法对 9~10 年生白木香树进行人工诱导,诱导 2 年后采样,阴干,待用。沉香药材主干标记为 T,支干标记为 B,见插页ⅩⅨ图 1。

2 实验方法

2.1 鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备 取本品粉末 0.5 g,加乙醚 30 mL,超声处理 60 min,滤过,滤液蒸干,残渣加三氯甲烷 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。

2.1.2 对照药材溶液的制备 取沉香对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液。

2.1.3 薄层色谱条件 吸取上述两种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 HSGF254 薄层板上,以三氯甲烷-乙醚(10∶1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm 和 254 nm)下检视。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性实验 色谱柱:Waters Symmetry Shield™ RP18(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水(B),洗脱梯度[15% 20% A(0~10 min),20% ~23% A(10~19 min),23% 33% A(19~21 min),33% A(21~25.1 min),95% A(25.1~35 min),95% ~15% A(35~40 min)];流速:0.7 mL·min^{-1};柱温:30 ℃;进样量:10 μL;检测波长:252 nm。理论板数按沉香四醇峰计算应不低于 6000。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 10 mL,称定重量,浸泡 0.5 h,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)1 h,放冷,再称定重量,用乙醇补足减失的重量,摇匀,静置,取上清液滤过,取续滤液,即得,制备好的沉香样品溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,注入样品瓶中备用。

2.2.3 对照品溶液的制备 取沉香四醇对照品适量,精密称定,用无水乙醇溶解,并用 25 mL 容量瓶定容,摇匀,制成浓度为 58.4 μg·mL^{-1}的对照品溶液,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤备用。

2.3 特征图谱

2.3.1 色谱条件与系统适用性实验 色谱柱:Waters Symmetry Shield ™ RP18(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水(B),洗脱梯度[15% 20% A(010 min),20% 23% A(1019 min),2333A(1921 min),33% A(2139 min),3335A(3940 min),35% A(4050 min),395A(5060 min),9515A(6065 min)];流速:0.7 mL·min^{-1};柱温:30 ℃;进样量:10 μL;检测波长:252 nm。理论塔板数按沉香四醇峰计算应不低于 6000。

2.3.2 供试品溶液的制备 方法同“2.2.2”。

2.3.3 对照药材溶液的制备 取沉香对照药材约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 10 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)1 h,放冷,再称定重量,用乙醇补足减失的重量,摇匀,静置,取上清液滤过,取续滤液,制备好的沉香样品溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,注入样品瓶中备用。

2.3.4 精密度实验 按“2.3.1”项下的色谱条件,取同一份对照品溶液,连续进样 6 次,计算得到各成分峰面积的 RSD 均小于 0.61%,说明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性实验 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3.1”项下的色谱条件,分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、16 h、32 h 进样测定,计算得到峰面积的 RSD 均小于 0.66%,说明在 32 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.3.6 重复性考察 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3.1”项下的色谱条件进样测定,计算得到沉香四醇峰面积的 RSD 均小于 0.91%,说明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 取同一批已知含量沉香供试品 6 份,每份取样约 1 g,精密称定。每份再精密加入沉香对照品适量,按“2.2.2”项下的方法,制备供试品溶液,按“2.3.1”项下的色谱条件测定,计算得到沉香四醇的平均加样回收率为 97.09%,RSD 为 1.23%。

3 结果

3.1 薄层色谱

供试品与对照药材薄层色谱图见插页ⅩⅨ图 2。

3.2 含量测定

分别取待测供试品和对照品,在“2.2.1”色谱条件下进行样品含量测定,HPLC 色谱图见插页ⅩⅩ图 3、表 1。

3.3 特征图谱的建立及相似度评价

3.3.1 沉香 HPLC 特征图谱的建立 取 26 批沉香样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件依次进样测定,记录 HPLC 特征图谱。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012.130723 版(以下简称相似度评价系统)进行数据处理,设定图谱中 B10、T10 色谱为参照图谱,设定时间窗宽度 0.1 min,采用中位数法,进行多点校正和 Mark 峰匹配生成沉香共有模式图谱,共标定 6 个共有峰,通过与对照药材峰比对,指认了其中的 3 个共有峰,分别为沉香四醇(峰 1)、8-氯-2-(2-苯乙基)-5,6,7-三羟基-5,6,7,8-四氢色酮(峰 3)、6,4’-二羟基-3’-甲氧基-2-(2-苯乙

基)色酮(峰 5)。1 号色谱峰为沉香四醇特征峰,其含量高低在一定程度上可以反映沉香质量的品质,可以看出除 4 号、9 号、12 号、13 号之外,其余各组的支干沉香四醇含量均高于主干,见表 2。26 批沉香样品特征图峰及共有模式图谱、对照药材 HPLC 色谱图。见插页ⅩⅫ - ⅩⅫ图 4。

表 1 26 批样品中沉香四醇含量(n = 3)

样品编号	沉香四醇含量百分数/(%)	样品编号	沉香四醇含量百分数/(%)
T1	0.02	B1	0.18
T2	0.10	B2	0.17
T3	0.06	B3	0.06
T4	0.25	B4	0.05
T5	0.10	B5	0.22
T6	0.08	B6	0.49
T7	0.05	B7	0.11
T8	0.26	B8	0.26
T9	0.04	B9	0.03
T10	0.54	B10	0.51
T11	0.17	B11	0.58
T12	0.45	B12	0.26
T13	0.37	B13	0.24

