

基于“蛛网”模式和 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的甘松多成分含量测定

岳道乾^{1,2}, 林林^{1,2}, 谭乐俊², 孙仟², 高文燕³, 张德馨^{4*}, 林永强^{1,2*} (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东省食品药品检验研究院, 山东省中药标准创新与质量评价工程实验室, 济南 250101; 3. 新泰市人民医院耳鼻喉科, 山东 泰安 271200; 4. 山东协和学院, 济南 250109)

摘要:目的 基于“蛛网”模式,采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 法建立甘松中 6 种倍半萜成分的含量测定方法。方法 采用“蛛网”模式,确定甘松中 6 种倍半萜的提取方法;采用 Waters CORTECS™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm);以乙腈为流动相 A,体积分数 0.05% 甲酸溶液(含 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵)为流动相 B,梯度洗脱,流速 0.5 mL · min⁻¹;柱温 35 °C;电喷雾正离子模式进行检测。结果 “蛛网”结果显示,最佳提取条件为甲醇提取,料液比 1:12.5,加热回流 30 min。去氧甘松醇 A、甘松新酮二醇、甘松香酮 A、Axinyson B、甘松新酮、甘松香酮 H 分别在 0.386 4 ~ 1.425 6、0.366 3 ~ 2.424 5、0.462 1 ~ 1.458 8、0.639 7 ~ 1.783 2、3.542 5 ~ 14.657 6 和 0.432 7 ~ 1.439 3 μg · mL⁻¹ 内与峰面积积分值的线性关系良好,相关系数 *r* 均不小于 0.999 3;6 个成分的平均加样回收率为 101.42%、99.48%、95.58%、97.10%、102.34% 和 97.75%;将结果通过聚类分析和偏最小二乘法(PLS-DA)进行分析评价,结果显示甘松的潜在差异标志物为甘松新酮、甘松香酮 A 和甘松香酮 H。结论 本研究建立的方法能够实现甘松中 6 种倍半萜成分的快速、准确定量分析,可以为甘松的质量评价提供参考。

关键词:甘松;多成分含量测定;“蛛网”模式;多元统计分析;高分辨质谱

doi:10.11669/cpj.2024.21.011 中图分类号:R284 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)21-2075-09

Quantitative Determination of Multiple Components in *Nardostachys jatamansi* DC. Based on “Spider-web” Model and UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

YUE Daoqian^{1,2}, LIN Lin^{1,2}, TAN Lejun², SUN Qian², GAO Wenyan³, ZHANG Dexin^{4*}, LIN Yongqiang^{1,2*} (1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Engineering Laboratory for Standard Innovation and Quality Evaluation of TCM, Shandong Provincial Institute of Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 3. Otolaryngology Department, The People's Hospital of Xintai City, Taian 271200, China; 4. Shandong Xiehe University, Jinan 250109, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS method to determine the contents of six sesquiterpenes in *Nardostachys jatamansi* DC. based on the ‘spider web’ model. **METHODS** The extraction methods of six sesquiterpenes in *Nardostachys jatamansi* DC. were studied and determined by cobweb mode. Waters CORTECS™ C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm) was used. Acetonitrile was used as mobile phase A, and 0.05% formic acid solution containing 5 mmol · L⁻¹ ammonium formate was used as mobile phase B. Gradient elution was conducted at a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹. The column temperature was maintained at 35 °C. Detection was carried out in electrospray positive ion mode. **RESULTS** The results of spider web showed that the optimum extraction conditions were methanol extraction: solid-liquid = 1:12.5, heating reflux for 30 min. Deoxyeugenol A, nardosinonediol, nardosinone A, axinyson B, nardosinone and nardosinone H had good linear relationship with the peak area integral value in the range of 0.386 4 – 1.425 6, 0.366 3 – 2.424 5, 0.462 1 – 1.458 8, 0.639 7 – 1.783 2, 3.542 5 – 14.657 6 and 0.432 7 – 1.439 3 μg · mL⁻¹, respectively, and the correlation coefficients (*r*) were not less than 0.999 3. The average recoveries of the six components were 98.39%, 100.05%, 100.35%, 97.13%, 102.84% and 97.15%, respectively. The results were analyzed and evaluated by clustering and partial least squares (PLS-DA). The results showed that the potential differential markers of *Nardostachys jatamansi* DC were nardosinone, nardosinone A and nardosinone H. **CONCLUSION** The method established in this study can realize the rapid and accurate quantitative analysis of six sesquiterpenes in *Nardostachys jatamansi* DC, which can provide reference for the quality evaluation of *Nardostachys jatamansi* DC.

KEY WORDS: *Nardostachys jatamansi* DC.; multi-component content determination; ‘spider web’ model; multivariate statistical analysis; high resolution mass spectrometry

基金项目:国家重点研发计划(中医药现代化)课题资助(2023YFC3504102);“新高校 20 条”科研带头人工作室项目资助(202228096);泉城产业领军人才支持计划创新团队项目资助(MRJT2105)

作者简介:岳道乾,男,硕士研究生 研究方向:药物分析学研究 * **通讯作者:**林永强,男,博士,主任药师 研究方向:药品质量控制研究 Tel:(0531)81216521

甘松(*Nardostachys jatamansi* DC.)为败酱科植物甘松的干燥的根及根茎,在中国和印度的传统医学中应用广泛,自唐代陈藏器《本草拾遗》首次记载以来^[1],被用于治疗多种疾病,包括心悸、气滞肝郁等^[2-3],其药理作用主要归功于其独特的倍半萜类成分^[4-6]。近年来,甘松的化学成分和药理作用得到了深入研究,但关于其有效成分含量测定和药材质量控制的研究仍相对有限^[7-9]。

