

不同产地细辛中主要有效成分含量测定与比较

王志清¹, 宋佳¹, 马海琴², 逢世峰², 马琳², 崔丽丽², 田义新¹

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 132118

2. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

摘要: 目的 研究 47 份不同来源、不同表型正品细辛样品的主要有效成分含量, 评价正品细辛样品的质量, 揭示有效成分形成与遗传和地域的关系, 为细辛优良品种选育与开发利用提供理论依据。方法 冷凝回流法提取挥发油、乙醇热浸法提取醇溶性浸出物, HPLC 法测定细辛脂素含量、气质联用 (GC-MS) 分析挥发油组分, 组间联接法进行聚类分析。结果 47 份细辛样品挥发油量 0.81%~3.32%。有 5 份样品挥发油量超过 3.0%。醇溶性浸出物量为 9.87%~29.40%, 含量超过 20% 的样品占总数的 63.8%。细辛脂素质量分数为 0.118%~0.424%, 有 26 份样品细辛脂素质量分数超过 0.25%; 47 份细辛挥发油可分离出的化合物种类 48~77 种, 化合物种类和含量有较大差异。基于有效成分的聚类分析将不同来源地、不同表型的细辛分为 10 类, 聚类方式基本是按照来源地为基础进行聚类, 同一来源地的汉城细辛和北细辛聚在一类中。结论 在同一栽培环境和条件下, 不同来源地、不同植物学表型的样品个体间有效成分含量间存在差异, 新品种选育时可依照植物表型选择优良育种材料。大部分样品聚类与来源地域有关而与植物表型以及植物学分类无关。

关键词: 细辛; 有效成分; 细辛脂素; 挥发油; 聚类分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0748-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.027

Analysis and evaluation on main active ingredients of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* from different habitats

WANG Zhi-qing¹, SONG Jia¹, MA Hai-qin², PANG Shi-feng², MA Lin², CUI Li-li², TIAN Yi-xin¹

1. College of Herbal Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 132118, China

2. Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Changchun 130112, China

Abstract: Objective Active ingredients of 47 *Asarum* samples from different habitats with different phenotypes were analyzed in this paper in order to reveal the relationship between the formation of active ingredients and genetics and geography, and provide some scientific basis for the breeding and utilizing of *Asarum*. **Methods** Ethanol extract and volatile oil were extracted according to the methods of Chinese Pharmacopoeia. Asarinin was detected by HPLC. Volatile oil composition was determined by GC-MS. The between-groups linkage clustering method was carried out. **Results** Volatile oil content of 47 samples was 0.81%—3.32%, and five samples' volatile oil content exceeded 3.0%. Ethanol extract content of samples was 9.87%—29.40%, and ethanol extract content of 30 resources accounting for 63.8 percent of all samples exceeded 20%. Asarinin content of 26 resources was more than 0.25%. Totally 48—77 compounds from the volatile oil could be determined and relative content of each compound was different. Forty-seven samples from different habitats with different phenotypes were divided to ten groups by between-groups linkage clustering method according to the active ingredients. All the accessions could be classified clearly. The cluster of accessions was associated with resource region. *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* and *Asarum sieboldii* var. *seoulense* from the same origin were grouped together. **Conclusion** There were much more differences in active ingredients content among *Asarum* resources which were in different regions cultivated with same way and environment with different phenotypes. We could select the perfect fundamental material according to the phenotypes and introduce germplasm from different regions for breeding and utilizing of *Asarum*. Most of samples clustered together associated with their origins instead of phenotype or specie.

Key words: *Asarum* germplasm resources; active ingredients; asarinin; volatile oil; cluster analysis

北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. var. *sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai 是《中国药典》*mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 和汉城细辛 *A.* 2015 年版收载的正品, 以根入药, 味辛, 性温, 归

收稿日期: 2019-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81403052); 吉林省科技厅技术攻关项目 (20190304017YY); 吉林省科技厅医药健康专项 (20191102038YY); 国家重点专项 (2019YFC1710070)

作者简介: 王志清 (1976—), 女, 山西原平人, 副教授, 博士, 从事中药资源与开发研究。E-mail: wangzhiqing96@sohu.com

心、肺、肾经，具有祛风散寒、通窍止痛、温肺化饮的功效，临床上常用于治疗风寒头痛、痰饮咳喘、关节疼痛、鼻塞、牙痛等^[1]。细辛醇溶性浸出物具有抗炎、强心等作用，细辛脂素具有抗病毒、抗结核杆菌等作用，细辛的挥发油有解热、镇静、镇痛、抑菌、抗炎和局部麻醉等作用，因此，《中国药典》2015 年版将细辛中挥发油、浸出物、细辛脂素等的含量作为质量控制的重要指标。近年来，细辛在化工工业方面应用也逐渐广泛，常用于靶向药物、日用品、香精、杀虫剂、绿色农药等产品开发^[2-3]。在细辛及其有效成分深度开发的推动下，日本、德国、美国等国家大量从我国进口细辛药材，细辛的需求日益增长。

细辛药材的优质、高效、安全、稳定是药品质量的命脉和关键，也是北细辛开发利用和出口创汇的重要前提。所以筛选优良种质进行繁育和栽培是细辛开发与利用重要工作。目前，北细辛和汉城细辛主要在东北地区栽培种植，并以北细辛居多，汉城细辛仅零星分布。东北地区细辛种质表型丰富，是细辛的优良品种选育和开发利用的物质基础，本实验将收集并繁育的不同表型的细辛样品挥发油、浸出物、细辛脂素等的含量进行评价和比较，为细辛开发与利用、以细辛为基原的细辛药材合理用药

