

不同生长方式防风色原酮物质含量测定及差异性分析

王文祎 徐 佳 刘 杰 杨瑶珺

(北京中医药大学中药学院, 北京, 100102)

摘要 目的:以同时测定防风中的两种色原酮物质升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷为目标,建立了上述两种物质的含量测定方法。方法:色谱柱采用 Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);梯度洗脱的流动相为水、甲醇,检测波长 254 nm,流速 1 mL/min,柱温 35 ℃,进样量 10 μL。结果:不同生长方式的防风样品的 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量无统计学意义,野生和栽培防风的升麻素苷含量有差异,不同生长方式对防风样品的色原酮含量有差异。结论:野生防风质量较好,同时测定两种色原酮方法简便,结果准确,精密度、重现性、稳定性较好,可以此作为防风中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的测定方法。

关键词 防风;色原酮;升麻素苷;5-O-甲基维斯阿米醇苷

Content Determination and Difference Analysis of Chromone in Fangfeng with Different Growth Patterns

Wang Wenyi, Xu Jia, Liu Jie, Yang Yaojun

(TMC College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: To establish a content determination method to simultaneously determine two kinds of chromoneS including Prim-O-glucosylcimifugin and 4'-O-beta-Glucopyranosyl-5-O-Methylvisamminol in Fangfeng. **Methods:** Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as chromatographic column; water and methanol were used as gradient elution of the mobile phase, wave length of 254nm was detected, with the flow rate of 1 mL / min, column temperature of 35 ℃, the injection volume 10μL. **Results:** 4'-O-beta-Glucopyranosyl-5-O- Methylvisamminol content of Fangfeng with different growth patterns had no significant difference; there was difference in the content of Prim-O-glucosylcimifugin between wild and cultivated Fangfeng; there were differences in Chromones contents in Fangfeng with different growth patterns. **Conclusion:** Wild Fangfeng has better quality, and the simultaneous determination of two Chromones method is simple, accurate, with good precision, reproducibility and stability, and this can be used as determination method of Prim-O-glucosylcimifugin and 4'-O-beta-Glucopyranosyl-5-O-Methylvisamminol in Fangfeng.

Key Words Fanbfeng; Chromone; Prim-O-glucosylcimifugin; 4'-O-beta-Glucopyranosyl-5-O-Methylvisamminol

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.09.031

防风为伞形科植物 *Saposhnicovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根^[1]。具有解表祛风、胜湿、止痉的功效。色原酮类成分是其发挥药效的主要物质基础,具有解热、镇痛作用^[2-6],升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷属于色原酮类成分,因此升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷是其药效学基础物质。

2010 版《中华人民共和国药典》使用固定流动相比比例的方法对升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷进行含量测定。本实验通过考察发现,采用固定比例流动相的方法在前 10 min 时,标准品出峰完全,但样品中色谱峰未能完全分离,可能会影响实验的结果。

因此本实验参考相关文献^[7-15]以梯度洗脱的方法同时测定升麻素苷,5-O-甲基维斯阿米醇苷为目标,建立了防风中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量测定方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本实验共收集野生防风样品 15 份,栽培防风 25 份,所有样品经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定为伞形科植物 *Saposhnicovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根。样品见表 1。

仪器使用 Sigma 3K15 离心机 (Sigma 公司), Sartorius BP110S 分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司), DFT-100 手提式高速中药粉碎机 (温岭市大德中药机械有限公司), Aglient 1100 液相系统

基金项目:北京中医药大学“重点学科”开发课题 (编号:2013-2DXKKF-21)

通信作者:杨瑶珺 (1969—),女,博士,教授,硕士研究生导师,黑龙江哈尔滨人,北京中医药大学中药学院,研究方向:中药品种及质量鉴定, E-mail: yangyaojunbucmtcm@163.com

(Aglient 公司,美国),KQ5200E 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

试剂使用甲醇(Fisher 公司,色谱纯),屈臣氏蒸馏水,升麻素苷对照品(111522 - 201209,纯度 98%,中国食品药品检定研究院),5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品(111523 - 201208,纯度 98%,中国食品药品检定研究院)。