表 2 沉香样品特征图谱峰面积

组别	各组峰的峰面积/(mAU)					
	1	2	3	4	5	6
沉香四醇	45.555					
对照	73.589	11.745	13.097	25.845	6.889	88.761
T1	4.432	2.240	5.106	9.338	2.739	13.395
T2	16.595	8.760	15.816	33.545	3.552	61.998
T3	9.701	3.306	7.283	28.996	6.658	92.605
T4	37.870	5.399	18.439	22.572	6.310	92.324
T5	15.911	1.302	14.216	17.526	2.618	76.059
T6	13.611	3.553	9.621	16.517	6.768	31.305
T7	9.913	2.545	8.019	20.495	1.507	73.873
T8	35.820	6.478	12.701	55.684	10.276	142.660
T9	10.215	2.735	4.677	17.014	2.282	25.047
T10	73.550	11.897	37.906	85.983	7.788	212.330
T11	23.318	3.708	15.662	31.259	6.125	93.578
T12	57.878	7.254	31.355	75.237	8.493	156.274
T13	47.402	18.460	27.847	80.758	9.950	215.371
B1	26.941	14.813	18.608	55.719	10.754	162.210
B2	25.274	10.820	13.625	38.326	4.914	93.933
B3	11.616	6.330	11.438	29.020	2.504	83.267
B4	8.950	1.006	4.807	13.432	1.564	31.983
B5	32.075	5.308	19.144	43.316	9.339	129.783
B6	68.233	8.430	42.052	72.628	21.422	319.855
B7	19.462	6.934	11.935	22.960	2.668	74.489
B8	37.022	24.046	14.233	52.634	4.815	108.069
B9	6.724	2.554	5.427	11.336	2.732	26.732
B10	86.135	14.421	27.788	90.410	11.814	282.225
B11	83.248	15.186	12.949	89.453	11.556	206.495
B12	35.825	14.818	16.493	59.899	6.976	104.810
B13	31.695	9.153	8.225	48.304	8.041	111.223

3.3.2 相似度评价 以共有模式对照图谱作为参照图谱,进行相似度评价,相似度可以体现不同批次样品间各成分在种类及其相对量上的整体相似程度,结果见表 3。分析结果表明,26 批沉香样品的主干相似度为 0.842 ~ 0.999,支干相似度为 0.901 ~ 0.994。表明沉香的主干与支干可能存在一定的质量差异,如需更为客观地反映沉香的内在品质,需进行后续的化学计量学分析。

表 3 26 批样品的相似度评价结果

样品编号	相似度	样品编号	相似度
T1	0.842	B1	0.957
T2	0.908	B2	0.990
T3	0.989	B3	0.965
T4	0.910	B4	0.901
T5	0.981	B5	0.986
T6	0.913	B6	0.985
T7	0.986	B7	0.979
T8	0.994	B8	0.957
T9	0.890	B9	0.955
T10	0.999	B10	0.994
T11	0.996	B11	0.989
T12	0.999	B12	0.970
T13	0.982	B13	0.950

峰 6 色谱峰峰形佳,峰面积较大,分离度高,且为《中华人民共和国药典》(2020 年版)上规定的特征峰,除 3 号、4 号、8 号、12 号、13 号样品外,其余各组对应峰面积支干均大于主干。确定峰 6 为参照峰(S),分别计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各共有峰的相对保留时间 RSD < 2%,共有峰相对峰面积 RSD 差异较大,说明不同沉香的主干和支干的同一化学成分的含量差异较大。各共有峰相对峰面积及 RSD。见表 4。

3.4 化学计量学分析

3.4.1 主成分分析(PCA) 将各共有峰的峰面积数据标准化处理后导入 IBM SPSS Statistics 27.0 软件,进行主成分分析,见表 5、表 6。主成分 1 的累计方差贡献率为 78.082%,能够代表沉香特征图谱共有峰大部分信息,结合碎石图(插页ⅩⅩ图 5 - A)突变点,提取 1 个主成分进行评价。成分矩阵反映了各变量对主成分贡献的大小和方向,数值越大表示与主成分相关性越高。由表 6 可知,峰 4、峰 6 对主成分 1 贡献最大,其变量的权重值可以最大程度反映化学成分与药材质量的相关性,故这些成分是影响沉香主干及支干质量差异的重要因素。

将沉香 26 批样品的 6 个共有峰的峰面积输入 Excel 表格内,利用 SIMCA 14.1 软件对 26 批沉香药材样品共有峰的相对峰面积采用无监督模式的 PCA 分析,归一化方法选择 Par 默认自动建模(Autofit),如插页ⅩⅩ图 5 - B 所示,结果发现 $R^2X = 0.9 > 0.5$、$Q^2 = 0.678 > 0.5$,说明模型拟合准确性和预测能力较好。从插页ⅩⅩ图 5 - B 中可以看出大部分样本均在 95% 的置信区间内,累计方差贡献率为 90% > 85%。从无监督的 PCA 分析中无法完全区分沉香物质,还需进行有监督的 OPLS - DA 分析。

3.4.2 正交偏最小二乘法 - 判别分析(OPLS - DA) 在主成分分析的基础上,对 26 批沉香样品 6 个共有峰进行有监督的 OPLS - DA 模式识别分析,筛选出引起组间差异较大的色谱峰。OPLS - DA 模型主要是以数据变量重要性作为依据来筛

