

HPLC 指纹图谱结合化学模式识别和多成分定量不同产地甘松的质量评价

王姿杨^{1,2}, 邢耀莹^{1,2}, 付文芮^{1,2}, 王 露^{1,2}, 邓小斌^{1,2}, 庞 哲^{1,2}, 崔治家^{1,2*}, 邵 晶^{1,2,3,4*}

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000
2. 西北中藏药省部共建协同创新中心, 甘肃 兰州 730000
3. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000
4. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 建立不同产地甘松 *Nardostachys jatamansi* 的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法, 并结合化学模式识别法探究不同产地甘松化学成分差异, 评价不同产地、不同批次甘松药材的质量。 **方法** 采用 HPLC 法建立甘肃、青海、四川 16 批次甘松的指纹图谱, 并对指标成分进行含量测定。进行相似度评价结合聚类分析(cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)等模式识别技术进行分析。 **结果** 16 批次甘松 HPLC 指纹图谱共匹配到 60 个共有峰, 通过与对照品比对, 指出绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮 5 个色谱峰, 指纹图谱相似度范围为 0.943~0.999。16 批次甘松样品中绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮含量测定变化范围分别为 1.046 5~4.975 3、0.028 4~0.108 7、0.016 7~0.157 4、7.442 1~37.869 1、0.673 7~4.306 5 mg/g, 5 种成分在不同产地间均具有显著性差异。HCA 将 16 批次甘松分为 3 类; PCA 得不同批次甘松质量差异较大; 经 OPLS-DA 筛选出了绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮等 31 个差异成分。指纹图谱综合评价结果表明 S4、S7、S10 甘松样本质量较好。 **结论** 确定了绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮 4 种指标成分作为评价甘松质量差异的潜在标志性成分, 建立的甘松 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法稳定、可靠, 可为甘松药材的质量控制、综合评价和临床应用的有效性提供科学依据。

关键词: 甘松; HPLC; 指纹图谱; 绿原酸; 丁香酸; 蒙花苷; 甘松新酮; 马兜铃酮; 化学模式识别

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)03-0956-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.026

Quality evaluation of *Nardostachys jatamansi* of different origins by HPLC fingerprinting and multi-component quantitative combined with chemical pattern recognition

WANG Ziyang^{1,2}, XING Yaoying^{1,2}, FU Wenrui^{1,2}, WANG Lu^{1,2}, DENG Xiaobin^{1,2}, PANG Zhe^{1,2}, CUI Zhijia^{1,2}, SHAO Jing^{1,2,3,4}

1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China
2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Gansu Province & MOE of PRC, Lanzhou 730000, China
3. Gansu Engineering Research Center for Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Lanzhou 730000, China
4. Gansu Province Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 2022 年度甘肃省中医药科研立项课题项目(GZKP-2022-39); 甘肃中医药大学科学研究与创新基金重点项目(2020KCZD-2); 甘肃省科技计划项目(东西协作专项-鲁甘科技协作)(22CX8NA068); 甘肃省教育厅双一流重大科研项目(GSSYLXM-05)

作者简介: 王姿杨(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及质量标准研究。E-mail: yingtao20@126.com

***通信作者:** 邵 晶(1978—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及质量控制与产品开发研究。E-mail: cn221@163.com
崔治家(1980—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药用植物多样性及中药资源保护和开发利用研究。E-mail: zhijiacui@126.com

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of Gansong (*Nardostachys jatamansi* DC.) from different origins and determine the content of multi-components, and to investigate the differences of the chemical components of *N. jatamansi* from different origins in combination with the chemical pattern recognition method, so as to evaluate the quality of *N. Jatamansi* from different origins and batches of *N. jatamansi*. **Methods** The fingerprints of 16 batches of *N. jatamansi* from Gansu, Qinghai and Sichuan were established by HPLC method, and the content determination of the index components was carried out. Similarity evaluation combined with pattern recognition techniques such as cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were performed. **Results** The HPLC fingerprints of 16 batches of *N. jatamansi* were matched to a total of 60 common peaks, and five peaks were identified as chlorogenic acid, cedar acid, acaciin, nardosinone and (-)-aristolone by comparison with the control product, and the similarity of fingerprints was in the range of 0.943—0.999. The variations of the contents of chlorogenic acid, cedar acid, acaciin, nardosinone and (-)-aristolone in 16 batches of *N. jatamansi* samples were in the range of 1.046 5—4.975 3 mg/g, 0.028 4—0.108 7 mg/g, 0.016 7—0.157 4 mg/g, 7.442 1—37.869 1 mg/g, and 0.673 7—4.306 5 mg/g respectively, and the five components were significantly different among different origins. HCA divided the 16 batches of *N. jatamansi* into three categories; PCA showed that the quality of different batches of *N. jatamansi* varied greatly; 31 differential components, including chlorogenic acid, cedar acid, nardosinone and (-)-aristolone, were screened out by OPLS-DA. The results of the comprehensive evaluation of fingerprint mapping showed that the quality of S4, S7 and S10 samples of *N. jatamansi* was better. **Conclusion** Four index components, chlorogenic acid, cedar acid, nardosinone and (-)-aristolone, were identified as the potential marker components for evaluating the quality difference of *N. jatamansi*, and the established HPLC fingerprints of *N. jatamansi* and the method for determining the content of multi-components were stable and reliable, which can provide scientific basis for the quality control, comprehensive evaluation and the effectiveness of the clinical application of *N. jatamansi* medicinal herbs.

Key words: *Nardostachys jatamansi* DC.; HPLC; fingerprint; chlorogenic acid; cedar acid; acaciin; nardosinone; (-)-aristolone; chemical pattern recognition

甘松 *Nardostachys Radix et Rhizoma* 为败酱科植物甘松 *Nardostachys jatamansi* DC.的干燥根及根茎，是我国应用历史悠久的传统中药及藏药，在阿育吠陀和乌纳尼医学体系中也一直用于治疗各种疾病。最早记载于唐代陈藏器所著的药学专著《本草拾遗》中。甘松性辛、甘，温；归脾、胃经；具有理气止痛、开郁醒脾、外用祛湿消肿的功效。临床上常用于治疗脘腹胀满、食欲不振、呕吐；外用治疗牙痛、脚气肿毒^[1]。甘松中含有萜类、黄酮类、醌类、糖类、香豆素类、木脂素类等成分^[2-6]。现代药理研究表明，甘松具有抗心律失常、抗氧化、抑菌、抗炎、抗疟、抗抑郁、降血压、镇静、抗癫痫、保护心肌细胞等多种生物活性^[7-18]。

我国甘松药材以野生为主，主要分布在西藏、四川、甘肃、青海等省份^[19]。由于采收、加工、储藏等环节的不规范性，导致市场甘松药材质量差异较大，且常掺杂有其他植物干燥根及根茎，有时难以识别，《中国药典》2020 年版对甘松质量评价以挥发油和甘松新酮含量为指标，文献研究多以挥发油、甘松新酮、绿原酸和蒙花苷等作为指标性成分对甘松药材进行质量控制^[20]，另有文

献研究丁香酸、马兜铃酮同样作为甘松药材的化学成分^[21-22]，分别具有抗肺癌药理作用^[23]、杀伤癌细胞作用^[24]。本课题组前期开展的基于“网络药理学-分子对接-药效学验证”的甘松“理气止痛、开郁醒脾”功效质量标志物研究，也表明绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮等可作为甘松质量标志成分，相关研究结果另行发表。目前尚无文献报道甘松中丁香酸、马兜铃酮 2 种化学成分在 HPLC 研究中的指认及定量分析，故对甘松原料药材、饮片、药材粉末的综合质量评价中尚缺乏全面性，因此有必要对甘松建立基于临床有效性的多成分综合评价方法。