和质量控制提供理论参考。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

47 份细辛种质样品来源于辽宁、吉林和黑龙江省，具体来源见表 1。经吉林农业大学田义新教授分别鉴定为北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 和汉城细辛 *Asarum sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai。对照品细辛脂素（批号 133-05-01，质量分数大于 98%）购自上海源叶生物科技有限公司，供含量测定。

1.2 仪器和试剂

Agilent 7890A 气相色谱仪/Agilent 5975C 质谱仪（美国 Agilent 公司）、Agilent1290 Infinity 超高压液相色谱系统（美国 Agilent 公司）、PS-80A 型超声波清洗器（深圳洁康小型超声波清洗机有限公司）、CPA225D 型 Sartorius 分析天平，ACCULAB 型智能电子调温水浴锅、回流冷凝装置和挥发油提取装置、98-1-B 型电子调温热套（天津赛维斯特仪器有限公司），电热烘箱（上海一恒科学仪器有限公司）、PS-80A 型超声波清洗器（深圳洁康小型超声波清洗机有限公司）等。色谱纯甲醇（Fisher 公司）、色谱纯乙腈（Fisher）、超纯水、乙醇（分析纯，北京化工厂）。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	来源	种名	生长年限/年	特征描述
1	辽宁新宾	北细辛	10	叶片肾形，叶柄青紫色，果被筒浅粉色
2	辽宁新宾	汉城细辛	10	花被片不下翻，花被片上有腺点，果被筒棱明显
3	辽宁新宾	北细辛	10	大叶细辛，叶柄绿色，叶片心形
4	辽宁新宾	北细辛	10	叶片心形，大叶，叶柄青紫色
5	辽宁新宾	北细辛	10	果被筒浅黄绿色，果柄绿色，叶柄绿色
6	辽宁新宾	北细辛	10	果被筒黄绿色，果柄绿色，叶柄绿色
7	辽宁新宾	汉城细辛	10	花被片半直立不下翻，茎绿色，果柄绿色，花被片基部浅黄绿色
8	辽宁新宾	北细辛	10	叶柄绿色，叶片心形，果被筒绿色上有紫色斑点
9	辽宁新宾	汉城细辛	10	花被片不下翻，果被筒较长近“U”形，果被筒有明显棱
10	辽宁新宾	北细辛	10	叶柄基部紫色，果被筒紫色，果柄紫色
11	吉林通化	北细辛	10	叶柄深紫红色，果柄深紫红色，果被筒深紫红色
12	吉林通化	北细辛	10	叶柄基部绿色带有紫色，花被片绿色，果被筒绿色有紫褐色腺点
13	吉林通化	北细辛	10	叶柄青紫红色，花被片绿色，果柄基部紫色上部绿色
14	吉林通化	汉城细辛	10	叶柄青紫红至紫红色，花被片紫色、半直立不下翻，果被筒紫色，果柄青紫红至紫红色绿色
15	吉林通化	北细辛	10	叶柄绿色，花被片紫色，果被筒基部绿上部紫，果柄绿色
16	吉林通化	北细辛	10	叶柄青紫红色，花被片紫色，果被筒紫色，果柄青紫红色，叶心形
17	吉林通化	北细辛	10	叶柄绿色，果较大，果柄绿色，叶卵心形，花被片基部绿色上部紫色