表 1 测定防风样品表

编号	产地	生长方式	编号	产地	生长方式
FA1	海拉尔	野生	FB1	内蒙古赤峰	栽培
FA2	海拉尔	野生	FB2	内蒙古	栽培
FA3	海拉尔	野生	FB3	内蒙古赤峰	栽培
FA4	海拉尔	野生	FB4	内蒙古赤峰	栽培
FA5	黑龙江	野生	FB6	黑龙江	栽培
FA6	关防风	野生	FB7	黑龙江	栽培
FA7	满洲里	野生	FB8	河北安国	栽培
FA8	满洲里	野生	FB9	河北安国	栽培
FA9	通辽	野生	FB10	河北安国	栽培
FA10	通辽	野生	FB11	河北安国	栽培
FA11	黑龙江泰康	野生	FB12	河北安国	栽培
FA12	黑龙江大庆	野生	FB15	黑龙江	栽培
FA13	黑龙江大庆	野生	FB16	黑龙江大庆	栽培
FA15	满洲里	野生	FB17	黑龙江	栽培
FA16	内蒙古	野生	FB20	河北安国	栽培
FA17	内蒙古	野生	FB21	河北安国	栽培
			FB22	河北安国	栽培
			FB23	安徽亳州	栽培
			FB24	河北安国	栽培
			FB25	内蒙古	栽培
			FB26	内蒙古	栽培
			FB27	河北安国	栽培
			FB28	内蒙古	栽培
			FB29	河北安国	栽培
			FB30	河北安国	栽培

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:水、甲醇(梯度洗脱如表 2);检测波长 254 nm,流速 1 mL/min,柱温 35 ℃,进样量 10 μL。

表 2 梯度洗脱表

时间(min) 流动相	0	2	20	25	50	55	60
水	85	70	55	40	10	0	0
甲醇	15	30	45	60	90	100	100

1.2.2 对照品溶液的配制 精密称取升麻素苷对照品 4.14 mg,5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品 3.27 mg,加甲醇定容到 10 mL 容量瓶中,再分别精密吸取两种对照品溶液各 1 mL,混合、定容,制成每 1 mL 含升麻素苷 0.0828 mg,5-O-甲基维斯阿米醇苷

0.0654 mg 的混标溶液。

1.2.3 样品溶液的配制 精密称取防风样品粉末(过 60 目筛)0.5 g,加甲醇 10 mL,浸泡过夜,超声提取 20 min,离心 15 min,取滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

1.3 方法学考察

1.3.1 标准曲线绘制及线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 2 μL、4 μL、6 μL、8 μL、10 μL、16 μL、24 μL,注入高效液相色谱仪,测定峰面积值,以对照品进样量为横坐标,峰面积值为纵坐标,绘制标准曲线。结果:升麻素苷计算回归方程为 $Y = 2249.3X + 13.749$, $r = 0.9999$,含量在 0.1656 - 1.9872 mg/mL 范围内;5-O-甲基维斯阿米醇苷计算回归方程为 $Y = 2747.1X + 20.482$, $r = 0.9997$,含量在 0.1308 ~ 1.5696 mg/mL 范围内,表明线性关系良好。

1.3.2 精密度考察 分别吸取对照品溶液,0.45 μm 滤膜滤过,进样 5 次,每次 10 μL,分别测定升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积。结果:RSD 分别为 0.28%、0.34%,表明仪器精密度良好。

1.3.3 重现性考察 精密称取防风药材(FFA-15) 2 批,每批 5 份,每份 0.5 g,加甲醇 10 mL,浸泡过夜,超声提取 20 min,离心 15 min 取滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,分别进样 10 μL,测定峰面积计算含量。结果:升麻素苷 RSD 为 0.48%,5-O-甲基维斯阿米醇苷 RSD 为 1.25%,表明重现性良好。

1.3.4 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,在 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h 分别测定峰面积。结果:升麻素苷 RSD 为 0.62%,5-O-甲基维斯阿米醇苷 RSD 为 1.43%,表明样品在 24 h 内基本稳定。