Maiwulanjiang 等^[10]建立了甘松甲醇提取物 HPLC 指纹图谱,对甘松新酮进行了定量分析,但提取条件的优化尚不全面,从而限制了提取效率和结果的可靠性,不能反映甘松药材的整体质量。Le 等^[11]改进了高效液相色谱法,同时测定 desoxo-narchinol A、甘松二萜酮和甘松新酮,但仍存在未能涵盖其他可能影响甘松整体质量的倍半萜类生物活性成分的问题。“蛛网”模式作为一种多参数评估领域的创新工具, Yang 等^[12]首次将“蛛网”模式应用于中药研究,成功筛选出丹红注射液中的关键质量标志物。Yang 等^[13]的研究进一步证实了“蛛网”模式在中药炮制方法科学性评价中的有效性。该模式可直观展示多个评价指标,有效地揭示了复杂系统的整体表现和各组分之间的相互影响,将该模式与提取方法结合或为最佳提取工艺的选择提供新的解决思路。

本研究结合超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术和“蛛网”模式,建立了一种快速、准确的甘松多成分含量测定方法,有望为甘松药材的质量控制和标准化提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(Q-Exactive-Orbitrap-MS)、UltiMateTM 3000 超高效液相色谱

系统(美国赛默飞世尔科技公司);十万分之一电子天平(美国梅特勒托利多科技有限公司);万能高速粉碎机(天津泰斯特有限公司);电热恒温水浴锅(上海树立仪器有限公司)。

1.2 材料

甘松新酮对照品(纯度 98.2%,批号:111832-201704,中国食品药品检定研究院);去氧甘松醇 A(纯度 98.0%,批号:PS2891-0005MG)、甘松新酮二萜(纯度 98.0%,批号:PS013052)、甘松香酮 A(纯度 98.0%,批号:PS2890-0005MG)、Axinyson B(纯度 98.0%,批号:PS013043)、甘松香酮 H(纯度 98.0%,批号:PS2814-0005MG)(成都普思生物科技股份有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯;甲酸、甲酸铵均为优级纯;甘松药材共 18 批(编号 S1~S18),其中 S1~S14 产地为四川,S15~S18 产地为甘肃,经山东省食品药品检验研究院汪冰主任中药师鉴定,均为败酱科植物甘松(*Nardostachys jatamansi* DC.)的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 仪器分析条件

色谱条件:色谱柱 Waters CORTECSTM C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm),以乙腈为流动相 A,以体积分数 0.05% 甲酸溶液(含 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵)为流动相 B,梯度洗脱:0~16 min, 10%~40% A; 16~20 min, 40%~60% A; 20~25 min, 60%~62% A; 25~30 min, 62%~80% A; 流速:0.5 mL · min⁻¹; 柱温:35 °C; 进样量:1 μL。

质谱条件:ESI 离子源,正离子检测模式;电压 3.6 kV;离子传输管温度 320 °C;辅助气温度 320 °C;扫描模式:Full MS/dd-MS2;Full Ms 分辨率 70 000;离子扫描范围(*m/z*) 90~1 350。各成分的质谱信息见表 1,质谱图及色谱图见图 1~2。

表 1 甘松中 6 种倍半萜类成分质谱信息

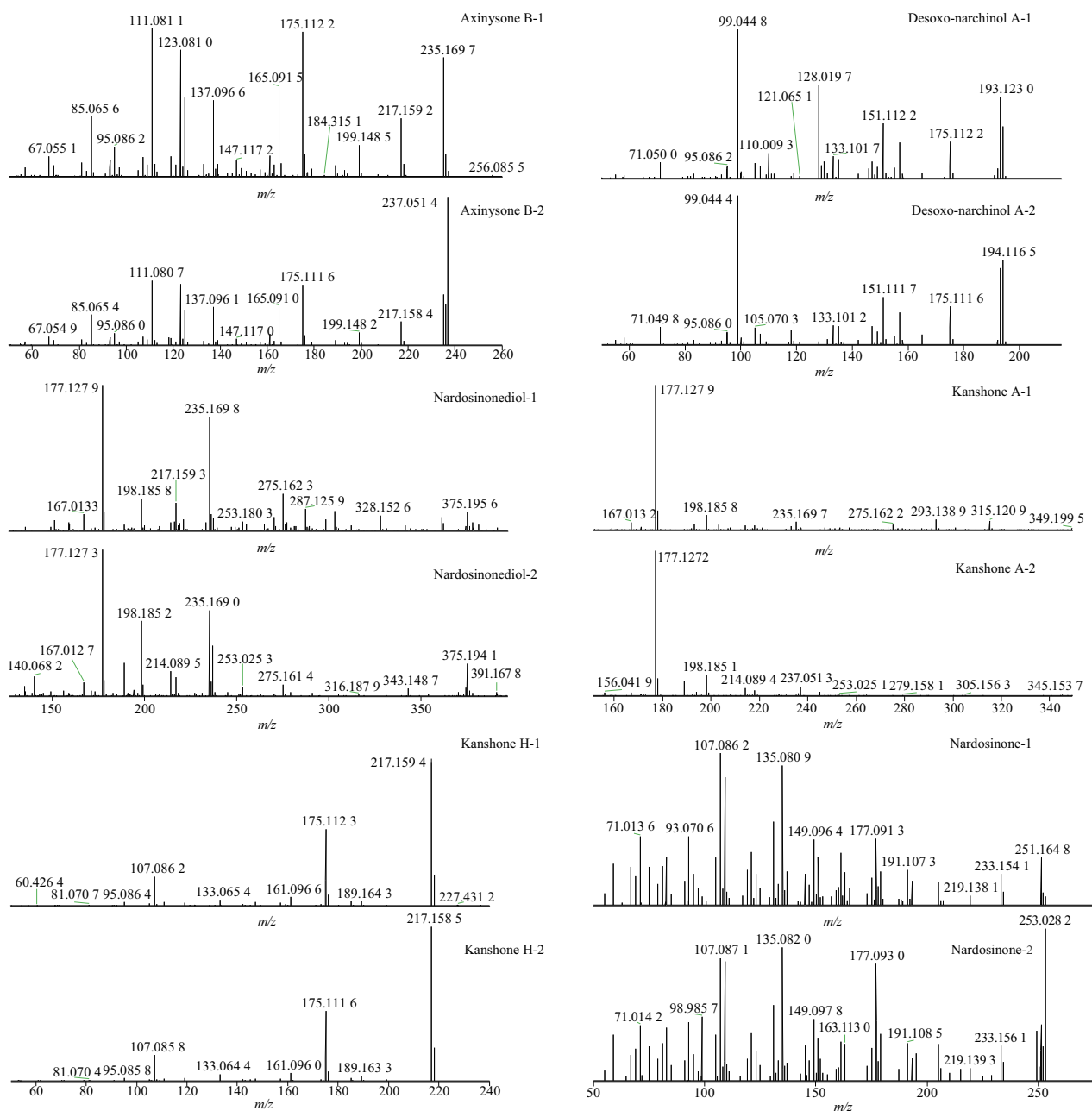
Tab. 1 Mass spectrum information of six sesquiterpenoids in *Nardostachys jatamansi* DC.

