

不同产地细辛中挥发油 GC-MS 指纹图谱的建立及其化学模式识别研究

柴士伟^{1,2}, 苗欣欣³, 姚广哲³, 何俊^{3*}

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300193

3. 天津中医药大学 组分中药国家重点实验室, 天津 301617

摘要: **目的** 建立不同产地细辛药材挥发油的气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 指纹图谱, 并结合化学模式识别进行评价。**方法** 采用 GC-MS 法建立细辛挥发油的指纹图谱, 进行相似度评价, 并通过聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法 (OPLS-DA) 判别分析不同产地细辛挥发油的质量差异。**结果** 建立了细辛挥发油的 GC-MS 指纹图谱, 确认 24 个共有峰, 并指认了其中 10 个共有峰。不同批次细辛挥发油样品相似度在 0.908 以上。CA、PCA 和 OPLS-DA 结果显示细辛挥发油存在一定的质量差异, 以变量投影重要度 (VIP) 值 >1.0 为标准, 筛选出 8 个差异性标志成分。**结论** GC-MS 指纹图谱结合化学模式识别可以全面、系统地评价细辛挥发油的质量特征, 为细辛药材的质量评价提供参考。

关键词: 细辛; 挥发油; 指纹图谱; 相似度; 聚类分析; 成分分析; 正交偏最小二乘法分析

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)01-0071-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.01.010

GC-MS fingerprints and chemical pattern recognition of volatile oil in *Asari Herba* from different origins

CHAI Shi-wei^{1,2}, MIAO Xin-xin³, YAO Guang-zhe³, HE Jun³

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300193, China

3. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To establish GC-MS fingerprints of volatile oil in *Asari Herba* from different origins, and analyze the results by chemical pattern recognition. **Methods** Fingerprints of volatile oil in *Asari Herba* were established by GC-MS, and the similarity was evaluate. The quality of volatile oil in *Asari Herba* from different origins was discussed by cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** GC-MS fingerprints of volatile oil in *Asari Herba* were established, 24 peaks in it were confirmed, and 10 peaks of them were identified. The similarity of volatile oil in *Asari Herba* was above 0.908. CA, PCA, and OPLS-DA results showed that there were certain qualitative differences in volatile oil in *Asari Herba*. Using the VIP value >1.0 as the criterion, eight markers of difference were screened out, which can be used to distinguish between different origins. **Conclusion** GC-MS fingerprint combined with chemical pattern recognition can comprehensively and systematically evaluate the inherent quality characteristics of volatile oil in *Asari Herba*, which can provide a reference for the quality evaluation research of *Asari Herba*.

Key words: *Asari Herba*; volatile oil; fingerprint; similarity; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis

细辛为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.)

Kitag., 汉城细辛 *A. sieboldii* Miq. f. *seoulense* (Nakai) C. Y. Cheng et C. S. Yang 或华细辛 *A. sieboldii* Miq.

收稿日期: 2022-08-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673824)

作者简介: 柴士伟 (1979—), 男, 副主任药师, 博士, 研究方向为中药学。E-mail: chaishiwei791109@sina.com

*通信作者: 何俊 (1981—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为药物分析。E-mail: hejun673@163.com

的干燥根和根茎^[1]。《神农本草经》中细辛位列上经，书中称细辛“味辛，温，主咳逆，头痛脑动，百节拘挛，风湿痹痛，死肌，久服明目，利九窍，轻身长年”^[2]。细辛可通达表里上下，用途广泛，临床多用于复方汤剂中。细辛含有丰富的化学成分，包括木脂素类、黄酮类、甾体类、多糖类和挥发油等，其中挥发性成分为细辛中主要有效成分，具有麻醉、解热、镇痛、抗炎、抗菌等作用^[3-4]。研究表明，不同品种、不同产地的细辛中挥发性成分具有一定差异^[5]，可能对细辛药材质量和临床药效产生影响。目前，对细辛挥发油质量评价的研究主要集中在指标成分测定^[6-7]和单一基源细辛指纹图谱分析^[8]，不能比较直观地反映不同基源、不同产地细辛药材挥发油的差异。近年来，指纹图谱与化学模式识别技术相结合已成为常用的、有效的评价中药质量的手段，通过对指纹图谱进行化学计量学分析，可以客观地反映药材品质的整体性和差异^[9]。因此，本研究通过建立不同产地、不同批次细辛挥发油的 GC-MS 指纹图谱，结合化学模式识别研究，为细辛质量评价提供更加全面、系统的参考。