本研究以收集到的 16 个批次的甘松药材作为研究对象，通过 HPLC 法对甘松中绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮 5 种化学成分同时进行含量测定，建立不同批次甘松样品指纹图谱，并运用主成分分析（principal component analysis, PCA）和聚类分析（cluster analysis, HCA），对所有样品的图谱进行探索性分析，结合正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA）筛选不同批次甘松药材的差异成分，并对其共有峰

进行分析,同时构建甘松药材的主成分综合评价模型,为甘松药材的质量综合评价提供方法和参考依据,以期规范当前甘松药材的市场流通及产地采收加工现状,同时保障优质的甘松药材能够应用于中医药临床。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ME204E 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);BS110S 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);YH-IS 型远红外电热鼓风干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司通州分公司);3 号药典筛(浙江上虞市金鼎标准筛具厂)。

1.2 材料

对照品绿原酸(批号 A22GB158496)、丁香酸(批号 S18J10K93270)、蒙花苷(批号 A02GB144093)、甘松新酮(批号 H30D5X1)、马兜铃酮(批号 R09J9F63410),购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数均大于 98%。甲醇(色谱纯,批号 20220103)、乙腈(色谱纯,批号 20230301)、85%磷酸(色谱纯,批号 20210415)、乙醇(分析级,批号 20220901),购自天津市大茂化学试剂厂。实验用甘松药材为 2022 年 6、10 月分别于四川、青海、甘肃 3 个省野外采集的样品。经甘肃中医药大学崔治家教授鉴定为败酱科植物甘松 *N. jatamansi* DC. 的干燥根及根茎,共 16 批(编号 S1~S16),具体信息见表 1。

表 1 甘松药材来源

Table 1 Sources of *N. jatamansi*

编号	产地	批号	采集时间	生长方式
S1	四川省阿坝州	2022060301	2022-06	野生
S2	四川省阿坝州	2022060302	2022-06	野生
S3	四川省阿坝州	2022060303	2022-06	野生
S4	青海省河南县宁木特乡	2022120601	2022-10	野生
S5	青海省河南县宁木特乡	2022120602	2022-10	野生
S6	青海省河南县宁木特乡	2022120603	2022-10	野生
S7	青海省河南县宁木特乡	2022120604	2022-10	野生
S8	青海省河南县宁木特乡	2022120605	2022-10	野生
S9	青海省河南县宁木特乡	2022120606	2022-10	野生
S10	青海省河南县宁木特乡	2022120607	2022-10	野生
S11	青海省河南县宁木特乡	2022120608	2022-10	野生
S12	青海省河南县宁木特乡	2022120609	2022-10	野生
S13	青海省河南县宁木特乡	2022120610	2022-10	野生
S14	青海省河南县宁木特乡	2022120611	2022-10	野生
S15	甘肃省甘南州玛曲县阿瓦曹乡洛河大队	2022101801	2022-10	野生
S16	青海省河南县宁木特乡梧桐村	2022101802	2022-10	野生

2 方法

2.1 不同产地甘松样品 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮 5 种对照品适量,加甲醇分别制成一定质量浓度的母液,分别量取一定体积混合,制成含绿原酸 80.0 $\mu\text{g/mL}$ 、丁香酸 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、蒙花苷 3.5 $\mu\text{g/mL}$ 、甘松新酮 700.0 $\mu\text{g/mL}$ 、马兜铃酮 175.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取甘松药材细粉 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 95%乙醇 20 mL,称定质量,超声提取 30 min (30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 kHz、600 W),放冷,用 95%乙醇补足质量,滤过,取续滤液 10 mL,水浴蒸干,用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.3 色谱条件 色谱条件参考杨祎辰等^[25]研究,并在其基础上加以改善,最终确定色谱条件:Agilent 5 HC- C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.2%磷酸水溶液(B)-乙腈(D),梯度洗脱(0~20 min, 10%~35% D; 20~23 min, 35%~40% D; 23~37 min, 40%~54% D; 37~42 min, 54%~69% D; 42~47 min, 69%~72% D; 47~48 min, 72%~10% D); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 275 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μL 。

2.1.4 精密度试验 取甘松样品(S1),按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.3”项下色谱条件重复进样 6 次,测得各共有峰保留时间的 RSD 均小于 0.35%,峰面积的 RSD 均小于 1.91%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取甘松样品 (S1) 6 份, 按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下进样测得各共有峰保留时间的 RSD 均小于 0.35%, 峰面积的 RSD 均小于 2.98%。

2.1.6 稳定性试验 取甘松样品 (S1), 按照“2.1.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件, 分别于制备后的 0、2、4、8、12、16、24 h 进样分析, 测得各共有峰保留时间的 RSD 均小于 0.36%, 峰面积的 RSD 均小于 2.47%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 指纹图谱的建立及化学计量学分析 将“2.1.2”项下方法制成的 16 批供试品溶液按“2.1.3”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》, 以 S1 样品为参照指纹图谱 (R), 设置时间窗宽度为 0.2 min, 采用多点校正法自动匹配分析法建立指纹图

谱, 中位数法生成对照指纹图谱, 并进行相似度计算。将得到的 60 个共有峰的峰面积导入 SPSS 25.0 进行 HCA 分析, SIMCA 14.1 进行 PCA 分析、OPLS-DA 分析。

2.2 5 个指标成分含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 同“2.1.1”项。

2.2.2 供试品溶液的制备 同“2.1.2”项。

2.2.3 色谱条件 同“2.1.3”项。

2.2.4 线性关系考察 取“2.1.1”项下混合对照品溶液, 用甲醇逐次稀释成系列不同浓度, 进样测定, 记录 5 种成分的色谱峰面积, 以各成分的峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 分别建立绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮和马兜铃酮的线性回归方程, 计算相关系数 (R^2), 各相关系数均大于 0.999 6, 表明各成分线性关系良好, 见表 2。

表 2 甘松药材中 5 种成分线性关系考察结果

Table 2 Results of linear relationship between five components of *N. jatamansi*

成分	线性方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	$Y=5\,710\,919.971\,6\,X+8\,393.850\,7$	0.999 6	2.5~80.0
丁香酸	$Y=16\,960\,170.575\,7\,X+310.621\,9$	0.999 9	0.025~0.800
蒙花苷	$Y=5\,633\,520.560\,5\,X+638.920\,4$	0.999 9	0.1~3.5
甘松新酮	$Y=3\,135\,110.179\,7\,X+24\,125.213\,9$	0.999 8	21.9~700.0
马兜铃酮	$Y=5\,337\,882.153\,5\,X+18\,689.575\,8$	0.999 8	5.5~175.0

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液, 在“2.1.3”项条件下连续进样 6 次, 记录绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮的峰面积积分值, 计算 RSD 分别为 2.02%、2.87%、2.02%、1.08%、2.08%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取甘松样品粉末 (S1) 6 份, 按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下进样测定, 计算绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮的平均质量分数分别为 1.590 0、0.038 4、0.043 5、10.242 3、1.576 3 mg/g, RSD 分别为 2.66%、1.23%、0.90%、1.84%、3.25%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取甘松样品 (S1), 按照“2.1.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件, 分别于制备后的 0、2、4、8、12、16、24 h 进样分析, 记录绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮的峰面积积分值, 计算 RSD 分别为 2.47%、