| Compound | Mode | Molecular | <i>m/z</i> (Precursor ion) | <i>m/z</i> (Measured) |
|--------------------|----------------------|--|----------------------------|-----------------------|
| Desoxo-narchinol A | [M + H] ⁺ | C ₁₂ H ₁₆ O ₂ | 193.122 3 | 193.123 0 |
| Nardosinonediol | [M + H] ⁺ | C ₁₅ H ₂₄ O ₃ | 253.179 8 | 253.180 3 |
| Kanshone A | [M + H] ⁺ | C ₁₅ H ₂₂ O ₂ | 235.169 3 | 235.169 7 |
| Axinyson B | [M + H] ⁺ | C ₁₅ H ₂₂ O ₂ | 235.169 3 | 235.169 7 |
| Nardosinone | [M + H] ⁺ | C ₁₅ H ₂₂ O ₃ | 251.164 2 | 251.164 8 |
| Kanshone H | [M + H] ⁺ | C ₁₅ H ₂₀ O | 217.158 7 | 217.159 4 |

2.2 供试品溶液制备

本研究基于“蛛网”模式的研究思路,考察不同

提取溶剂、提取时间、提取方式以及料液比等单一变量对提取效率影响的实验中,对甘松药材中 6 个



1 - 样品; 2 - 对照品。

1 - the sample; 2 - the control.

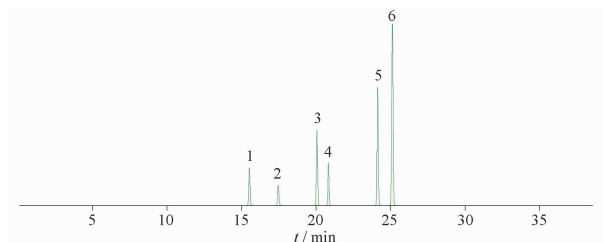
图 1 甘松样品中 6 种倍半萜类成分质谱图

Fig. 1 Mass spectra of six sesquiterpenoids in the sample

倍半萜成分进行了整体分析。通过对比分析不同实验条件下甘松中各成分含量的变化,筛选出最优的供试品溶液制备条件。本研究选择甲醇作为提取溶剂,主要基于其高效性和稳定性。倍半萜类成分极性较小,甲醇能够有效提取目标成分,并保证测定结果的准确性和重复性。

在评估特定因素(例如提取溶剂)对提取效率的影响时,本研究首先计算了在不同设定条件(如体积分数 20% 甲醇、体积分数 50% 甲醇、甲醇和水)下,6 种

主要倍半萜类成分所得到的色谱峰面积与该因素下得到的最大色谱峰面积之间的比率。这一步骤产生的归一化数据(P 值)分别标记为 $P_1 \sim P_6$,以此反映各成分在特定提取条件下的表现。在分别计算 6 个成分于不同提取变量下的 P 值,并进行归一化处理后,相加得到 6 个成分的回归面积。此方法可消除大数据波动造成的分析偏差,并用于构建“蜘蛛网”模式的内容维度。进一步利用以下公式综合评估每种候选条件下的提取效率,通过计算回归面积(S 值)来实现(公式 1)。



1 - 去氧甘松醇 A; 2 - 甘松新酮二醇; 3 - 甘松香酮 A; 4 - Axinysonone B; 5 - 甘松新酮; 6 - 甘松香酮 H。

1 - desoxo-narchinol A; 2 - nardosinonediol; 3 - kanshone A; 4 - axinysonone B; 5 - nardosinone; 6 - kanshone H.

