

一测多评法同时测定野生和家种防风 药材中4种有效成分的含量

丘 嫻^{1,2}, 李振雨^{1,2}, 周湘媛^{1,2}, 林碧珊³, 马懿飞^{1,2}, 何民友^{1,2},
赵书运⁴, 魏 梅^{1,2}, 孙冬梅^{1,2}, 陈向东^{1,2*}

(1. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244; 2. 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244; 3. 广东环球制药有限公司, 广东 佛山 528000; 4. 中国中药控股有限公司, 广东 佛山 528303)

摘要:目的: 采用一测多评法同时测定防风药材中升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的含量, 为野生和家种防风药材质量评价提供依据。方法: 色谱柱为 Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱; 流速为 0.35 mL/min; 检测波长为 254 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 1 μL。以升麻素苷为内参物, 测定升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的相对校正因子, 利用相对校正因子计算含量, 建立一测多评法, 并将一测多评的计算结果与外标法测定结果进行比较, 从而确定一测多评的准确性。同时比较野生和家种防风4种有效成分的含量差异。结果: 采用所建立的一测多评法计算的防风药材升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的含量与外标法计算的含量相对偏差均小于 5.0%, 野生防风中升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷含量均明显高于家种防风 ($P < 0.05$), 而升麻素苷在野生与家种中的含量无明显差异 ($P > 0.05$)。结论: 该一测多评法准确、便捷, 能够为防风药材的质量评价提供参考依据。

关键词: 防风; 一测多评; 野生; 家种; 质量评价

DOI: 10.11954/ytctyy.202309011

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1673-2197(2023)09-0059-07



Simultaneous Determination of Four Active Components in Wild and Cultivated *Saposhnikovia Divaricata* by One Test and Multiple Evaluation Method

Qiu Xian^{1,2}, Li Zhenyu^{1,2}, Zhou Xiangyuan^{1,2}, Lin Bishan³, Ma Yifei^{1,2}, He Minyou^{1,2},
Zhao Shuyun⁴, Wei Mei^{1,2}, Sun Dongmei^{1,2}, Chen Xiangdong^{1,2*}

(1. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China;
3. Guangdong Global Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528000, China;
4. China Traditional Chinese Medicine Holdings Co., Ltd., Foshan 528303, China)

Abstract: **Objective:** To provide the basic for the quality evaluation of wild and cultivated *Saposhnikovia divaricata*, the contents of cimicifugoside, cimifugin, 5-O-methylvisamitol glycoside and sec-O-glucosylhamaudol were simultaneously determined by the method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS). **Methods:** The determination was performed on Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile-water with gradient elution. The flow rate was 0.35 mL/min. The detection wavelength was 254 nm. The column temperature was 30 °C. The injection volume was 1 μL. The cimicifugoside was used as internal reference to determine the relative correction factors of cimifugin, 5-O-methylvisamitol glycoside and sec-O-glucosylhamaudol. The content was calculated by relative calibration factors to develop a method of quantitative analysis of multi-components. Comparing the results of QAMS with those of external standard method (ESM), the accuracy of one-evaluation and

收稿日期: 2022-11-21

基金项目: 佛山市核心技术攻关项目(1920001000378); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2020B1515120033)

作者简介: 丘嫻(1995—), 女, 广东一方制药有限公司标准研究员, 研究方向为中药饮片及中药配方颗粒质量控制。

E-mail: 269803601@qq.com

通讯作者: 陈向东(1974—), 男, 广东一方制药有限公司高级工程师, 研究方向为中药饮片及中药配方颗粒。E-mail:

1083656123@qq.com

multi-evaluation was determined. At the same time, the contents of four effective components of wild and cultivated *Saposhnikovia divaricata* were compared. **Results:** The average relative deviations between the results of QAMS and ESM were less than 5.0%. The contents of cimifugin, 5-O-methylvisamitol glycoside and sec-O-glucosylhamaudol in wild *Saposhnikovia divaricata* were significantly higher than those in cultivated *Saposhnikovia divaricata* ($P < 0.05$). There was no significant difference in the content of cimicifugoside between the wild and cultivated species. **Conclusion:** The QAMS method was accurate and convenient, which provided reference for the quality evaluation of *Saposhnikovia divaricata*.

