

防风药材质量的多指标综合评价

马丙如¹, 崔静轩², 王雨懿¹, 刘子君³, 宁凝⁴, 王云贺¹, 杨利民¹, 韩忠明¹

(1. 吉林农业大学 中药材学院/吉林省生态系统与生态恢复重点实验室, 吉林 长春 130118; 2. 白山市食品药品检验所, 吉林 长春 134300; 3. 吉林吉隆东北沙棘产业有限责任公司, 吉林 大安 131300; 4. 国药集团北京华邈药业有限公司, 北京 102600)

摘要: 【目的】建立防风 *Saposhnikovia divaricata* 药材多指标成分同时定量分析的测定方法, 并以多指标成分为评价指标, 结合不同成分对防风药材抗炎活性的贡献, 分析不同产地的防风药材质量, 为防风药材质量的综合评价提供科学依据。【方法】采用高效液相色谱 (HPLC) 建立防风 6 种色原酮和 4 种香豆素成分同时定量的测定方法, 采用聚类分析和主成分分析对防风药材质量进行综合评价; 采用脂多糖诱导的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞炎症模型, 分析防风 10 种化学成分与抗炎活性的相关关系。【结果】防风 10 种化学成分在各自范围内线性关系、准确度和分离度均良好。聚类分析和主成分分析把 17 批样品分为 4 类, 其中以内蒙古 S5 和吉林 S8~S11 产地的 2 年生防风的综合质量相对较好; 17 批防风醇提物能不同程度地抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞分泌一氧化氮 (NO)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β); 其中升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇、欧前胡素与抗炎活性呈正相关; 灰色关联度分析表明: 防风抗炎活性是多种成分协同作用的结果, 升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇与 3 个细胞炎症指标 (NO、IL-6 和 IL-1 β) 的关联度均大于 0.8, 是发挥抗炎作用的主要物质基础。【结论】本研究建立的防风多指标成分测定方法良好, 可用于防风色原酮和香豆素成分的同时测定, 结合抗炎活性与灰色关联度分析法建立了基于生物活性的防风药材质量综合评价模式, 为建立防风药材质量综合评价的标准提供了新的方法和科学依据。图 3 表 7 参 30

关键词: 防风; 色原酮; 香豆素; 抗炎活性; 关联度分析

中图分类号: S567 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)04-0715-09

Comprehensive quality evaluation of *Saposhnikoviae radix* based on multi-component contents determination

MA Bingru¹, CUI Jingxuan², WANG Yuyi¹, LIU Zijun³, NING Ning⁴,
WANG Yunhe¹, YANG Limin¹, HAN Zhongming¹

(1. College of Chinese Medicinal Materials/Key Laboratory for Ecological Restoration and Ecosystem Management of Jilin Province, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China; 2. Food And Drug Control Institute of Baishan City, Baishan 134300, Jilin, China; 3. Jilin Jilong Northeast Hippophae Industry Company, Da'an 131300, Jilin, China; 4. Beijing Huamiao Pharmaceutical Company, SINOPHARM, Beijing 102600, China)

Abstract: [Objective] To establish a method for quantitative analysis of multi-index components in *Saposhnikoviae radix* (*Saposhnikovia divaricata*), and for comprehensive quality evaluation of the medicinal materials from different areas, using the contents of multiple-index components as evaluation indexes, and the contribution of different components to the anti-inflammatory activity. [Method] The concentrations of 6 chromones and 4 coumarins from *Saposhnikoviae radix* were quantified by high-performance liquid

收稿日期: 2023-11-24; 修回日期: 2024-04-22

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20210204011YY); 中央财政林业科技推广示范项目 (JLT2024-30); 国家现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-21)

