

基于指纹图谱和化学模式识别评价甘松挥发油质量及抑菌活性研究

海来约布^{1,2,3}, 蔡晓霞^{2,3,4}, 文 阳^{1,2,3}, 马 权^{1,2,3}, 李奕松², 夏 清², 李 莹^{1,2,3}, 李文兵^{1,2,3*}, 刘 圆^{1,2,3*}

1. 西南民族大学, 四川 成都 610041
2. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225
3. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225
4. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 建立甘松 *Nardostachys jatamansi* 挥发油 GC-MS 指纹图谱, 结合化学模式识别筛选其差异标志物, 并进行抑菌活性研究, 为甘松挥发油质量评价及应用提供参考。方法 采用 GC-MS 鉴定甘松挥发油的化学成分并建立指纹图谱; 通过相似度评价、聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘-判别分析对差异标志物进行筛选; 并用牛津杯法评价其抑菌活性。结果 甘松挥发油中鉴定出 33 个化学成分, 建立了甘松挥发油指纹图谱, 共标定 15 个共有峰, 相似度为 0.936~0.994; 通过聚类分析将不同产地甘松挥发油分为 4 类, 主成分分析结果与聚类分析结果基本相同, 综合分析筛选白菖烯、百秋李醇、 β -马里烯、马兜铃酮、马榄醇及马兜铃烯可作为甘松挥发油差异标志物; 甘松挥发油对红色毛癣菌、须癣毛癣菌、牙龈卟啉单胞菌、幽门螺旋杆菌、肺炎链球菌有明显抑菌效果, 最小抑菌浓度分别为 0.4%、0.8%、3.1%、1.6%、6.25%。结论 采用指纹图谱结合化学模式识别技术可快速、有效地筛选甘松挥发油差异标志物, 且甘松挥发油具有较好抑菌活性, 可为甘松资源的综合开发利用及挥发油质量标准的建立奠定基础。

关键词: 甘松挥发油; GC-MS; 指纹图谱; 化学模式识别; 差异标志物; 抑菌; 白菖烯; 百秋李醇; β -马里烯; 马兜铃酮; 马榄醇; 马兜铃烯

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)07-2527-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.026

Quality evaluation and antibacterial activity of volatile oil from *Nardostachys jatamansi* based on fingerprint and chemical pattern recognition

HAILAI Yuebu^{1,2,3}, CAI Xiaoxia^{2,3,4}, WEN Yang^{1,2,3}, MA Quan^{1,2,3}, LI Yisong², XIA Qing², LI Ying^{1,2,3}, LI Wenbing^{1,2,3}, LIU Yuan^{1,2,3}

1. Southwest Minzu University, Chengdu, 610041, China
2. Sichuan Provincial Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering Laboratory, Chengdu, 610225, China
3. Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization Key Laboratory of National Ethnic Affairs Commission of China, Chengdu 610225, China
4. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550025, China

Abstract: Objective To establish a GC-MS fingerprint of volatile oil from *Nardostachys jatamansi*, combined with chemical pattern recognition to screen its differential markers, and study its antibacterial activity, providing a reference for the quality evaluation and

收稿日期: 2024-09-05

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1706101); 四川省重点研发项目(2024YFFK0190); 四川省中医药管理局中医药科研专项(2023MS315); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项(ZYN2025023)

作者简介: 海来约布(1994—), 男, 彝族, 四川越西县人, 硕士研究生, 主要从事民族药资源与鉴定。

Tel: 13880436653 E-mail: 1157820560@qq.com

*通信作者: 李文兵, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为民族药炮制工艺及质量标准研究。

Tel: 13540876731 E-mail: 285892232@qq.com

刘 圆, 博士, 教授, 博士生导师, 从事少数民族药物研究和教学。Tel: (028)85528812 E-mail: 499769896@qq.com

application of volatile oil from *N. jatamansi*. **Methods** GC-MS was used to identify the chemical components of the volatile oil from *N. jatamansi* and establish a fingerprint; Differential markers were selected through similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis, and orthogonal partial least squares discriminant analysis; The antibacterial activity was evaluated by Oxford Cup method. **Results** A total of 33 chemical components were identified in the volatile oil of *N. jatamansi*, and a fingerprint of the volatile oil of *N. jatamansi* was established. A total of 15 common peaks were calibrated, with a similarity of 0.936 to 0.994. The volatile oil of *N. jatamansi* from different regions was divided into four categories through cluster analysis. The results of principal component analysis and cluster analysis were basically the same. Through comprehensive analysis, calarene, patchouli alcohol, β -maaliene, aristolone, maaliolcohol, and aristolene alkene can be used as differential markers for the volatile oil of *N. jatamansi*; The volatile oil of *N. jatamansi* had obvious antibacterial effect on *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Porphyrromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori* and *Streptococcus pneumoniae*. The minimum inhibitory concentration was 0.4%, 0.8%, 3.1%, 1.6%, and 6.25%, respectively. **Conclusion** Using fingerprint combined with chemical pattern recognition technology can quickly and effectively screen the differential markers of volatile oil of *N. jatamansi*, and the volatile oil of *N. jatamansi* has good antibacterial activity. This study lays a material foundation for the comprehensive development and utilization of *N. jatamansi* resources and the establishment of quality standards for the volatile oil.