2.37%、1.98%、1.47%、1.64%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知成分含量的甘松粉末 9 份 (S1), 每份约 0.25 g, 置具塞锥形瓶中, 按比例 (1:0.8、1:1、1:1.2) 分别精密加入一定体积的对照品溶液, 每个比例按“2.1.2”项方法平行制备 3 份供试品溶液, 在“2.1.3”项下方法进样分析, 计算加样回收率和 RSD 值。结果绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮的平均回收率分别为 99.41%、98.96%、99.13%、102.97%、101.03%, RSD 分别为 1.33%、1.87%、1.91%、0.96%、1.58%。

2.2.9 样品测定 分别精密称取 16 批次甘松样品粉末 0.5 g (平行 3 份), 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.3”项条件下进样分析, 测定 5 个成分峰面积, 代入“2.2.4”项下直线回归方程, 计算各成分的质量分数。

3 结果与分析

3.1 HPLC 指纹图谱的建立

将 16 批次样品色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》，建立 16 批样品的 HPLC 指纹图谱（图 1），以 S1 为参照图谱，时间窗口设定为 0.2 min，以中位数法建立

对照图谱（R），采用多点校正全谱峰自动匹配共得到 60 个共有峰，通过与混合对照品溶液图谱（图 2）比对，指认出其中 5 个共有峰，依次为绿原酸（7 号峰）、丁香酸（13 号峰）、蒙花苷（32 号峰）、甘松新酮（50 号峰）、马兜铃酮（55 号峰）。

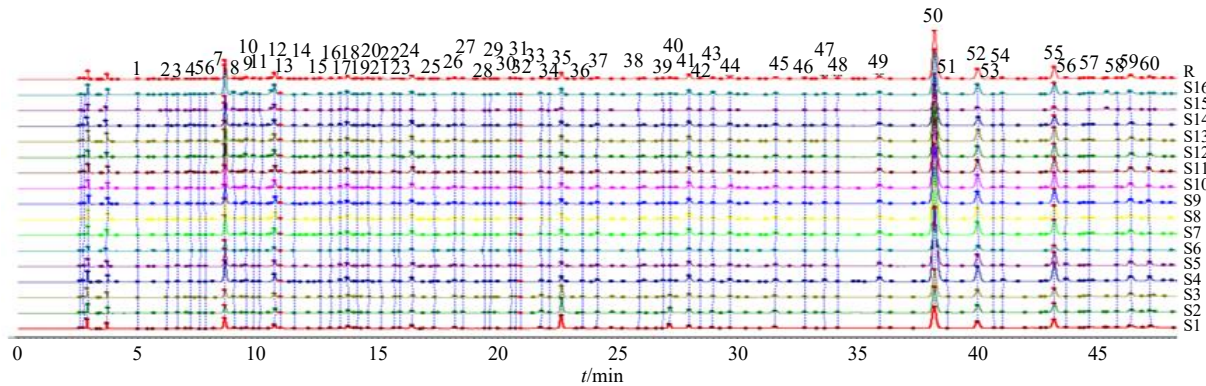
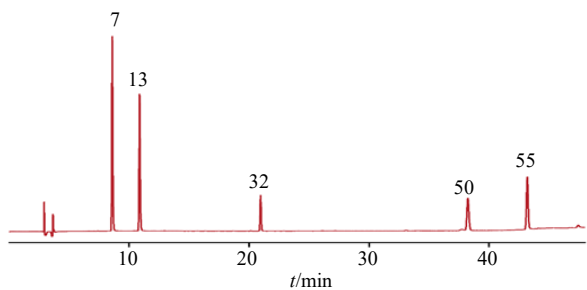


图 1 16 批次甘松的 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱 (R)
Fig. 1 HPLC superimposed fingerprints and control fingerprints of 16 batches of *N. jatamansi* (R)



7-绿原酸, 13-丁香酸, 32-蒙花苷, 50-甘松新酮, 55-马兜铃酮
7-chlorogenic acid, 13-cedar acid, 32-acaciin; nardosinone, 50-(-)-aristolone

图 2 混合对照品溶液的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC diagram of mixed reference solution

3.2 共有峰面积差异分析

不同产地甘松药材各共有峰峰面积 RSD 为 26.17%~88.42%，且 7（绿原酸）、50（甘松新酮）、52、55（马兜铃酮）号共有峰峰面积相对较高；四川产甘松药材各共有峰峰面积 RSD 为 1.12%~65.72%，且 7、12、35、50、52、55、59 号共有峰峰面积相对较高；青海河南产甘松药材各共有峰峰面积 RSD 为 22.98%~72.76%，且 7、12、35、41、49、50、52、55、59 号共有峰峰面积相对较高；甘肃玛曲产甘松药材 7、12、50、52、55 号共有峰峰面积相对较高。不同产地甘松药材的共有峰峰面积差异较大，其中均以

50 号共有峰甘松新酮的峰面积最高。

3.3 相似度分析

以生成的对照指纹图谱为标准，计算 16 批次甘松样品的相似度，结果如表 3 所示，样品相似度为 0.943~0.999，其中四川甘松相似度为 0.943~0.974，平均相似度为 0.956；青海甘松相似度为 0.981~0.999，相似度较高，平均相似度为 0.997；甘肃甘松相似度为 0.959，表明各批次甘松样品之间不同峰面积对应的成分含量存在一定差异，可通过指纹图相似度结果将青海甘松分别与四川、甘肃甘松进行区分，但甘肃甘松并未能通过指纹图谱相似度与四川甘松进行有效区分。从平均相似度来看，呈现青海>甘肃>四川的趋势。

表 3 16 批次甘松样品 HPLC 指纹图谱相似度评价结果

Table 3 HPLC fingerprint similarity evaluation results of 16 batches of <i>N. jatamansi</i> samples			
编号	相似度	编号	相似度
S1	0.943	S10	0.999
S2	0.952	S11	0.999
S3	0.974	S12	0.998
S4	0.998	S13	0.999
S5	0.997	S14	0.997
S6	0.997	S15	0.959
S7	0.998	S16	0.981
S8	0.998	平均 (S1~S3)	0.956
S9	0.998	平均 (S4~S14、S16)	0.997

3.4 化学模式识别

3.4.1 HCA 以指纹图谱 60 个共有峰的峰面积为变量, 进行 min-max 标准化处理, 导入 SPSS 25.0 软件, 采用组间联接、欧式距离法进行系统聚类分析, 结果如图 3 所示, 各色块颜色由蓝至红分别代表各化合物峰面积由低到高, 当距离为 20 时, 16 批甘松样品可聚为 2 类, 其中 5 批甘松 (S1~S3、S6、S15) 聚为第 1 类, 分别产自四川阿坝州、青海河南县、甘肃玛曲县; 其余甘松 (S4、S5、S7~S14、S16) 聚为第 2 类, 均产自青海河南县; 当距离为 15 时, 16 批甘松样品可聚为 3 类, 其中 3 批甘松 (S1~S3) 聚为第 1 类, 产自四川阿坝州, 此类样品各共有峰代表的化学成分含量高低不一; 2 批甘松 (S6、S15) 聚为第 2 类, 分别产自青海河南县、甘肃玛曲县, 此类样品各共有峰代表的化学成分含量均相对较小; 其余甘松 (S4、S5、S7~S14、S16) 聚为第 3 类, 均产自青海河南, 此类样品各共有峰代表的化学成分含量整体分布较为均匀, 且各成分相对含量均处于较高水平。HCA 结果表明, 不同产地的甘松药材质量存在一定的差异, 除 S6 外, 均可按其产地来源进行有效区分。

