

六经头痛片中辛夷和细辛 GC 指纹图谱研究

张晓燕¹, 龚苏晓², 王磊³, 张洪兵², 朱晓丹³, 韩彦琪², 许浚², 陈常青^{2*}, 张铁军^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂, 天津 300457

摘要: 目的 建立六经头痛片原料药材辛夷和细辛的 GC 指纹图谱, 为六经头痛片质量评价提供依据。方法 采用 Agilent DB-WAX (20 m×0.18 mm, 180 μm) 气相色谱柱, 优化程序升温条件, 测定 11 批辛夷、细辛原料药材, 利用 SPSS 聚类分析和中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 建立辛夷药材指纹图谱, 并通过 Agilent 7890A-5975C 气-质联用仪对共有峰进行指认。结果 通过 11 批样品的测定和 SPSS 聚类分析将 10 批辛夷药材聚为一类, 并建立辛夷药材 GC 指纹图谱, 相似度均在 0.9 以上, 共得 22 个共有峰, 其中归属至全方的成分为 14 个, 药材独有成分 8 个; 将 10 批细辛药材聚为一类, 并建立细辛药材 GC 指纹图谱, 相似度均在 0.9 以上, 共得 11 个共有峰, 其中归属至全方的成分为 4 个, 药材独有成分为 7 个。结论 本方法专属性强、准确性高、重复性良好, 可为辛夷、细辛药材的质量控制提供依据。

关键词: 辛夷; 细辛; 六经头痛片; GC; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)20-4203-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.012

Study on GC fingerprint of *Magnoliae Flos* and *Asari Radix et Rhizoma* in Liujing Toutong Tablets

ZHANG Xiao-yan¹, GONG Su-xiao², WANG Lei³, ZHANG Hong-bing², ZHU Xiao-dan³, HAN Yan-qi², XU Jun², CHEN Chang-qing², ZHANG Tie-jun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Longshunrong Pharmaceutical Factory, Tianjin 300457, China

Abstract: Objective To establish the fingerprint of *Magnoliae Flos* and *Asari Radix et Rhizoma* of Liujing Toutong Tablets (LTT), provide the basis for the evaluation of the quality of LTT. **Methods** Agilent DB-WAX (20 m×0.18 mm, 180 μm) gas chromatography column, select the appropriate temperature conditions, the determination of the 11 batch of *Magnoliae Flos*, *Asari Radix et Rhizoma*, the use of SPSS clustering analysis and chromatographic fingerprint evaluation system (2004A version) the establishment of Xinyi medicine fingerprints, and through the Agilent 7890A-5975C gas quality for instrument on the common peaks were identified. **Results** The 11 batches of samples were measured and SPSS cluster analysis of 10 batches of medicinal materials were clustered into one group, and the establishment of Xinyi medicine GC fingerprint, the similarity was more than 0.9, a total of 22 common peaks, which belongs to the whole party into 14 components, medicinal unique ingredients 8; 10 batches of Asarum medicinal materials were clustered into one group, and the establishment of Asarum GC fingerprint, the similarity was more than 0.9, a total of 11 common peaks, which belongs to the whole Party composition for 4, 7 for a particular component of medicinal materials. **Conclusion** This method has strong specificity, high accuracy, good repeatability, and provide the basis for quality control of Herba *Magnoliae Flos* and *Asari Radix et Rhizoma*.

Key words: Liujing Toutong Tablets; *Magnoliae Flos*; *Asari Radix et Rhizoma*; GC; fingerprint; quality control

辛夷为木兰科植物望春花 *Magnolia biondii* *Magnolia sprengeri* Pamp. 的干燥花蕾。辛夷性温、Pamp.、玉兰 *Magnolia denudata* Desr. 或武当玉兰 味辛, 归肺、胃经, 具有散风寒、通鼻窍的功效,

收稿日期: 2017-04-23

作者简介: 张晓燕 (1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药复方制剂研究。Tel: (022)23006843 E-mail: 13920375607@163.com

*通信作者 陈常青 Tel: (022)23006829 E-mail: chencq@tjpr.com

张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjpr.com

用于治疗风寒头痛、鼻塞流涕、鼻鼽、鼻渊等症。细辛为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.、汉城细辛 *Asarum sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai 或华细辛 *Asarum sieboldii* Miq. 的干燥根和根茎。