作者简介: 马丙如 (ORCID: 0009-0001-6686-9871), 从事中药资源研究。E-mail: 448573685@qq.com。通信作者: 韩忠明 (ORCID: 0000-0002-2971-3923), 教授, 从事中药资源研究。E-mail: hanzm2008@126.com

chromatography (HPLC). The quality was comprehensively evaluated using cluster analysis and principal component analysis. The correlations between 10 chemical components and their anti-inflammatory activities were analyzed in a lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation model in RAW 264.7 mice. [Result] The 10 kinds of chemical components had good linear relationship, accuracy, and separation in their respective ranges, respectively. 17 batches of samples were grouped into 4 categories by cluster analysis and principal component analysis. The quality of 2-year-old *S. divaricata* grown in Inner Mongolia (S5) and Jilin (S8 to S11) were relatively better. 17 batches of *S. divaricata* alcohol extracts differentially inhibited NO, IL-6, and IL-1 β secreted by lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. Prim-O-glucosylcimifugin, 5-O-methylvisammioside, cimifugin, sec-O-glucosylhamaudol, 5-O-methylvisamminol, and imperatorin were positively correlated with anti-inflammation. The anti-inflammatory effect of *S. divaricata* is the result of the combined action of several components, and the correlation degrees among prim-O-glucosylcimifugin, 5-O-methylvisammioside, cimifugin, sec-O-glucosylhamaudol, and 5-O-methylvisamminol with three cellular indicators of inflammation (NO, IL-6, and IL-1 β) were over 0.8, which were the main material basis for the anti-inflammatory activity, according to the gray correlation analysis. [Conclusion] A comprehensive evaluation model of the quality of *S. divaricata* based on biological activity and combining the anti-inflammatory activity and gray correlation analysis was established, which provided a new method and scientific basis for the establishment of quality standards for a comprehensive evaluation of the quality of *S. divaricata*. [Ch, 3 fig. 7 tab. 30 ref.]

Key words: *Saposhnikovia divaricata*; chromone; coumarin; anti-inflammatory; correlation analysis

防风 *Saposhnikovia divaricata* 为伞形科 Apiaceae 多年生草本植物, 以未抽薹的干燥根入药。其味辛、甘, 性温, 归膀胱、肝、脾经, 具有祛风解表、胜湿止痛、止痉之效, 常用于治疗发烧、头痛、过敏性鼻炎、风湿性关节炎、免疫系统疾病等^[1-4]。目前已从防风中分离出 100 多种化合物, 其中色原酮、香豆素类化合物是其发挥药效的主要物质基础^[5]。防风主要分布于内蒙古、辽宁、吉林、黑龙江、河北、河南、山东、甘肃等地区^[6]。受生长环境、采收时间、种质资源等^[7-8] 因素的影响, 不同产地的防风药效成分及其临床药效差异较大。

中药具有多成分、多靶点作用的特点, 检测单一成分难以全面反映药材内在质量, 因此多指标、多成分的质量控制已成为发展趋势。《中国药典》2020 年版一部“防风”药材项下, 将升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷作为评价防风药材质量的中药指标成分, 规定两者占比不得低于 0.24%。但升麻素、亥茅酚苷、补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素等色原酮和香豆素化合物均为表征不同产地、不同年限、不同商品规格的防风药材质量的特征成分, 也都具有一定的抗菌、解热抗炎的功效^[9-13]。因此, 仅以升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷作为防风药材的质量标志物 (Q-Marker), 无法全面评价防风的内在质量, 为此, 亟需建立完整的防风质量评价体系。

近年来, 与炎症相关的疾病发病率逐年递增, 寻找一种安全有效的抗炎药物成为研究的热点^[14-15]。临床及实验证实很多中药具有很好的抗炎作用, 且毒副作用小^[16-17]。防风药材质量的差异可能会导致活性成分的差异进而呈现不同的临床疗效。目前关于不同产地防风药材抗炎活性的研究较少, 且抗炎活性成分尚未明确, 不利于其进一步开发利用。本研究通过建立防风药材多指标成分的高效液相色谱 (HPLC) 测定方法, 结合建立脂多糖诱导的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞炎症模型, 通过化学成分和药效指标相关联, 筛选出与抗炎作用相关的药效成分群, 探讨防风抗炎作用的药效基础, 为完善防风药材质量标准提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2022 年 9—10 月, 分别在内蒙古自治区、吉林省、河北省、新疆维吾尔自治区等采集 17 批防风样

品(表 1), 经吉林农业大学中药材学院韩忠明教授鉴定为伞形科植物防风的干燥根。将防风根洗净泥沙, 置于恒温干燥箱中 60 °C 烘干至恒质量, 粉碎后过 60 目筛, 备用。