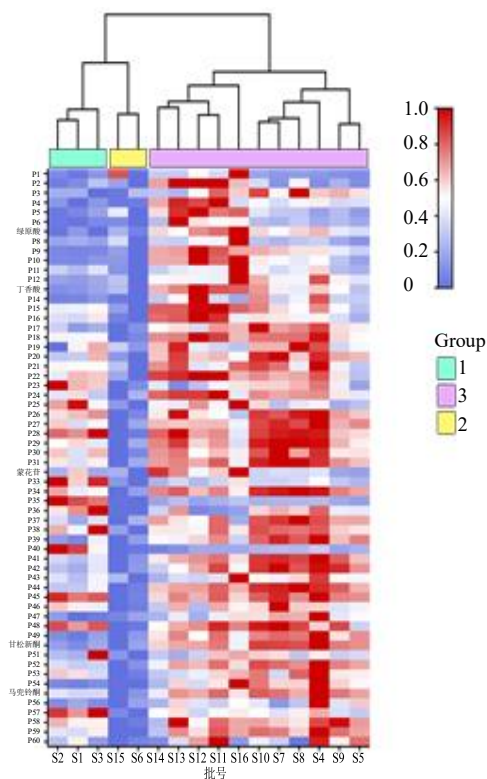


图 3 甘松 60 个共有峰的聚类分析热图

Fig. 3 Cluster analysis heat map of 60 common peaks of *N. jatamansi*

3.4.2 PCA 以 60 个共有峰的峰面积为变量, 得到 16×60 阶数据矩阵, 导入 SIMCA 14.1 软件进行 PCA, 以主成分特征值>1 为提取标准, 得到 7 个主成分, 其累积方差贡献率为 94.503%, 说明这 7 个主成分能充分代表甘松药材的基本特征和主要信息。特征值及贡献率见表 4。

表 4 特征值及方差贡献率

Table 4 Characteristic values and variance contribution rate

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	31.445	52.408	52.408
2	9.803	16.338	68.746
3	6.611	11.018	79.764
4	3.877	6.462	86.226
5	2.003	3.338	89.564
6	1.656	2.761	92.325
7	1.307	2.178	94.503

进一步通过将各特征向量标准化后, 由 PC1 (52.408%) 和 PC2 (16.338%) 为坐标轴构建的 PCA 得分散点图可以看出不同产地的甘松样品 (除 S6 外) 明显分开, 如图 4, 结果显示不同产地的 16 批样品被分为 3 类, 与 HCA 结果完全一致。

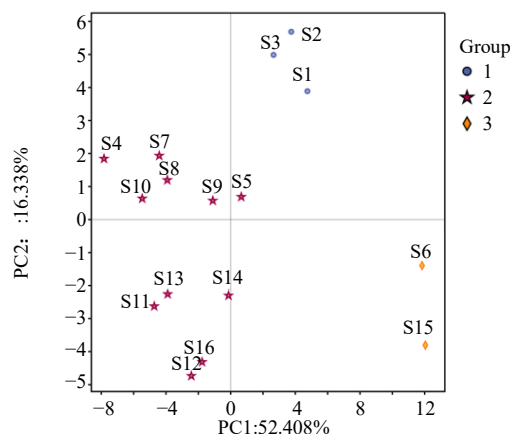


图 4 16 批不同产地甘松样品的 PCA 散点得分图

Fig. 4 Scatter plot of PCA scores of 16 batches of *N. jatamansi* samples of different origins

因子载荷矩阵反映了各主成分与 60 个共有峰即原始变量之间的相关系数, 见表 5。结果表明, 主成分 1 主要反映了色谱峰 3、4、7、9~22、24、26~31、34、37~39、41、42、44~50、52~56、58、59 的信息, 主成分 2 主要反映了色谱峰 1、2、5、6、23、33、35、36、40、57 的信息, 主成分 3 主要反映了色谱峰 8、25、32 的信息, 主成分 4 主要反映了色谱峰 43 的信息, 主成分 5 主要反映了色谱峰 60 的信息, 主成分 6 主要反映了色谱峰 56 的信息, 主成分 7 主要反映了色谱峰 51 的信息。

表 5 因子载荷矩阵
Table 5 Factor load matrix

共有峰编号	载荷						
	1	2	3	4	5	6	7
X1	-0.075	-0.720	0.472	0.368	-0.165	-0.090	-0.109
X2	0.454	-0.637	0.363	-0.435	0.013	-0.017	-0.072
X3	0.692	-0.139	-0.343	0.245	0.287	-0.322	0.188
X4	0.724	-0.494	0.014	-0.399	0.102	0.081	-0.060
X5	0.402	-0.776	0.375	-0.238	-0.052	0.010	-0.103
X6	0.558	-0.566	0.201	-0.250	-0.152	0.252	-0.045
X7	0.706	-0.630	0.108	0.232	0.062	-0.121	0.096
X8	0.333	-0.579	0.592	0.422	-0.032	-0.114	0.033
X9	0.775	-0.580	0.054	-0.162	0.060	-0.120	0.014
X10	0.663	-0.647	0.330	-0.036	0.036	-0.105	0.016
X11	0.643	-0.186	0.551	0.458	-0.077	-0.046	0.002
X12	0.729	-0.362	0.131	0.515	-0.139	0.086	0.037
X13	0.733	-0.622	0.192	-0.086	0.051	-0.036	-0.071
X14	0.752	-0.251	-0.161	-0.139	0.129	0.207	-0.001
X15	0.785	-0.314	0.442	-0.237	0.089	-0.029	-0.037
X16	0.703	-0.237	0.356	-0.539	0.064	-0.035	-0.088
X17	0.903	-0.019	-0.207	0.218	-0.020	-0.119	0.090
X18	0.940	-0.047	0.129	-0.183	0.144	-0.016	0.075
X19	0.589	0.083	-0.180	-0.194	-0.589	0.203	0.124
X20	0.901	0.109	-0.133	-0.087	-0.255	0.061	-0.193
X21	0.740	0.095	0.289	0.148	-0.369	0.176	0.125
X22	0.801	-0.179	0.374	-0.365	0.012	0.039	0.031
X23	0.398	0.683	0.348	0.225	0.177	-0.262	0.211
X24	0.812	-0.162	0.040	-0.473	0.176	0.012	0.188
X25	0.297	0.085	0.817	0.129	0.217	0.065	0.275
X26	0.799	0.447	-0.119	-0.196	-0.195	0.183	0.080
X27	0.895	0.279	-0.259	0.000	0.026	-0.066	0.094
X28	0.767	0.486	0.154	-0.323	-0.194	0.021	0.021
X29	0.878	0.224	-0.207	-0.198	-0.133	-0.034	0.265
X30	0.890	0.313	0.004	-0.078	-0.202	-0.060	0.005
X31	0.918	0.201	-0.228	-0.151	-0.029	-0.183	0.072
X32	0.414	-0.426	0.608	-0.030	-0.197	0.037	0.326
X33	0.128	0.691	0.657	0.098	0.026	0.015	-0.137
X34	0.920	0.252	-0.155	-0.092	-0.043	-0.092	0.144
X35	-0.060	0.758	0.618	-0.102	0.132	0.060	0.047
X36	0.397	0.775	0.088	-0.080	-0.387	0.244	-0.049
X37	0.816	0.151	-0.456	-0.149	-0.020	-0.228	0.058
X38	0.751	0.485	0.171	-0.005	-0.111	-0.194	-0.288
X39	0.853	0.058	-0.445	0.047	-0.026	-0.119	-0.149
X40	-0.057	0.786	0.477	-0.024	0.309	0.060	0.161
X41	0.956	0.037	-0.247	0.036	0.042	-0.086	-0.026
X42	0.865	0.082	-0.373	0.102	0.149	-0.143	-0.172
X43	0.627	0.034	0.254	0.698	-0.082	0.090	-0.068
X44	0.954	0.012	-0.192	0.036	-0.032	-0.156	-0.003
X45	0.786	0.551	0.176	-0.072	0.133	0.050	-0.058
X46	0.724	0.415	0.106	-0.008	-0.073	-0.142	0.042
X47	0.764	-0.055	-0.387	0.439	-0.093	0.046	0.103
X48	0.733	0.361	0.313	-0.121	0.109	-0.338	-0.068
X49	0.885	-0.156	-0.394	0.039	-0.060	0.044	0.002
X50	0.893	-0.125	-0.425	0.019	0.020	-0.038	0.014
X51	0.500	0.237	0.344	0.209	-0.148	-0.242	-0.593
X52	0.959	0.041	-0.217	0.090	0.122	0.056	-0.026
X53	0.753	0.331	0.077	0.348	0.256	0.092	0.212
X54	0.830	-0.209	-0.085	0.484	-0.044	0.091	0.008
X55	0.953	0.056	-0.192	0.059	0.161	0.107	-0.065
X56	0.645	-0.154	-0.191	0.313	0.106	0.607	0.048
X57	0.363	0.658	0.608	-0.072	-0.063	0.071	-0.070
X58	0.769	0.208	0.078	0.053	0.179	0.325	-0.165
X59	0.923	0.130	-0.039	0.162	0.117	0.140	-0.221
X60	0.522	0.014	-0.138	-0.063	0.622	0.390	-0.238