Key Words: volatile oil of *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC.; GC-MS; fingerprint; chemical pattern recognition; differential markers; antimicrobial; calarene; patchouli alcohol; β -maaliene; aristolone; maaliolcohol; aristolene alkene

甘松为败酱科植物甘松 *Nardostachys jatamansi* (D. Don) DC.的干燥根及根茎,具有理气止痛、开郁醒脾、祛湿消肿(外用)的功效^[1],分布于四川、青海、甘肃、云南和西藏等青藏高原地区^[2]。甘松是一味经典的藏药材,在藏医临床上常用于治疗“旧热症,热毒证”和“瘟疫症”^[3],是藏香的重要原材料之一。甘松富含挥发油,现代研究表明甘松挥发油具有抗心律失常、抗疟、抑菌、抗炎、抗抑郁、镇静、降压、抗肿瘤等药理活性^[4-6],广泛应用于保健日化产品中^[5]。

甘松挥发油药效保证与安全应用以质量评价为基础。目前,甘松挥发油缺乏完善的质量标准,《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003版)收载“甘松油(松根油)”,但仅有“性状”和“鉴别”等简单的性状描述,难以控制挥发油质量^[7]。本研究以27批甘松挥发油为研究对象,通过GC-MS分析挥发油成分,对其主要化学成分进行宏观整体表征,并结合化学模式识别谱对指纹图谱中提取共有峰的面积进行分析,从而得到影响不同产地质量的特征化学成分,建立甘松挥发油潜在的差异标志物^[8],为甘松资源的综合开发利用及挥发油质量标准的建立和质量评价奠定基础。同时药用植物挥发油是一种良好的抑菌剂,具有相对分子质量小、脂溶性强、易透过体内生物膜和生物利用度高等特点,有望成为新型替抗药物^[9]。故本研究采用牛津杯法评价其抑菌活性,为后续以甘松挥发油为原料的系列产品开发奠定坚实基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 7000D/8890 型 GC-MS 仪器(美国安捷伦公司), SXKW-2000ML 型智能电热套(北京中兴伟业世纪仪器有限公司), 1810D 型摩尔超纯水器(重庆摩尔水处理设备有限公司), BSC-1100-II A2X 型生物安全柜(科博生物有限公司), 3131 型三气培养箱(赛默飞世尔科技公司), THZ-98A 型振荡培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

M0028B 型哥伦比亚血琼脂基础, C0030A 型脑心浸粉; S0002 型无菌脱纤维绵羊全血, M0006 型营养肉汁琼脂, M4110 型 PDA 琼脂均购于山东拓普生物工程有限公司。正己烷(成都市科隆化学品有限公司, 批号 2020071701), A610100 型 PBS 粉剂[生工生物工程(上海)股份有限公司]; DMSO(国药集团), 水为蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

幽门螺旋杆菌(批号 ATCC 43504); 肺炎链球菌(批号 ATCC 49619); 牙龈卟啉单胞菌(批号 ATCC33277); 红色毛癣菌(批号 NBRC 5467); 须癣毛癣菌(批号 NBRC 6202); 鲍曼不动杆菌(批号 ATCC 19606); 铜绿假单胞菌(批号 ATCC 10145)均购于宁波明海生物技术有限公司。

1.3 药材

27 批甘松药材分别采集于四川省阿坝州、甘孜州以及青海省和甘肃省,经西南民族大学青藏高原研究院刘圆教授鉴定为败酱科甘松属植物甘松 *N. jatamansi* DC.的干燥根及根茎,样品信息见表 1。

表1 样品来源信息

Table 1 Information of samples

编号	采集地/来源	经度/E	纬度/N	海拔/m	采收时间
S1	四川省甘孜州理塘县濯桑苗圃	99°49'12"	29°50'38"	3 680	2019-11-29
S2	四川省阿坝州红原县邛溪镇	102°35'00"	32°50'07"	3 490	2019-11-29
S3	四川省阿坝州红原县邛溪镇	102°35'00"	32°50'07"	3 490	2019-11-29
S4	四川省阿坝州红原县邛溪镇	102°35'01"	32°50'08"	3 491	2019-11-29
S5	四川省阿坝州红原县邛溪镇	102°35'02"	32°50'09"	3 492	2019-11-29
S6	四川省阿坝州红原县邛溪镇	102°35'03"	32°50'10"	3 493	2019-11-29
S7	四川省阿坝州红原县阿木乡	102°44'10"	32°55'20"	3 560	2020-05-21
S8	四川省阿坝州红原县安曲镇安下哈拉玛村	102°27'06"	32°44'52"	3 561	2020-05-21
S9	四川省阿坝州红原县阿木乡峨扎村	102°44'11"	32°55'24"	3 560	2020-05-21
S10	四川省阿坝州红原县麦洼乡麦洼一村	102°49'05"	33°04'24"	3 610	2020-05-21
S11	四川省阿坝州若尔盖县唐克镇俄色村	102°37'18"	33°26'24"	3 503	2020-05-21
S12	四川省阿坝州若尔盖县班佑多玛村	103°03'22"	33°29'02"	3 484	2020-05-21
S13	四川省阿坝州若尔盖县班佑乡求吉郎哇村	103°08'55"	33°22'46"	3 548	2020-05-21
S14	青海省黄南州河南县优干宁镇	101°49'36"	34°36'12"	3 610	2020-05-21
S15	青海省果洛州久治县智青松多镇果江村	101°16'58"	33°23'36"	3 930	2020-05-21
S16	青海省果洛州久治县索呼日麻乡	101°02'41"	33°25'59"	4 130	2020-05-21
S17	甘肃省甘南州玛曲县欧拉镇	101°45'24"	34°03'45"	3 430	2020-05-21
S18	甘肃省甘南州玛曲县欧拉镇欧强村	101°55'05"	33°53'06"	3 520	2020-05-21
S19	购于四川省阿坝州阿坝县	102°11'07"	33°30'25"	3 500	2020-08-14
S20	阿坝州红原天然产物有限责任公司提供	102°54'05"	32°79'91"	3 420	2020-08-02
S21	阿坝州红原天然产物有限责任公司提供	102°54'05"	32°79'91"	3 420	2020-08-07
S22	阿坝州红原天然产物有限责任公司提供	102°54'05"	32°79'91"	3 420	2020-08-15
S23	阿坝州红原天然产物有限责任公司提供	102°54'05"	32°79'91"	3 420	2020-08-21
S24	阿坝州红原天然产物有限责任公司提供	102°54'05"	32°79'91"	3 420	2020-09-05
S25	阿坝州红原天然产物有限责任公司提供	102°54'05"	32°79'91"	3 420	2020-09-07
S26	阿坝州红原天然产物有限责任公司提供	102°54'05"	32°79'91"	3 420	2020-09-09
S27	阿坝州红原天然产物有限责任公司提供	102°54'05"	32°79'91"	3 420	2020-10-18