表 1 17 批防风药材样品信息

Table 1 Sample information of 17 batches of Saposhnikovia radix

样品序号	产地	生长年限/a	样品序号	产地	生长年限/a
S1	内蒙古自治区赤峰市松山区南地村	1	S10	吉林省白城市永茂林场	2
S2	内蒙古自治区赤峰市松山区柳条沟村	1	S11	吉林省白城市枫林湾中药材种植基地	2
S3	内蒙古自治区赤峰市松山区西道村	1	S12	河北省承德市隆化县兴隆庄村	1
S4	内蒙古自治区通辽市科尔沁区庆和林场	1	S13	河北省承德市丰宁满族自治县胡麻营村	1
S5	内蒙古自治区赤峰市林西县	2	S14	河北省承德市围场县天桥村	1
S6	吉林省长春市吉林农业大学药园	1	S15	新疆维吾尔自治区阿勒泰哈巴河实验站	1
S7	吉林省白山市江源区平川村	1	S16	新疆维吾尔自治区阿勒泰哈巴河实验站	1
S8	吉林省白山市江源区平川村	2	S17	新疆维吾尔自治区阿勒泰哈巴河实验站	2
S9	吉林省白城市青山林场	2			

升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素对照品(批号分别为 111522-202214、111523-202212、111710-200602、111714-200501、110739-202319、112077-202101、112078-202101、110826-202219), 均购自中国食品药品检定研究院; 5-O-甲基维斯阿米醇、亥茅酚对照品(批号分别为 B23192、B23109), 均购自源叶生物科技有限公司。

1.2 供试品、对照品与药物提取液的制备

称取防风粉末 0.2 g 于锥形瓶中, 加 6 mL 甲醇溶液, 超声提取 1 h, 放冷, 用甲醇补足质量, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 即得供试品溶液。配置 1 mL 甲醇溶液含升麻素苷 0.110 μg、5-O-甲基维斯阿米醇苷 0.170 μg、升麻素 0.018 μg、亥茅酚苷 0.014 μg、5-O-甲基维斯阿米醇 0.002 μg、补骨脂素 0.002 μg、花椒毒素 0.003 μg、亥茅酚 0.002 μg、佛手柑内酯 0.001 μg、欧前胡素 0.004 μg 的混合溶液为对照。

取 5 g 防风粉末, 按液料比为 1:30 (质量体积比) 加入甲醇溶液, 超声提取 1 h, 旋蒸浓缩至 10 mL, 冷冻干燥, 得不同批次的提取物冻干粉。取冻干粉 10 mg, 溶于 4 mL RAW 264.7 培养基中, 制成质量浓度为 2.5 g·L⁻¹ 的母液, 于 4 °C 避光保存。

1.3 色谱条件

色谱条件: 色谱柱 Supfex AQ-C₁₈(4.6 mm×250.0 mm, 5 μm), 流动相为水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~8 min, 20.0%~40.5%B; 8~20 min, 40.5%~55.0%B; 20.0~25.0 min, 55%B, 25.0~35.0 min, 55.0%~65.0%B, 35.0~40.0 min, 65.0%~80.0%B), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 波长 254 nm, 进样量 15 μL。

1.4 方法学考察

1.4.1 标准曲线的制备 吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20 μL, 注入液相色谱仪进行测定, 以进量(x, μg)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 计算线性回归方程和相关系数。

1.4.2 专属性试验 分别取混合对照品溶液、样品溶液、空白溶剂(体积分数为 100% 的甲醇), 根据“1.3”色谱条件分别进样 15 μL, 比较色谱图。

1.4.3 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 15 μL, 根据“1.3”色谱条件测定升麻素苷等 10 种物质的峰面积(RSD)。重复 6 次。

1.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 15 μL, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 按照“1.3”色谱条件测定 10 种物质的 RSD 值。重复 6 次。

1.4.5 重复性试验 分别精密称取同一批供试品 6 份, 根据“1.2”方法制备供试品溶液, 按照“1.3”色谱条件测定 10 种物质的 RSD 值。重复 6 次。