3.4.3 OPLS-DA 为了更好地分析不同产地甘松样本之间的差异, 采用 SMICA 14.1 软件对 16 批甘松药材 60 个共有峰进行有监督的 OPLS-DA (模型的拟合效果通常通过 R^2_X 、 R^2_Y 、 Q^2 这 3 个指标来评价, 这些指标大于 0.5 较为可信, 并且越接近 1 说明模型的拟合效果越好^[25-27]) 散点得分图见图 5。结果显示, 同 HCA 和 PCA 一致, 分为 3 类。200 次置换检验显示该模型不存在过拟合 (图 6)。变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值是筛选差异性化合物的重要指标, VIP 值越高, 对组间差异的影响越大^[28]。以 $VIP > 1$ 筛选出差异化合物, 由 VIP 得分图 (图 7) 可知, 贡献值较大的差异化合物有 31 个, 依次为 35、57、40、33、45、23、28、38、36、30、48、9、52、49、50、41、44、55、7、18、34、59、31、26、13、27、17、46、20、29、54 号峰, 其中 7 号峰为绿原酸, 13 号峰为丁香酸、50 号峰为甘松新酮, 55 号峰为马兜铃酮, 这些化合物是甘松各批次样品间产生差异的主要标志性成分, 提示在甘松的质量控制和品质评价中, 应重点关注这些成分的含量变化。而 32 号峰为蒙花苷, 但 32 号峰并未出现在 $VIP > 1$ 的色谱峰中, 则基于本研究样本, 提示它可能不是甘松质量差异的主要成分。

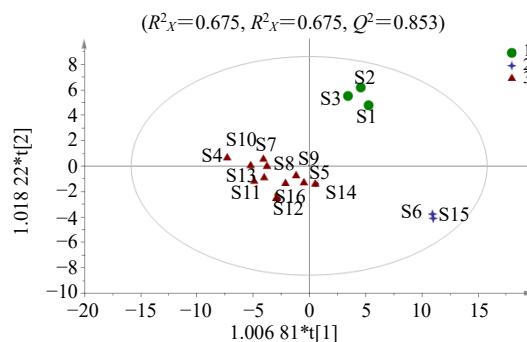


图 5 16 批甘松药材 OPLS-DA 图

Fig. 5 OPLS-DA analysis of 16 batches of *N. jatamansi*

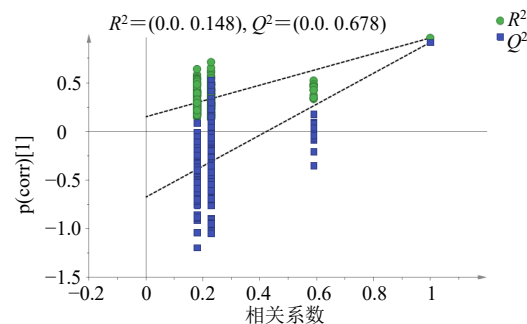


图 6 不同产地甘松 200 次置换检验 OPLS-DA 模型验证

Fig. 6 Validation of OPLS-DA model for 200 times replacement test of *N. jatamansi* of different origin

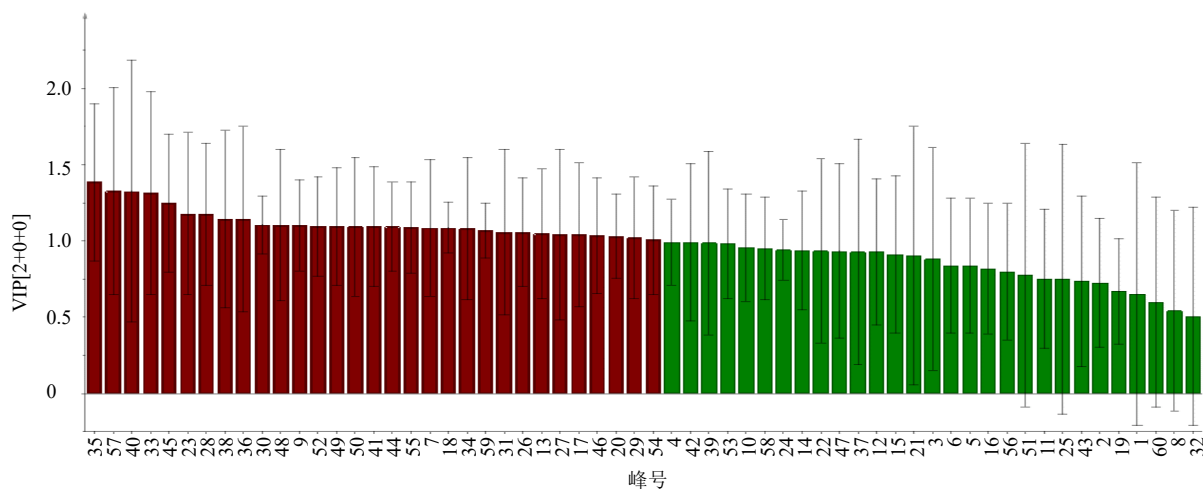


图 7 不同产地甘松各成分 VIP 图

Fig. 7 VIP diagram of each component of *N. jatamansi* of different origins

3.4.4 指纹图谱综合评价 运用 SPSS 25.0 软件计算 16 批次甘松样品的主成分得分, 以各主成分对应的贡献率为权重系数计算综合得分, 并将其排序, 见表 6。由表可知, S4、S7、S10 3 个批次甘松综合得分位居前 3, 因此, 以 60 个共有峰峰面积为综合