选差异代谢产物，能够把握数据的整体特征及变异规律，见插页Ⅻ图 6 - A。考虑到可能出现对数据的过度拟合，此外本研究还进行 OPLS - DA 模型验证（置换检验 n = 200），结果显示 R^2 拟合直线 Y 轴截距为 0.166 < 0.3，表明所建立的 OPLS - DA 模型结果可靠；Q^2 拟合直线 Y 轴截距为 -0.236 < 0，表明所构建的 OPLS - DA 模型不存在过度拟合现象，预测能力好，见插页Ⅻ图6 - B。

表 4 26 批样品共有峰相对峰面积及 RSD 值

峰号	1	2	3	4	5	6
T1	0.331	0.167	0.381	0.697	0.204	1.000
T2	0.268	0.141	0.255	0.541	0.057	1.000
T3	0.105	0.036	0.079	0.313	0.072	1.000
T4	0.410	0.058	0.200	0.244	0.068	1.000
T5	0.209	0.017	0.187	0.230	0.034	1.000
T6	0.435	0.113	0.307	0.528	0.216	1.000
T7	0.134	0.034	0.109	0.277	0.020	1.000
T8	0.251	0.045	0.089	0.390	0.072	1.000
T9	0.408	0.109	0.187	0.679	0.091	1.000
T10	0.346	0.056	0.179	0.405	0.037	1.000
T11	0.249	0.040	0.167	0.334	0.065	1.000
T12	0.370	0.046	0.201	0.481	0.054	1.000
T13	0.220	0.086	0.129	0.375	0.046	1.000
B1	0.166	0.091	0.115	0.343	0.066	1.000
B2	0.269	0.115	0.145	0.408	0.052	1.000
B3	0.140	0.076	0.137	0.349	0.030	1.000
B4	0.280	0.031	0.150	0.420	0.049	1.000
B5	0.247	0.041	0.148	0.334	0.072	1.000
B6	0.213	0.026	0.131	0.227	0.067	1.000
B7	0.261	0.093	0.160	0.308	0.036	1.000
B8	0.343	0.223	0.132	0.487	0.045	1.000
B9	0.252	0.096	0.203	0.424	0.102	1.000
B10	0.305	0.051	0.098	0.320	0.042	1.000
B11	0.403	0.074	0.063	0.433	0.056	1.000
B12	0.342	0.141	0.157	0.572	0.067	1.000
B13	0.285	0.082	0.074	0.434	0.072	1.000
RSD/%	31.95	60.85	44.33	30.53	66.05	0.00

表 5 26 批样品主成分特征值和方差贡献率

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差/(%)	累积/(%)	总计	方差/(%)	累积/(%)
1	4.685	78.082	78.082	4.685	78.082	78.082
2	0.715	11.917	89.999			
3	0.282	4.699	94.698			
4	0.212	3.531	98.229			
5	0.058	0.964	99.193			
6	0.048	0.807	100.000			

表 6 26 批样品成分矩阵

共有峰	主成分 1
1	0.941
2	0.684
3	0.863
4	0.957
5	0.857
6	0.968

在 OPLS - DA 模型下，生成载荷图（Loading Biplot），见插页Ⅻ图 6 - C。载荷图中共有峰分布的位置表明其对样品分组相应的贡献率，获得 S - plots 图和 VIP 来描述变量的贡献程度，结果见插页Ⅻ图 6 - D，插页Ⅻ图 6 - E。在相应的 S - plot 图中离原点较远和VIP > 1 的变量被认为在样本分组方面有显著性贡献[25-26]。VIP 值越大，表明该色谱峰对沉香的分类贡献程度越大，VIP > 1 的有成分峰 4，峰 6。在 S - plots 图中，也能显示出这 2 个化学成分的变量离原点的距离较远，说明这 2 个成分是造成沉香不同部位质量差异的主要标记成分。

4 讨论

4.1 薄层色谱

薄层色谱结果显示，样品荧光斑点 R_f 值与对照药材基本一致。通过观察薄层色谱图，在紫外分析仪 254 nm 下检视，R_f 值为 0.30 和 0.38 时，样品斑点颜色支干较主干更为明显；对于 R_f 值为 0.74 和 0.82 相对应斑点在大多样品中均有出现且主干部分多于支干部分；R_f 值 0.66 支干与主干部位颜色均较浅。在紫外分析仪 365nm 下检视，R_f 值为 0.59 和 0.72 时，主干部分斑点颜色较支干部分更为明显。综上所述，该人工诱导法所得沉香的支干与主干存在差异。

4.2 含量测定

含量测定结果显示，沉香四醇含量范围为 0.02% ~ 0.58%，主干的沉香四醇平均含量为 0.19，支干的沉香四醇平均含量为 0.24，两者相比，支干的沉香四醇平均含量比主干含量较高。对同一样品不同部位沉香四醇含量进行分析可以看出，4 号样品，其主干部位含量为 0.25%，而其支干则仅为 0.05%；6 号样品，其支干含量为 0.49%，但主干仅为 0.08%。对于不同样品间沉香四醇含量也有着一定的不同，沉香四醇含量百分数最高为 0.58%，样品编号为 B11；最低为 0.02%，样品编号为 T1。其中 10 号样品的沉香四醇平均含量最高为 0.52%，9 号样品的沉香四醇平均含量最低为 0.04%，这些差异可能是存在个体性差异造成的。沉香四醇的含量在一定程度上反映了沉香的品质，是评价沉香品质的一个重要指标[27-28]。