Keywords: *Saposhnikovia Divaricata*; The Method of Quantitative Analysis of Multi-Components by Single Marker (QAMS); Wild; Cultivated; Quality Evaluation

防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 被誉为上品, 味辛、甘, 性微温, 具有解热、镇痛的作用^[1], 主要用于治疗感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒、破伤风^[2]。《本草纲目》载:“防者, 御也。其功效风最要, 故名。”防风历来被认为是“治风通用”之药^[3], 其主要有效成分为色原酮类、挥发油类、多糖类和香豆素类等^[4], 关于色原酮类成分的研究较多, 如升麻素、升麻苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷等; 最新的研究发现, 防风具有抗氧化、解热镇痛、抗炎等生物活性。有研究表明, 防风中色原酮成分可以通过清除自由基而表现出抗氧化活性^[5]; 防风中色原酮类成分在脂多糖(LPS)诱导的小鼠体内具有一定的抗炎、镇痛作用^[6,8], 其含量与抗炎活性密切相关^[7,9]。因此, 测定色原酮的含量常被用于防风药材的质量控制。

市场流通的防风药材有野生和家种两种。野生防风生长过程中无人干预, 产量较低; 家种防风在我国主要产于内蒙古、黑龙江、河北、四川等地^[10]。防风的药源一直以野生为主, 但近年来野生资源减少, 而防风为大宗药材, 需求量极大, 各地早有家种品出现, 但对家种防风的品种和质量未见系统研究, 造成对家种防风的应用缺乏科学依据^[11]。目前对野生防风和家种防风的区别研究主要集中在对两者的性状和药理活性进行比较, 而关于野生和家种防风有效成分的含量对比研究则较少^[12-13]。

《中华人民共和国药典》2020年版“防风药材”项下仅以升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷作为含量测定指标, 不能充分反映药材的质量; 本实验建立一测多评法, 对防风药材中 4 种主要活性成分进行含量检测, 并结合统计学分析, 旨在为野生和家种防风的质量评价提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters H-Class 超高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司); 超纯水系统(Milli-Q Direct, 默克股份有限公司); 万分之一天平(ME204E, 梅特勒-托利多

公司); 十万分之一天平(MS105DU, 梅特勒-托利多公司); 数控超声波清洗器(KQ-500DE, 昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药

试剂: 色谱纯甲醇、乙腈均为默克股份有限公司; 超纯水(自制); 其余试剂均为分析纯。

试药: 升麻素苷(111522-201913, 94.6%)、升麻素(111710-200602)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(111523-201811, 97.4%)、亥茅酚苷(111714-200501)均由中国食品药品检定研究院提供; 野生防风药材 8 批、家种防风 12 批, 按《中华人民共和国药典》2020 年版一部“防风”项下性状规定, 对本研究所用的 20 批防风药材性状进行检验, 结果均符合药典规定; 该 20 批防风药材经中国中医科学院中药研究所鉴定为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根。见表 1。

表 1 本研究所用 20 批防风药材来源信息

序号	批号	产地	资源情况
1	FF01	河北省承德市	野生
2	FF02	河北省承德市	野生
3	FF03	河北省承德市	野生
4	FF04	河北省承德市	野生
5	FF05	黑龙江大庆市	野生
6	FF06	黑龙江大庆市	野生
7	FF07	黑龙江大庆市	野生
8	FF08	黑龙江大庆市	野生
9	FF09	内蒙古呼伦贝尔市	家种
10	FF10	内蒙古呼伦贝尔市	家种
11	FF11	内蒙古呼伦贝尔市	家种
12	FF12	黑龙江大兴安岭地区	家种
13	FF13	黑龙江大兴安岭地区	家种
14	FF14	内蒙古呼伦贝尔市	家种
15	FF15	内蒙古呼伦贝尔市	家种
16	FF16	内蒙古呼伦贝尔市	家种
17	FF17	黑龙江大兴安岭地区	家种
18	FF18	黑龙江大兴安岭地区	家种
19	FF19	黑龙江大兴安岭地区	家种
20	FF20	黑龙江齐齐哈尔市	家种

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)

色谱柱;以乙腈(A)—水(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min,5%~29% A;10~11 min,29%~49% A;11~13 min,49%~100%);流速为0.35 mL/min;检测波长为254 nm;柱温为30℃;进样量为1 μL。

2.2 对照品溶液制备

准确称量升麻素苷对照品、亥茅酚苷对照品、5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品和升麻素对照品适量,加甲醇充分溶解,制成混合对照品溶液,其中升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的浓度分别为60 μg/mL、10 μg/mL、60 μg/mL和10 μg/mL。