续表 1

编号	来源	种名	生长年限/年	特征描述
18	吉林通化	北细辛	10	叶柄青紫红色, 花被片紫色, 果被筒紫色, 果柄青紫红色
19	吉林通化	北细辛	10	叶柄绿略带紫色, 果被筒黄白略带紫色, 花被片紫红色、基部黄白色
20	吉林通化	北细辛	10	叶柄基部绿中带紫色, 花被片紫色、平折不下翻, 果较大, 果柄绿色
21	吉林通化	北细辛	10	叶片宽心形, 叶柄浅紫红色, 花被片紫色、基部黄绿, 果被筒紫色
22	吉林通化	北细辛	10	叶柄浅紫色, 花被片浅紫色、基部黄绿色, 果被筒浅紫色, 果柄浅紫色, 叶片心形
23	吉林通化	北细辛	10	叶片心形, 叶柄绿色略带浅紫, 花被片绿且带紫, 果被筒浅黄绿带青紫红色, 果柄绿色
24	吉林通化	北细辛	10	叶柄黄绿色基部略带紫色, 叶片宽心形, 花被片紫红、基部黄绿, 果被筒浅黄绿带浅紫色, 果柄黄绿色
25	吉林通化	北细辛	10	叶柄绿色, 花被片浅紫红色、基部黄绿, 花被片平折、边缘翻卷, 果被筒黄绿色且较长, 果柄绿色
26	吉林通化	北细辛	10	叶柄绿色, 叶片宽心形, 花被片紫红色、基部黄绿, 花被片平折、边缘翻卷, 果被筒绿色且较长, 果柄绿色
27	吉林通化	北细辛	10	叶柄浅紫色, 花被片黄绿色、上有紫色腺点, 花被片基部黄绿色, 果被筒紫粉色, 果柄浅紫色
28	吉林通化	北细辛	10	果柄浅紫色, 花被片紫红色、基部黄绿色, 果被筒浅黄绿色, 果柄浅紫色
29	吉林通化	北细辛	10	叶柄绿色、基部浅紫色, 叶片心形, 花被片紫红色, 果上半部有明显棱, 果筒较长, 果柄浅紫色
30	辽宁清原	北细辛	10	叶柄紫红色, 果柄紫红色, 果被筒紫红色, 花被片紫红色
31	辽宁清原	北细辛	10	叶柄绿色, 果柄绿色, 花被片紫红色、基部浅紫粉色, 果被筒下半部绿色、上半部浅紫
32	吉林通化	北细辛	10	叶柄绿色, 果柄黄白色, 花被片紫红色、平折, 三角状
33	辽宁清原	北细辛	10	叶柄基部青紫红色、上部绿色, 花被片紫色, 花被片平折不下翻, 果被筒紫色, 果柄紫色
34	吉林通化	北细辛	10	叶柄紫红色, 果柄紫红色, 花被片绿中带紫、平折、三角状, 果被筒绿中带紫
35	辽宁清原	北细辛	10	叶柄青紫红色, 花被片深紫红色, 果被筒深紫红色, 果柄深紫红色
36	吉林通化	北细辛	10	叶柄浅黄绿色, 果被筒浅黄绿色, 花被片浅黄绿色, 花被片 3~4 枚
37	吉林通化	北细辛	10	叶柄青紫红色, 叶片宽心形, 果实较大, 花被片紫红色果被筒深紫红色, 花被片上举, 果被筒紫红色, 果柄紫红色
38	黑龙江牡丹江	北细辛	10	叶柄绿色, 果被筒下半部绿, 花被片青紫红色、基部绿色
39	吉林敦化	北细辛	10	叶柄绿色, 果柄绿色, 果被筒紫红色, 花被片基部绿色, 上部浅紫红色
40	辽宁新宾	北细辛	10	叶柄浅紫红色, 果柄浅紫红色, 果被筒浅紫红色, 花被片基部绿色, 上部浅紫紫红色
41	吉林通化	北细辛	10	叶柄黄绿色, 果柄浅黄绿色, 花被片紫红色、下翻, 果被筒上部紫色, 底部浅黄绿色
42	辽宁新宾	北细辛	10	叶柄浅黄绿色, 果柄浅紫红色, 花被片紫色, 下翻
43	辽宁新宾	汉城细辛	10	叶柄浅紫红色花被片上举, 花被片浅紫红色、不下翻, 果被筒较长近“U”形, 果被筒有明显棱
44	吉林通化	北细辛	10	叶柄深紫红色, 果柄深紫红色, 果被筒深紫红色
45	吉林通化	北细辛	10	叶柄浅紫红色, 果柄浅紫红色, 花被片浅紫红色, 果被筒浅紫红色
46	吉林通化	北细辛	10	叶柄绿色, 果柄绿色, 叶卵心形, 大叶, 花被片基部绿色上部浅紫色
47	吉林通化	北细辛	10	叶柄青紫色, 花被片紫色, 果被筒紫色, 果柄青紫色

2 方法与结果

2.1 样品处理

在北细辛种质资源基地(北纬 44.04', 东经 126.05', 年平均气温 3.6 °C, 绝对低温-39.8 °C, 最高气温 36.9 °C, ≥10 °C 活动积温 2 779.6 °C; 年降雨量 697 mm, 多集中在 6~8 月, 年日照数 2 400~2 600 h; 无霜期 125 d 左右)繁殖并栽培, 出苗展叶后给予 50% 自然光照。6 月下旬采收上述植株的根部, 洗净泥土, 晾干表面水分, 40 °C 恒温条件下烘 6 h, 在小型样品粉碎机上磨成细粉, 过 3 号筛用于醇溶性浸出物含量测定; 过 2 号筛用于挥发油含量和细辛脂素含量测定。

2.2 醇溶性浸出物、总挥发油含量测定

采用乙醇热浸法进行醇溶性浸出物的提取和含量测定, 采用冷凝回流法进行挥发油的提取和含量测定, 具体参照《中国药典》2015 年版的方法^[1]。

2.3 细辛脂素的测定

2.3.1 色谱条件 Poroshell C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 °C, 进样量 1 μL; 细辛脂素检测波长为 287 nm 以乙腈(A)-水(B)为流动相, 梯度洗脱(0~20 min, 50% A; 20~26 min, 50%~100% A); 对照品及样品色谱图见图 1。

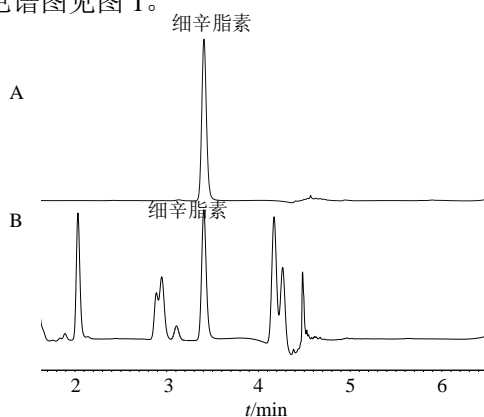


图 1 细辛脂素对照品 (A) 和细辛样品 (B) HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and *Asarum* (B)

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称定细辛脂素对照品 18.11 mg, 用 100 mL 甲醇溶液溶解后定容至棕色量瓶中, 超声处理 5 min, 待冷却后得对照品贮备液。

2.3.3 供试品溶液的制备 称定 1.0 g 左右待测样品, 置于具塞三角瓶中, 分别精密加入甲醇 15 mL 密塞后, 精密称定质量, 于超声波清洗器中超声提

取 45 min, 待三角瓶中液体冷却后, 继续称量, 补足减失的质量后, 抽滤, 得粗品, 锡箔纸包裹三角瓶后避光保存。将粗品用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后得供试品溶液。

2.3.4 线性关系考察 量取制备的细辛脂素标准液贮备液 1、5、20、30、40、50 μL 进样, 测定峰面积, 以细辛脂素进样量为横坐标(X), 色谱峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 曲线回归方程为 $Y=1.154\ 94\times 10^6 X-49\ 981.2$, $r^2=0.999\ 9$ 。线性范围 0.061~3.050 μg/mL。