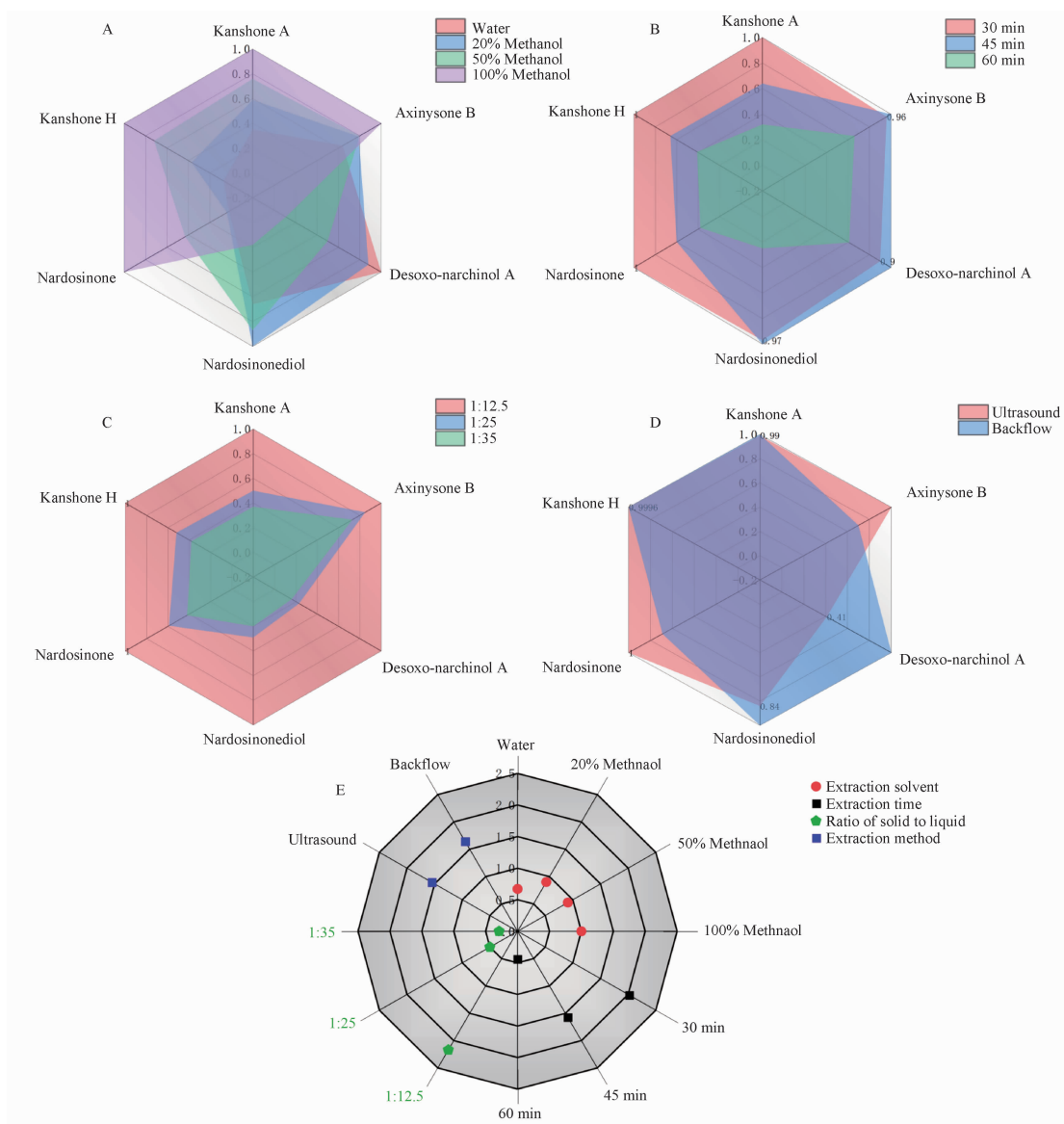
图2 甘松样品中6种倍半萜类成分色谱图

Fig. 2 Chromatographic chromatograms of six sesquiterpenoids in *Nardostachys jatamansi* DC.

$$S = \frac{1}{2} \sin \alpha \left(\sum_{i=1}^{n-1} P_{i+1} + P_n \times P_1 \right) \quad \text{公式(1)}$$

式中, S 为候选提取条件的回归面积; α 为相邻变量之间的角度; P 为变量的归一化值。

通过计算单因素实验下“蛛网”上候选化合物的回归面积, 综合评价指标化合物的提取效率(图3, 表2), 得到最优的提取条件为: 取本品粉末 2 g, 精密称定, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 1 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。



A - 提取溶剂; B - 提取时间; C - 料液比; D - 提取方式; E - 回归面积蛛网图。

A - extraction solvent; B - extraction time; C - ratio of solid to liquid; D - extraction method; E - spider web diagram of regression area.

图3 甘松各提取条件下蜘蛛网回归面积结果

Fig. 3 The results of spider web regression area under each extraction condition in *Nardostachys jatamansi* DC.

表2 甘松各提取条件下蜘蛛网回归面积结果

Tab. 2 The results of spider web regression area under each extraction condition in *Nardostachys jatamansi* DC.

| Extraction conditions | P1 (desoxo-narchinol A) | P2 (nardosinonediol) | P3 (kanshone A) | P4 (axinysonone B) | P5 (nardosinone) | P6 (kanshone H) | S |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------|--------------------|------------------|-----------------|------|
| Extraction solvent | | | | | | | |
| Water | 1.00 | 0.66 | 0.35 | 0.64 | 0.02 | 0.07 | 0.67 |
| 20% Methanol | 0.88 | 1.00 | 0.59 | 0.79 | 0.04 | 0.37 | 0.90 |
| 50% Methanol | 0.50 | 0.87 | 0.76 | 0.80 | 0.43 | 0.72 | 0.91 |
| Methanol | 0.11 | 0.18 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Extraction time | | | | | | | |
| 30 min | 0.90 | 0.97 | 1.00 | 0.96 | 1.00 | 1.00 | 2.02 |
| 45 min | 1.00 | 1.00 | 0.64 | 1.00 | 0.60 | 0.66 | 1.57 |
| 1 h | 0.61 | 0.25 | 0.32 | 0.66 | 0.38 | 0.41 | 0.44 |
| Ratio of solid to liquid | | | | | | | |
| 1:12.5 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 2.17 |
| 1:25 | 0.23 | 0.29 | 0.50 | 0.85 | 0.59 | 0.52 | 0.50 |
| 1:35 | 0.16 | 0.20 | 0.37 | 0.73 | 0.42 | 0.38 | 0.29 |
| Extraction method | | | | | | | |
| Ultrasound | 0.41 | 0.84 | 0.99 | 1.00 | 1.00 | 0.99 | 1.55 |
| Refluxing | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.70 | 0.69 | 1.00 | 1.64 |

2.3 方法学考察

2.3.1 对照品溶液的制备 取6种对照品适量,加甲醇制成甘松新酮 $78.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;甘松新酮二醇 $8.008 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;甘松香酮 H $7.395 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;去氧甘松醇 A $4.769 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;Axinysonone B $8.488 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;甘松香酮 A $8.266 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液。