1.3.5 加样回收率考察 精密称取已知升麻素苷含量的防风药材粉末 6 份,分别加入相同含量的升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品溶液,测定峰面积,计算含量。结果:升麻素苷平均加样回收率为 98.98%,RSD 为 2.56%,5-O-甲基维斯阿米醇苷平均加样回收率为 96.72%,RSD 为 1.13%,符合要求。

2 结果

2.1 野生和栽培防风样品的含量测定 本实验对 25 份栽培防风样品、15 份野生防风样品,按“样品溶液配置”方法制备供试品溶液,分别进样 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱峰面积,根据标准曲线方程计算升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量。测定结果见表 3。

表 3 防风样品中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量测定结果表

样品 编号	升麻素苷 (%)	5-O-甲基 维斯阿米 醇苷(%)	总含量 (%)	样品 编号	升麻素苷 (%)	5-O-甲基 维斯阿米 醇苷(%)	总含量 (%)
FA-1	0.3624	0.1323	0.4947	FB-1	0.1923	0.1702	0.3626
FA-2	0.3848	0.1244	0.5092	FB-2	0.1271	0.0993	0.2263
FA-3	0.2359	0.0957	0.3315	FB-3	0.1736	0.1913	0.3649
FA-4	0.2054	0.1945	0.3999	FB-4	0.1203	0.1649	0.2853
FA-5	0.1147	0.2948	0.4095	FB-6	0.1967	0.1867	0.3834
FA-6	0.3041	0.1131	0.4172	FB-7	0.1575	0.0862	0.2437
FA-7	0.1739	0.0552	0.229	FB-8	0.2287	0.1537	0.3825
FA-8	0.8547	0.2507	1.1054	FB-9	0.1312	0.0566	0.1877
FA-9	0.2638	0.1937	0.4575	FB-10	0.2626	0.1181	0.3807
FA-11	0.1242	0.3353	0.4594	FB-11	0.2047	0.1336	0.3382
FA-12	0.3562	0.1278	0.484	FB-12	0.1472	0.1319	0.2791
FA-13	0.1401	0.1386	0.2787	FB-15	0.2321	0.2145	0.4467
FA-15	0.3721	0.103	0.4751	FB-16	0.2032	0.2924	0.4956
FA-16	0.2117	0.082	0.2938	FB-17	0.0189	0.4201	0.4391
FA-17	0.2952	0.1434	0.4386	FB-20	0.5824	0.4447	1.0271
平均含量	0.293	0.159	0.452	FB-21	0.1055	0.1596	0.265
				FB-22	0.0701	0.1033	0.1733
				FB-23	0.1514	0.1195	0.2709
				FB-24	0.1591	0.1291	0.2882
				FB-25	0.1455	0.2245	0.37
				FB-26	0.1617	0.2049	0.3666
				FB-27	0.1399	0.0655	0.2055
				FB-28	0.1027	0.0696	0.1723
				FB-29	0.0986	0.1488	0.2474
				FB-30	0.1143	0.0426	0.1569
				平均含量	0.169	0.165	0.334

本实验对 25 份栽培防风样品,15 份野生防风样品进行了含量测定。2010 版《中华人民共和国药典》规定防风中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的总量不得少于 0.24%。

40 份样品中有 7 份样品的升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的总量低于 0.24%。其中栽培防风样品中 FFB-2、FFB-9、FFB-22、FFB-27、FFB-28、FFB-30 六批升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的总量低于 0.24%,不合格率为 24%。野生防风样品中 FFA-7 批样品升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的总量总量低于 0.24%,不合格率为 6.7%。野生防风的合格率高于栽培防风。

栽培防风升麻素苷平均含量为 0.17%,5-O-甲基维斯阿米醇苷平均含量为 0.16%,升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷平均含量为 0.33%。野生防风升麻素苷平均含量为 0.29%,5-O-甲基维斯阿米醇苷平均含量为 0.16%,升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷平均含量为 0.45%。从总体上看,野生防风的色原酮类成分高于栽培防风。

2.2 野生和栽培防风在升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量上的差异性 将野生和栽培防风分别与升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量相关联,