2.3.5 精密度试验 量取细辛脂素对照品溶液, 按照上述色谱条件重复进样 5 次, 每次 1 μL, 细辛脂素峰面积积分值的 RSD 分别为 0.9%, 表明仪器的精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取细辛样品(26 号)按照“2.3.3”项方法制备 5 份样品, 连续进样, 每次 1 μL, 测定细辛脂素的峰面积积分值的 RSD 分别为 0.3%, 表明重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取细辛样品(26 号)溶液, 分别于配制后 0、1、3、7、15 h 进样, 测定细辛脂素峰面积为 0.6%, 表明样品中细辛脂素在 15 h 内稳定, 可以满足本方法测定时间上的要求。

2.3.8 加样回收率试验 取 0.25 g 已测定的样品 9 份, 每份精密称定, 加入样品中各成分量的 80%、100%、120% 的对照品, 各平行 3 份, 按照供试品溶液的制备方法处理并按“2.3.1”项测定, 计算平均加样回收率和 RSD。平均加样回收率为 98.33%~103.50%, RSD≤2.3%, 均符合分析要求。

2.4 挥发油气质联用(GC-MS)分析

气相色谱: 色谱柱为 HP-5 MS 石英毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm), 初始温度 40 °C, 恒温 2 min, 以 2.5 °C/min 升温至 160 °C, 再以 8 °C/min 升温至 280 °C, 恒温 7 min。氦气体积流量 1 mL/min, 脉冲不分流。进样口温度 280 °C。进样体积 1 μL。

质谱: 电子轰击源(EI), 电子能量 70 eV, 扫描范围 m/z 30~550, 倍增管电压 0.98 kV。离子源 230 °C, 四级杆 150 °C。溶剂延迟 3 min。

3 结果与分析

3.1 不同细辛样品挥发油含量

47 份样品的挥发油含量测定数据见表 2。从表 2 可看出, 所有 47 份细辛样品的挥发油质量分数在 0.81%~3.32%。绝大部分样品的挥发油质量分数集中在 2.0%~3.0% (图 2-A) 在 47 份样品

表 2 47 份细辛样品的挥发油、醇溶性浸出物和细辛脂素含量
Table 2 Volatile oil, ethanol extract and asarinin content of 47 *Asarum* samples

编号	挥发油/%	醇溶性浸出物/%	细辛脂素/%	编号	挥发油/%	醇溶性浸出物/%	细辛脂素/%
1	2.26	26.85	0.400	25	1.99	23.39	0.275
2	3.06	29.40	0.395	26	2.77	17.79	0.358
3	2.02	21.43	0.149	27	2.90	23.85	0.298
4	1.72	24.32	0.218	28	2.10	21.74	0.287
5	2.14	20.32	0.214	29	2.41	20.76	0.259
6	2.09	20.97	0.271	30	3.13	22.73	0.282
7	1.56	22.95	0.223	31	3.32	25.39	0.391
8	1.66	21.16	0.182	32	1.01	20.90	0.118
9	2.19	19.18	0.330	33	2.87	17.64	0.272
10	2.94	22.06	0.253	34	0.81	9.87	0.264
11	2.09	21.53	0.203	35	1.96	13.67	0.161
12	2.77	19.72	0.249	36	2.48	19.73	0.419
13	2.50	17.82	0.182	37	1.86	15.26	0.231
14	2.59	24.76	0.304	38	1.17	23.45	0.279
15	2.00	17.21	0.226	39	2.75	16.63	0.302
16	2.60	22.74	0.180	40	3.00	17.10	0.227
17	2.21	24.00	0.424	41	2.22	23.95	0.333
18	3.19	16.13	0.333	42	1.80	20.81	0.164
19	2.54	19.16	0.151	43	2.67	16.97	0.242
20	2.90	17.38	0.291	44	1.06	21.15	0.202
21	2.35	25.49	0.324	45	2.14	21.44	0.212
22	2.84	20.59	0.225	46	1.07	22.31	0.169
23	2.71	20.49	0.289	47	2.31	17.69	0.317
24	2.41	20.82	0.281				

中, 有 12 份样品的挥发油含量低于《中国药典》2015 年版规定的 2.0%, 它们分别是来自辽宁新宾的 4、7、8、42 号, 辽宁清原 35 号, 吉林通化的 25、32、34、37、44、46 号和黑龙江牡丹江的 38 号样品。有 30 份样品挥发油质量分数在 2.0%~3.0%, 占总数的 63.8%, 30 份样品中, 有 7 份来自辽宁新宾, 21 份来自吉林通化, 1 份来自辽宁清原, 1 份来自吉林敦化。有 5 份样品挥发油质量分数超过 3.0%, 是来自辽宁新宾的 2 号和 40 号样品, 来自吉林通化的 18 号样品以及来自清原的 30 号和 31 号样品。

3.2 不同细辛样品醇溶性浸出物含量

所有 47 份细辛醇溶性浸出物量为 9.87%~29.40% (表 2), 含量超过了《中国药典》2015 年版规定的 9.0%。大部分样品的醇溶性浸出物量集中在 15%~25% (图 2)。在所有 47 份样品中, 有 30 份样品的醇溶性浸出物量超过 20%, 占总数的 63.8%, 其中 10 份样品分别采自辽宁新宾, 17 份采自吉林通化, 2 份样品采自辽宁清原, 1 份样品来

自黑龙江牡丹江。原采自辽宁新宾的 2 号样品, 其醇溶性浸出物含量最高, 为 29.40%; 而采自吉林通化的 34 号样品, 其醇溶性浸出物量最低, 为 9.87%。