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取

参照《中国药典》2020年版四部通则 2204—挥发油测定法甲法对甘松挥发油进行测定^[1]。精密称取甘松（过3号筛）50 g，置于圆底烧瓶中，加蒸馏水 500 mL，保持微沸约 5 h，至测定器中油量不再增加，停止加热，收集上层挥发油，加入适量无水硫酸钠干燥，即得。

2.2 检测条件

安捷伦 Agilent HP-5MS UI（30 m×250 μm×0.25 μm）毛细管色谱柱，载气为高纯氦气，柱内载气体积流量为 1.0 mL/min，升温程序 80 °C（保持 0 min），再以 20 °C/min 升温到 130 °C，以 1 °C/min 升温到 140 °C，然后以 30 °C/min 升温到 160 °C（保持 4 min），以 1 °C/min 升温到 165 °C，以 40 °C/min 升温到 280 °C（保持 5 min）；进样量为 1 μL，分流比（10：1）进样；溶剂延迟时间 2 min。EI 电

离源；接口温度为 280 °C；电子能量 70 eV；离子源温度 230 °C；扫描质量范围 m/z 50~500。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取甘松挥发油 100 μL，加入正己烷溶解，定容至 100 mL 量瓶中，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 成分分析

27 个不同批次的甘松挥发油采用 GC-MS 按“2.2”项中的方法进样测定，GC-MS 总离子流图如图 1 所示。根据安捷伦气相色谱质谱仪中数据库 NIST17.L 检索，结合文献，占各挥发油样品总量的 80%~90%的成分被鉴定，累积有 75 个成分，各批甘松挥发油的成分不尽相同，获得的甘松挥发油的化学成分信息，共有 37 个峰，鉴定出 33 个化学成分，如表 2 所示。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 精密度考察 取同一甘松挥发油供试品（S19），按“2.3”项下方法制备供试品溶液 1 份，

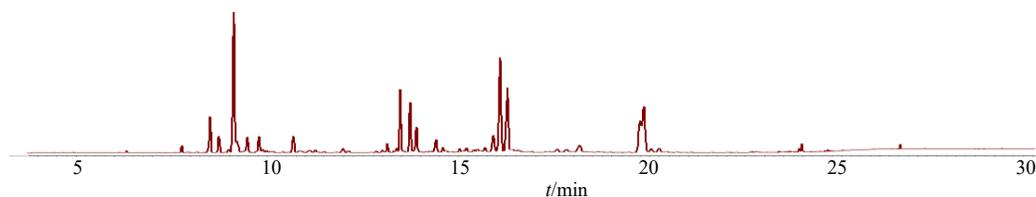


图1 甘松挥发油 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion flow diagram of volatile oil of *N. jatamansi*

表2 甘松挥发油组分中化学成分的定性分析结果

Table 2 Qualitative analysis results of chemical components in volatile oil of *N. jatamansi*

编号	名称	CAS	分子式	t_R /min
1	β -广藿香烯	514-51-2	C ₁₅ H ₂₄	7.77
2	cyclohexane	515-13-9	C ₆ H ₁₂	7.90
3	β -马利烯	489-29-2	C ₁₅ H ₂₄	8.54
4	白菖烯	6831-16-9	C ₁₅ H ₂₄	8.75
5	1,1,7,7,7a-tetramethyl-1a,2,6,7,7a,7b-hexahydro-1H-cyclopropa[a]naphthalene	154098-14-3	C ₁₅ H ₂₂	9.02
6	水菖蒲烯	17334-55-3	C ₁₅ H ₂₄	9.15
7	selina-3,7(11)-diene	6813-21-4	C ₁₅ H ₂₄	9.27
8	seychellene	20085-93-2	C ₁₅ H ₂₄	9.51
9	valerena-4,7(11)-diene	351222-66-7	C ₁₅ H ₂₄	9.82
10	1H-3a,7-methanoazulene2,3,6,7,8,8a-hexahydro1,4,9,9-tetramethyl-(1 α ,3 α ,7 α ,8 α \beta)-adendrene	20071-49-2	C ₁₅ H ₂₄	9.98
11	alloaromadendrene	25246-27-9	C ₁₅ H ₂₄	9.99
12	trans- β -Ionone	79-77-6	C ₁₅ H ₂₀ O	10.68
13	1H-cyclopropa[a]naphthalene	20071-49-2	C ₁₅ H ₂₄	11.14
14	α -愈创木烯	3691-12-1	C ₁₅ H ₂₄	11.28
15	δ -愈创木烯	3691-11-0	C ₁₅ H ₂₄	11.48
16	α -马利烯	489-28-1	C ₁₅ H ₂₄	12.02
17	δ -葑澄茄烯	483-76-1	C ₁₅ H ₂₄	12.12
18	megastigma-4,6(E),8(Z)-triene	71186-24-8	C ₁₃ H ₂₀ O	13.02
19	selin-6-en-4 α -ol	118173	C ₁₅ H ₂₆ O	13.16
20	(1aR,3aS,7S,7aS,7bR)-1,1,3a,7-tetrahyldodecahydro-1H-cyclopropa[a]naphthalen-7-ol	527-90-2	C ₁₅ H ₂₆ O	13.47
21	1H-cycloprop[e]azulen-7-ol	6750-60-3	C ₁₅ H ₂₄ O	13.76
22	蓝桉醇	489-41-8	C ₁₅ H ₂₆ O	13.92
23	7-tetracyclo[6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol,4,4,11,11-tetramethyl-acryldehyde	74842-43-6	C ₁₅ H ₂₄ O	14.43
24	benzene	61142-76-5	C ₆ H ₆	14.62
25	(-)-spathulenol	77171-55-2	C ₁₅ H ₂₄ O	15.43
26	β -愈创木烯	88-84-6	C ₁₅ H ₂₄	15.94
27	百秋李醇	5986-55-0	C ₁₅ H ₂₆ O	16.12
28	ledene oxide-(II)	159367	C ₁₅ H ₂₄ O	16.27
29	(1aR,7R,7aR,7bS)-(+)-1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,7,7a-teramethyl-1H-cyclopropa[a]naphthalen-3-one	114339-93-4	C ₁₅ H ₂₂ O	16.63
30	trans-valerenyl acetate	101527-74-6	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	17.40
31	(E)-3-((4S,7R,7aR)-3,7-dimethyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1H-inden-4-yl)-2-methylacryldehyde	4176-16-3	C ₁₅ H ₂₂ O	18.20
32	马兜铃酮	6831-17-0	C ₁₅ H ₂₂ O	19.87
33	(2aS,3aR,5aS,9bR)-2a,5a,9-trimethyl-2a,4,5,5a,6,7,8,9b-octahydro	352457-43-3	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	20.27