1.5 对脂多糖(LPS)所致 RAW 264.7 细胞炎症模型的影响试验

取对数生长期细胞, 2.5×10⁴ 个·孔⁻¹ 细胞接种于 96 孔板, 设置仅含完全培养基的空白对照组和用完全培养基稀释成质量浓度为 100、200、400、600、800 mg·L⁻¹ 的防风醇提取物组, 药物干预 24 h 后, 采

用 CCK-8 法检测不同质量浓度防风醇提取物对 RAW 264.7 细胞活性的影响, 细胞存活率=(加药组吸光度-空白组吸光度)/(正常组吸光度-空白组吸光度) $\times 100\%$ 。结果显示: 当防风醇提取物质量浓度低于 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 RAW 264.7 细胞活性无影响。将细胞以 2.5×10^4 个 \cdot 孔 $^{-1}$ 接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 弃上清液, 根据 CCK-8 细胞活力检测结果, 设置正常对照组、模型对照组 (LPS 质量浓度为 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和防风醇提取物组 (防风醇提取物 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 LPS $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 共同干预细胞。药物干预细胞 24 h 后, 取细胞上清按试剂盒说明书检测一氧化氮 (NO)、白细胞介素 6 (IL-6) 和白细胞介素 1β (IL- 1β) 含量。

1.6 数据分析

根据 17 批防风样品中 10 种化学成分的质量分数, 用 Metaboanalyst 5.0 进行系统聚类; 将 10 种化学成分的质量分数标准化处理后进行主成分分析, 得相关系数的特征值和方差贡献率; 将 10 种化学成分与 NO、IL-6 和 IL- 1β 的表达量进行相关性分析; 采用均值化法对数据进行无量纲化处理, 以 NO、IL-6 和 IL- 1β 水平为参考序列, 以化学成分质量分数为比较序列, 求参考序列与比较序列的灰色关联系数^[18]。采用 SPSS 21.0 进行显著性检验 ($\alpha=0.05$)、主成分分析以及相关性分析, 采用 Excel 22.0 进行灰色关联度分析, 采用 Metaboanalyst 5.0 进行聚类分析绘图, Origin 2022 软件进行柱形图绘制。

2 结果与分析

2.1 方法学考察结果

表 2 显示: 升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇、补骨脂素、花椒毒素、亥茅酚、佛手柑内酯、欧前胡素等 10 种化学成分的线性关系良好, 决定系数 (R^2) 均大于 0.999 0。专属性试验结果 (图 1) 可见: 空白溶剂对样品的检测无干扰。精密度试验测得升麻素苷等 10 种化学成分的 RSD 分别为 0.61%、0.54%、0.53%、0.62%、0.50%、0.69%、0.69%、2.10%、0.63% 和 1.16%, 表明该方法精密度良好。稳定性试验测得 10 种化学成分的 RSD 分别为 1.15%、0.80%、0.75%、0.98%、1.32%、0.77%、0.84%、4.16%、1.68% 和 1.29%, 表明该方法稳定性良好。重复性试验测得 10 种化学成分的 RSD 分别为 4.58%、1.62%、1.62%、1.71%、1.24%、3.10%、1.69%、4.76%、1.50% 和 1.88%, 表明该方法重复性良好。

2.2 不同产地防风药材质量分析

由图 2 可见: 17 批防风样品升麻素和 5-O-甲基维斯阿米醇苷质量分数总和为 2.93~12.09 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 均符合《中国药典》(2020 年版) 防风项下规定升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷 2 种成分质量分数总和不少于 0.24% 的规定。其中产自内蒙古自治区赤峰市林西的 S5 10 种化学成分质量分数最高, 为 13.06 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 河北省承德县胡麻营的 S13 10 种化学成分质量分数最低, 为 3.41 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 两者相差 3.83 倍。防风中 10 种化学成分质量分数差异较大, 质量分数从高到低分别为 5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇、花椒毒素、欧前胡素、佛手柑内酯、补骨脂素、亥茅酚。

2.3 聚类分析

由图 3 可见: 17 批防风样本聚为 4 类, 产自内蒙古的 S5 和吉林的 S8~S11 聚为第一大类, 表现为富含升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇和欧前胡素; 产自内蒙古的 S1~S4 聚为第二大类, 表现为富含补骨脂素、花椒毒素、亥茅酚、佛手柑内酯; 产自河北的 S12~S14 聚为第三大类, 补骨脂素、花椒毒素、佛手柑内酯质量分数相对较高; 产自吉林的 S6~S7 和