4.3 特征图谱与化学计量学分析

为明确沉香的质量标志物，本研究采用 HPLC 对 26 批的沉香样品进行研究，建立沉香主干与支干的特征图谱，确认了 6 个共有峰。从共有峰 1 沉香四醇可得，除 4 号、9 号、12 号、13 号之外，其余各组的支干沉香四醇含量均高于主干。相似度评价发现，沉香样品图谱主干 T 的相似度为 0.842 ~ 0.999，支干 B 的相似度为 0.901 ~ 0.998，表明沉香化学成分相似度较高，支干相似度比主干相似度效果较好，但仍存在一定差异。并结合 PCA 和 OPLS - DA 等化学计量学方法对其进行了综合质量评价，发现共有峰 4，峰 6 是区分沉香主干及支干的重要差异性成分。本文采用高效液相法对沉香主干和支干进行特征图谱分析，为深入了解其化学成分，后续将利用气相色谱 - 质谱联用、液相色谱 - 质谱联用等多种技术手段，对研究不同部位沉香存在差异提供更有力的支持[29-33]。

综上所述，不同部位沉香样品的荧光斑点与对照药材基本一致。不同结香部位沉香样品的化学成分有明显差异，除部分

样品表现出明显的个体差异外,其余沉香样品的支干结香效果较为突出,且支干相似度比主干相似度效果较好。结合 PCA 和 OPLS-DA 等化学计量学方法,发现共有峰 4 和共有峰 6 对不同部位沉香的结香质量影响较大,可作为引起沉香主干及支干结香差异的潜在标志物,本实验建立的方法为评价不同结香部位沉香质量提供参考,也为后续深入研究结香机制提供依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社,2020.
[2] 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.
[3] WANG S,YU Z,WANG C,et al. Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and *Aquilaria* Plants[J]. Molecules,2018,23(2):21-25.
[4] IBRAHIM S R,MOHAMED G A. Natural occurring 2-(2-phenylethyl) chromones,structure elucidation and biological activities[J]. Nat Prod Res,2015,29(16): 1489-520.
[5] LEI Z D,LIU D L,ZHAO Y M,et al. A new 2-(2-Phenylethyl) chromone from *Aquilaria sinensis*[J]. Chemistry of Natural Compounds,2018,54(1): 30-33.
[6] HUO H X,GU Y F,SUN H,et al. Anti-inflammatory 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives from Chinese agarwood[J]. Fitoterapia,2017,118: 49-55.
[7] LI C G,PAN L,HAN Z Z,et al. Antioxidative 2-(2-phenylethyl) chromones in Chinese eaglewood from *Aquilaria sinensis*[J]. J Asian Nat Prod Res,2020,22(7): 639-646.
[8] XIA L,LI W,WANG H,et al. LC-MS guided identification of dimeric 2-(2-phenylethyl) chromones and sesquiterpene-2-(2-phenylethyl) chromone conjugates from agarwood of *Aquilaria crassna* and their cytotoxicity[J]. Fitoterapia,2019,138: 104349.
[9] LIAO G,MEI W L,KONG F D,et al. 5,6,7,8-Tetrahydro-2-(2-phenylethyl) chromones from artificial agarwood of *Aquilaria sinensis* and their inhibitory activity against acetylcholinesterase[J]. Phytochemistry,2017,139: 98-108.
[10] MEI W L,YANG D L,WANG H,et al. Characterization and determination of 2-(2-phenylethyl) chromones in agarwood by GC-MS[J]. Molecules,2013,18(10): 12324-12345.
[11] FAIZAL A,HERMAWATY D,JUNITA E,et al. Evaluation of biotic and abiotic stressors to artificially induce agarwood production in *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke seedlings[J]. Symbiosis,2022,86(2): 229-239.
[12] MA C T,CHO E,NGUYEN H T,et al. Malacinones A and B,two novel sesquiterpenoids with 6/6/5 tricyclic ring system from the agarwood of *Aquilaria malaccensis*[J]. Tetrahedron Letters,2020,61(1): 151355.
[13] AQMARINA NASUTION A,SIREGAR U J,MIFTAHUDIN,et al. Identification of chemical compounds in agarwood-producing species *Aquilaria malaccensis* and *Gyrinops versteegii*[J]. Journal of Forestry Research,2020,31(4): 1371-1380.
[14] XU Y,ZHANG Z,WANG M,et al. Identification of genes related to agarwood formation: transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis*[J]. BMC Genomics,2013,14: 227.
[15] JUN-QING H,JIAN-HE W,ZHENG Z,et al. Historical records and modern studies on agarwood production method and overall agarwood production method[J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2013,38(3): 302-306.
[16] 刘娟. 全球沉香资源的分布与结香方法的研究现状[J]. 中国食品药品监管,2020(12): 100-104.
[17] 张蕊,徐延昭,张静,等. HPLC 法测定参乌益肾片中 8 种成分及其化学计量学综合评价[J]. 现代药物与临床,2022,37(5): 976-982.
[18] 张智慧,王悦,张学兰,等. 基于 HPLC 指纹图谱与多元统计分析的生地黄与熟地黄差异评价[J]. 时珍国医国药,2021,32(6): 1383-1386.
[19] 高博闻,任浩蕊,李博艺,等. 基于指标性成分含量测定及指纹图谱对蒙药质量控制的研究进展[J]. 中国药学杂志,2022,57(13): 1049-1056.
[20] 梁军,刘彩凤,刘冬涵,等. 藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究[J]. 中草药,2020,51(2): 356-363.
[21] 吴泽青,李静,陈金明,等. 不同树龄对火烫法所得沉香色酮类成分的影响[J]. 中药材,2019,42(2): 365-368.
[22] 吴泽青,李智,孔静怡,等. 不同树龄对火烫法所得沉香的质量比较研究[J]. 时珍国医国药,2019,30(9): 2255-2258.
[23] XIANG P,DONG W H,CAI C H,et al. Three new dimeric 2-(2-phenylethyl) chromones from artificial agarwood of *Aquilaria sinensis*[J]. Nat Prod Res,2021,35(21): 3592-3598.
[24] SUBASINGHE S M C U P,HITIHAMU H I D,FERNANDO K M E P. Use of two fungal species to induce agarwood resin formation in *Gyrinops walla*[J]. Journal of Forestry Research,2019,30(2): 721-726.
[25] 韩正洲,杨勇,贾红梅,等. 基于植物代谢组学的栽培型与野生型野菊花的化学成分比较及定量分析[J]. 药物分析杂志,2017,37(7): 1196-1206.
[26] 张博,孙秀丽,郭云龙,等. 液质联用技术分析不同产地不同年限人参的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(8): 206-212.
[27] CHHIPA H,KAUSHIK N. Combined effect of biological and physical stress on artificial production of agarwood oleoresin in *Aquilaria malaccensis*[M]. Cold Spring Harbor Laboratory,2020.
[28] LIU Y Y,WEI J H,GAO Z H,et al. A Review of Quality Assessment and Grading for Agarwood[J]. Chinese Herbal Medicines,2017,9(1): 22-30.
[29] 王茜,尚丽丽,晏婷婷,等. 不同产地沉香的高效液相色谱指纹特征[J]. 林业科学,2021,57(2): 150-159.
[30] 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):213-215.
[31] 杨锦玲,梅文莉,余海谦,等. 紫外-可见分光光度法测定沉香中色酮成分的含量[J]. 热带生物学报,2014,5(4): 400-404.
[32] 晏婷婷,陈媛,王茜,等. 液相色-质谱结合化学计量学用于国产沉香品质分析[J]. 木材工业,2019,33(6): 8-14,28.
[33] 吴惠勤,黄芳,黄晓兰,等. 沉香的高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱数字化指纹图谱研究[J]. 分析测试学报,2020,39(1): 89-98.