六经头痛片以细辛、辛夷、荆芥穗油等 9 味中药为处方, 治疗全头痛、偏头痛^[1], 其中细辛、辛夷药材是取其挥发油和水煎液共同入药, 研究报道细辛水提液和挥发油均有较强的镇痛作用, 对内脏疼痛的镇痛效果挥发油强于水煎液^[2]。细辛善行能通, 止痛之力较强, 治六经中少阴头痛^[3]; 辛夷善宣通窍, 助细辛解表之力, 增强细辛止痛之功。早在《证治准绳》中细辛、辛夷配伍使用治疗鼻渊头痛、鼻内窒塞不通不得喘息, 《本草纲目》中记载辛夷上行头目, 可治疗风寒湿厥头痛^[4], 现代临床中细辛则应用于肝经风热头痛等多种头痛^[5], 本方中细辛温肺化饮、通窍止痛, 作为全方少阴经引经用药, 辛夷上达头目, 通窍止痛。方中细辛、辛夷药材收载于《中国药典》2015 年版^[6], 查阅文献尚未有对六经头痛片中辛夷、细辛质量研究的报道, 本实验建立了辛夷、细辛药材的 GC 指纹图谱, 运用相似度评价软件进行分析, 并对其全部共有峰进行指认, 得辛夷共有峰中 14 个归属于六经头痛片全方成分, 8 个为药材本身的特有成分; 细辛共有峰中归属至全方化合物为 4 个, 7 个为药材本身的特有成分。

1 仪器与材料

美国 Agilent 7890B 气相色谱仪 (氢火焰检测器, FID); DB-WAX 气相色谱柱 (20 m×0.18 mm, 180 μm), 美国 Agilent 公司; 美国 Agilent 7890A-5975C 气-质联用系统; 色谱专用空气发生器 Air-Model-5 L, 色谱专用氢气发生器 HG-Model 300A, 天津市色谱科学技术公司; 高纯氮气 (99.99%), 天津东方气体有限公司; BT25S 万分之一电子天平, 德国 Sartorius 公司。

辛夷药材 (批号 Y901~Y910, Y1505206), 产地河南, 由天津隆顺裕发展制药有限公司提供。经天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定为木兰科植物望春花 *Magnolia biondii* Pamp. 的干燥花蕾。对照品为桉叶油素 (批号为 110788-201506, 质量分数 98.4%) 购自中国食品药品检定研究院。

细辛药材 (批号 Z901~Z910, Y1411470), 产地辽宁, 由天津隆顺裕发展制药有限公司提供, 经天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr.

Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根和根茎。对照品为甲基丁香酚 (批号为 111642-200301) 购自中国药品生物制品检定所, 质量分数大于 98%。醋酸乙酯 (色谱纯) 购自天津市康科德科技有限公司, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 辛夷 GC 色谱条件 进样口温度 250 °C, 检测器温度 290 °C, 进样量 5 μL, 分流比 50:1; 体积流量 0.8 mL/min。程序升温条件: 初温 40 °C (保持 5 min), 以 8 °C/min 的速度上升至 100 °C (保持 2 min), 以 1.5 °C/min 的速度上升至 110 °C (保持 10 min), 以 5 °C/min 的速度上升至 230 °C (保持 6 min)。

2.1.2 细辛 GC 色谱条件 色谱条件: 进样口温度 230 °C, 检测器温度 290 °C, 进样量 3 μL, 分流比 30:1; 体积流量 1 mL/min。程序升温条件: 初温 50 °C (保持 5 min), 以 4 °C/min 的速度上升至 120 °C (保持 2 min), 以 2 °C/min 的速度上升至 145 °C (保持 8 min), 以 5 °C/min 的速度上升至 230 °C (保持 6 min)。

2.1.3 质谱条件 EI 电离源; 电子能量 70 eV; 四极杆温度 150 °C; 离子源温度 230 °C; 倍增器电压 1 412 V; 溶剂延迟 2.30 min; Scan 扫描范围 *m/z* 10~700。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取对照品桉叶油素适量, 精密称定, 加醋酸乙酯制成含 3.648 mg/mL 的溶液, 摇匀, 即得; 取对照品甲基丁香酚适量, 精密称定, 加醋酸乙酯制成含 8 mg/mL 甲基丁香酚的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取辛夷药材粗粉 10 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加入 30 倍水, 按照《中国药典》2015 年版^[6]挥发油检查项下方法加热回流提取挥发油, 挥发油提取器液面上方精密加入 2 mL 醋酸乙酯, 水蒸气蒸馏提取 3 h, 取醋酸乙酯层转移至 5 mL 量瓶中, 用适量醋酸乙酯润洗挥发油提取器, 一并转移至量瓶中, 用醋酸乙酯稀释至刻度, 混匀。取适量无水硫酸钠加入量瓶中脱水, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。同法制备细辛供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取批号为 Y1505206 的辛夷药材, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 依据“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以桉叶油素峰 (8 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 计算 RSD 值, 考察进样精密度, 结果显