按“2.2”项下 GC-MS 检测条件连续进样 6 次，以白菖烯（4 号峰）为参照峰（S），计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 2%，表明仪器精密密度良好。

2.5.2 重复性考察 取同一甘松挥发油供试品

（S19），按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.2”项下 GC-MS 检测条件进样，以白菖烯（4 号峰）为参照峰（S），计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 2%，表明重复性良好。

2.5.3 稳定性考察 取同一甘松挥发油供试品

(S19), 按“2.3”项下方法制备供试品一份, 按“2.2”项下 GC-MS 检测条件分别于配制后 0、4、10、14、24 h 进样, 以白菖烯 (4 号峰) 为参照峰 (S), 计算各特征峰的相对保留时间与相对峰面积。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 2%, 表明稳定性良好。

2.5.4 相似度评价 取 27 批不同产地甘松挥发油按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项 GC-MS 检测条件进样并记录色谱数据, 将所得的 27 批甘松挥发油色谱图以 txt 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.1 版本)”, 并进行相似度评价, 得到 27 批甘松挥发油指纹图谱, 见图 2。根据安捷伦 7890A/5975C 气相色谱质谱仪中数据库 NIST17.L 检索, 分别获得 27 批甘松挥发油的化学成分信息, 其

中有 15 个共有成分, 见图 3, 分别为 β -广藿香烯 (1)、 β -马里烯 (2)、马兜铃烯 (3)、白菖烯 (4)、西车烯 (5)、 β -紫罗兰酮 (6)、 α -愈创木烯 (7)、 δ -愈创木烯 (8)、 δ -葑澄茄烯 (9)、马榄醇 (10)、1H-cycloprop[e]azulen-7-ol (11)、蓝桉醇 (12)、 β -愈创木烯 (13)、百秋李醇 (14)、马兜铃酮 (15)。4 号峰峰面积较大, 峰形与分离度较好, 故选择 4 号峰白菖烯 (calarene) 为参照峰 (S), 计算共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.5%, 但共有峰相对峰面积为 16.02%~105.79%, 差异较大, 表明 27 批甘松挥发油样品中 15 个共有成分之间含量差异较大。以 S19 为参照图谱, 生成 27 批甘松挥发油指纹图谱, 27 批甘松挥发油的相似度为 0.932~0.994, 相似度均大于 0.900, 说明不同甘松挥发油批次整体相似度较高, 相似度评价见表 3。