2.3 供试品溶液制备

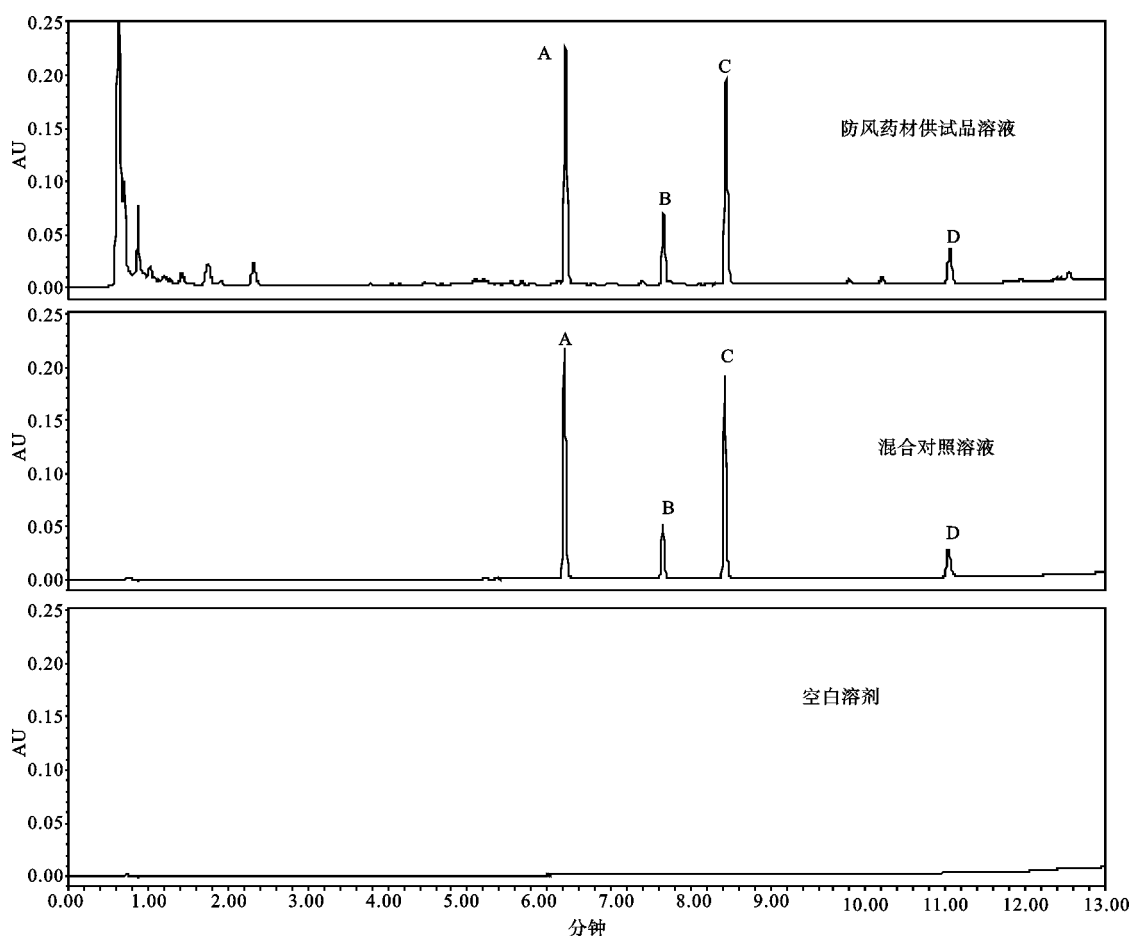
称取防风药材细粉约0.2 g,精密称定,精密加入

甲醇10 mL,称定质量,回流2 h,取出,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察 取防风药材(批号:FF01)细粉、空白溶剂(甲醇)、升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷及亥茅酚苷的混合对照溶液,按“2.1”项下确定的色谱条件进样测定,结果显示,防风药材供试品溶液4个色谱峰不受空白溶剂干扰,表明本方法具有良好的专属性。见图1。

2.4.2 精密度考察 取“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.1”项中规定的色谱条件,准确吸取混合对



注:峰A为升麻素苷;峰B为升麻素;峰C为5-O-甲基维斯阿米醇苷;峰D为亥茅酚苷。

图1 专属性考察结果

照品溶液,连续进样分析6次,对4种对照品的色谱峰面积分别进行记录,并对其RSD值进行计算。结果显示,连续进样分析6次,4种对照品(升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷以及亥茅酚苷)的峰面积RSD值分别为0.30%、1.42%、0.37%和0.41%,RSD值均低于3.0%,表明所用仪器的精密度达到分析要求。

2.4.3 稳定性考察 取防风药材(批号:FF01)细粉,按规定的方法制备供试品溶液,并按已知的色谱分析条件,分别在0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、18 h及24 h进样分析,分别记录升麻素苷、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷以及升麻素的色谱峰面积,并计算峰面积的RSD值,结果显示,在不同的时间点,上述4种化学成分的色谱峰面积的RSD值分别为0.4%、