3.3 不同细辛样品细辛脂素含量

47 份样品的细辛脂素质量分数在 0.118%~0.424% (表 2), 超过了《中国药典》2015 年版规定的 0.05%, 其中 32 号样品中细辛脂素质量分数最低, 为 0.118%, 而 17 号样品中细辛脂素质量分数最高, 为 0.424%。大部分样品的细辛脂素质量分数集中在 0.20%~0.35% (图 2)。47 份样品中, 有 26 份样品中细辛脂素含量超过 0.25%, 是《中国药典》2015 年版规定的细辛脂素含量标准的 5 倍以上, 这 26 份样品中, 按来源归类, 有 5 份采自辽宁新宾, 16 份采自吉林通化, 3 份采自辽宁清原, 1 份采自吉林敦化, 1 份采自黑龙江牡丹江, 按种属归类, 有 3 份为汉城细辛, 23 份为北细辛。

3.4 不同细辛样品化学成分聚类分析

根据每份样品的挥发油、醇溶性浸出物和细辛脂素含量, 利用 SPSS 统计分析软件, 采用组间联

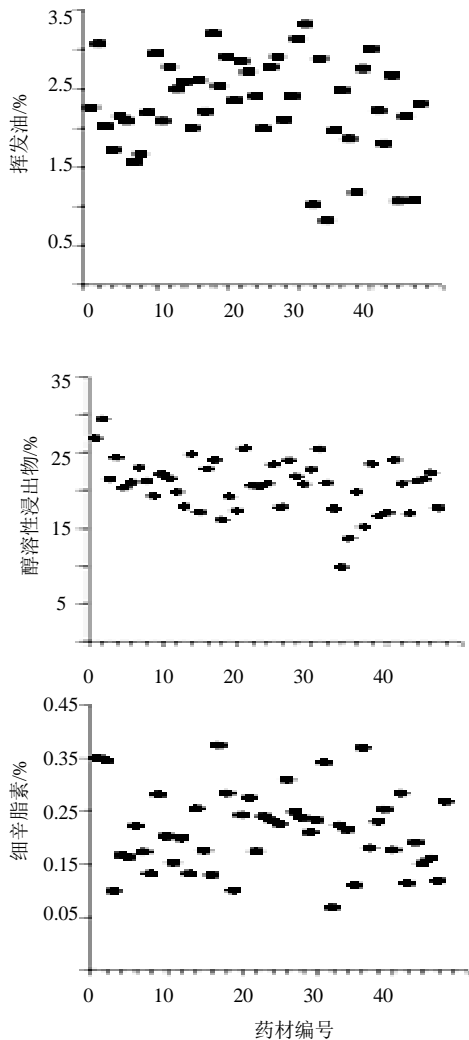


图 2 47 份细辛样品有效成分含量分布散点图

Fig. 2 Content scatter plot of active ingredients of 47 different *Asarum* samples

接法进行聚类, 可将 47 份样品完全分开。依据组间的平均平方距离阈值为 5, 可将 47 份样品分为 10 类 (图 3), 其聚类方式基本是按照来源地为基准进行聚类的。采自吉林通化的编号为 24、29、23、25、28、27、30、14、21、41 的样品聚成一类 (图 3, I), 并且这 10 份样品均为北细辛。采自通化的编号为 18、20、26 的样品以及来自辽宁新宾的 9 号样品聚为一类 (图 3, II), 其中, 9 号样品为汉城细辛, 其他 3 份均为北细辛。采自辽宁新宾的 7 份样品和吉林通化的 7 份样品聚成一类 (图 3, III), 其中来自辽宁新宾的编号为 5、6、4、7、3、8 样品以及来自吉林通化的 11 号样品先聚为一类, 这 7 份样品中, 有 4 份为北细辛, 3 份为汉城细辛, 来自吉林通化的 6 份样品 (12、22、16、13、19、

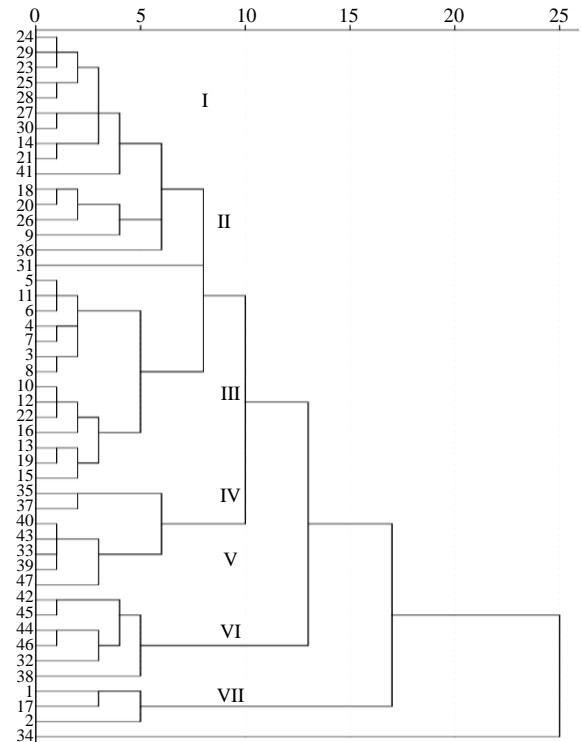


图 3 基于有效成分的聚类图 (组间联接法)

Fig. 3 Dendrogram generated by between-groups linkage methods based on active ingredients