评价指标, 可得 S4、S7、S10 3 个批次甘松质量较好, S6 和 S15 排名最后。

3.5 不同产地甘松的化学成分含量测定

由甘松 HPLC 指纹图谱共指认出 5 个共有化学成分, 含量测定结果见表 7。由表可以看出不同产

表 6 16 批次甘松的主成分因子得分和排序
Table 6 Principal component factor scores and ranking of 16 batches of *N. jatamansi*

编号	得分							综合得分	排序
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5	主成分 6	主成分 7		
S1	-0.820	1.202	1.106	-0.445	0.670	0.911	1.474	-0.064	12
S2	-0.647	1.759	1.139	-0.008	1.193	-0.328	0.651	0.125	8
S3	-0.458	1.542	1.054	-0.442	-1.262	-0.214	-2.402	-0.001	11
S4	1.352	0.570	-0.659	1.334	0.032	1.771	0.236	0.921	1
S5	-0.114	0.213	-1.404	0.592	0.630	0.975	-0.721	-0.115	13
S6	-2.044	-0.431	-1.504	-0.025	0.379	-0.094	0.478	-1.364	15
S7	0.763	0.598	-0.801	-0.161	-0.992	-1.488	-0.285	0.337	3
S8	0.677	0.370	-0.782	0.083	-0.676	-1.277	1.509	0.327	4
S9	0.191	0.177	-0.935	0.336	0.766	0.045	-0.719	0.062	9
S10	0.944	0.197	-0.477	0.286	-0.124	-0.605	0.143	0.503	2
S11	0.816	-0.812	0.281	-0.777	1.682	-0.891	-1.045	0.301	6
S12	0.420	-1.464	0.555	-1.269	1.403	0.133	-0.304	0.004	10
S13	0.672	-0.698	0.324	-1.429	-1.465	2.075	0.141	0.204	7
S14	0.023	-0.712	0.300	-1.173	-1.061	-0.662	1.189	-0.185	14
S15	-2.079	-1.177	-0.133	0.595	-0.897	0.034	-0.531	-1.374	16
S16	0.305	-1.334	1.935	2.503	-0.278	-0.386	0.186	0.318	5

表 7 16 批次甘松中 5 个化学成分的含量 (n=3)
Table 7 Contents of five chemical components in 16 batches of *N. jatamansi* (n=3)

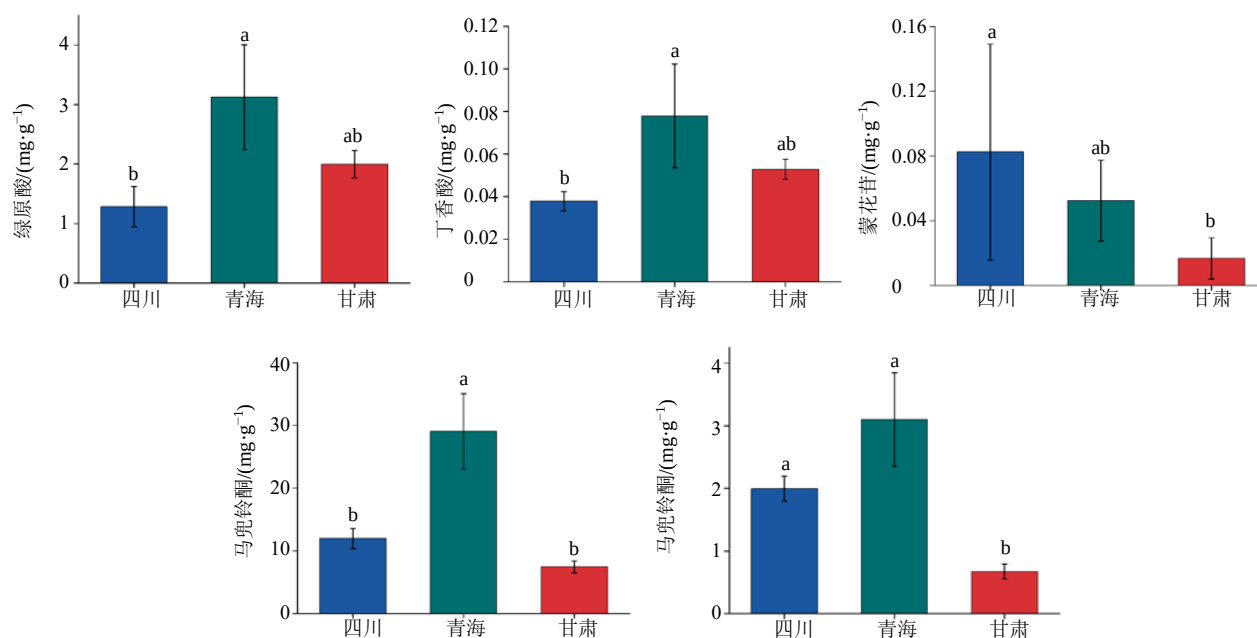
编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	绿原酸	丁香酸	蒙花苷	甘松新酮	马兜铃酮	总量
S1	1.670 3	0.039 4	0.060 1	10.900 6	1.921 5	14.591 8
S2	1.046 5	0.032 8	0.029 8	11.178 6	1.850 2	14.137 8
S3	1.130 8	0.041 4	0.157 4	13.817 1	2.223 2	17.369 8
S4	3.244 5	0.075 0	0.042 5	37.869 1	4.306 5	45.537 6
S5	2.302 9	0.049 1	0.034 4	28.515 5	3.079 8	33.981 7
S6	1.447 6	0.028 4	0.018 2	14.570 2	1.246 1	17.310 5
S7	2.772 3	0.068 0	0.053 2	32.391 1	3.170 7	38.455 3
S8	2.965 4	0.058 7	0.038 4	31.550 9	2.905 4	37.518 8
S9	2.889 8	0.076 5	0.035 3	33.205 4	3.500 5	39.707 5
S10	2.954 0	0.077 0	0.041 3	32.730 8	3.592 9	39.396 0
S11	4.122 3	0.102 4	0.062 1	32.659 7	3.722 1	40.668 6
S12	3.578 0	0.108 7	0.051 8	27.678 6	2.962 3	34.379 3
S13	2.813 0	0.101 6	0.071 6	27.013 4	3.221 5	33.221 0
S14	3.417 0	0.087 2	0.116 2	27.637 8	2.506 8	33.765 0
S15	1.997 2	0.052 8	0.016 7	7.442 1	0.673 7	10.182 6
S16	4.975 3	0.102 0	0.063 7	22.635 6	2.983 4	30.759 9
平均值	2.707 9	0.068 8	0.055 8	24.487 3	2.741 7	30.061 4

地批次甘松中 5 个指标成分含量存在差异。不同产地甘松药材平均含量为甘松新酮>马兜铃酮>绿原酸>丁香酸>蒙花苷。青海(除 S6 的绿原酸质量分数为 1.447 6 mg/g 外)、四川、甘肃甘松的绿原酸质量分数分别为均在 2.302 9 mg/g 以上、1.046 5~1.670 3 mg/g、1.997 2 mg/g, 呈现青海>甘肃>四川的趋势; 四川甘松中丁香酸的质量分数均小于 0.041 4 mg/g, 整体小于甘肃、青海(除 S6 的丁香酸质量分数为 0.028 4 mg/g 外)甘松中丁香酸的含量, 可作为四川甘松与其他产地甘松区分的指标成分; 蒙花苷含量在甘肃甘松中达到最低(0.016 7 mg/g), 明显低于其他产区甘松, 可作为区分甘肃甘松与其他产区甘松的指标成分; 甘松新酮在青海、四川、甘肃甘松中质量分数依次降低, 分别为 14.570 2~37.869 1 mg/g、10.900 6~13.817 1 mg/g、7.442 1 mg/g; 青海(除 S6 的马兜铃酮质量分数为 1.246 1 mg/g 外)、四川、甘肃甘松的马兜铃酮质量分数分别为均在 2.506 8 mg/g 以上、1.850 2~2.223 2 mg/g、0.673 7 mg/g; 青海(除 S6 的 5 种成分总质量分数为 17.310 5 mg/g 外)、四川、甘肃甘松的 5 种成分总质量分数分别为均在 30.759 9 mg/g 以上、14.137 8~17.369 8 mg/g、10.182 6 mg/g。甘