1.4%、0.7%和1.7%，均 $\leq 3.0\%$ ，说明供试品溶液的稳定性在24h内符合分析要求。

2.4.4 重复性考察 取防风(FF01)的细粉末精确称量，按照“2.3”项下方法，制备6份供试品溶液，按照指定的色谱分析条件进行测定，记录各化合物的色谱峰峰面积，并利用外标法对4个组分进行含量测定，对6份样品的RSD值进行计算，结果显示4个组分(升麻素、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷)的平均含量为0.38%、0.29%、0.41%、0.18%；RSD值为1.2%、0.8%、0.41%、0.18%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收试验 取已知含量的防风(批号：FF01)细粉精确称量约0.1g，平行3组，每组3份，共

9份样品，分别置于具塞锥形瓶中，按照样品与对照品的含量比为1:0.5、1:1和1:1.5分别加入上述4种对照品，按“2.3”项下的制备方法制备9份供试品溶液，按已确定的色谱条件进行测定，对各化合物的峰面积进行记录，并对各成分的加样回收率及其RSD值进行计算，结果显示，升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷以及亥茅酚苷的平均加样回收率分别为101.44%、102.24%、100.97%及100.95%；其RSD值分别为2.35%、3.54%、2.02%和1.86%。结果显示4种有效成分的加样回收率在92%~108%范围之内，且RSD值均低于4%，说明所建立的分析方法的准确度达到了要求。见表2。

表2 防风中4种成分的加样回收率

化合物	取样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
升麻素苷	0.105 0	0.397 2	0.190 8	0.590 2	101.15	101.44	2.35
	0.103 0	0.389 6	0.190 8	0.589 2	104.59		
	0.101 5	0.384 0	0.190 8	0.583 6	104.63		
	0.102 3	0.387 0	0.381 5	0.769 5	100.26		
	0.102 9	0.389 3	0.381 5	0.768 8	99.48		
	0.103 8	0.392 7	0.381 5	0.765 4	97.70		
	0.106 9	0.404 4	0.572 3	0.978 6	100.33		
	0.105 4	0.398 7	0.572 3	0.977 8	101.19		
升麻素	0.103 4	0.391 2	0.572 3	0.984 1	103.61	102.24	3.54
	0.105 0	0.305 6	0.145 8	0.452 0	100.45		
	0.103 0	0.299 7	0.145 8	0.453 1	105.19		
	0.101 5	0.295 4	0.145 8	0.456 2	110.31		
	0.102 3	0.297 7	0.291 5	0.592 1	101.00		
	0.102 9	0.299 4	0.291 5	0.591 0	100.02		
	0.103 8	0.302 1	0.291 5	0.590 1	98.81		
	0.106 9	0.311 1	0.437 3	0.749 6	100.28		
5-O-甲基维斯阿米醇苷	0.105 4	0.306 7	0.437 3	0.750 0	101.37	100.97	2.02
	0.103 4	0.300 9	0.437 3	0.750 2	102.75		
	0.105 0	0.427 8	0.204 4	0.632 5	100.16		
	0.103 0	0.419 6	0.204 4	0.635 1	105.42		
	0.101 5	0.413 5	0.204 4	0.620 4	101.22		
	0.102 3	0.416 8	0.408 7	0.825 7	100.06		
	0.102 9	0.419 2	0.408 7	0.826 9	99.75		
	0.103 8	0.422 9	0.408 7	0.824 8	98.34		
亥茅酚苷	0.106 9	0.435 5	0.613 1	1.048 7	100.01	100.95	1.86
	0.105 4	0.429 4	0.613 1	1.049 8	101.19		
	0.103 4	0.421 3	0.613 1	1.050 1	102.57		
	0.105 0	0.193 5	0.096 8	0.291 2	100.96		
	0.103 0	0.189 8	0.094 9	0.289 1	104.59		
	0.101 5	0.187 1	0.093 5	0.280 2	99.58		
	0.102 3	0.188 5	0.186 3	0.375 2	100.19		
	0.102 9	0.189 6	0.186 3	0.376 8	100.46		
	0.103 8	0.191 3	0.186 3	0.374 5	98.33	100.95	1.86
	0.106 9	0.197 0	0.279 5	0.476 5	100.01		
	0.105 4	0.194 3	0.279 5	0.477 5	101.36		
	0.103 4	0.190 6	0.2795	0.478 5	103.04		

2.4.6 线性关系考察 精密称取升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷以及亥茅酚苷对照品适