示共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.083%，相对峰面积的 RSD 值均小于 1.631%；同法考察细辛药材进样精密度，以甲基丁香酚峰（7 号峰）为参照峰，共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.314%，相对峰面积的 RSD 值均小于 2.316%。

2.3.2 重复性试验 取批号为 Y1505206 的辛夷药材，按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，依据“2.1.1”项下色谱条件分别进样，以桉叶油素峰（8 号峰）为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，计算 RSD 值，结果显示共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.083%，相对峰面积的 RSD 值均小于 2.715%；同法考察细辛重复性，以甲基丁香酚峰（7 号峰）为参照峰，各共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.316%，相对峰面积的 RSD 值均小于 4.831%。

2.3.3 稳定性试验 取批号为 Y1505206 的辛夷药材，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，依据“2.1.1”项下色谱条件在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样，以桉叶油素峰（8 号峰）为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，计算 RSD 值，结果显示共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.105%，相对峰面积的 RSD 值均小于 1.648%；同法考察细辛药材稳定性，以甲基丁香酚峰（7 号峰）为参照峰，各共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.459%，相对峰面积的 RSD 值均小于 3.247%。均符合指纹图谱的要求，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4 聚类分析及指纹图谱的建立

2.4.1 药材指纹图谱的测定及聚类分析 将 11 批辛夷、细辛药材分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，依据“2.1”项下色谱条件分别进样。将得到的指纹图谱的 AIA 数据文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版相似度软件中，分别以 Y901/Z901 作为参照图谱自动匹配，得到的匹配数据，运用 SPSS 统计分析软件对其进行系统聚类分析，分别将细辛、辛夷各 11 批药材分为 2 类，其中批号为 Y910/Z910 的药材单独成一类，其余 10 批聚为一类，见图 1-A、B。

2.4.2 对照指纹图谱的建立及相似度评价 根据对 11 批辛夷、细辛药材的聚类分析结果，将聚为一类的 10 批辛夷、细辛药材图谱的 AIA 数据文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版相似度软件中生成指纹图谱及对照指纹图谱（图 2、3），并分别计算相似度评价结果，计算结果见表 1、2，各批之间相似度均在 0.9 以上。

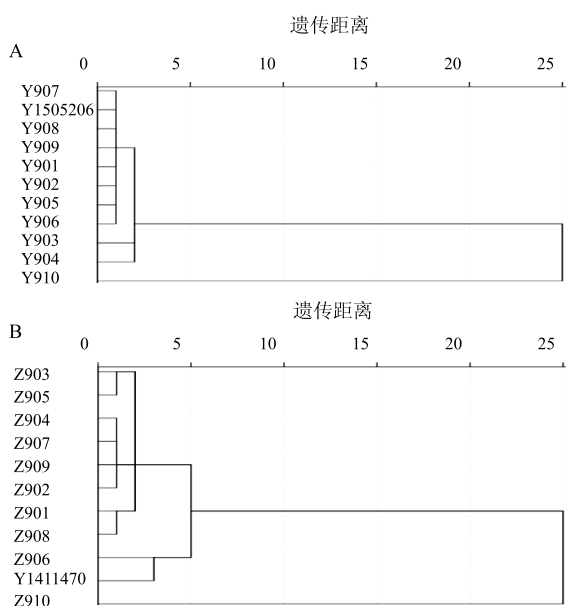


图 1 11 批辛夷 (A) 和细辛 (B) 的聚类分析树状图
Fig. 1 Dendrogram of cluster analysis of for 11 batches of *Magnolia biondii* (A) and *Asarum heterotropoides* (B)