表 2 防风 10 种化学成分线性关系考察结果

Table 2 Results of linear relationship between ten components of *Saposhnikovia radix*

成分	回归方程	R^2	线性范围/ μg
升麻素苷	$y=2250.7x+24.200$	0.999 6	0.110~1.130
5-O-甲基维斯阿米醇苷	$y=1947.2x+79.014$	0.999 1	0.170~3.000
升麻素	$y=2401.8x+5.534$	0.999 6	0.018~0.350
亥茅酚苷	$y=2693.3x+0.829$	0.999 9	0.014~0.280
5-O-甲基维斯阿米醇	$y=2915.1x-0.029$	0.999 9	0.002~0.040
补骨脂素	$y=3480.5x+0.555$	0.999 9	0.002~0.040
花椒毒素	$y=4947.8x+0.905$	0.999 9	0.003~0.060
亥茅酚	$y=3119.3x-2.227$	0.999 2	0.002~0.040
佛手柑内酯	$y=4601.6x+0.230$	0.999 9	0.001~0.020
欧前胡素	$y=4115.7x+0.172$	0.999 8	0.004~0.080

说明: x 指进量(mg); y 指峰面积。

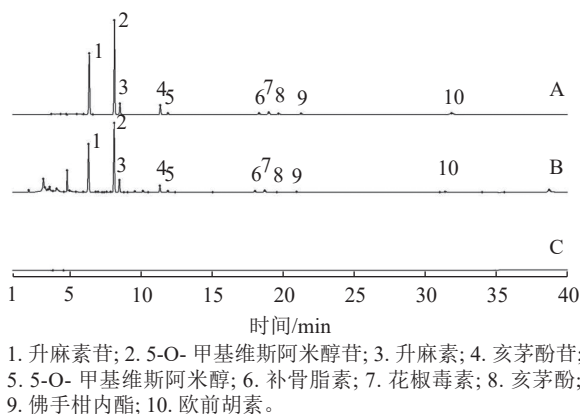


图 1 混合对照品 (A)、样品溶液 (B) 及空白溶剂 (C) 的 HPLC 图
Figure 1 HPLC diagram of mixed reference (A), sample solution (B) and blank solvent (C)

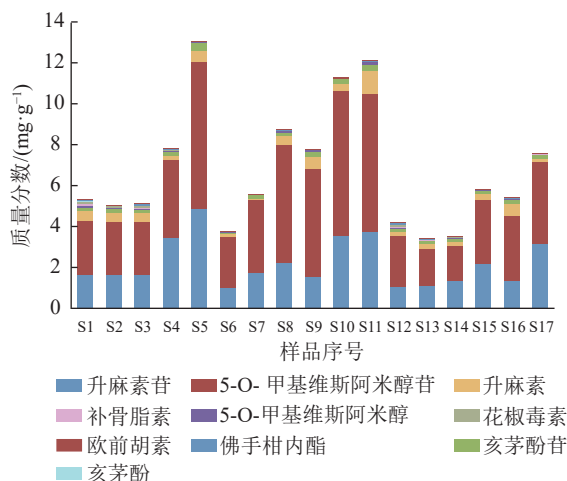


图 2 防风药材各指标质量分数的堆积柱形图
Figure 2 Accumulation column diagram of the contents of Saposhnikovia radix