1 仪器与材料

GCMS-QP 2010 型气相色谱质谱联用仪（日本岛津公司）；AS 60/220.R2 型十万分之一天平（苏州培科实验室仪器科技有限公司）；Milli-Q 超纯水制备仪（天津信睿生物科技有限公司）；G3KT18273 型旋涡混合器（赛默飞世尔科技公司）；5424R 型高速控温离心机（Eppendorf 公司）；ZZ-L6DT 超声波清洗机。

(1R)-(+) - α -蒎烯（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190408-137）、(-) β -蒎烯（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190311-011）、(+)-3-萜烯（质量分数 $\geq 90\%$ ，批号 DST190408-137）、桉叶油醇（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190408-137）、右旋龙脑（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190405-062）、优葛缕酮（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190420-305）、 α -松油醇（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190402-206）、草蒿脑（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190330-107）、黄樟醚（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190410-157）、甲基丁香酚（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 DST190317-064）对照品均购自成都德思特生物科技有限公司。正己烷（分析纯）购自天津市康科德科技有限公司。

不同产地细辛经天津中医药大学何俊研究员鉴定为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides*

Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.、汉城细辛 *A. sieboldii* Miq. f. *seoulense* (Nakai) C. Y. Cheng et C. S. Yang 或华细辛 *A. sieboldii* Miq. 的干燥根和根茎，药材样品信息见表 1，保存于天津中医药大学中医药研究院。细辛药材经粉碎后，过三号筛，备用。

表 1 细辛药材样品信息
Table 1 Information of *Asari Herba* samples

样品编号	批次	产地	基原
S1	20180915	昭通	北细辛
S2	20180721	玉林	北细辛
S3	20180820	延边	北细辛
S4	20180802	新宾	汉城细辛
S5	20180904	铁西	北细辛
S6	20180726	秦岭	北细辛
S7	20180811	盘锦	华细辛
S8	20180817	靖宇	北细辛
S9	20180620	神农架	华细辛
S10	20180817	抚顺	北细辛
S11	20180627	丹东	北细辛
S12	20181011	赤峰	北细辛
S13	20180306	长治	北细辛
S14	20180818	本溪	汉城细辛

2 方法与结果

2.1 GC-MS 分析条件

色谱条件：DB-17 (50%-苯基)-甲基聚硅氧烷毛细管色谱柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)；载气：高纯氦 (体积分数 $\geq 99.999\%$)；色谱柱温度程序：起始温度 60 $^{\circ}$ C，以 20 $^{\circ}$ C/min 升温至 140 $^{\circ}$ C，以 2 $^{\circ}$ C/min 升温至 180 $^{\circ}$ C，以 5 $^{\circ}$ C/min 升温至 200 $^{\circ}$ C (保持 4 min)，再以 3 $^{\circ}$ C/min 升温至 240 $^{\circ}$ C (保持 4 min)；进样方式：分流进样；体积流量：1.4 mL/min；进样量：0.4 μ L；进样口温度：280 $^{\circ}$ C。

质谱条件：电子轰击离子源 (EI)，采用 SIM 监测模式进行扫描，离子源温度：230 $^{\circ}$ C；接口温度：280 $^{\circ}$ C；溶剂延迟时间：5.5 min。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 (1R)-(+) - α -蒎烯、(-) β -蒎烯、(+)-3-萜烯、桉叶油醇、右旋龙脑、优葛缕酮、 α -松油醇、草蒿脑、黄樟醚、甲基丁香酚对照品适量，加正己烷溶解并定容至 5 mL，配制成 1 mg/mL 的储备液，4 $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