2.3.2 线性关系 精密吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液,分别进样 0.1、0.2、0.5、1、2、5 μL ,按“2.1”项下条件测定,以质量浓度 $x(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,计算6种成分的线性回归方程,结果见表3,各成分在相应线性范围内均呈良好的线性关系。

表3 甘松样品中6种倍半萜类成分的线性关系考察结果

Tab. 3 Linear relationship results of six sesquiterpenoids in *Nardostachys jatamansi* DC.

| Compound | Linearity | Linear Range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | r | Detection limit/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ | Limit of quantitation/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|--------------------|----------------------------|--|---------|---|---|
| Desoxo-narchinol A | $y = 2\,973.9x + 4\,991.2$ | 0.386 4 – 1.425 | 0.999 3 | 0.096 6 | 0.029 2 |
| Nardosinonediol | $y = 578.63x + 263.87$ | 0.366 3 – 2.424 | 0.999 8 | 0.081 4 | 0.024 3 |
| Kanshone A | $y = 2\,472.6x + 1\,931.1$ | 0.462 1 – 1.458 | 0.999 9 | 0.092 4 | 0.027 5 |
| Axinysonone B | $y = 6\,546.6x + 3\,646.7$ | 0.639 7 – 1.783 | 0.999 6 | 0.164 0 | 0.049 2 |
| Nardosinone | $y = 759.8x + 2\,882.5$ | 3.542 – 14.65 | 0.999 5 | 0.738 2 | 0.221 6 |
| Kanshone H | $y = 8\,448.5x + 992.41$ | 0.432 7 – 1.439 | 0.999 9 | 0.103 3 | 0.030 7 |

2.3.3 精密度试验 取混合对照品溶液,按“2.1”项下条件连续进样6次,每次1 μL ,记录峰面积。结果去氧甘松醇 A、甘松新酮二醇、甘松香酮 A、Axinysonone B、甘松新酮和甘松香酮 H 峰面积积分值的相对标准偏差(RSD)值分别为3.09%、2.49%、0.99%、2.35%、1.96%和1.49%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 同一批次甘松,平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下条件进样检测。结果去氧甘松醇 A、甘松新酮二醇、甘松香酮 A、Axinysonone B、甘松新酮和甘松香酮 H 含量测定结果的RSD值分别为3.14%、2.59%、2.90%、3.16%、1.85%和1.44%,表明方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取“2.3.4”项下供试品溶液1份,按“2.1”项下条件,分别于0、2、4、8、12和24 h

进样检测,记录峰面积积分值。去氧甘松醇 A、甘松新酮二醇、甘松香酮 A、Axinysonone B、甘松新酮和甘松香酮 H 峰面积积分值的RSD值分别为2.64%、2.94%、2.18%、1.20%、1.85%和1.67%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率实验 取已知含量的甘松,精密称取6份,每份约1 g,分别精密加入6个成分质量浓度为124.84、202.50、210.94、215.02、2110.70、194.32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品5 mL,精密加入甲醇20 mL,按“2.2”项条件制备供试品溶液,按“2.1”项条件进样检测,计算各成分的回收率,结果见表4。

2.4 样品的测定

取18批甘松样品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下条件进行测定,计算6种成分的含量,结果见表5。

表 4 甘松样品中 6 个成分的加样回收结果

Tab. 4 Results of recovery test of six components in *Nardostachys jatamansi* DC. samples

| Component | <i>m</i> (Sample) | <i>m</i> (Original) | <i>m</i> (Added) | <i>m</i> (Measured) | Recovery | Mean recovery | RSD |
|--------------------|-------------------|---------------------|------------------|---------------------|----------|---------------|------|
| | /g | /mg | /mg | /mg | /% | /% | /% |
| Desoxo-narchinol A | 1.045 | 0.623 2 | 0.624 2 | 1.269 | 103.51 | 101.42 | 3.12 |
| | 1.032 | 0.615 8 | 0.624 2 | 1.237 | 99.55 | | |
| | 1.043 | 0.622 3 | 0.624 2 | 1.254 | 101.23 | | |
| | 1.050 | 0.626 3 | 0.624 2 | 1.281 | 104.89 | | |
| | 1.046 | 0.623 7 | 0.624 2 | 1.271 | 103.81 | | |
| | 1.021 | 0.609 1 | 0.624 2 | 1.205 | 95.55 | | |
| Nardosinonediol | 1.016 | 1.017 | 1.012 | 2.058 | 102.78 | 99.48 | 2.16 |
| | 1.012 | 1.013 | 1.012 | 2.015 | 99.02 | | |
| | 1.013 | 1.014 | 1.012 | 2.018 | 99.16 | | |
| | 1.012 | 1.013 | 1.012 | 2.008 | 98.25 | | |
| | 1.015 | 1.017 | 1.012 | 2.044 | 101.50 | | |
| | 1.005 | 1.006 | 1.012 | 1.980 | 96.18 | | |
| Kanshone A | 1.016 | 1.050 | 1.054 | 2.095 | 99.12 | 95.58 | 3.69 |
| | 1.017 | 1.051 | 1.054 | 2.107 | 100.18 | | |
| | 1.005 | 1.038 | 1.054 | 2.030 | 94.07 | | |
| | 1.026 | 1.060 | 1.054 | 2.169 | 105.17 | | |
| | 1.006 | 1.040 | 1.054 | 2.043 | 95.08 | | |
| | 1.009 | 1.043 | 1.054 | 2.075 | 97.88 | | |
| Axinysone B | 1.012 | 1.074 | 1.075 | 2.135 | 98.69 | 97.10 | 0.98 |
| | 1.012 | 1.073 | 1.075 | 2.122 | 97.51 | | |
| | 1.010 | 1.072 | 1.075 | 2.117 | 97.21 | | |
| | 1.009 | 1.071 | 1.075 | 2.097 | 95.50 | | |
| | 1.011 | 1.073 | 1.075 | 2.115 | 96.89 | | |
| | 1.011 | 1.073 | 1.075 | 2.113 | 96.82 | | |
| Nardosinone | 1.070 | 10.56 | 10.55 | 21.42 | 102.93 | 102.34 | 1.35 |
| | 1.082 | 10.67 | 10.55 | 21.61 | 103.70 | | |
| | 1.065 | 10.50 | 10.55 | 21.17 | 101.13 | | |
| | 1.086 | 10.71 | 10.55 | 21.69 | 104.03 | | |
| | 1.032 | 10.18 | 10.55 | 20.95 | 102.12 | | |
| | 1.065 | 10.51 | 10.55 | 21.07 | 100.12 | | |
| Kanshone H | 1.075 | 0.994 4 | 0.971 6 | 1.942 | 97.55 | 97.75 | 0.94 |
| | 1.043 | 0.964 3 | 0.971 6 | 1.905 | 96.85 | | |
| | 1.062 | 0.982 2 | 0.971 6 | 1.947 | 99.35 | | |
| | 1.054 | 0.974 5 | 0.971 6 | 1.916 | 96.92 | | |
| | 1.039 | 0.961 2 | 0.971 6 | 1.906 | 97.25 | | |
| | 1.032 | 0.954 6 | 0.971 6 | 1.912 | 98.58 | | |