量，分别加甲醇制成每1mL含升麻素苷为1.74 μ g、5.79 μ g、28.96 μ g、57.91 μ g、231.65 μ g、463.30 μ g，含

升麻素为 1.04 μg 、5.22 μg 、10.43 μg 、20.86 μg 、208.60 μg 、417.24 μg ，含 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为 1.78 μg 、5.93 μg 、29.67 μg 、59.34 μg 、237.37 μg 、474.73 μg ，含亥茅酚苷为 1.02 μg 、5.10 μg 、10.20 μg 、20.40 μg 、204.00 μg 、408.00 μg 的系列对照品溶液，根据“2.1”项中确定的色谱条件进样分析，对上述 4 种

化学成分的峰面积进行记录，把进样浓度作为横坐标(x)，峰面积作为纵坐标(y)，绘制标准曲线，并对回归方程和相关系数 R^2 值进行计算，结果 4 种活性成分的线性方程 R^2 均高于 0.999，说明 4 种成分在线性范围内线性关系良好。见表 3。

表 3 防风中 4 种成分的线性回归方程及线性范围

对照品名称	线性方程	R^2	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
升麻素苷	$y=5365.1x-4434.1$	0.9999	1.74~463.30
升麻素	$y=7842.6x+7297.2$	0.9998	1.04~417.24
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$y=5438.3x+8103.2$	0.9998	1.78~474.73
亥茅酚苷	$y=7358.1x+273.48$	0.9999	1.02~408.00

2.4.7 相对校正因子(f)的计算 以升麻素苷作为内参物，按照公式 $f_{ab} = f_a / f_b = C_a \times A_b / (C_b \times A_a)$ ，其中 C_a 为升麻素苷的浓度， A_a 为升麻素苷的峰面积， C_b 为其余对照品浓度， A_b 为其余对照品的峰面积，根据“2.4.6”项下线性考察结果，以对照品的质量浓度及其对应的色谱峰面积，计算内参物升麻素苷与亥茅酚苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷以及升麻素的相对校正因子，结果显示，当内参物为升麻素苷时，升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的相对校正因子分别为 0.66、0.95 和 0.74。见表 4。

表 4 防风中 3 种成分的相对校正因子

序号	$f_{\text{升麻素苷/升麻素}}$	$f_{\text{升麻素苷/5-}O\text{-甲基维斯阿米醇苷}}$	$f_{\text{升麻素苷/亥茅酚苷}}$
1	0.659	0.945	0.736
2	0.657	0.952	0.735
3	0.66	0.939	0.736
4	0.661	0.949	0.735
5	0.663	0.948	0.739
6	0.662	0.947	0.737
平均值	0.660	0.947	0.736
$RSD(\%)$	0.33	0.47	0.20

2.4.8 耐用性考察 按“2.1”项下色谱条件对“2.2”项下混合对照品溶液进行测定，分别考察不同色谱柱、流速及柱温对亥茅酚苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和升麻素的相对校正因子影响，结果显示，当内参为升麻素苷时，分别采用不同品牌的色谱柱、设置不同的柱温和流速，各成分的相对校正因子 RSD 值都可以达到低于 3.0% 的要求，说明所建立的色谱分析方法的耐用性符合要求。见表 5—表 7。

表 5 不同色谱柱对相对校正因子的影响

色谱柱	$f_{\text{升麻素苷/升麻素}}$	$f_{\text{升麻素苷/5-}O\text{-甲基维斯阿米醇苷}}$	$f_{\text{升麻素苷/亥茅酚苷}}$
Waters UPLC BEH C_{18}	0.663	0.952	0.735
Welch Ultimate UHPLC AQ C_{18}	0.659	0.944	0.728
YMC Triart C_{18}	0.656	0.943	0.739
平均值	0.659	0.946	0.734
$RSD(\%)$	0.53	0.52	0.76

表 6 不同柱温对相对校正因子的影响

柱温($^{\circ}\text{C}$)	$f_{\text{升麻素苷/升麻素}}$	$f_{\text{升麻素苷/5-}O\text{-甲基维斯阿米醇苷}}$	$f_{\text{升麻素苷/亥茅酚苷}}$
25	0.659	0.945	0.736
30	0.663	0.952	0.735
35	0.660	0.944	0.735
平均值	0.661	0.947	0.735
$RSD(\%)$	0.32	0.46	0.08

表 7 不同流速对相对校正因子的影响

流速 ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	$f_{\text{升麻素苷/升麻素}}$	$f_{\text{升麻素苷/5-}O\text{-甲基维斯阿米醇苷}}$	$f_{\text{升麻素苷/亥茅酚苷}}$
0.32	0.661	0.944	0.739
0.35	0.663	0.952	0.735
0.38	0.660	0.946	0.737
平均值	0.661	0.947	0.737
$RSD(\%)$	0.23	0.44	0.27