使用 SPSS 软件对其进行分析,显著性差异情况见表 4。

表 4 野生和栽培防风的色原酮含量显著差异表^a

	升麻素苷	5-O-甲基维斯阿米醇苷	总含量(%)
Mann-Whitney U	77.000	182.000	85.000
Wilcoxon W	402.000	302.000	410.000
Z	-3.087	-.154	-2.864
渐近显著性(双侧)	.002	.878	.004
精确显著性 [2*(单侧显著性)]	.002 ^a	.890 ^a	.004 ^a

注:^a. 分组变量:品种(1=栽培,2=野生)

升麻素苷含量数据、5-O-甲基维斯阿米醇苷含量数据和色原酮总含量数据通过正态性检验,sig < 0.05 均不服从正态分布,因此用非参数的秩和检验。升麻素苷含量渐进显著性(双侧) < 0.05,说明野生和栽培防风的升麻素苷含量有统计学意义,不同生长方式的防风样品的升麻素苷含量不一样。5-O-甲基维斯阿米醇苷含量渐进显著性(双侧) > 0.05,说明野生和栽培防风的 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量无差异,不同生长方式的防风样品的 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量无统计学意义。色原酮总含量渐进性显著性(双侧) < 0.05,说明野生和栽培防风的色原酮总含量有统计学意义,不同生长方式对防风样品的色原酮含量有差异。

3 讨论

通过实验数据可看出栽培与野生防风色原酮总量的含量有差异,野生防风的色原酮总量要高于栽培防风,说明野生防风的质量要优于栽培防风。而从两种色原酮物质含量来看,差异主要体现在升麻素苷的含量。野生防风升麻素苷含量明显高于栽培防风升麻苷含量,而 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量在栽培和野生防风中含量基本相同,差异性不显著。因此可增加样本量,继续探究栽培与野生防风和升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的关系,考察升麻素苷的含量是否适合作为鉴别栽培和野生防风、评价防风质量优劣的依据。

本实验通过梯度洗脱方法同时测定升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷,有效避免呀药典方法中色谱峰未能完全分离的问题,而且方法简便,结果准确,精密度、重现性、稳定性较好,可以此作为防风中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的测定方法。

本实验还考查了栽培与野生防风中两种色原酮物质含量的差异,并采用 SPSS 软件分析,但数据显示栽培与野生防风只在升麻素苷含量有差异,5-O-
(下接第 1415 页)

表 3 方差分析结果表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
乙醇浓度	14. 782	2	11. 530	9. 000	*
溶剂倍数	15. 349	2	11. 973	9. 000	*
时间	1. 336	2	1. 042	9. 000	
误差	1. 28	2			

由实验结果可知,对于乙醇回流法提取返魂草总黄酮的过程,乙醇浓度和溶剂的用量对整个结果的影响较大,3 个因素对于结果的影响大小程度分别为:乙醇浓度>溶剂用量>提取时间,且乙醇浓度和溶剂用量均具有显著性影响(a=0.1),从直观分析结果我们可以看出最佳的实验方案为 A2B3C3,即:乙醇浓度为 70%,溶剂用量为 22 倍量,提取时间为 150 min。

2.5 验证实验 按“2.4”项下返魂草总黄酮最佳提取工艺参数,按照“2.2”项下的过程进行 3 个批次的返魂草总黄酮的提取。返魂草总黄酮含量结果见表 4。结果表明,本工艺稳定,可操作性强,适合返魂草总黄酮的提取。

表 4 验证实验结果表

批次	150301	150302	150303	($\bar{x} \pm s$)
总黄酮/%	7. 22	7. 18	7. 24	7. 21 ± 0. 03
出膏率/%	9. 33	9. 24	9. 14	9. 24 ± 0. 10

3 讨论

本研究采用芦丁显色的方法进行总黄酮的含量测定,方法比较成熟,在经过预实验的过程中,我们

进行了该方法的稳定性、精密度、重复性、回收率等一系列的方法学研究,研究表明各项指标均能满足返魂草中总黄酮的含量测定的要求。

返魂草的成方制剂为“返魂草颗粒”,即“肺宁颗粒”主要用于肺部疾病的预防和治疗,具有悠久的用药历史,但返魂草的应用主要集中在返魂草水溶性酚酸类成分,据研究报道,返魂草的黄酮类成分也具有广泛的抗炎、抗氧化的作用,在肺部疾病的治疗过程中也起到一定的积极作用。本研究采用单因素结合正交设计的方法进行返魂草有效成分的提取研究,建立了简便、易行的工艺设计,为返魂草药材的合理化应用提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] 孙佳丹,王晓波,姜爽,等. 返魂草素Ⅱ对全氟异丁烯致大鼠吸入性急性肺损伤的预防作用[J]. 国际药学研究杂志,2014,41(4): 444-448.