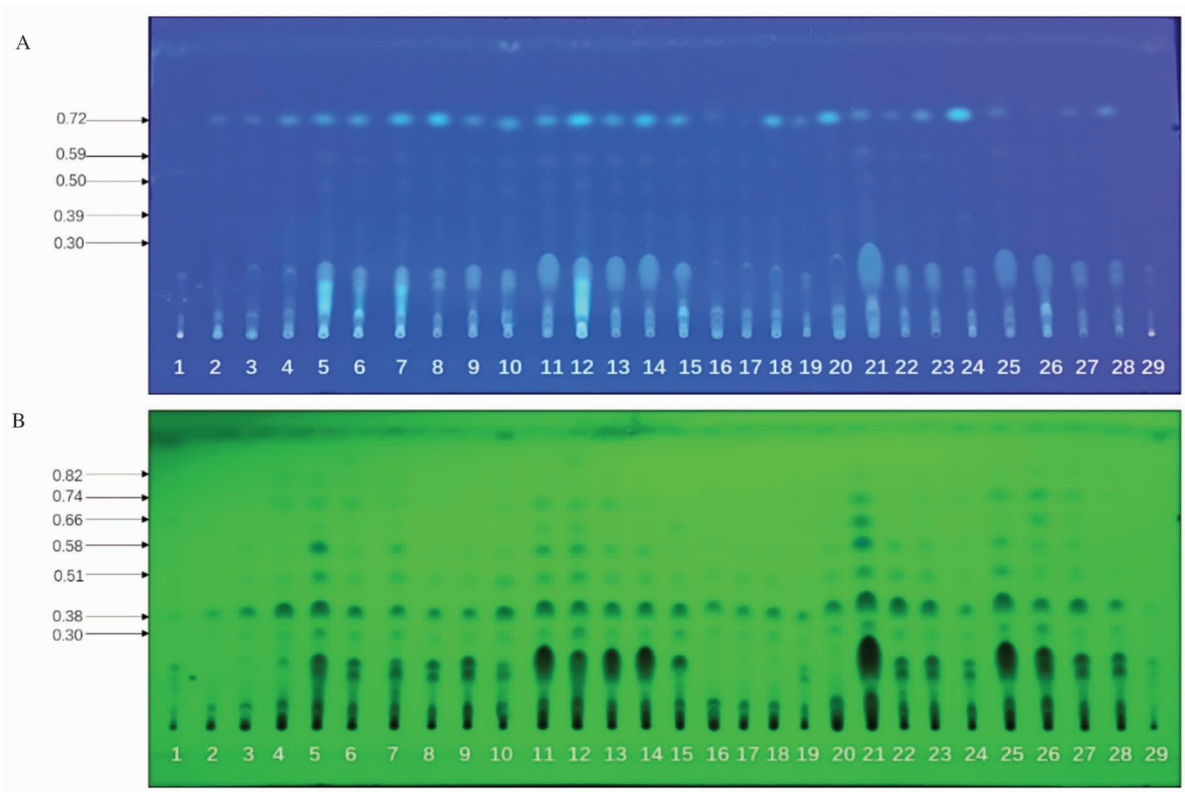
HPLC 指纹图谱结合化学计量学方法比较人工诱导法所得不同结香部位沉香的成分差异