2.4.9 色谱峰定位 根据“2.4.8”项下耐用性考察结果，以升麻素苷色谱峰为参照峰，计算升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷色谱峰相对于参照峰的相对保留时间，结果显示，不同品牌的色谱柱、不同的柱温和流速对升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的相对保留时间影响较小， RSD 值均达到小于 5.0% 的要求。因此，可以采用相对保留时间作为色谱峰定位的依据，升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的相对保留时间值分别取不同色谱柱、柱温和流速下相对保留时间的均值，分别是 1.20、1.30 和 1.70，并规定各色谱峰的相对保留时间应在规定值的 (± 5)% 范围内。见表 8—表 10。

表 8 不同色谱柱对相对保留时间的影响

色谱柱	$f_{\text{升麻素苷/升麻素}}$	$f_{\text{升麻素苷/5-}O\text{-甲基维斯阿米醇苷}}$	$f_{\text{升麻素苷/亥茅酚苷}}$
Waters UPLC BEH C_{18}	1.197	1.321	1.702
Welch Ultimate UHPLC AQ C_{18}	1.192	1.291	1.691
YMC Triart C_{18}	1.197	1.282	1.703
平均值	1.195	1.298	1.697
$RSD(\%)$	0.24	1.57	0.50

表 9 不同柱温对相对保留时间的影响

柱温(℃)	<i>f</i> -升麻素苷/升麻素	<i>f</i> -升麻素苷/5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	<i>f</i> -升麻素苷/亥茅酚苷
25	1.193	1.286	1.687
30	1.197	1.321	1.702
35	1.193	1.301	1.706
平均值	1.194	1.303	1.697
RSD(%)	0.19	1.35	0.79

表 10 不同流速对相对保留时间的影响

流速 (mL·min ⁻¹)	<i>f</i> -升麻素苷/ 升麻素	<i>f</i> -升麻素苷/5- <i>O</i> - 甲基维斯阿米醇苷	<i>f</i> -升麻素苷/ 亥茅酚苷
0.32	1.190	1.281	1.664
0.35	1.197	1.321	1.702
0.38	1.194	1.299	1.714
平均值	1.194	1.300	1.693
RSD(%)	0.29	1.54	1.54

2.5 样品测定和分析

取 20 批防风药材(药材批号及产地信息见表 1)细粉,按规定方法制备供试品溶液,按已确定的色谱条件进样分析,对 4 种成分的峰面积进行记录,并分别计算 4 种成分的含量,应用 SPSS 20.0 软件,以防风药材的 4 种活性成分的含量为变量,采用组间连接方法对 20 批筋骨草药材进行聚类分析,同时通过外标法对升麻素苷的含量进行计算,以升麻素苷为内参物,分别采用外标法和一测多评法对升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷以及亥茅酚苷的含量进行计算,对两种方法计算的 3 种成分含量的相对平均偏差进行比较。见图 2 和表 11。

聚类分析结果显示,当分类距离为 15 时,20 批防风药材大致分为两类,序号 1~8 为一类,序号 9~20 为一类,结果显示,野生防风药材与家种防风药材

中,4 种活性成分的含量差异较大。表明该 UPLC 法可测定防风药材中 4 种活性成分的含量,测定结果可作为初步判断野生防风 and 家种防风的参考。

外标法和一测多评法检测结果显示,20 批防风药材采用两种方法测定的升麻素含量的相对平均偏差在 0.08%~3.48% 范围内,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量的相对平均偏差在 0.07%~2.26% 范围内,亥茅酚苷含量的相对平均偏差在 0.43%~2.66% 范围内,都低于 4.0%,说明两种测定方法的结果无显著差异,表明一测多评法结果准确可靠。野生防风中升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的含量均显著高于家种防风中的含量,经独立样品 *t* 检验, $P<0.05$,说明差异有统计学意义,而升麻素苷的含量与家种防风的含量差异不大($P>0.05$)。此检测结果进一步说明,通过 UPLC 法测定防风药材中升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的含量可作为判断野生防风 and 家种防风的参考依据。