2.5 化学计量学分析

2.5.1 聚类分析 以测得的四川(S1 ~ S14)和甘肃(S15 ~ S18)两个不同产地的甘松样品中的 6 种倍半萜成分的含量为变量,分别导入 SPSS 26.0 软件进行聚类分析,结果见图 4,四川产地的样品除 S2 和 S4 外其余聚为 1 类,同为四川产地的样品 S2 和 S4 与甘肃产地的样品一起聚为第 2 类。

2.5.2 偏最小二乘-判别分析(PLS-DA) 由聚类分析可知来自四川和甘肃两个不同产地的样品在 6 种倍半萜类成分含量上表现出了组间差异。为了进

一步分析引起组间差异的原因,将这些样品的化学数据输入到 Simca 14.1 软件中,建立监督识别模式偏最小二乘法-判别分析模型。模型共提取 2 个主成分, X 矩阵结实率 R^2X 为 0.767,模型稳定性参数 R^2Y 为 0.644,模型预测能力参数 Q^2 为 0.502,均大于 0.5 (R^2Y 和 Q^2 越接近 1 说明所建立的模型稳定性和预测性越好),且 R^2Y 和 Q^2 二者差距小于 0.3,说明所建 PLS-DA 模型解释率和预测率均较好。设置分类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验,得置换检验图,见图 5。 R^2 拟合直线在 Y

表 5 甘松样品中 6 种倍半萜类成分含量测定结果。mg · g⁻¹

Tab. 5 Determination results of six sesquiterpenoids in *Nardostachys jatamansi* DC. samples. mg · g⁻¹

| No. | Desoxo-narchinol A | Nardosinonediol | Kanshone A | Axinysonone B | Nardosinone | Kanshone H |
|-----|--------------------|-----------------|------------|---------------|-------------|------------|
| S1 | 0.453 7 | 0.931 9 | 0.937 2 | 0.939 2 | 14.25 | 0.976 6 |
| S2 | 1.336 | 2.301 | 0.834 2 | 0.757 6 | 8.593 | 0.760 1 |
| S3 | 0.628 6 | 0.893 5 | 1.033 | 1.201 | 14.61 | 0.986 6 |
| S4 | 0.590 2 | 0.879 7 | 0.862 5 | 0.969 1 | 6.958 | 0.759 1 |
| S5 | 0.859 9 | 1.260 | 0.805 6 | 1.660 | 10.97 | 0.758 2 |
| S6 | 0.596 2 | 1.001 | 1.033 | 1.061 | 9.862 | 0.924 4 |
| S7 | 0.601 8 | 0.897 2 | 0.941 4 | 1.061 | 9.612 | 0.934 6 |
| S8 | 0.865 9 | 1.265 | 0.808 3 | 1.235 | 10.78 | 0.756 7 |
| S9 | 0.608 9 | 1.079 | 1.367 | 0.682 4 | 12.19 | 1.295 |
| S10 | 0.628 6 | 0.919 8 | 1.000 | 0.971 3 | 11.34 | 1.029 |
| S11 | 0.603 5 | 0.926 1 | 1.350 | 0.896 7 | 14.21 | 1.378 |
| S12 | 0.572 9 | 0.978 3 | 1.429 | 1.513 | 13.19 | 1.223 |
| S13 | 0.850 3 | 1.011 | 1.139 | 1.215 | 11.24 | 1.027 |
| S14 | 0.565 6 | 0.915 8 | 1.183 | 1.001 | 10.86 | 1.141 |
| S15 | 0.877 3 | 0.827 2 | 0.675 5 | 0.982 3 | 6.065 | 0.613 3 |
| S16 | 0.717 6 | 0.905 3 | 0.732 3 | 0.923 3 | 7.517 | 0.623 5 |
| S17 | 0.488 9 | 1.006 | 0.768 5 | 1.042 | 6.174 | 0.715 4 |
| S18 | 0.443 1 | 0.385 7 | 0.485 1 | 0.726 3 | 3.595 | 0.458 5 |

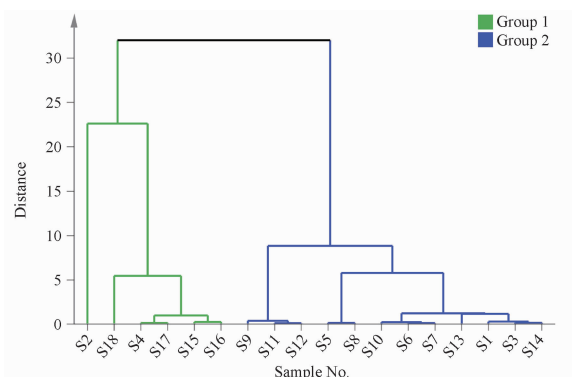


图 4 两个不同产地的甘松样品聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis plot of *Nardostachys jatamansi* DC. samples from two different origin places