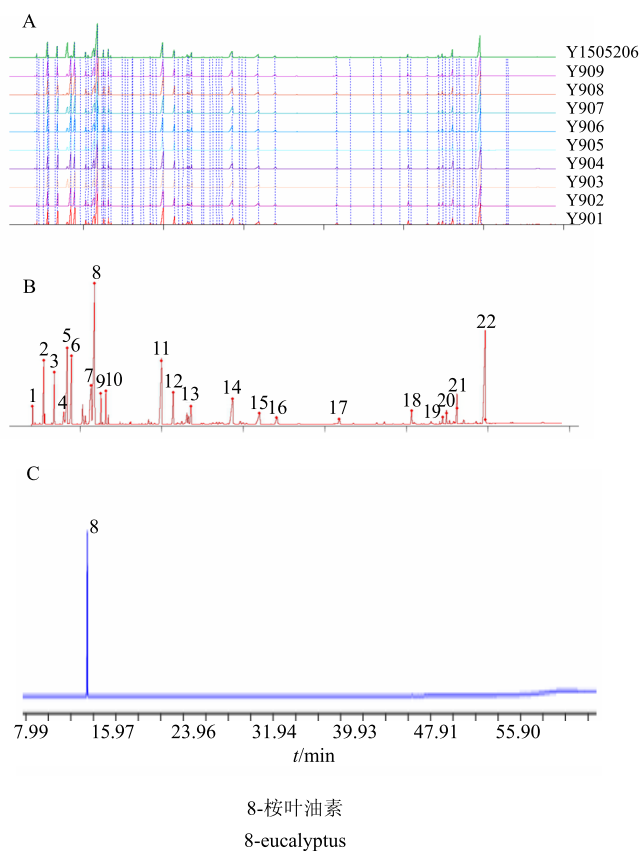


图 2 10 批辛夷药材 GC 指纹图谱 (A)、对照指纹图谱 (B) 和对照品色谱峰 (C)

Fig. 2 GC fingerprints (A), reference fingerprint (B), and substances peak of *Magnolia biondii* (C)

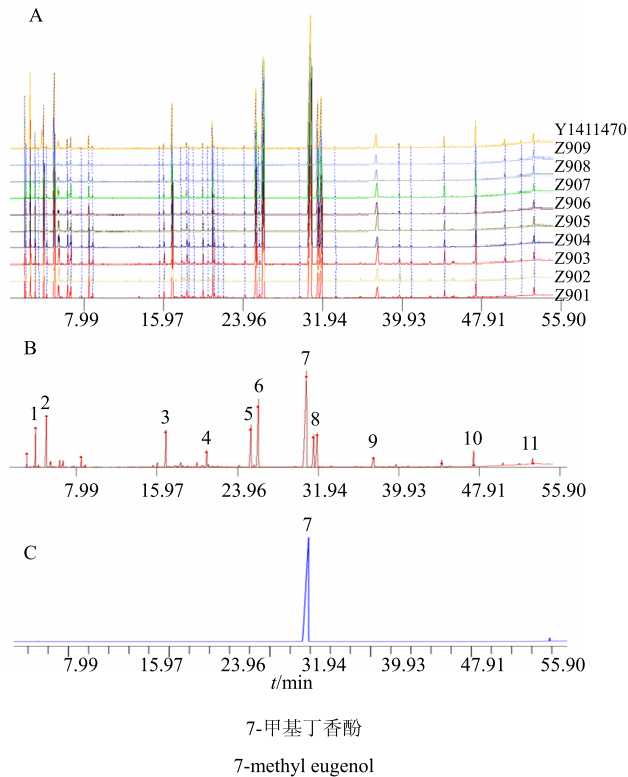


图 3 10 批细辛药材 GC 指纹图谱 (A)、对照指纹图谱 (B) 和对照品色谱峰 (C)

Fig. 3 GC fingerprints (A), reference fingerprint (B), and substances peak of *Asarum heterotropoides* (C)

表 1 10 批辛夷相似度评价结果

Table 1 Similarity evaluation results for 10 batches of *Magnolia biondii*

批号	相似度	批号	相似度
Y901	0.999	Y906	0.996
Y902	0.997	Y907	0.994
Y903	0.986	Y908	0.997
Y904	0.976	Y909	0.999
Y905	0.992	Y1505206	0.928

表 2 10 批细辛相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results for 10 batches of *Asarum heterotropoides*

批号	相似度	批号	相似度
Z901	0.995	Z906	0.984
Z902	0.997	Z907	0.974
Z903	0.994	Z908	0.995
Z904	0.999	Z909	0.983
Z905	0.994	Y1411470	0.997