松新酮、马兜铃酮及 5 种成分总质量分数均呈现青海>四川>甘肃的趋势, 表明绿原酸、甘松新酮、马兜铃酮及 5 种成分总含量可作为 3 产地甘松相互区分的指标成分。

通过分析含量测定结果柱形图(图 8), 可以看到 VIP>1 的 4 个差异性成分(绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮)的含量在不同产地间存在显著差异, 且均为青海产甘松平均含量最高, 且在平均含量水平上, 绿原酸和丁香酸呈现青海>甘肃>四川的趋势, 甘松新酮和马兜铃酮呈现青海>四川>甘肃的趋势, 蒙花苷在不同产地批次样本间也存在显著差异, 平均含量为四川>青海>甘肃, 但其 VIP<1, 故基于本研究结果, 可将绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮 4 种指标成分作为评价甘松质量差异潜在的标志成分。

将绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮 4 种指标成分含量进行 min-max 归一化处理后, 采用组间联接、欧式距离法进行系统聚类, 结果见图 9, 可知不同样本间, 当欧氏距离为 15 时, 16 批甘肃样本可分为 2 类, 其中 S4、S5、S7~S14、S16 聚为第 1 类, 此类含萜类(甘松新酮、马兜铃酮)、苯丙素类(绿原酸)、酚类(丁香酸)成分含量均



不同字母 a、b、c 代表不同产地间具有差异, $P < 0.05$ 。

Different letters a, b, and c represent differences between different regions, with $P < 0.05$.

图 8 5 个指标成分含量测定柱形图

Fig. 8 Content determination bar graph of five index components

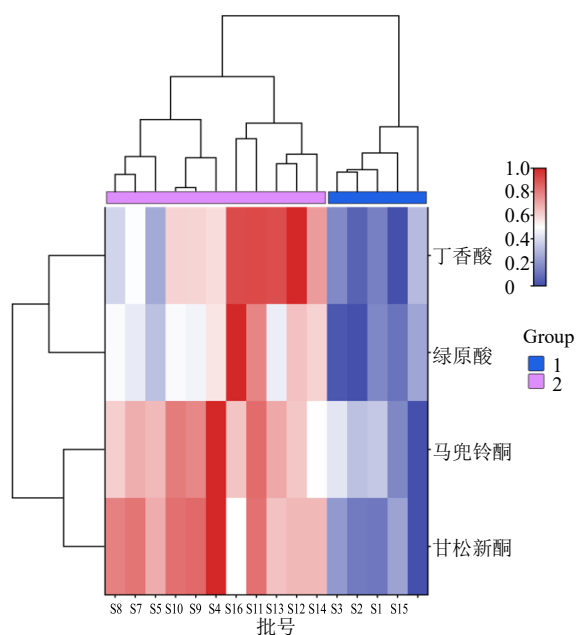


图 9 4 种指标成分聚类分析热图

Fig. 9 Heat map of cluster analysis of four index components

较高, 其中绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮含量最高的分别为 S16、S12、S4 样本。S1~S3、S6 及 S15 聚为第 2 类, 此类含上述 4 种成分含量均较少, 其中绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮含量最低的分别为 S2、S6、S15 样本, 此聚类结果与 60 个共有峰聚类结果完全相同。而在不同成分间, 甘松新酮、马兜铃酮均属于萜类成分, 聚为一类, 绿原酸、丁香酸分别属于苯丙素类、酚类, 各自聚为一类。依据 4 种成分含量聚类结果, 可将不同产地甘松进行有效区分, 进一步验证了这 4 种指标成分作为甘松的潜在质量标志物的合理性。

4 讨论

本研究以甘松为研究对象, 收集了 16 批不同产地甘松样品进行指纹图谱和多成分含量测定研究, 并通过相似度分析、HCA、PCA 以及 OPLS-DA 综合评价甘松的质量。通过考察提取方法(95%乙醇回流提取、95%乙醇超声提取)、提取时间(15、30、45 min)对提取结果的影响, 最终确定以 95%乙醇超声提取 30 min 作为供试品溶液提取方法。考察不同波长(254、275、326 nm)下指纹图谱色谱峰数量、峰型和分离度, 同时对各波长下绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮、马兜铃酮 5 种成分进行含量检测, 分析发现 275 nm 下各色谱峰的响应较高且分离度较好, 因此选用 275

nm 作为检测波长。

本研究对 16 批次不同产地甘松指纹图谱进行研究, 结合化学模式识别法分析, 首次对甘松中丁香酸和马兜铃酮 2 种化学成分于同一 HPLC 色谱条件下进行指认并定量分析, 对甘松的多成分控制药材质量进行了补充, 使其质量评价更为全面客观。在指纹图谱相似度分析中, 16 批次样品相似度均高于 0.943, 表明采集到的 16 批甘松的化学成分组成较为相似, 但各批次样品之间化学成分含量存在一定差异, 指纹图谱相似度结果将青海甘松分别与四川、甘肃甘松进行区分, 而甘肃甘松未能通过指纹图谱相似度与四川甘松进行有效区分, 可能是因为甘松中不同成分峰面积对应的含量变化对相似度结果有抵消作用^[29], 进一步分析不同产地甘松平均相似度, 呈现青海>甘肃>四川的趋势。

含量测定结果显示, 16 批样品中 5 种成分含量差异较大, 绿原酸的质量分数为 1.046 5~4.975 3 mg/g、丁香酸的质量分数为 0.028 4~0.108 7 mg/g、蒙花苷的质量分数为 0.016 7~0.157 4 mg/g、甘松新酮的质量分数为 7.442 1~37.869 1 mg/g、马兜铃酮的质量分数为 0.673 7~4.306 5 mg/g。5 种成分在不同产地间均呈现显著性差异, 且平均含量从高到低依次为甘松新酮>马兜铃酮>绿原酸>丁香酸>蒙花苷。

HCA、PCA、OPLS-DA 结果均显示, 四川阿坝州产甘松(S1~S3)聚为第 1 类, 青海河南县、甘肃玛曲县产甘松(S6、S15)聚为第 2 类, 青海河南县产甘松(S4、S5、S7~S14、S16)聚为第 3 类。本研究 S6 与 S15 无法区分的原因可能是因为 2 批样品各共有峰代表的化学成分相对含量均较低, 且较为接近, 导致两者无法区分; 也可能是生长年限不同, 由于本研究甘松样本均为野生采挖, 且甘松为多年草本植物, 《中国药典》2020 年版对其生长年限并未作出明确规定, 文献研究表明其生长年限的不同会对其次生代谢产物的积累产生影响^[25,30], 生长年限等信息的不明确, 亦会影响聚类分析的结果; 另气候环境、经纬度、海拔等的影响, 也会导致对样本的区分能力较弱。

本研究结果表明, 青海甘松中绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮的平均质量分数分别为 3.123 5、0.077 9、29.038 2、2.887 5 mg/g, 整体高于其他产区, 特别是甘松新酮作为《中国药典》2020 年版甘松项下限定质控指标成分, 在四川甘松中