2.3 供试品溶液的制备

分别精密称取细辛粗粉（过 60 目筛）50.0 g，加 400 mL 纯水，加热回流 6 h，挥发油使用无水硫酸钠脱水。取挥发油 1 μ L，置于 10 mL 量瓶，加正己烷溶解，并加至刻度，涡旋混匀，4 $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取样品 S5，制备供试品溶液，重复进样 6 次，计算得 24 个共有色谱峰保留时间 RSD 值均小于 0.05%，峰面积 RSD 值均小于 7.31%。

2.4.2 重复性试验 精密称取样品 S5 6 份，平行制备供试品溶液，注入气相色谱-质谱联用仪中，进样测定，计算得 24 个共有色谱峰保留时间 RSD 值均小于 0.07%，峰面积 RSD 值均小于 7.75%。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取样品 S5 制备的供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析，计算得 24 个共有色谱峰保留时间 RSD 值均小于 0.05%，峰面积 RSD 值均小于 7.74%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立

分别称取 14 个不同批次的细辛药材，制备供试品溶液，分别进样测定，得到不同批次细辛挥发油的 GC-MS 图谱。使用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2.0 版，国家药典委员会，2010）”生成 14 批细辛挥发油指纹图谱，见图 1，对照指纹图谱见图 2。从该软件分析得出 14 批细辛药材挥发油有 24 个共有峰，通过对照品比对指认出 10 个色谱峰，依次为(1R)-(+)- α -蒎烯、(-)- β -蒎烯、(+)-3-萜烯、桉叶油醇、右旋龙脑、优葛缕酮、 α -松油醇、草蒿脑、黄樟醚、甲基丁香酚。

2.6 相似度评价

采用平均数法，时间窗宽度为 0.1，通过多点

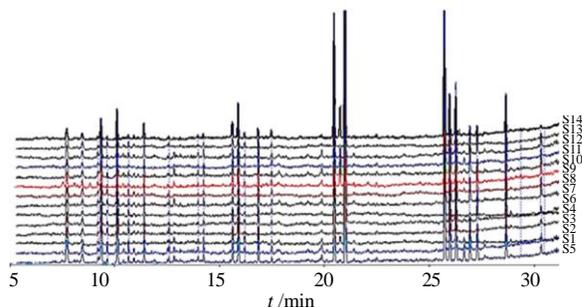
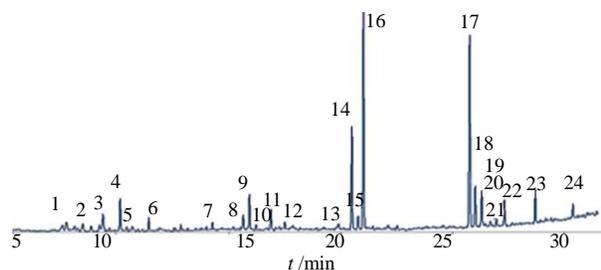


图 1 细辛挥发油的 GC-MS 指纹图谱

Fig. 1 GC-MS fingerprints of *Asari Herba* volatile oil



1-(1R)-(+)- α -蒎烯 3(-)- β -蒎烯 4-(+)-3-萜烯 6-桉叶油醇
8-右旋龙脑 9-优葛缕酮 10- α -松油醇 12-草蒿脑 16-黄樟醚
17-甲基丁香酚
1-(1R)-(+)- α -pinene 3(-)- β -pinene 4-(+)-3-carene 6-cineole 8(-)-borneol 9-2,6,6-trimethyl-2,4-cycloheptadien-1-one 10- α -terpineol
12-4-allylanisole 16-safrole 17-methyl eugenol

图 2 细辛挥发油的对照指纹图谱

Fig. 2 Standard fingerprints of *Asari Herba* volatile oil

校正后，将 14 批细辛药材挥发油指纹图谱数据进行整体相似度评价，相似度评价结果见表 2。14 批不同产地细辛药材挥发油相似度范围为 0.908~0.984。结果表明，各批药材间主要挥发性成分较为一致，符合中药指纹图谱的研究要求，可以用于评价细辛的质量。