(正文见 107 – 112 页)



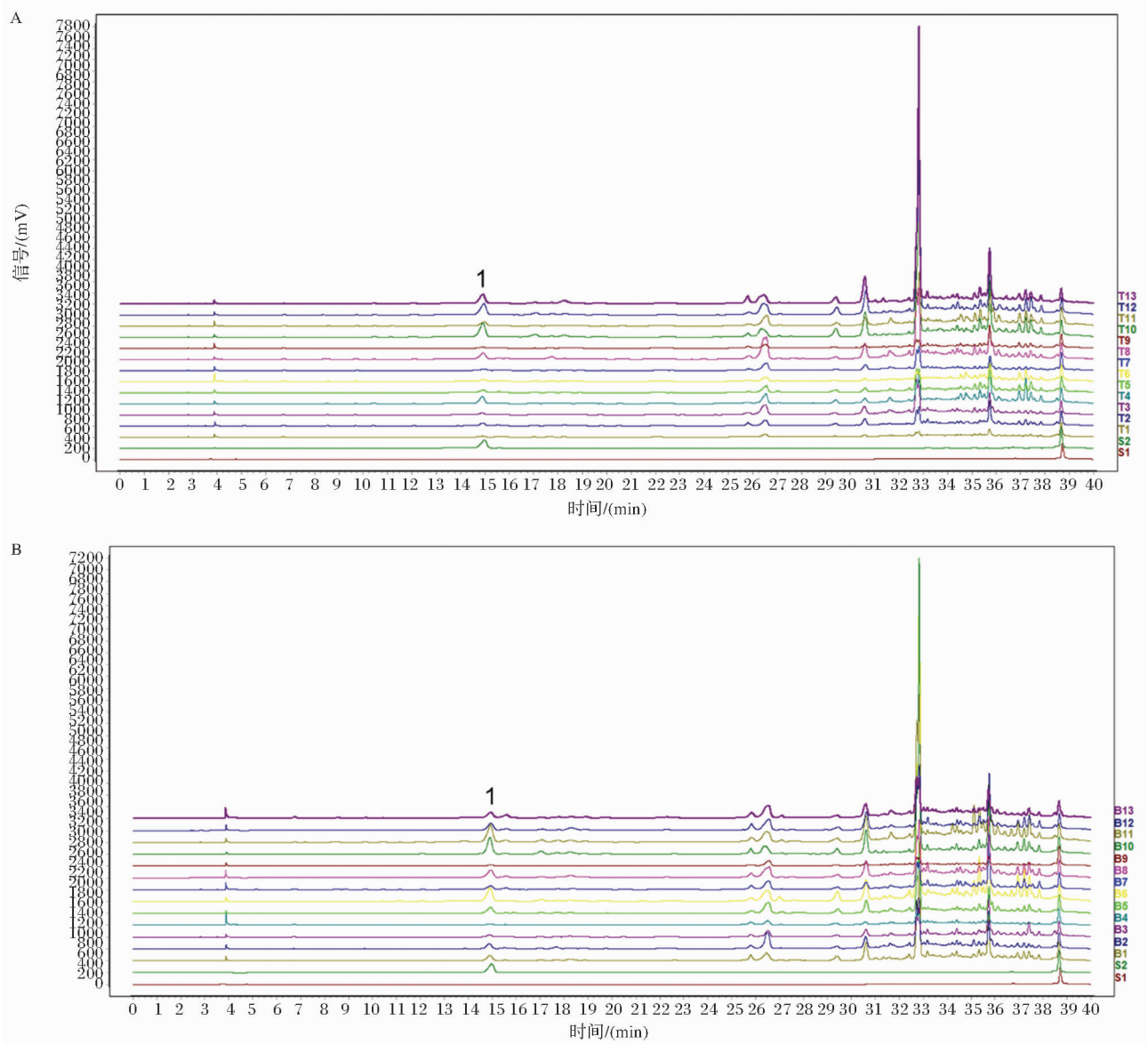
注:1. 沉香主干;2. 沉香支干;3. 白木。

图 1　沉香样品



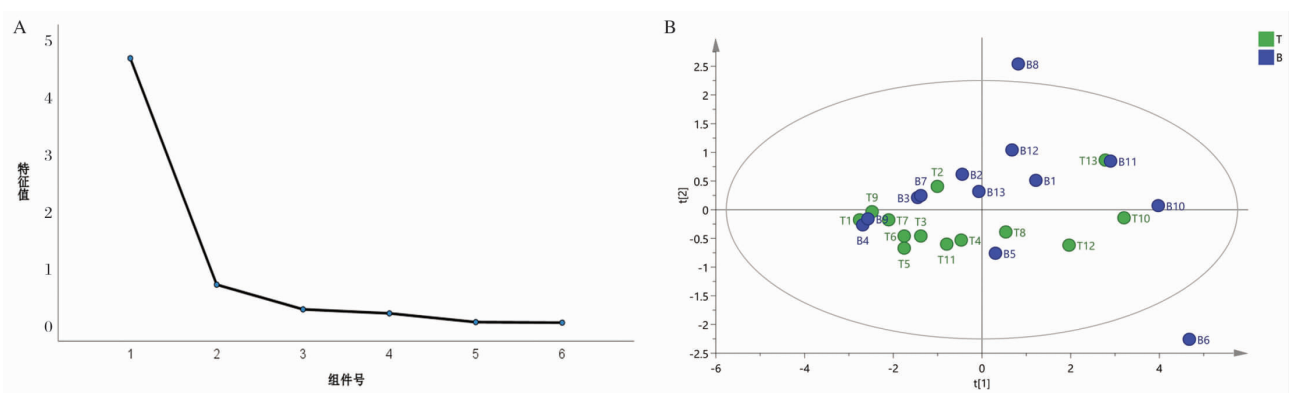
注:1,29. 白木;15. 对照药材;2 – 14. 供试品(主干,T);16 – 28. 供试品(支干,B);A. 365 nm B. 254 nm。