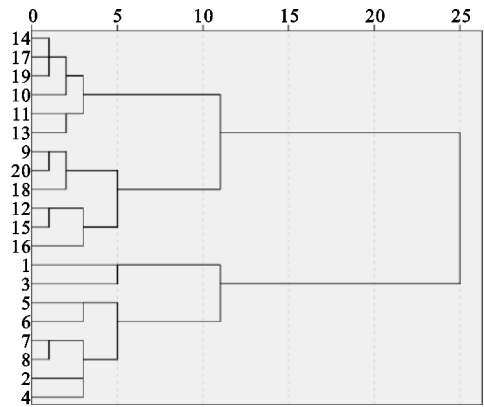


图 2 防风药材聚类分析树状图

表 11 本研究 20 批防风药材的含量测定结果

批号	升麻素 苷(%) EMS	升麻素(%)			5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷(%)			亥茅酚苷(%)		
		EMS	QAMS	相对平均 偏差(%)	EMS	QAMS	相对平均 偏差(%)	EMS	QAMS	相对平均 偏差(%)
FF01	0.393 5	0.300 7	0.291 1	1.62	0.452 1	0.432 1	2.26	0.190 9	0.184 7	1.65
FF02	0.381 9	0.122 1	0.115 2	2.91	0.431 5	0.432 6	0.13	0.143 5	0.1511	2.58
FF03	0.362 3	0.271 0	0.256 8	2.69	0.360 9	0.359 8	0.15	0.162 7	0.164 5	0.55
FF04	0.341 1	0.182 3	0.175 9	1.79	0.423 7	0.420 9	0.33	0.133 1	0.130 5	0.99
FF05	0.312 1	0.251 1	0.241 0	2.05	0.426 5	0.440 1	1.57	0.140 9	0.134 6	2.29
FF06	0.271 0	0.190 9	0.184 5	1.70	0.411 3	0.403 3	0.98	0.151 4	0.144 5	2.33
FF07	0.311 2	0.121 2	0.122 1	0.37	0.400 1	0.401 2	0.14	0.122 1	0.120 7	0.58
FF08	0.293 3	0.123 1	0.123 9	0.32	0.434 4	0.421 1	1.55	0.151 9	0.153 2	0.43
FF09	0.411 0	0.060 8	0.060 7	0.08	0.273 5	0.280 9	1.33	0.030 1	0.031 1	1.63
FF10	0.243 3	0.051 3	0.053 1	1.72	0.263 1	0.261 2	0.36	0.021 5	0.020 9	1.42
FF11	0.251 1	0.064 7	0.063 3	1.09	0.313 5	0.314 4	0.14	0.042 5	0.041 2	1.53
FF12	0.372 2	0.041 1	0.042 1	1.20	0.373 5	0.371 3	0.30	0.051 5	0.054 1	2.46
FF13	0.291 9	0.080 3	0.074 9	3.48	0.344 4	0.354 5	1.45	0.041 5	0.043 7	2.58
FF14	0.293 1	0.024 3	0.023 4	1.89	0.283 1	0.290 9	1.36	0.021 4	0.022 3	2.06
FF15	0.421 3	0.041 3	0.043 4	2.48	0.373 1	0.382 5	1.24	0.052 4	0.050 8	1.55
FF16	0.432 4	0.100 3	0.094 8	2.82	0.363 6	0.354 5	1.27	0.044 3	0.043 5	0.91
FF17	0.281 9	0.030 3	0.030 7	0.66	0.281 8	0.274 6	1.29	0.023 1	0.024 1	2.12
FF18	0.380 3	0.021 8	0.022 9	2.46	0.291 3	0.293 4	0.36	0.033 4	0.034 3	1.33

(续表 11)

批号	升麻素 苷(%)	升麻素(%)			5-O-甲基维斯阿米醇苷(%)			亥茅酚苷(%)		
	EMS	EMS	QAMS	相对平均 偏差(%)	EMS	QAMS	相对平均 偏差(%)	EMS	QAMS	相对平均 偏差(%)
FF19	0.281 0	0.021 3	0.022 2	2.07	0.303 6	0.304 7	0.18	0.020 1	0.021 2	2.66
FF20	0.453 8	0.041 2	0.042 1	1.08	0.280 7	0.281 1	0.07	0.041 5	0.042 5	1.19
<i>t</i> (野生)	0.33	0.19	0.19	1.94	0.42	0.41	0.73	0.15	0.15	1.66
<i>t</i> (家种)	0.34	0.05	0.05	0.99	0.31	0.31	0.80	0.03	0.03	0.00
<i>F</i>	9.898	13.180	15.822	/	2.921	3.382	/	1.336	2.025	/
<i>P</i>	0.006	0.002	0.001	/	0.045	0.032	/	0.026	0.017	/