坐标轴的截距为 0.159(应小于 0.3), Q^2 拟合直线在 Y 坐标轴的截距为 -0.246(应小于 0.05), 虽然略低,但在可接受范围内,满足模型验证的要求,证明本研究构建的模型是稳定的,不存在过度拟合现象,表明该模型对于区分 18 批甘松样品是有效的。PLS-DA 模型得分图和变量重要性投影值图(VIP 图)见图 6~7。18 批样品分布在 95% 置信区间内,6 种倍半萜类成分含量的不同,可聚为 2 类,区分明显,与聚类分析结果一致(图 6)。变量重要性投影(VIP)可直观体现各化合物引起组间差异的权重大小,化合物 VIP > 1 说明对样品分类结果权重影响率小于 50%,即对分类结果影响具有统计学意义,为差异标志物。甘松的

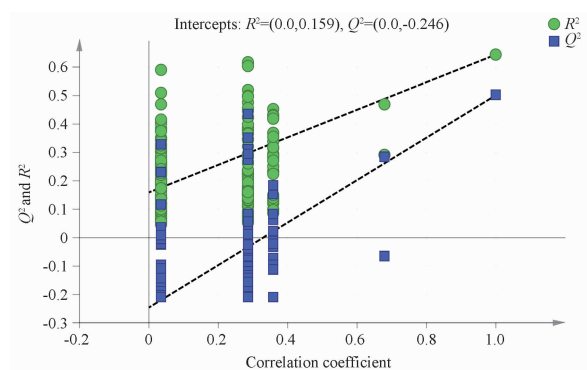


图 5 两个不同产地的甘松样品偏最小二乘 - 判别分析(PLS-DA)置换检验图

Fig. 5 PLS-DA Permutation test plot of *Nardostachys jatamansi* DC. samples from two different origin places

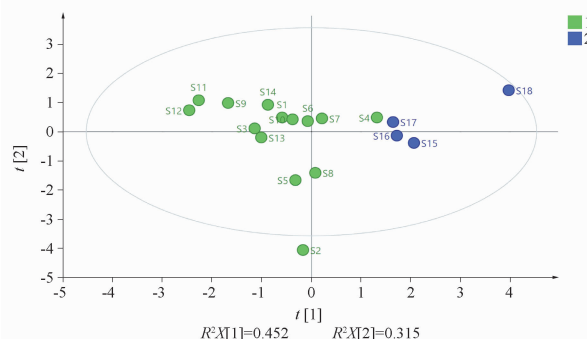


图 6 两个不同产地的甘松样品 PLS-DA 得分散点图

Fig. 6 PLS-DA scatter plot of *Nardostachys jatamansi* DC. samples from two different origin places

潜在差异标志物为甘松新酮、甘松香酮 A 和甘松香酮 H(图 7)。

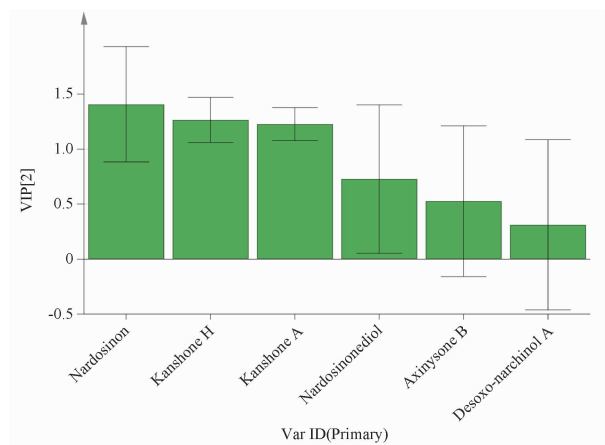


图 7 甘松样品中 6 种倍半萜类成分的 PLS-DA VIP 值图。
 $n = 18, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 PLS-DA VIP value chart of six sesquiterpenoids in *Nardostachys jatamansi* DC. . $n = 18, \bar{x} \pm s$

3 讨论

雷达图分析方法因其能够直观呈现多变量研究对象的特点,已成为应用最广泛的多指标综合评价方法之一。形式上与蜘蛛网高度相似,有专家以此为基础,提出了“蛛网”模式的创新概念。该模式通过归一化法对多个变量进行综合评价,将不同变量标记的点以蜘蛛网的形态连接起来,构建候选化合物的回归区域。模式图中多变量构成的图形大小能直观反映研究对象的整体状况或变化趋势。该模式作为一种多指标综合评价的可视化分析模型,通过对多成分、多指标、多个影响因素的综合分析,可以有效解决中药安全性、有效性、质量可控性,直观展现研究对象的整体状况或变化趋势,发掘关键的量变特征,可为中药复杂、系统的质量控制指标的优化提供有价值的参考和帮助^[14-20]。本研究采用“蛛网”模式,通过比较各提取条件下阴影面积的大小,确定了甘松的最优提取方法。尽管研究确定了最佳提取条件,但对不同条件对提取效率和结果稳定性的影响探讨尚不深入。未来研究将重点考察环境因素、采收时间等对化学成分的影响,以进一步完善质量控制标准。

甘松新酮、甘松香酮 A 和甘松香酮 H 是甘松中的主要成分,通过对这些主要成分的含量测定,发现甘松中的倍半萜类成分不仅在化学组成上具有特异

性,而且在药理作用上也具有独特的优势。例如,甘松新酮具有显著的抗炎和镇静作用,甘松香酮 A 被证明具有抗菌和抗肿瘤活性,而甘松香酮 H 则在神经保护和抗氧化方面表现出较好的效果。因此,甘松新酮、甘松香酮 A 和甘松香酮 H 的含量可以初步反映甘松药材的整体质量水平,从而为其质量控制提供科学依据。