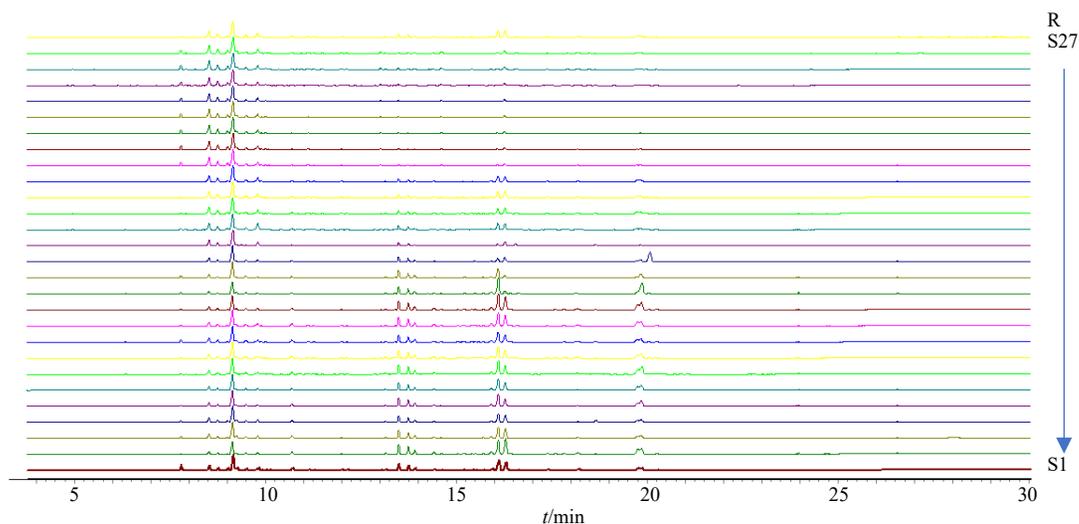
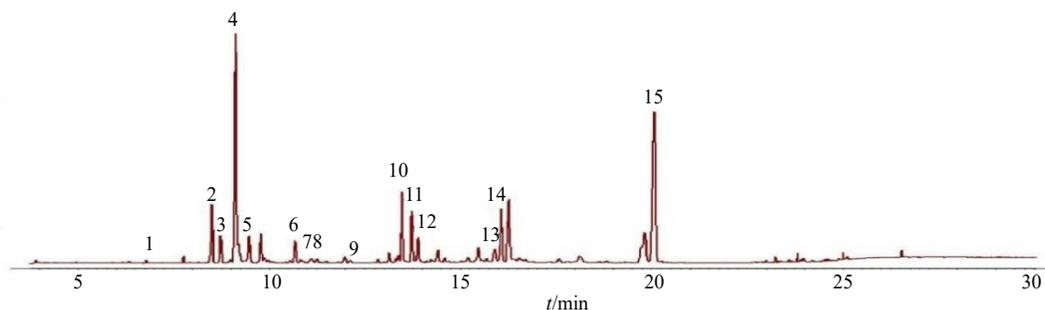


图 2 甘松挥发油指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of volatile oil of *N. jatamansi*



1- β -广藿香烯; 2- β -马里烯; 3-马兜铃烯; 4-白菖烯; 5-西车烯; 6- β -紫罗兰酮; 7- α -愈创木烯; 8- δ -愈创木烯; 9- δ -葑澄茄烯; 10-马榄醇; 11-1H-cycloprop[e]azulen-7-ol; 12-蓝桉醇; 13- β -愈创木烯; 14-百秋李醇; 15-马兜铃酮。

1- β -patchoulene; 2- β -maaliene; 3-aristolene; 4-calarene; 5-seychellene; 6- β -ionone; 7- α -guaiene; 8- δ -guaiene; 9- δ -cadinene; 10-maali alcohol; 11-1H-cycloprop[e]azulen-7-ol; 12-($-$)-globulol; 13- β -guaiene; 14-patchouli alcohol; 15-aristolone.

图 3 甘松挥发油共有成分

Fig. 3 Common components of volatile oil of *N. jatamansi*

表 3 27 批甘松挥发油相似度评价结果

Table 3 Similarity evaluation results of 27 batches of volatile oil of *N. jatamansi*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.984	S10	0.988	S19	0.936
S2	0.990	S11	0.964	S20	0.985
S3	0.982	S12	0.948	S21	0.946
S4	0.982	S13	0.967	S22	0.986
S5	0.978	S14	0.975	S23	0.983
S6	0.994	S15	0.932	S24	0.990
S7	0.983	S16	0.968	S25	0.968
S8	0.989	S17	0.946	S26	0.945
S9	0.993	S18	0.965	S27	0.988

2.6 基于化学模式识别对甘松挥发油的分析

2.6.1 聚类分析 (cluster analysis, CA) 利用 SPSS.26.0 软件以甘松挥发油指纹图谱标定的 15 个共有峰的峰面积为变量, 对 27 批甘松挥发油数据进行 CA, 采用组间连接的聚类方法, 以块为样品间距离进行 CA, 结果见图 4。当分类距离 15 时, 显示 27 批甘松挥发油样品共聚为 4 类, 其中 S1 单独聚为一类, 是 27 批样品中唯一产自四川省甘孜藏族自治州的甘松药材; S2~S13 聚为一类, 这 12 批甘松药材均产自阿坝藏族羌族自治州; S14~S19 聚为一类, 其中 S14~S16 产自青海省黄南州河南县和果洛州久治县, S17 和 S18 均产自甘肃省甘南州玛曲县, 只有 S19 产于四川省阿坝藏族

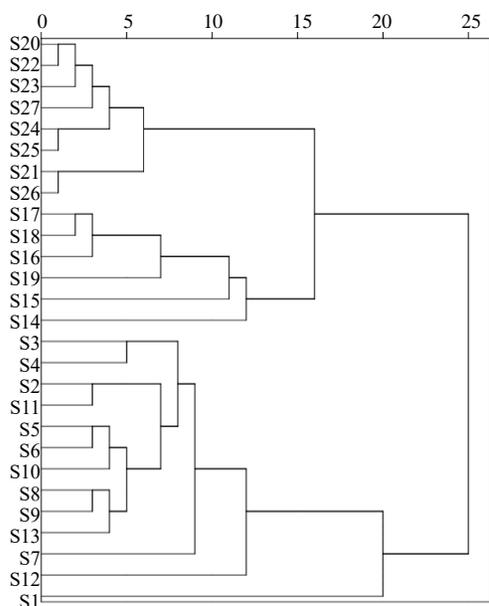


图 4 27 批甘松挥发油聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of 27 batches of volatile oil of *N. jatamansi*