2.7 化学模式识别分析

2.7.1 聚类分析 (CA) 以 14 批细辛药材挥发油共有峰的相对峰面积为变量，经标准化处理后，导入 SPSS 25.0 软件，对其进行聚类分析。方法为组间平均连接法，度量标准为欧氏距离^[11]，结果见图 3。当距离刻度大约为 18 时，本研究选择的 14 批样品主要分为 3 大类，S3、S11、S14、S1、S9、S4、S6、S2 为第 1 类，S7、S8、S10、S12 为第 2 类，S5、S13 为第 3 类。其中第 2 类中细辛的产地分布较为集中，其余两类较为离散。

2.7.2 主成分分析模式 (PCA) 将 14 批细辛药材挥发油 GC-MS 指纹图谱的 24 个共有峰峰面积进行标准化处理后，导入 SIMCA 14.1 软件，构建 14 \times 24 的原始数据矩阵，Par 作为标度化方式，进行主成分分析，绘制出 PCA 分析图，见图 4。结果表明，不同批次的细辛样品呈现出明显的分类，不同产地的分类与聚类分析的结果一致。载荷图（图 5）中的每一个点表示为一个色谱峰，其与原点 (0,0) 距离的远近代表该色谱峰对样品整体分布贡献程度的大小^[12]。4、9、15、16、17、18、19 号色谱峰在坐标系中距离原点较远，表明其对细辛药材的整体质量起到了重要影响作用。聚类分析和主成分分析表明，自然分组与细辛药材基源相关性不强。

表 2 细辛挥发油的相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of *Asari Herba* volatile oil

相似度	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	R
S1	1.000														
S2	0.874	1.000													
S3	0.888	0.920	1.000												
S4	0.910	0.896	0.945	1.000											
S5	0.895	0.936	0.938	0.922	1.000										
S6	0.928	0.875	0.947	0.959	0.931	1.000									
S7	0.842	0.918	0.934	0.939	0.878	0.891	1.000								
S8	0.813	0.799	0.880	0.880	0.797	0.854	0.909	1.000							
S9	0.925	0.856	0.938	0.955	0.917	0.976	0.880	0.849	1.000						
S10	0.828	0.856	0.901	0.899	0.831	0.867	0.937	0.921	0.843	1.000					
S11	0.892	0.918	0.968	0.960	0.949	0.954	0.942	0.892	0.946	0.898	1.000				
S12	0.823	0.859	0.879	0.912	0.836	0.861	0.938	0.883	0.836	0.942	0.899	1.000			
S13	0.890	0.880	0.944	0.943	0.962	0.952	0.866	0.810	0.943	0.826	0.952	0.839	1.000		
S14	0.890	0.905	0.948	0.969	0.921	0.941	0.954	0.905	0.938	0.918	0.966	0.918	0.925	1.000	
R	0.930	0.937	0.977	0.980	0.957	0.971	0.957	0.908	0.961	0.928	0.984	0.926	0.958	0.980	1.000

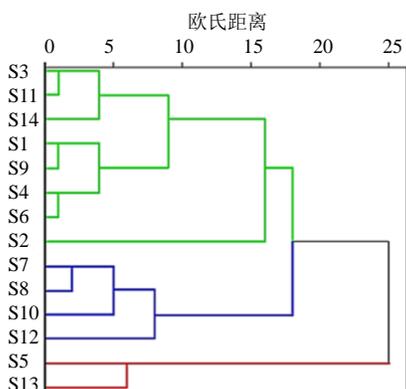


图 3 细辛挥发油的聚类分析

Fig. 3 Dendrogram cluster analysis of *Asari Herba* volatile oil

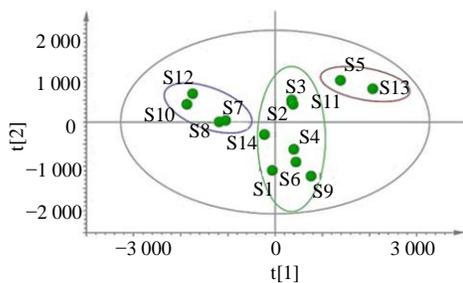


图 4 细辛挥发油主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis diagram of *Asari Herba* volatile oil