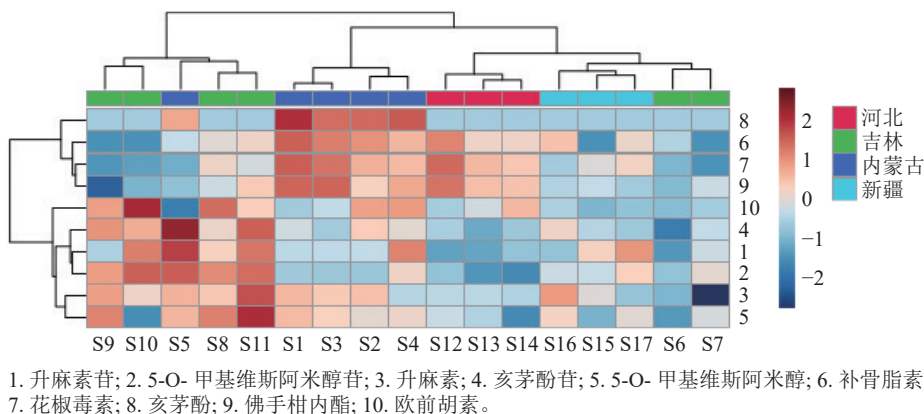


图 3 17 批防风药材聚类分析
Figure 3 Hierarchical clustering analysis of 17 batches of Saposhnikovia radix

新疆的 S15~S17 聚为第四大类，10 种化学成分质量分数相对较低。整体来看，防风药材样本具有一定的区域特征，但同一产地不同批次的药材之间存在差异性，这可能是由于生长年限、土壤、降水量等因素影响了防风次生代谢产物的积累。

2.4 主成分分析

由表 3 可见：以主特征值 > 1 为提取标准，提取 3 个主成分，分别代表了变量总方差的 44.033%、28.648%、10.611%，累计贡献率达 83.292%，大于 80.00%。这表明这 3 个主成分是影响防风质量评价的主要因子，可全面反映防风药材的综合质量特征。以提取的主成分的因子得分乘以

表 3 特征值及累计方差贡献率

主成分	特征值	方差/%	累积贡献率/%
1	4.403	44.033	44.033
2	2.865	28.648	72.681
3	1.061	10.611	83.292

相应主成分特征值的算术平方根计算综合得分，对 17 批防风样品进行综合评价，结果见表 4。来自内蒙古的 S5 和吉林的 S8~S11 综合得分在 1 以上，质量相对较好；来自内蒙古的 S1 和河北的 S12 综合得分较低，质量相对较差。

2.5 不同产地防风醇提取物抗炎活性

由表 5 可见：与正常对照组比较，模型对照组 NO、IL-6 和 IL-1 β 质量浓度显著升高 ($P < 0.01$)，说明 RAW 264.7 炎性模型造模成功；与模型对照组比较，各受试药物组可不同程度地降低 NO、IL-6 和 IL-1 β 水平，说明防风醇提取物质量浓度为 200 mg·L⁻¹ 时具有一定的抗炎效果。其中防风样品 S8~S11、S17 对细胞中炎症因子 NO 表达量具有较强的抑制作用，S7、S9~S11、S17 对细胞中炎症因子

IL-6 表达量具有较强的抑制作用, S5、S8~S11 对炎症因子 IL-1 β 表达量具有较强的抑制作用。可能因为防风样品 S5、S8~S11 中富含升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇和欧前胡素, 且综合质量较高, 样品 S7、S17 中具有其他低成分高活性的物质, 因此抗炎活性较强。

2.6 双变量相关性分析

将 10 个化学成分与 NO、IL-6 和 IL-1 β 的表达量进行相关性分析(表 6)表明: 升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷和 5-O-甲基维斯阿米醇与 NO 表达量呈显著或极显著负相关, 5-O-甲基维斯阿米醇苷、5-O-甲基维斯阿米醇、欧前胡素与 IL-6 表达量呈显著或极显著负相关, 升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷与 IL-1 β 表达量呈显著或极显著负相关, 表明升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇、欧前胡素与抗炎活性呈正相关, 是防风发挥抗炎作用的主要活性成分。