[2] 马鸿雁,杨莉,王长虹,等. HPLC 法同时测定返魂草颗粒中 6 种活性成分[J]. 中成药,2012,34(8): 1496-1500.

[3] 赵春芳,李庆杰,王莲萍,等. 返魂草的高效液相色谱法指纹图谱研究及成分分析[J]. 分析化学,2013,41(1): 133-136.

[4] 李丽静,王继彦,王岩,等. 返魂草提取物及其有效成分抗病毒作用的研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2005,11(8): 585-587.

[5] 马鸿雁,杨莉,王长虹,等. 返魂草药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13): 101-104.

[6] 周世友. 返魂草胶囊中绿原酸的含量测定[J]. 广西医科大学学报,2013,30(3): 355-357.

[7] 钟芳丽,王晓林,安媛,等. 返魂草中总黄酮提取工艺研究[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(22): 1937-1940.

[8] 王志兵,王力,姜海峰,等. 返魂草总黄酮的微波提取及响应面优化[J]. 食品工业,2012(3): 3-6.

(2015-07-08 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 1412 页)

甲基维斯阿米醇苷无统计学意义,这可能与防风的内在生长机制有关,值得进一步探究。

参考文献

[1] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》(2010 年版第一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2012.

[2] 钟芬. 栽培与野生防风的质量对比研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.

[3] 王喜军,曹玲,孙晖. 人工规范化种植防风药材的指纹图谱研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2004,6(3): 33-36.

[4] 马丽杰,杨滨,冯雪峰等. 野生和栽培防风升麻苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量测定及指纹图谱分析[J]. 中国中药杂志,2010,35(13): 1731-1734.

[5] 李鑫,孙晶波,张丽华. 防风总色原酮含量测定方法研究[J]. 中药材,2012,35(12): 1967-1969.

[6] 肖永庆,杨滨,姚三桃,等. 防风质量标准的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(3): 185-187.

[7] 李丽,桂语歌,时东方,等. 防风中色原酮类化合物的抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(9): 2135-2137.

[8] 韩志明,王云贺,李轶雯,等. 防风色原酮微波辅助提取及含量动

态变化研究[J]. 中药材,2011,34(3): 465-468.

[9] 孙晶波,郝玉钢,张秋菊,等. HPLC 法同时测定陇西地区防风中色原酮和香豆素类成分[J]. 中草药,2013,44(24): 3557-3560.

[10] 赵博,杨鑫宝,杨秀伟,等. HPLC 法同时测定防风中 6 个主要成分的含量药物分析杂志[J],2013,33(3): 382-387.

[11] 牛德斌. HPLC 测定防风通圣丸中 2 个色原酮苷类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16): 113-115.

[12] 高森,李正翔,王志涛,等. 九龙化风丸中升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、羌活醇、异欧前胡素和细辛脂素的 HPLC 梯度洗脱法测定[J]. 中成药,2014,36(3): 541-547.

[13] 江月华. HPLC 梯度洗脱法同时测定复方荆芥熏洗剂中的升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 中南药学,2014,12(5): 472-475.

[14] 柴军,汪桂萍,谢浙裕. 高效液相色谱法同时测定明目蒺藜丸中黄芩苷、盐酸小檗碱、升麻素苷和甘草苷的含量[J]. 中华中医药学刊,2013,31(3): 652-654.

[15] 黄澜,陈惠玲,李玲玲. HPLC 同时测定正天丸中芍药苷、阿魏酸、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J]. 中国中药杂志,2013,38(13): 2114-2117.

(2014-09-28 收稿 责任编辑:张文婷)