15) 聚为一类, 样品种属类型均为北细辛。采自辽宁新宾的编号为 40、43、33、47 和采自吉林通化的编号为 39 的样品聚成一类 (图 3, V)。采自吉林通化的编号为 32、44、45、46, 采自辽宁新宾的 42 号样品以及采自黑龙江牡丹江的 38 号样品聚为一类 (图 3, VI), 其中 32 号样品为汉城细辛, 其余为北细辛。而采自通化的 36、34、31 号样品分别单独聚类。

3.3 挥发油成分 GS-MS 分析

采用气相色谱-质谱系统对其中 43 份材料的挥发油成分进行测试分析, 得到其总离子流图 (图 4), 将所得的离子流图通过计算机系统与 NBS 质谱数据库中的图谱进行检索比对, 从而确定出每份材料挥发油中的化学成分。检索结果显示, 相同测试条件下, 每份材料分离出的化合物种类 48~77 种, 化合物种类和含量有差异。以符合度 90% 为界值, 某种化合物在某一份材料中的含量超过 1% 即被筛选, 总共筛选出 14 种化合物: α -pinene (α -蒎烯)、bicyclo [3.1.1] heptane,6,6-dimethyl-2-methylene-(1S) (β -蒎烯)、2,4-cycloheptadien-1-one, 2,6,6-trimethyl (优葛萜酮)、3,5-dimethoxytoluene (3,5-二甲氧基甲苯)、1,3-benzodioxole, 5-(2-propenyl)

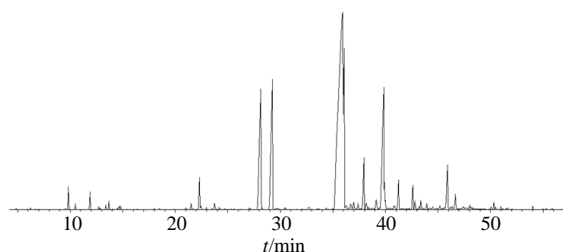


图 4 挥发油总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram of volatile oil

(黄樟醚)、benzene,1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl) (甲基丁香酚)、1,3-benzodioxole,4-methoxy-6-(2-propenyl) (肉豆蔻醚)、bicyclo [4.1.0] ept-3-ene,3,7,7-trimethyl-(1*S*)-3-Carene ((1*S*)-3-萜烯)、3,4-methylene dioxypropiofenone (3,4-亚甲基二氧苯丙酮)、benzene,1,2,3-trimethoxy-5-(2-propenyl) (榄香脂素)、2-hydroxy-4,5-methylenedioxypropiofenone (卡枯醇)、octane (辛烷)、estragole (爱草脑)、borneol (龙脑)。各成分的相对含量在每份样品中差异较大。表 3 列出其中 12 种,从表 3 数据可知,47 份实验材料中,有 8 份样品中的 α -萜烯相对含量超过 1%,有 2 份材料未检索出此化合物,相对含量最高的是 15 号样品,为 2.543%。有 9 份样品中的 β -萜烯相对含量超过 1%,有 3 份样品未检索出此化合物,相对含量最高的是 29 号样品,为 2.558%。47 份实验材料中均含有优葛萜酮、3,5-二甲氧基甲苯、黄樟醚、甲基丁香酚、肉豆蔻醚、榄香脂素、卡枯醇和辛烷 8 种化合物,其中,3,5-二甲氧基甲苯、黄樟醚和甲基丁香酚的相对含量均在每份样品中都较高,是细辛挥发油中的主要化合物。3,5-二甲氧基甲苯在每份样品中的相对含量均超过了 5%,为 5.109%~21.615%,在 14 份样品中相对含量低于 10% (2 号样品中相对含量仅为 5.109%),在 28 份样品中相对含量在 10%~20%,在 1 份样品 (30 号) 中相对含量达到 21.625%。黄樟醚相对含量在 8.569%~24.618%,在 2 号和 47 号 2 份样品中相对含量低于 10%,在 29 份材料中含量是 10%~20%,在 11 份样品中相对含量超过 20% (23 号样品中的达到 24.618%)。甲基丁香酚相对含量在每份样品中均超过 20%,为 20.637%~54.623%,在 9 份样品中相对含量低于 30% (26 号样品中仅为 20.637%),14 份样品中相对含量是 30%~40%,16 份样品中相对含量在 40%~50%,4 份样品中相对含量在高于 50% (17

号样品达 54.623%)。肉豆蔻醚、榄香脂素、卡枯醇和辛烷相对含量分别在 0.292%~9.205%、0.069%~22.106%、0.095%~7.654% 和 0.628%~6.079%。(1*S*)-3-萜烯和 3,4-亚甲基二氧苯丙酮的含量与 α -萜烯、 β -萜烯相似,相对含量较低且在有的样品中未检索出。

4 讨论

北细辛是东北道地大宗中药材,在吉林和辽宁两省种植面积约 6500 公顷除了一少部分用于中药或中成药外,大量生药出口日本、韩国、德国等国家用于有效成分提取,因此,细辛中有效成分含量是细辛开发利用及种植细辛药材效益的重要依据。由于受到马兜铃酸 I 肾毒性^[4-6]以及北细辛根中马兜铃酸 I 含量^[6-12]的影响,处于用药安全的角度,人们对细辛的用药非常谨慎。然而,细辛除了在治病方面的应用外,在日用品、杀虫剂、绿色农药等方面的产品开发具有广泛前景。因此,细辛中各个有效成分评价指标以及细辛中所有有效成分的综合评价对细辛开发利用十分必要的。