注: $P<0.05$,表示差异具有统计学意义;*t*代表含量均值。EMS为外标法;QAMS为一测多评法。

3 讨论

本研究前期建立了防风药材的含量测定方法,同时对防风中4种活性成分进行了含量分析,以Waters BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)为色谱柱,乙腈和水为流动相,按照规定的色谱条件进样分析。除此之外,本研究还对供试品溶液的制备方法进行了考察,其中包括提取溶剂考察、方式考察以及时间考察。首先对提取溶剂进行考察,分别用水、50%甲醇以及甲醇提取,结果显示,当提取溶剂为甲醇时,4种成分的总含量最高,且色谱峰峰型较好,故选择提取溶剂为甲醇;对比超声提取和加热回流提取的结果,结果显示加热回流提取后,4种成分的总含量显著高于超声提取法,故选择加热回流的提取方式;分别考察加热回流1h、2h和3h后4种化学成分的总含量,结果显示,回流2h和3h,4种化学成分的总含量高于1h,且回流2h和3h的总含量基本一致,故提取时间选择回流2h。根据上述实验结果,供试品溶液制备方法确定为:精密称取防风药材细粉约0.2g于锥形瓶中,加入甲醇10mL,称定质量,回流2h,将其取出,放冷至室温后,用甲醇补足减失的质量,充分摇匀,滤过,取续滤液,即得。

防风药材是临床常用的中药材之一,其药用历史悠久。但目前防风混淆品多,导致药材质量参差不齐。有研究发现,野生防风根粗壮,为圆锥形或圆柱形,分枝少,根外皮皱缩而粗糙,表面颜色较深;而家种防风形状因地域不同而不同,通常粗壮,有的有分枝,根外皮表面颜色较浅;此外,野生防风气稍特异,味微甜;而家种防风气浓烈芳香,味甘^[14]。在活性研究方面,野生防风和栽培防风均能抑制脂多糖(LPS)诱导的RAW 264.7细胞分泌一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子(TNF-α),从而发挥抗炎作用,其中野生防风和多年生栽培防风的抗炎效果无明显差异,都显著优于1年生栽培防风^[15]。

《中华人民共和国药典》2020版对防风药材含量测定的规定为:按干燥品计算,含升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的总量不少于0.24%。除此之外,本研究同时测定升麻素和亥茅酚苷的含量,结果显示,以升麻素苷为内参物,通过一测多评法计算防风

药材中亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷和升麻素的含量,其结果与外标法计算的含量相对偏差小于5.0%,表明本研究所建立的一测多评法具有可行性,可用于防风药材质量控制;此外野生防风中3种成分(亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷和升麻素)的含量均显著高于家种防风中的含量,升麻素苷的含量与家种防风的含量差异不大,进一步说明野生防风和家种防风的质量之间存在差异,本研究为防风药材质量评价提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 崔玲. 神农本草经·上卷[M]. 天津:天津古籍出版社,2009.
- [2] 刘双利,姜程曦,赵岩,等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药,2017,48(10):2146-2152.
- [3] 李时珍. 本草纲目[M]. 刘山永,校注. 北京:华夏出版社,2011.
- [4] 陈雨秋,张涛,陈长宝,等. 防风的化学成分、提取工艺及药理作用研究进展[J]. 江苏农业科学,2021,49(9):43-48.
- [5] 王士杰,罗超,韩凤波,等. 防风总色原酮的超声提取工艺及抗氧化作用研究[J]. 黑龙江农业科学,2015,22(6):101-105.
- [6] 姜华,胡立立,王紫玮,等. 静脉给药防风色原酮单体药理活性对比研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(7):1575-1577.
- [7] ZHOU JIE, SUN YUANYUAN, SUN MENG YAO, et al. Prim-O-glucosylcimifugin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages[J]. Pharmacogn Mag, 2017, 13(51):378-384.
- [8] 陈娜. 升麻素苷抗炎及抗小鼠肺损伤作用的研究[D]. 长春:吉林大学,2014.
- [9] 张金华,林天凤,张榆,等. 防风色原酮类对照提取物含量标定及其在防风药材质量控制中的应用[J]. 中国中药杂志,2021,46(21):5658-5664.
- [10] 王浩,郭凌阁,尚兴朴,等. 基于防风外观性状和内在指标性成分划分防风药材商品规格等级研究[J]. 中草药,2020,51(20):5320-5327.
- [11] 冯贞,崔宇宏,李民生,等. 防风药材及饮片质量控制和评价思路[J]. 中国现代中药,2021,23(10):1686-1691.
- [12] 郭旭. 防风药材质量与生态环境关系及适生区的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2020.
- [13] 薛雪,王浩,贾天颖,等. 不同生长方式及年限防风饮片质量的比较研究及对《中华人民共和国药典》防风饮片标准的思考[J]. 中国中药杂志,2019,44(18):4034-4042.
- [14] 李继红,李蓓龙,范翠丽,等. 药用防风及其近缘种的性状调查[J]. 河北中医药学报,2014,29(4):38-41.
- [15] 李依林,薛雪,王海丽,等. 不同生长方式防风的HPLC特征图谱和体外抗炎活性比较研究[J]. 中国现代中药,2021,23(7):1195-1203.

(编辑:陈湧涛)