2.4.3 共有色谱峰的指认 共标定辛夷药材共有色谱峰 22 个, 细辛药材色谱峰 11 个, 通过 Agilent 7890A-5975C 气-质联用检测分析 (图 3-A、B) 结合 NIST08 谱库检索、保留时间、对照品及相关文献数据^[7-10]对辛夷、细辛药材共有峰进行指认, 辨识结果见表 3、4。

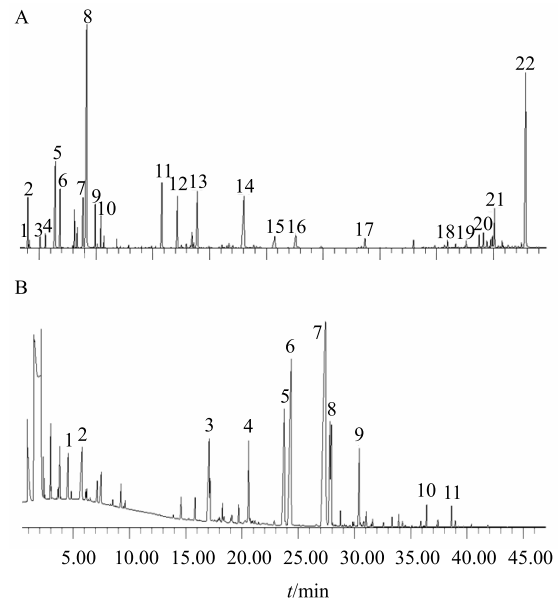


图 3 辛夷 (A) 和细辛 (B) GC-MS 总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of volatile components in *Magnolia biondii* (A) and *Asarum heterotropoides* (B)

表 3 辛夷指纹图谱色谱峰指认

Table 3 Identification for fingerprint of *Magnolia biondii*

峰号	t_R /min	化合物	相对分子质量	分子式
1	4.000	1R- α -蒎烯	136	C ₁₀ H ₁₆
2	4.148	β -月桂烯	136	C ₁₀ H ₁₆
3	5.077	左旋樟脑	152	C ₁₀ H ₁₆ O
4	5.566	乙酸丁酯	116	C ₆ H ₁₂ O ₂
5	6.402	β -蒎烯	136	C ₁₀ H ₁₆
6	6.844	β -水芹烯	136	C ₁₀ H ₁₆
7	8.867	柠檬烯	136	C ₁₀ H ₁₆
8	9.138	桉叶油素	154	C ₁₀ H ₁₈ O
9	9.936	蒎品烯	136	C ₁₀ H ₁₆
10	10.432	邻异丙基甲苯	134	C ₁₀ H ₁₄
11	15.786	右旋樟脑	152	C ₁₀ H ₁₆ O
12	17.150	芳樟醇	154	C ₁₀ H ₁₈ O
13	18.932	(-)-4-蒎品醇	154	C ₁₀ H ₁₈ O
14	23.039	α -蒎品醇	154	C ₁₀ H ₁₈ O
15	25.681	δ -杜松烯	204	C ₁₅ H ₂₄
16	27.595	β -香茅醇	156	C ₁₀ H ₂₀ O
17	33.693	橙花醇	154	C ₁₀ H ₁₈ O
18	44.107	A-萜橙蒎醇	222	C ₁₅ H ₂₆ O
19	44.425	古巴烯	204	C ₁₅ H ₂₄
20	44.929	γ -杜松烯	204	C ₁₅ H ₂₄
21	45.099	绿花白千层醇	222	C ₁₅ H ₂₆ O
22	47.796	金合欢醇	222	C ₁₅ H ₂₆ O

表 4 细辛指纹图谱色谱峰指认

Table 4 Identification for fingerprint of *Asarum heterotropoides*

峰号	t_R/min	化合物	相对分子质量	分子式
1	4.551	α -蒎烯	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
2	5.767	3-蒎烯	136	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$
3	17.034	2,4-cycloheptadien-1-one-2,6,6-trimethyl	154	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
4	20.606	A-松油醇	154	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
5	23.752	3,5-dimethoxytoluene	154	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$
6	24.302	5-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole,	162	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$
7	27.37	甲基丁香酚	178	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$
8	27.851	3,4,5-三甲氧基甲苯	182	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$
9	30.423	肉豆蔻醚	192	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$
10	33.926	δ -杜松烯	204	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$
11	34.259	二十四烷	338	$\text{C}_{24}\text{H}_{50}$