此外,通过多元统计分析(包括 PLS-DA 和聚类分析)进一步验证了这些成分在区分不同产地甘松样品中的重要性。结果表明,这些主要成分的含量差异显著,有助于识别和评价不同产地的甘松质量。但聚类分析揭示了尽管在同一地理区域内样品化学成分大体相似,某些样品由于特定的环境条件或个别差异,其化学成分特征与其他区域样品更为接近。这表明在进行中药材质量控制时,不仅需要考虑到地理来源,未来还需要综合考虑其他环境和处理因素。本次收集甘肃样本仅有 4 批,数据量相对小,未来将针对不同产区和不同经纬度收集更多样本进行深入研究。

基于“蛛网”分析模式和 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术,成功开发了一种针对甘松中 6 种倍半萜类化合物的快速、准确测定方法,并通过了方法学验证。对目前市场上的甘松药材进行了质量评价,这不仅有助于提高甘松药材的质量控制水平,还为其标准化生产和应用提供了可靠的科学依据。本研究不仅明确了甘松主要 6 种倍半萜成分的含量,还论证了其作为质量评价指标的可行性和科学性,为甘松药材的质量控制和标准化提供了坚实的理论基础。

REFERENCES

- [1] CHEN C Q, SHANG Z J. Compilation and Explanation. *Compendium of Materia Medica Supplement*(本草拾遗)[M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 2004: 60.
- [2] ZHANG D X, LIN L, SUN Q, et al. Processing technology of *Nardostachys jatamansi* DC and its fingerprint analysis[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2022, 57(24): 2084-2091.
- [3] WANG J Q, YANG Y C, WANG E H, et al. Comparative study of chemical composition of volatile oil from wild and cultivated *Nardostachys jatamansi* based on GC-MS and chemometrics [J]. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2022, 18(10): 42-48.
- [4] GENG X P, SHI J L, LIU Y, et al. Extraction process study of *Nardostachys jatamansi* new ketone [J]. *Chin J Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2011, 29(2): 291-293.
- [5] YU S L, YE X, JIA G F, et al. Research progress on medicinal plant *Nardostachys jatamansi* in Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27

- (19): 243-250.
- [6] LI Y F, LI S, ZHAO W J, *et al.* Analysis of chemical composition content and antioxidant activity of *Nardostachys jatamansi* from different sources [J]. *J Chengdu Med Coll* (成都医学院学报), 2023, 18(5): 545-548.
- [7] WANG Z Y, XING Y Y, FU W R, *et al.* Quality evaluation of *Nardostachys jatamansi* from different regions based on hplc fingerprint combined with chemometric analysis and multicomponent quantification [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2024, 55(3): 956-968.
- [8] CUI Q, FENG M K, FENG R L, *et al.* Analysis of genetic diversity of *Nardostachys* genus resources and ITS secondary structure phylogenetic information [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2024, 55(1): 249-257.
- [9] WANG J Q, WANG E H, YANG Y C, *et al.* Different harvest periods of *Nardostachys jatamansi* medicinal material: evaluation of differences in volatile oil and fingerprint by chemometric methods [J]. *Asia-Pac Tradit Med* (亚太传统医药), 2023, 19(5): 48-54.
- [10] MAIWULANJIANG M, DONG T X, ZHAN H Q, *et al.* HPLC fingerprint and determination of *Nardostachys jatamansi* new ketone content in medicinal materials [J]. *Her Med*(医药导报), 2017, 36(11): 1298-1302.
- [11] LE VNH, KHONG T Q, NA M K, *et al.* An optimized HPLC-UV method for quantitatively determining sesquiterpenes in *Nardostachys Radix et Rhizoma* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 145: 406-413.
- [12] YANG J, JIANG Z Z, CHAI X, *et al.* Study on the discrimination of Q-markers in traditional Chinese medicine injections: a case study of Danhong Injection [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术-中医药现代化), 2016, 18(12): 2056-2061.
- [13] YANG F, YU H J, CHAI X, *et al.* Illumination on “reserving phloem and discarding xylem” and quality evaluation of *Radix polygalae* by determining oligosaccharide esters, saponins, and xanthenes [J]. *Molecules*, 2018; 23(4): 836.
- [14] WANG D, DING J, FENG X, *et al.* Application of “Spider-Web” model in traditional chinese medicine research [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50(19): 4582-4588.
- [15] WANG D, DING J, FENG X, *et al.* Identification of Q-Markers from Hedan Tablet by Employing “Spider-Web” Mode and Taking Compounds’ Hepatotoxicity into Account [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 14(4): 612-621.
- [16] ZHANG J, WANG D, ZHANG X, *et al.* Application of “Spider-Web” mode in discovery and identification of Q-markers from Xuefu Zhuyu Capsule [J]. *Phytomedicine*, 2020, 77: 153273.
- [17] WANG K L, CAI Y, LIU C H, *et al.* Study on quality markers for anti-tumor and cardioprotective effects of Ai Di Injection based on “Spider-Web” model [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2024, 49(8):2088-2105.
- [18] WANG Y, JIANG Z Z, YANG F, *et al.* Establishment of a ternary network system for evaluating the antioxidant fraction of Danhong Injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(10): 1666-1675.
- [19] ZHANG J, YANG J J, CHAI X, *et al.* Study on powder uniformization of *Eucommia ulmoides* Oliv. decoction pieces [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2019, 36(7): 710-714.
- [20] YU H, YANG J, DING J, *et al.* Stability study and identification of degradation products of caffeoylgluconic acid derivatives from *Fructus Euodiae* [J]. *Molecules*, 2018, 23(8): 1975.

(收稿日期:2024-04-25)