羌族自治州阿坝县; S20~S27 聚为一类, 其均为生产于阿坝州红原天然产物有限责任公司的甘松挥发油产品。

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 采用 SPSS.26.0 软件对 27 批甘松挥发油的 15 个共有峰峰面积进行降维标准化处理, 计算相关系数载荷矩阵、特征值和累计方差贡献率, 结果显示 KMO 值为 0.822 > 0.5, 代表各变量相关性较好, 以主成分特征值 > 1 为提取标准, 提取得到 2 个主成分 (L1 和 L2), 主成分累积方差贡献率为 92.224%, 结果见表 4, 能最大反映甘松挥发油样品共有峰的信息, 以主成分因子变量绘制公因子碎石图, 见图 5, 结果显示特征值较高的 2 个主成分因子的斜率更大, 说明所提取的 2 个主成分可以最大程度地代表甘松挥发油的整体质量特征。因此可将这 2 个主成分作为甘松挥发油的评价指标。初始因子载荷矩阵, 见表 5, 将其进行正交旋转, 旋转后

表 4 特征值及累积方差贡献率

Table 4 Eigenvalue and cumulative variance contribution rate

成分	初始特征值		
	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
L1	10.370	69.130	69.130
L2	3.464	23.094	92.224

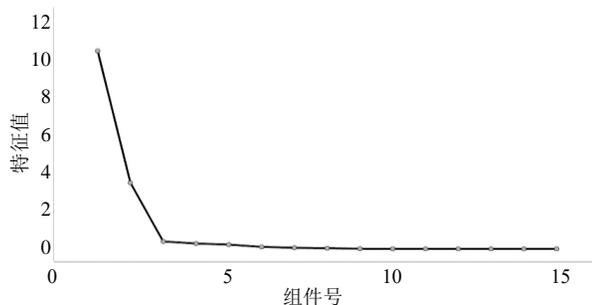


图 5 公因子碎石图

Fig. 5 Common factor gravel map

表 5 初始因子载荷矩阵

Table 5 Initial factor load matrix

共有峰	载荷		共有峰	载荷	
	L1	L2		L1	L2
1	0.668	0.569	9	0.796	0.153
2	0.755	0.640	10	0.857	-0.501
3	0.754	0.639	11	0.842	-0.522
4	0.886	0.425	12	0.880	-0.459
5	0.921	0.327	13	0.827	-0.531
6	0.927	-0.278	14	0.797	-0.584
7	0.902	0.386	15	0.743	-0.529
8	0.869	0.386			

得到的 15 个共有峰成分在 2 个主成分中的旋转矩阵,反映了各变量对主成分的贡献大小,其绝对值越大对该成分在决定样品区分中的作用越大。载荷矩阵结果表明主成分 1 信息主要来自 4 号峰白菖烯、5 号峰西车烯、6 号峰 β -紫罗兰酮、7 号峰 α -愈创木烯、8 号峰 δ -愈创木烯、10 号峰马榄醇、11 号峰 1*H*-cycloprop[e]azulen-7-ol、12 号峰蓝桉醇和 13 号峰 β -愈创木烯,主成分 2 信息主要来自 1 号峰 β -广藿香烯、2 号峰 β -马里烯和 3 号峰马兜铃烯,并根据主成分载荷矩阵,计算 2 个主成分得分,2 个主成分得分表达式: $L_1 = -0.444 X_1 - 23 X_2 - 0.232 X_3 + 0.212 X_4 + 0.355 X_5 + 0.38 X_6 + 0.276 X_7 + 0.147 X_8 - 0.107 X_9 + 0.102 X_{10} + 0.048 X_{11} + 0.189 X_{12} - 0.004 X_{13} - 0.103 X_{14} - 0.263 X_{15}$ 。 $L_2 = 0.345 X_1 + 0.437 X_2 + 0.435 X_3 + 0.191 X_4 + 0.113 X_5 + 0.086 X_6 + 0.158 X_7 + 0.158 X_8 + 0.024 X_9 + 0.275 X_{10} + 0.3 X_{11} + 0.232 X_{12} +$

$0.309 X_{13} + 0.373 X_{14} + 0.307 X_{15}$ 。将 27 批甘松挥发油样品各特征向量标准化,代入主成分得分表达式中计算主成分得分,再以每个主成分所对应的贡献率占所提取主成分总的贡献率之和的比例作为权重计算主成分综合模型: $L_{综} = -0.246 X_1 - 0.063 X_2 - 0.065 X_3 + 0.207 X_4 + 0.63 X_5 + 0.306 X_6 + 0.246 X_7 + 0.15 X_8 - 0.074 X_9 + 0.145 X_{10} + 0.111 X_{11} + 0.2 X_{12} + 0.074 X_{13} + 0.016 X_{14} - 0.120 X_{15}$ 。2 个主成分得分及综合得分情况见表 6,根据综合得分,其中 S1 得分 2.914 最高,可单独聚为一类; S2~S11、S13~S19、S21 得分大于 1 而小于 2.9,可单独聚为一类; S12、S20、S22~S27 得分小于 1,可聚为一类,与聚类分析结果大致相同。根据综合得分可知,其值越大表明峰面积相对越大,说明药材含量相对含量越高,可知, S1 批次含量最高, S2~S11、S13~S19、S21 批次数之, S12、S20、S22~S27 样品批次最后。

表 6 主成分得分和综合得分

Table 6 Principal component score and comprehensive score table

编号	L1得分	L2得分	总得分	排名	编号	L1得分	L2得分	总得分	排名
S1	0.798	7.353	2.914	1	S26	-0.168	3.639	1.421	15
S4	1.605	4.163	2.629	2	S2	0.922	2.758	1.409	16
S3	1.276	3.711	2.167	3	S9	0.749	2.584	1.387	17
S7	1.041	4.541	2.159	4	S21	-0.162	3.363	1.325	18
S19	0.920	3.152	2.008	5	S11	0.627	3.032	1.307	19
S10	1.096	3.430	1.848	6	S13	0.506	2.142	1.228	20
S16	1.020	2.711	1.822	7	S20	-0.271	2.759	0.974	21
S18	0.937	2.633	1.814	8	S25	-0.155	2.283	0.941	22
S6	0.939	3.295	1.746	9	S22	-0.246	2.633	0.926	23
S15	1.107	2.726	1.629	10	S27	-0.400	3.116	0.855	24
S5	0.636	3.425	1.546	11	S24	-0.211	1.912	0.743	25
S14	1.280	1.089	1.483	12	S23	-0.692	2.585	0.680	26
S17	0.793	2.360	1.480	13	S12	-0.423	2.635	0.458	27
S8	0.885	2.436	1.446	14					