本实验所研究的样品是从黑龙江、吉林、辽宁收集,虽来自不同地区,但在同一样地、同一栽培条件下栽培 4 年以上,而个体间有效成分含量差异较大,亦即同一省份或同一地区的细辛样品,其挥发油、醇溶性浸出物、细辛脂素以及挥发油中挥发性化合物的含量间存在差异,所以,样品间的有效成分含量差异主要是来自样品自身光合产物次生代谢与合成的差异,是有细辛样品本身遗传特性所决定的。利用每份样品有效成分含量进行聚类分析,聚类的方式基本是按照样品的来源地聚类的,这与利用遗传标记分析细辛样品遗传多样性时的来自同一地区的样品聚类特点基本相同^[13]。

细辛挥发油成分为苯丙烷类化合物,苯丙烷类化合物的次生代谢与光照强度强弱有关^[14-16],因此,细辛挥发油含量是受环境条件和遗传基因双重影响的。而细辛脂素和醇溶性浸出物含量是否受光照条件的影响或者是受遗传基因控制还有待于研究。本实验中测得的挥发油含量普遍较低,有 11 份样品的挥发油含量低于 2.0%,原因可能是由于本实验需要测定单株的挥发油、醇溶性浸出物以及细辛脂素含量,为了保证单株待测样品量,样品栽培的时间比较长,所有样品均为 10 年生,细辛挥发油的合成增长速度随着生长年限的生长而减缓^[17];

表 3 47 份细辛种质样品挥发油中 12 种主要成分含量
Table 3 Twelve compounds of 47 *Asarum* germplasm resources

编号	相对含量/%											
	α -蒎烯	β -蒎烯	优葛萜酮	3,5-二甲氧基甲苯	黄樟醚	甲基丁香酚	肉豆蔻醚	(1S)-3-萜烯	3,4-(亚甲基二氧)苯丙酮	榄香脂素	卡枯醇	辛烷
1	0.210	0.243	0.943	9.191	12.654	45.465	1.411	0.590	0.735	0.970	1.488	2.401
2	0.710	0.689	3.462	5.109	8.569	22.106	9.205	—	1.122	22.106	1.581	0.957
3	0.083	0.166	0.882	9.754	17.123	43.680	1.702	0.084	0.549	1.752	2.205	4.667
5	—	0.085	1.643	11.746	16.959	41.157	1.565	1.204	0.802	1.383	2.187	5.096
6	0.045	0.074	1.451	11.492	15.228	41.326	6.236	0.062	1.515	1.149	2.613	4.136
7	0.115	0.077	0.848	7.763	11.605	46.499	1.721	0.107	0.568	1.166	2.809	4.649
8	0.099	0.129	0.679	15.697	18.878	36.513	1.527	0.122	2.537	1.029	5.670	4.926
9	0.041	0.075	2.146	11.045	16.618	43.024	2.269	0.149	1.252	0.809	3.814	4.387
10	0.901	0.693	0.895	8.473	11.951	50.589	0.411	1.778	0.813	1.170	1.704	2.622
11	0.264	0.422	0.489	12.03	16.602	38.918	0.709	0.193	0.702	1.422	1.104	4.206
12	0.266	—	0.266	7.706	16.010	42.517	1.195	—	1.986	1.132	4.529	2.658
13	0.276	0.380	1.659	11.335	21.092	32.725	0.994	0.575	—	0.785	1.772	4.676
14	0.006	—	0.971	11.335	11.167	52.347	0.570	0.109	0.714	1.811	1.522	4.934
15	2.543	2.155	3.347	7.932	20.650	20.650	3.450	2.218	1.179	1.655	5.160	0.803
16	0.723	0.263	1.227	10.931	16.612	39.443	3.779	0.961	0.534	0.735	1.016	2.210
17	0.316	0.151	1.178	11.711	10.681	54.623	0.681	0.266	0.370	1.715	0.633	2.066
18	0.249	0.186	0.687	12.107	18.802	42.580	0.292	0.011	0.378	1.113	0.662	2.617
19	0.153	0.234	0.757	11.638	14.750	41.984	0.733	—	1.257	1.038	2.503	2.594
20	0.299	0.397	1.307	15.760	19.425	45.306	2.234	0.510	0.409	0.744	0.458	2.766
21	0.545	0.474	0.670	11.816	12.813	37.186	1.196	0.540	0.780	0.946	4.496	2.404
22	0.632	0.680	1.058	14.250	12.613	33.697	1.214	1.461	0.922	0.722	3.435	4.369
23	1.886	2.141	2.478	10.052	24.618	24.787	2.179	0.605	1.311	2.228	3.227	0.865
24	0.063	0.085	1.486	10.653	19.441	36.079	1.853	0.052	0.627	0.749	1.306	4.403
25	—	—	1.344	8.830	23.053	36.644	1.057	0.045	8.830	0.757	1.378	2.256
26	1.997	2.531	2.189	10.119	20.637	20.637	2.028	2.005	1.647	2.126	7.654	0.749
27	0.263	0.403	1.183	10.504	22.187	33.469	5.717	0.339	2.002	0.685	1.003	4.312
28	0.287	0.740	1.289	12.645	14.229	46.455	0.682	0.784	—	1.075	1.246	2.563
29	2.433	2.558	4.042	9.609	21.114	21.114	2.083	2.459	0.632	1.661	4.132	0.628
30	1.354	0.849	3.629	21.615	18.994	22.478	2.587	0.951	0.517	3.190	1.627	0.645
31	0.521	0.577	4.171	10.233	20.073	21.934	6.992	1.364	1.538	11.462	1.787	0.831
33	0.524	1.036	1.955	10.300	14.922	42.526	0.672	0.796	1.973	0.990	1.077	2.367
34	0.209	0.354	0.673	11.281	20.218	35.640	0.995	—	—	0.833	0.158	4.720
35	0.090	0.108	0.674	16.821	22.141	33.421	0.502	—	1.716	0.806	0.095	2.617
36	1.291	2.009	3.182	8.853	23.282	23.282	4.025	0.876	0.664	0.620	2.103	0.820
37	0.241	0.109	0.522	10.054	18.894	34.006	0.794	0.219	0.550	1.087	0.113	5.626
38	0.03	0.025	0.580	9.724	17.520	40.192	0.732	—	0.558	1.247	2.296	6.079
39	0.428	0.213	0.729	10.924	15.634	46.681	0.952	0.115	0.662	0.069	2.855	2.453
40	0.915	1.057	2.006	9.453	19.214	37.190	1.014	1.501	1.023	1.059	1.907	2.225
41	1.348	1.700	3.906	7.787	21.471	21.471	3.081	1.711	0.954	2.731	5.075	0.844
42	0.082	0.078	0.625	10.261	10.696	48.128	0.760	0.218	0.327	2.622	0.780	2.539
43	1.035	1.857	2.251	9.199	14.046	47.502	1.016	1.402	0.717	0.692	1.648	2.455
45	0.688	0.604	1.986	11.948	17.165	33.255	2.363	2.292	0.436	0.638	2.205	2.714
47	0.465	0.470	0.720	10.472	8.757	52.794	0.752	0.267	0.410	2.262	0.602	4.868