图 2　薄层色谱图



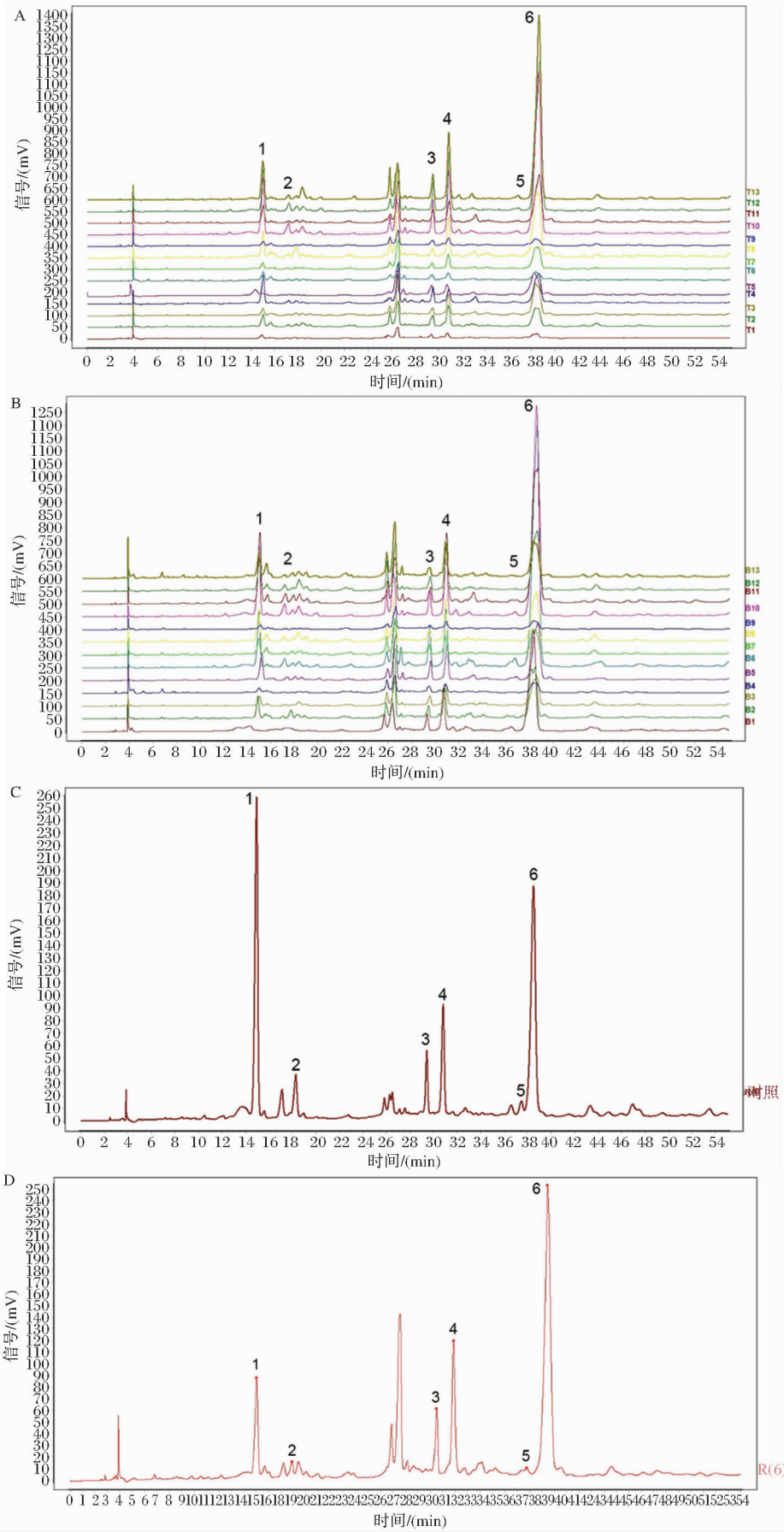
注:S1. 白木;S2. 沉香四醇标准品;A. 主干;B. 支干;1. 沉香四醇。