2.6.3 正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 为了进一步区分不同产地的甘松挥发油组内质量差异,将 27 批样品 15 个共有峰峰面积导入 SIMAC13.0 软件进行 OPLS-DA 方法分析,建立 OPLS-DA 模型,见图 6,结果显示 27 批甘松挥发油样品被分为 4 类,与聚类分析和主成分分析结果一致,结合 OPLS-DA 模型中变量重要性投影值(variable importance projection, VIP)进行分析,以 $VIP > 1$ 为条件筛选出

差异标志物,筛选出 6 个差异标志物,对甘松挥发油样品的影响程度依次为 4 号峰(白菖烯) > 14 号峰(百秋李醇) > 2 号峰(β -马里烯) > 15 号峰(马兜铃酮) > 10 号峰(马榄醇) > 3 号峰(马兜铃烯),其对应的 VIP 值依次为 1.717、1.689、1.461、1.147 和 1.137,见表 7,说明白菖烯(4 号峰)、百秋李醇(14 号峰)、 β -马里烯(2 号峰)、马兜铃酮(15 号峰)、马榄醇(10 号峰)及马兜铃烯(3 号峰)是不同产地的甘松挥发油的差异标志物。

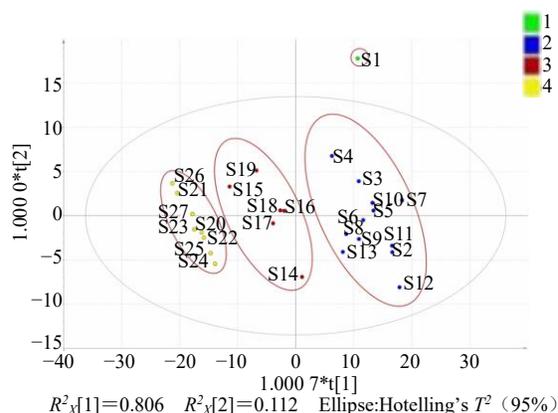


图6 甘松挥发油样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA score plot of volatile oil of *N. jatamansi*

表7 甘松挥发油各成分 VIP 值

Table 7 VIP values of each component of volatile oil of *N. jatamansi*

峰号	VIP值	峰号	VIP值
4	1.718	12	0.723
14	1.689	13	0.648
2	1.461	5	0.456
15	1.147	6	0.455
10	1.137	7	0.297
3	1.006	8	0.199
11	0.977	9	0.046

2.7 抑菌活性研究

2.7.1 菌种活化 参考《中国药典》2020年版^[1]三部一微生态活菌制品总论和 ATCC 数据库 (<https://www.atcc.org/products/43504>)。

2.7.2 菌液制备及活性测定 用无菌的 20%甘油溶液稀释到浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液 (麦氏浊度=2, $A_{600}=1$)。

将菌种接种到新鲜培养基中,静置 30 min。将接种后的平板分为 4 个区,用牛津杯贴在平板指定位置。甘松挥发油用正己烷稀释,按比例配制成 2 (50%)、4 (25%)、8 (12.5%)、16 (6.25%)、32 (3.1%)、64 (1.6%)、12 (0.8%)、256 (0.4%)、512 (0.2%)、1024 (0.1%) 10 个梯度。每个牛津杯中加入 100 μ L 药液,阴性参照加 100 μ L 无菌正己烷。放入培养箱中培养适当时间。观察结果,使用游标卡尺记录抑菌圈结果。

结果显示,甘松挥发油对鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌没有抑菌效果,对红色毛癣菌、须癣毛癣菌、牙龈卟啉单胞菌、幽门螺旋杆菌、肺炎链球菌有明显抑菌效果,其最小抑菌浓度分别为 0.4%、0.8%、1.6%、3.1%、6.25%。

3 讨论

甘松为青藏高原特色药用植物,分布于海拔 3 000~4 500 m 的沼泽草甸、河漫滩和灌丛草坡,是中、藏、蒙等多民族临床常用的大品种^[1-3]。由于甘松药材获取完全依靠野生,资源已日渐匮乏,为我国二级保护藏药^[10],同时被列入《濒危野生动植物物种国际贸易公约》和《国家重点保护野生植物目录》。因此,开展甘松资源保护与可持续利用迫在眉睫。甘松挥发油为甘松根及根茎经水蒸气蒸馏法提取获得一类挥发性小分子物质,具有镇静、抗炎、抗菌等多种药理活性,广泛应用于保健、日化产品等,远销印度、尼泊尔等国家。但其产业化过程中尚存在化学成分不清晰、缺乏完善质量控制体系等,在一定程度上影响其市场上竞争力。因此,本研究针对甘松挥发油在产业化过程中存在问题,从化学成分分析、差异标志物、抑菌活性等方面进行研究,并开展挥发油品质评价,建立完善质量评价体系,为后续以甘松挥发油为原料的系列产品开发奠定坚实基础。