另外, 由于大年生细辛叶片数较多, 叶片间相互遮挡, 一方面造成弱光阻碍挥发油合成, 另一方面, 造成光合作用减弱, 同时细辛生长需要消耗光合产物, 使细辛次生代谢物合成减少甚至是消耗, 所以挥发油含量较低^[18]。

细辛是典型的自花授粉植物, 细辛种质间没有基因交流。每份样品及其后代一直保持着亲代自身的遗传基因, 每份细辛样品有效成分含量在亲代和子代中含量除了受生长年限和环境条件影响外, 不会因杂交而受其他样品遗传特性的影响。因此, 有效成分含量高的细辛样品可以作为纯系成为细辛优良品种的重要材料。具有不同表型性状的细辛间有效成分含量具有差异, 在选择细辛优良种源时, 就可依照细辛的植物学性状进行选择。而且, 为了利于细辛定向开发和靶向选择, 在选择优质样品时, 可以依据开发利用目的, 分别以挥发油、细辛脂素、醇溶性浸出物以及甲基丁香酚、黄樟醚等的含量作为选择依据和选择目标, 进行优良种源的选择和优良品种的培育。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Wee S L, Alvin K W H, Tan K H. Comparative sensitivity to and consumption of methyl eugenol in three *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) complex sibling species [J]. *Chemoecology*, 2002, 12: 193-197.
- [3] Carlini E A, Dallmeier K, Zelger J L. Methyleugenol as a surgical anesthetic in rodents [J]. *Experientia*, 1981, 37: 588-589.
- [4] 李一昂, 李 霁, 于 锋. 马兜铃酸类化合物使用现状及肾脏毒性研究进展 [J]. *药学研究*, 2017, 36(9): 534-538.
- [5] 李 彪, 李晓玫, 张翠英, 等. 马兜铃酸 I 及马兜铃内酰胺 I 对肾小管上皮细胞损伤的差异 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2004, 36(1): 30-40.
- [6] 谢昭明, 李顺祥, 廖汉成, 等. HPLC 法测定细辛药材中马兜铃酸 A 的含量 [J]. *中南药学*, 2003, 1(3): 165-167.
- [7] 李国信, 于 艳, 田 原, 等. Rp-HPLC 法测定细辛根中马兜铃酸 A 的含量 [J]. *辽宁中医杂志*, 2005, 32(1): 1080-1081.
- [8] 吴艳蓉, 贾凌云, 高福坤, 等. 不同产地辽细辛中马兜铃酸的痕量检测 [J]. *中药研究与信息*, 2005, 7(1): 9-10.
- [9] 徐 玫, 李景华. 细辛不同部位的马兜铃酸及挥发油含量研究 [J]. *药物研究*, 2007, 16(10): 29-31.
- [10] 谢昭明, 李顺祥, 刘 杰, 等. 细辛不同部位马兜铃酸 A 的含量测定 [J]. *中成药*, 2007, 29(12): 1808-1810.
- [11] 薛 燕, 童湘晖, 王 峰. UPLC-UV 测定细辛地上和地下部位中的马兜铃酸 A [J]. *药学报*, 2008, 43(2): 221-223.
- [12] 张翠英, 俞 捷, 刘广学, 等. 3 种马兜铃酸和 2 种马兜铃内酰胺在北细辛、华细辛及汉城细辛不同部位的分布及含量分析 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2019, 21(77): 1295-1305.
- [13] 王志清, 刘继永, 李昌禹, 等. 利用 ISSR 和 SRAP 标记分析细辛资源遗传多样性与亲缘关系 [J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(5): 1035-1044.
- [14] 王志清, 郑培和, 逢世峰, 等. 光照强度对北细辛生长发育及质量的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 36(12): 1558-1567.
- [15] Chang X M, Alderson P G, Wright C J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils [J]. *Environ Exp Bot*, 2008, 63: 216-223.
- [16] 肖艳辉, 何金明, 王羽梅. 光照强度对茴香植株生长以及精油的含量和成分的影响 [J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(3): 551-555.
- [17] Wang Z Q, Guan Y M, Pang S F. Comparative analysis on traits of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. of different strains [J]. *Med Plant*, 2010, 9: 23-25.
- [18] 王志清. 北细辛种子特性及光合生理研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.