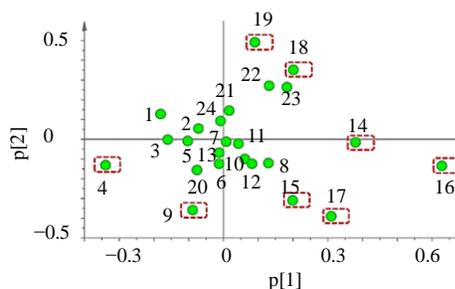


图 5 细辛挥发油的主成分载荷图

Fig. 5 Principal component loading plot of *Asari Herba* volatile oil

2.7.3 正交偏最小二乘回归分析法 (OPLS-DA) 为了进一步分析不同批次细辛样品的差异性, 基于聚类分析和主成分分析数据, 对不同批次细辛药材进行有监督的 OPLS-DA, 结果见图 6。

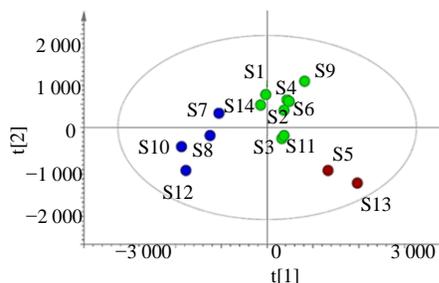


图 6 细辛挥发油的 OPLS-DA 散点图

Fig. 6 OPLS-DA scatter plot of *Asari Herba* volatile oil

由模型分析验证参数可知, 结实率参数 R^2_x 为 0.743, 区分参数 R^2_y 为 0.902, 预测参数 Q^2 为 0.544, 以上数据均大于 0.5, 表明模型稳定, 且具有较好的预测准确性^[12]。

为进一步筛选出对上述样品分类贡献较大的成分, 以变量投影重要度 (VIP) > 1.0 为筛选标准, 对数据进行处理分析。共得到 8 个有意义变量, 按照 VIP 值大小依次指认出 16 号峰 (黄樟醚)、19 号峰 (3,4,5-三甲氧基甲苯)、17 号峰 (甲基丁香酚)、18 号峰、14 号峰 (3,5-二甲基甲苯)、4 号峰 [(+)-3-萜烯]、15 号峰和 9 号峰 (优葛缕酮), 见图 7。这些成分是 14 批不同产地细辛药材之间产生差异的主要原因, 具有一定的标志性作用。该结果与 PCA 中载荷图的分析结果一致。

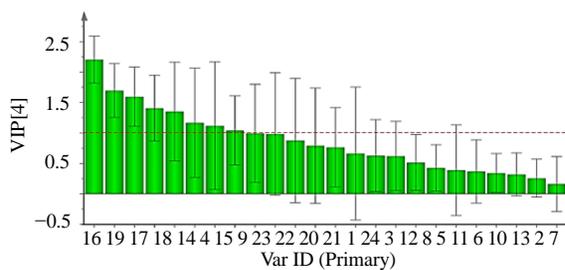


图 7 细辛挥发油中各活性成分的 VIP 图

Fig. 7 VIP diagram of each active ingredients in *Asari Herba* volatile oil

3 讨论

指纹图谱的整体性可以较为全面地反映中药复杂的化学成分及其比例, 使得指纹图谱成为中药药材资源开发和评价的重要手段^[8]。本研究建立了细辛挥发油 GC-MS 指纹图谱, 并进行了相似度评价。分析结果显示 14 个不同批次细辛药材挥发油中有 24 个共有峰, 并对其中 10 个峰进行指认, 依次为(1R)-(+)- α -蒎烯、(-)- β -蒎烯、(+)-3-萜烯、桉叶油醇、右旋龙脑、优葛缕酮、 α -松油醇、草蒿脑、黄樟醚、甲基丁香酚。相似度分析结果显示, 不同批次的样品挥发油相对对照图谱相似度范围为 0.908~0.984, 具有较高的相似度, 表明所建立的细辛挥发油 GC-MS 指纹图谱分析方法可以用于细辛药材的质量评价。