在建立甘松挥发油 GC-MS 指纹图谱的过程中,系统考察了初始温度、溶剂和分流比对谱图的影响,结果表明:初始温度为 80 $^{\circ}$ C、溶剂为正己烷、分流比为 10:1 时,谱图峰形、分离度较好。27 批甘松挥发油样品中,共鉴别出 75 个成分,主要成分有白菖烯 (9.88%~32.76%), ledene oxide-(II) (0~14.92%)、百秋李醇 (1.13%~13.28%) 等,其中 27 批甘松挥发油有 15 个共有成分。

CA 与 PCA 结果表明,不同产地的甘松挥发油在化学组成和主要成分的含量上既有相似性又有差异性,采用 OPLS-DA 模型 VIP 值筛选出白菖烯、百秋李醇、 β -马里烯、马兜铃酮、马榄醇及马兜铃烯是甘松挥发油的差异性特征差异标志物。研究表明白菖烯具有镇静作用也是甘松挥发油的主要成分^[11-13],同时有抗疟疾、登革热和丝虫病蚊子的作用^[14],百秋李醇具有抗炎、抑菌的作用,且具有治疗幽门螺旋杆菌相关慢性胃炎的作用,从而达到改善幽门螺旋杆菌相关慢性胃炎的症状^[15-18],与甘松挥发油的镇静、抗炎、抗疟和抑菌功效有一定关联性。结合化学模式识别对指纹图谱中提取共有峰的面积进行分析,筛选出白菖烯、百秋李醇、 β -马里烯、马兜铃酮、马榄醇及马兜铃烯作为甘松挥发油的差异标志物,为甘松挥发油质量评价及临床应用提供参考。

明代《本草易读》记载甘松“开脾气之郁结，洗脚气之浮肿”“最治风疔，兼疗齿”^[19]，《中国药典》2020年版记载甘松“外用治牙痛，脚气肿毒”的作用^[1]。现代研究表明，脚气与红色毛癣菌和须癣毛癣菌2种真菌密切相关^[20-22]；牙龈卟啉单胞菌是牙周病变区最主要的优势菌，在慢性牙周炎、侵袭性牙周炎、牙周脓肿等的发生、发展中起重要作用^[23]。故本研究紧密结合甘松古籍文献记载，选择红色毛癣菌、须癣毛癣菌、牙龈卟啉单胞菌等7种致病菌开展抑菌活性研究，结果表明，除对鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌没有抑菌效果外，对红色毛癣菌、须癣毛癣菌、牙龈卟啉单胞菌、幽门螺旋杆菌、肺炎链球菌有明显抑菌效果，最小抑菌浓度分别为0.4%、0.8%、1.6%、3.1%、6.25%，不仅验证古人用甘松治疗“脚气”和“牙病”的正确性，亦可为后续以甘松挥发油为原料的大健康系列产品开发奠定数据支撑。

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: 56.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第七十三卷第一分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1986: 25.
- [3] 李莹, 金乾, 群培, 等. 传统药用植物甘松的植物学名考 [J]. 中药材, 2017, 40(6): 1474-1477.
- [4] 金乾, 李莹, 刘哲, 等. 基于总量统计矩法综合评价不同产地甘松挥发油成分 [J]. 中成药, 2018, 40(9): 2025-2029.
- [5] 于素玲, 叶霄, 贾国夫, 等. 青藏高原药用植物甘松研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 243-250.
- [6] 李海亮, 龚慕辛, 仝燕. 甘松挥发油 β -环糊精包合物的制备 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 676-682.
- [7] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准: 2003年版 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 36.
- [8] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [9] 李旭领, 郭月婷, 王一佳, 等. 药用植物挥发油的抗菌作用及机制研究进展 [J]. 动物医学进展, 2022, 43(5): 97-101.
- [10] 孙嘉磊, 阿依佐合热, 王海生, 等. 新疆维吾尔自治区常用维药、药源植物调查 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(8): 1980-1982.
- [11] 武子敬. 甘松挥发油化学成分 GC-MS 分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(31): 17465-17466.
- [12] 贺玉琢. 吸入甘松香具有镇静作用 [J]. 国际中医中药杂志, 2006, 28(2): 113.
- [13] Takemoto H, Ito M, Shiraki T, *et al.* Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components [J]. *J Nat Med*, 2008, 62(1): 41-46.
- [14] Govindarajan M, Rajeswary M, Benelli G. δ -Cadinene, calarene and δ -4-carene from kadsura *Heteroclita* essential oil as novel larvicides against malaria, dengue and filariasis mosquitoes [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2016, 19(7): 565-571.
- [15] 赵思蕾, 熊亮, 王振强, 等. 基于成分敲除/敲入研究广藿香油抗菌主要药效物质 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(5): 707-712.
- [16] 连大卫. 百秋李醇治疗幽门螺杆菌感染的相关胃炎作用及机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [17] 谢建辉. 广藿香醇抗幽门螺杆菌相关性胃炎机理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [18] 周雪亮, 周渊, 朱强, 等. 幽门螺旋杆菌的研究进展 [J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(33): 101-104.
- [19] 清·汪沔庵撰. 本草易读 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 56.
- [20] 郑文爱, 乔凤, 唐小正, 等. 106株红色毛癣菌基因分型与药敏分析 [J]. 中国真菌学杂志, 2022, 17(5): 363-367.
- [21] 张祉思, 侯捷, 唐春萍, 等. 香鳞毛蕨有效部位乳膏体内外抗须癣毛癣菌作用的评价 [J]. 中成药, 2021, 43(10): 2834-2840.
- [22] 王鹏, 李梅娇, 符磊, 等. 复方三酸散浸泡治疗足癣临床观察 [J]. 中国药业, 2021, 30(8): 67-69.
- [23] 王冠儒, 冯强. 牙龈卟啉单胞菌在阿尔兹海默症发生中作用的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2022, 49(4): 397-403.

[责任编辑 时圣明]