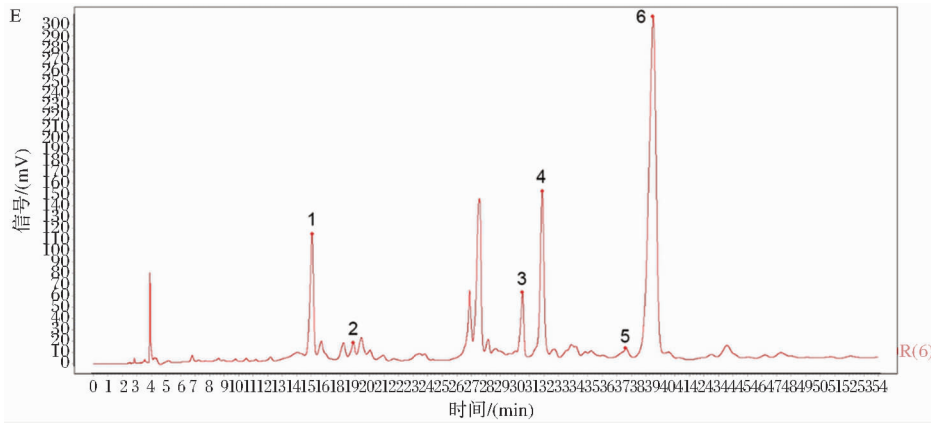
图 3 HPLC 色谱图



注:A. PCA 碎石图;B. PCA 得分图。

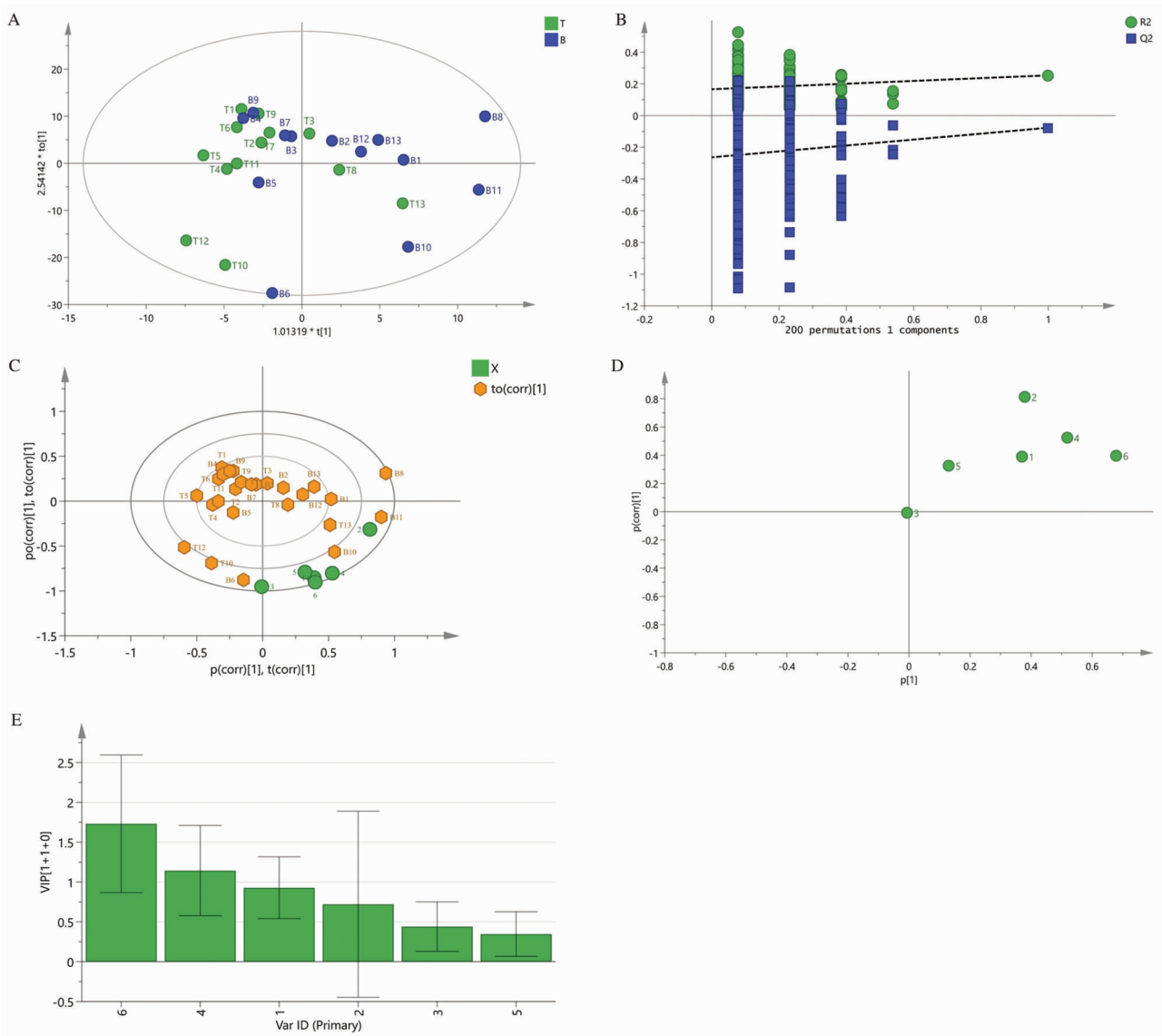
图 5 26 批沉香样品主成分分析


A
B
C
D
信号/(mV)
时间/(min)
1
2
3
4
5
6
对照
R(6)



注：A. 主干；B. 支干；C. 对照药材；D. 主干 T 的共有模式对照图谱；E. 支干 B 的共有模式对照图谱。峰 1. 沉香四醇；峰 3. 8－氯－2－(2－苯乙基)－5,6,7－三羟基－5,6,7,8－四氢色酮；峰 5. 6,4'－二羟基－3'－甲氧基－2－(2－苯乙基)色酮。

图 4　沉香样品特征图谱



注：A. OPLS－DA 得分图；B. 置换检验图；C. OPLS－DA 载荷图；D. S－plot 图；E. 变量重要性投影图。

图 6　26 批沉香样品的 OPLS－DA 分析