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

考察了 Aglient HP-5 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 DB-WAX (20 m×0.18 mm, 180 μm) 2 种不同类型的色谱柱, 结果表明 DB-WAX (20 m×0.18 mm, 180 μm) 色谱柱分离效果好、柱效高, 因此选择该色谱柱。

3.2 提取条件的考察

本实验考察了水蒸气蒸馏、超声、加热回流及冷浸 4 种提取方式, 水蒸气蒸馏法色谱峰杂峰干扰较少, 超声及加热回流 2 种提取方式差异较小, 但色谱峰杂峰较多, 故选择水蒸气蒸馏法做为提取方式, 并对提取时间 (1、2、3、4、5 h) 及溶剂倍量 (10、20、30、40、50 倍) 进行了考察, 结果表明溶剂倍量 30 倍提取 3 h 提取效率最高, 已完全提取。

3.3 辛夷、细辛共有峰在六经头痛片中的归属及分析

本实验中辛夷药材 22 个共有峰中 1R- α -蒎烯、 β -月桂烯、左旋樟脑、 β -蒎烯、 β -水芹烯、柠檬烯、桉叶油素、蒎品烯、邻异丙基甲苯、芳樟醇、(-)-4-蒎品醇、 α -蒎品醇、古巴烯、金合欢醇 14 个成分在全方中均可检测得到^[11], 其中金合欢醇在全方药材归属中仅来源于辛夷药材, γ -杜松烯、绿花白千层醇、A-萜橙茄醇、橙花醇、 β -香茅醇、右旋樟脑等 8 个成分在全方指认中未检测到, 为辛夷共有峰中的特有成分, 其中左旋樟脑具有中枢抑制作用, α -

蒎烯具有抗炎镇痛活性; 细辛药材 11 个共有峰中 1R- α -蒎烯、3-蒎烯、 δ -杜松烯、二十四烷 4 个成分在全方中均可检测得到, 3,5-dimethoxytoluene、5-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole、甲基丁香酚、3,4,5-三甲氧基甲苯、肉豆蔻醚等 7 个成分为细辛共有峰中的特有成分, 其中 α -蒎烯具有抗炎镇痛活性, 甲基丁香酚具有一定的镇痛作用^[12]。

本实验建立了辛夷药材 GC 指纹图谱, 共标定共有峰 22 个, 细辛药材共标定共有峰 11 个, 并通过 GC-MS 及相关手段对全部共有峰进行了指认。采用相似度评价软件对不同批次的辛夷和细辛药材进行了指纹图谱评价, 该方法稳定、可靠, 精密度、重复性良好, 为辛夷和细辛药材的质量评价和控制提供了依据, 对六经头痛片的质量控制提供了参考。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准中药成方制剂 (第 20 册) [S]. 1998.
- [2] 黄世佐, 明海霞, 李 军, 等. 单叶细辛镇痛及抗炎效应的实验研究 [J]. 甘肃中医, 2009, 22(12): 63-65.
- [3] 姜肖峰. 六经头痛片治疗偏头痛的临床观察 [J]. 中国医学工程, 2012, 20(2): 107.
- [4] 李永红. 头痛病证的历代文献研究与学术源流探讨 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2002.
- [5] 叶 颢. 细辛治头痛验案三则 [J]. 山东中医杂志, 1997, 16(1): 35-36.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] 宋庆武, 范开田, 林 静, 等. 分子蒸馏技术拆分细辛油及 GC-MS 分析 [J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(4): 586-590.
- [8] 杜成智, 陈玉萍, 覃洁萍, 等. 不同产地细辛挥发油的 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 57-59.
- [9] 罗会俊, 程庚金生, 彭金年. 辛夷正己烷萃取物的 GC-MS 分析 [J]. 赣南医学院学报, 2012, 32(4): 497-498.
- [10] 邱 琴, 刘廷礼, 崔兆杰. GC-MS 法测定辛夷挥发油成分 [J]. 中药材, 2001, 24(4): 269-270.
- [11] 张晓燕, 龚苏晓, 游飞祥, 等. 基于 GC-MS 的六经头痛片挥发性化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3787-3794.
- [12] 蒋 莹, 刘国卿, 马俊儒, 等. 甲基丁香酚的药理研究 [J]. 药学学报, 1982, 17(2): 87-92.