质量分数为 10.900 6~13.817 1 mg/g, 青海甘松中质量分数为 14.570 2~37.869 1 mg/g, 甘肃甘松中质量分数为 7.442 1 mg/g, 甘松新酮可将 3 产地甘松完全区分; 另 OPLS-DA 这 4 种成分均属于 VIP>1 的差异成分, 显著性分析也显示 4 种成分的含量在不同产地间存在显著差异, 表明本研究确定绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮作为甘松的质量差异的特异性标志成分是合理的。

本研究采用 HPLC 法对收集到的 16 批次甘松药材建立指纹图谱, 并对其中绿原酸、丁香酸、蒙花苷、甘松新酮和马兜铃酮的含量进行比较分析, 运用 PCA 和 HCA, 对其共有峰进行分析, 构建甘松药材的主成分综合评价模型, 结合 OPLS-DA 筛选不同批次甘松药材的差异成分, 为甘松药材的质量控制全面化、规范化、标准化提供参考依据。本研究建立的甘松指纹图谱及 5 种成分含量测定方法可为甘松原料药材的质量差异性评价提供科学方法, 可为甘松药材市场流通的等级划分提供参考依据, 以保障优质的甘松药材能够应用于中医药临床。

本课题组前期已开展了基于“网络药理学-分子对接-药效学验证”的甘松“理气止痛、开郁醒脾”功效质量标志物研究, 为确定绿原酸、丁香酸、甘松新酮、马兜铃酮等作为甘松质量标志成分提供了有效支撑, 相关研究结果另行发表。另由于甘松药材资源多为野生, 且生长环境多为藏区, 分布区域有限, 资源相对匮乏, 样本获取难度较大, 课题组近半年通过努力采集收集了甘肃、四川等地产甘松, 但样本持有量仍非常有限。但为了尽快推进甘松药材研究, 课题组对有限的样本进行了多成分定量及指纹图谱研究, 以期对甘松药材的资源整合、有效开发利用提供有益参考。另本课题组后续研究将考虑在 HPLC 指纹图谱研究的基础上, 通过 GC-MS 测定甘松挥发性成分、ICP-MS 测定无机元素等, 结合甘松药理药效, 实现基于甘松挥发性成分、无机元素指纹图谱的谱效相关研究, 为甘松产地区分及质量标志物的确立提供更为全面的参考。

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: 87.
[2] Wu H H, Deng X, Zhang H, *et al.* Dinardokanshones C-E, isonardoeudesmols A-D and nardoeudesmol D from *Nardostachys jatamansi* DC. [J]. *Phytochemistry*, 2018, 150: 50-59.

[3] 张毅, 林佳, 徐丽珍, 等. 甘松化学成分的研究(II) [J]. *中草药*, 2007, 38(6): 823-825.
[4] Deng X, Wu Y J, Chen Y P, *et al.* Nardonaphthalenones A and B from the roots and rhizomes of *Nardostachys chinensis* Batal [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(4): 875-879.
[5] 蒋开年, 韩泳平. 藏药甘松多糖 S 的研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(11): 2248-2250.
[6] 万新, 石晋丽, 刘勇, 等. 甘松属植物化学成分与药理作用 [J]. *国外医药: 植物药分册*, 2007, 22(1): 1-6.
[7] 钱薇. 甘松新酮抗心律失常作用的应用基础研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
[8] 景临林, 马慧萍, 范小飞, 等. 甘松不同溶剂提取物的抗氧化活性研究 [J]. *化学研究与应用*, 2014, 26(10): 1591-1596.
[9] 卢靖, 张丽珠, 王秀萍, 等. 甘松精油抑菌活性及抗氧化活性研究 [J]. *食品工业*, 2014, 35(4): 91-94.
[10] Bae G S, Park H J, Kim D Y, *et al.* *Nardostachys jatamansi* protects against cerulein-induced acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2010, 39(4): 520-529.
[11] Takaya Y, Kurumada K I, Takeuji Y, *et al.* Novel antimalarial guaiane-type sesquiterpenoids from *Nardostachys chinensis* roots [J]. *Tetrahedron Lett*, 1998, 39(11): 1361-1364.
[12] Jalali S, Zarrinhighi A, Sadraei S, *et al.* A system pharmacology study for deciphering anti depression activity of *Nardostachys jatamansi* [J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(5): 469-476.
[13] Bhat M D A, Malik S A. Efficacy of *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC. in essential hypertension: A randomized controlled study [J]. *Complement Ther Med*, 2020, 53: 102532.
[14] Takemoto H, Yagura T, Ito M. Evaluation of volatile components from spikenard: Valerena-4,7(11)-diene is a highly active sedative compound [J]. *J Nat Med*, 2009, 63(4): 380-385.
[15] 杨秀英. 甘松抗痢灵的主要药效学实验 [J]. *云南中医学院学报*, 1996, 19(3): 9-14.
[16] 李莹, 钟海蓉, 李奕松, 等. 基于高通量测序研究甘松根际细菌及药用部位内生细菌群落结构及多样性 [J]. *中草药*, 2022, 53(3): 835-847.
[17] Subashini R, Yogeeta S, Gnanapragasam A, *et al.* Protective effect of *Nardostachys jatamansi* on oxidative injury and cellular abnormalities during doxorubicin-induced cardiac damage in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(2): 257-262.
[18] 薛静文, 万国慧, 李佳园, 等. 基于肠-脑轴理论探讨甘松对帕金森大鼠运动功能障碍的改善作用及机

- 制 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2822-2831.
- [19] 金乾. 藏药植物甘松的生药学研究 [D]. 成都: 西南民族大学, 2019.
- [20] 李莹, 钟海蓉, 丰日落, 等. 基于 LC-MS 和 GC-MS 的仿野生栽培与野生甘松药材的主要成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5): 1218-1228.
- [21] 张小荣, 崔治家, 何海, 等. 甘松化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 11: 183-190.
- [22] 王丽霞. 中药甘松和水红木化学成分研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2018.
- [23] 戴媛媛, 马明华, 徐晓红, 等. LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中夏枯草消瘤合剂有效成分体内药动学研究 [J]. 药学实践与服务, 2023, 41(6): 358-365.
- [24] 许娜, 牟玉侦, 李文兵, 等. 基于 HPLC 法和多元统计分析的不同产地香附挥发油中 4 种成分含量的比较研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(23): 2833-2840.
- [25] 杨祎辰, 王二欢, 王继强, 等. 基于甘松 HPLC 指纹图谱的模式识别研究及综合主成分评价模型 [J]. 中医药导报, 2022, 28(7): 44-49.
- [26] Szymańska E, Saccenti E, Smilde A K, *et al.* Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies [J]. *Metabolomics*, 2012, 8(Suppl 1): 3-16.
- [27] Boulesteix A L, Strimmer K. Partial least squares: A versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data [J]. *Brief Bioinform*, 2007, 8(1): 32-44.
- [28] 郝壮壮, 曹宇欣, 刘朦朦, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定结合化学计量学的不同商品规格山慈菇质量差异分析 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1935-1945.
- [29] 周雯雯, 史银基, 何江, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同生长期刺山柑果质量 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2235-2242.
- [30] 杨祎辰, 王二欢, 王继强, 等. 基于响应面法的甘松挥发油提取工艺优化研究 [J]. 安徽农业科学, 2022, 50(8): 152-155.

[责任编辑 时圣明]