为了更加可靠地运用相似度评价系统对指纹图谱数据进行处理, 本实验采用化学模式识别技术对指纹图谱的数据进行分析^[13], 将 CA、PCA、OPLS-DA 分析方法联合使用。结果显示 CA 与 PCA 结果一致, 14 批细辛药材分为 3 类, S3、S11、S14、S1、

S9、S4、S6、S2 为第 1 类, S7、S8、S10、S12 为第 2 类, S5、S13 为第 3 类, 表明 14 批细辛药材质量存在差异, 但与细辛的地理分布、基原关联性不强。这可能是由于细辛药材分布广泛, 不同产地细辛生长的地理、气候等条件存在差异所导致, 也可能由土壤、水分、采收、加工等多种影响因素所造成。同时通过 OPLS-DA 模型中的 VIP 值共筛选出 8 个关键色谱峰, 与主成分载荷图结果一致。其中甲基丁香酚、黄樟醚是细辛挥发油中主要的化学成分。现代药理学研究表明, 甲基丁香酚是细辛中主要药理活性成分, 黄樟醚是主要的毒性成分^[14-15]。鉴于细辛主要有效成分为挥发油, 因此 8 个关键色谱峰可能是影响细辛药材质量的差异性标志成分。

本研究针对不同产地细辛药材挥发油 GC-MS 指纹图谱结合化学模式识别建立了信息丰富、判别精准的数学模型, 多种分析结果相互验证, 系统的揭示了细辛药材内在质量特征, 为建立细辛药材质量标准提供参考。

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: 240-242.
- [2] 沈晓敏, 袁红霞. 《神农本草经》与经方应用之细辛篇 [J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(2): 143-147.
- [3] Liu H Z, Wang C H. The genus *Asarum*: A review on phytochemistry, ethnopharmacology, toxicology and pharmacokinetics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 282(11): 114642.
- [4] 钱深思, 刘美怡, 容蓉, 等. 细辛挥发油的化学成分及其药理和毒理现代研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18(4): 388-395.
- [5] 臧埔, 武晓琳, 郜玉钢, 等. 不同产地细辛有效成分与毒性成分的比较研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(4): 416-421.
- [6] 李君辉, 闫微, 崔恩姬, 等. 不同产地细辛挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(1): 188-190.
- [7] 李峰, 李莉, 周卫涛. 细辛挥发油的提取及含量的测定 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(62): 106.
- [8] 鄢景森, 李景辉, 贾超, 等. 辽细辛挥发油气相色谱指纹图谱研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(35): 21657-21659.
- [9] 李妍, 何文媛, 王康宇, 等. 基于 HPLC 多指标成分测定及指纹图谱多模式识别方法的北细辛质量分析 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 238-243.
- [10] 范少楼, 刘利萍, 边可君. GC 双内标法同时测定细辛

- 挥发油中 5 种成分的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(10): 908-911.
- [11] 于游, 马海英, 牛思佳, 等. 华细辛气相色谱指纹图谱及药材含量测定研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(2): 116-118.
- [12] 曹洒, 李亚敏, 戴王强, 等. 高效液相色谱法测定细辛不同药用部位细辛脂素的含量 [J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(4): 42-44.
- [13] 刘学仁, 张莹, 何光召. 化学模式识别技术在药物分析中的应用与研究进展 [J]. 数理医药学杂志, 2011, 24(1): 101-103.
- [14] 宗时宇, 刘洋, 张红, 等. 不同基原与产地的细辛质量评价及肝毒性化学成分定量分析 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(6): 1351-1353.
- [15] 汪月娥, 姚光弼. 中草药和相关保健食品引起药物性肝病的研究 [J]. 中华消化杂志, 2007, 27(7): 435-438.

[责任编辑 解学星]