表 5 17 批防风样品的抗炎活性

Table 5 Anti-inflammatory capacity of 17 batches of Saposhnikovia radix

组别	NO/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-6/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	组别	NO/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-6/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)
正常对照	2.57±0.32	2.00±0.55	63.53±2.60	S9	20.02±0.94**	28.50±1.68**	138.09±17.62**
模型对照	37.57±3.39##	57.88±1.35##	227.92±26.06##	S10	19.02±0.71**	24.45±2.29**	125.46±6.26**
S1	29.60±1.30**	40.97±2.22	207.76±5.80*	S11	10.02±2.36**	24.21±2.36**	127.43±7.70**
S2	20.77±0.82**	42.07±1.89**	181.86±2.09**	S12	24.85±3.54**	45.73±1.28**	140.71±14.37**
S3	35.10±0.35	45.40±2.56**	178.25±1.62**	S13	35.35±0.47	35.54±1.41**	180.71±10.66**
S4	23.43±0.12**	38.02±1.82**	138.25±20.17**	S14	26.77±1.77**	45.83±7.21**	167.92±8.35**
S5	26.35±2.36**	36.59±3.03**	112.35±3.48**	S15	25.60±0.82**	57.50±1.75	159.07±28.28**
S6	36.93±0.82	40.26±0.27**	214.32±5.80	S16	25.52±2.83**	36.11±0.34**	176.94±6.72**
S7	24.35±4.71**	29.59±1.21**	173.33±9.51**	S17	20.43±2.71**	34.88±3.17**	147.60±5.10**
S8	18.02±1.41**	35.59±0.54**	135.46±7.42**				

说明: 防风醇提物剂量均为 200 mg·L⁻¹。与正常对照组比较, * P <0.05, ** P <0.01; 与模型组比较, ## P <0.01。

2.7 灰色关联度分析

由表 7 可见: 与 NO 表达量有较大关联性的成分贡献从大到小依次为亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷、升麻素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、补骨脂素、亥茅酚; 与 IL-6 表达量有较大关联性的成分贡献从大到小依次为亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷、升麻素、花椒毒素、欧前胡素、佛手柑内酯、补骨脂素、亥茅酚; 与 IL-1 β 表达量有较大关联性的成分贡献从大到小依次为亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷、花椒毒素、欧前胡素、佛手柑内酯、补骨脂素、亥茅酚。各化学成分与各药效指标的关联度均大于 0.6, 说明

表 4 17 批防风药材样品综合得分值

Table 4 Comprehensive score value of 17 batches of Saposhnikovia radix

样品	综合得分	样品	综合得分
S1	-2.05	S10	2.41
S2	-0.51	S11	4.39
S3	-1.91	S12	-2.52
S4	0.16	S13	-1.92
S5	3.77	S14	-1.72
S6	-1.91	S15	-0.71
S7	-0.74	S16	-0.03
S8	1.56	S17	-0.16
S9	1.88		

表 6 化学成分变量组与药效变量组的相关系数

Table 6 Canonical correlation analysis of components and pharmacodynamics indexes

成分	药效指标		
	NO	IL-6	IL-1 β
升麻素苷	-0.512*	-0.392	-0.736**
5-O-甲基维斯阿米醇苷	-0.658**	-0.703**	-0.787**
升麻素	-0.543*	-0.442	-0.315
亥茅酚苷	-0.534*	-0.456	-0.690**
5-O-甲基维斯阿米醇	-0.599*	-0.540*	-0.391
补骨脂素	0.268	0.319	0.424
花椒毒素	0.322	0.424	0.329
亥茅酚	0.212	0.219	0.346
佛手柑内酯	0.349	0.380	0.307
欧前胡素	-0.474	-0.535*	-0.386

说明: *表示显著相关(P <0.05); **表示极显著相关(P <0.01)。

防风体外抗炎作用是多组分协同作用的结果。其中升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇与 NO、IL-6、IL-1 β 表达量的关联系数排名靠前且均大于 0.8, 说明这 5 种化学成分对防风发挥抗炎活性的贡献较大。

表 7 防风药材化学成分质量分数和抗炎指标的灰色关联度

Table 7 Grey correlation between chemical composition contents and anti-inflammatory index

成分	NO		IL-6		IL-1 β	
	灰色关联度	排名	灰色关联度	排名	灰色关联度	排名
升麻素苷	0.801	4	0.813	4	0.801	5
5-O-甲基维斯阿米醇苷	0.806	3	0.818	3	0.806	4
升麻素	0.800	5	0.809	5	0.819	3
亥茅酚苷	0.849	1	0.862	1	0.859	1
5-O-甲基维斯阿米醇	0.842	2	0.853	2	0.840	2
补骨脂素	0.737	9	0.762	9	0.732	9
花椒毒素	0.781	6	0.793	6	0.778	6
亥茅酚	0.700	10	0.703	10	0.675	10
佛手柑内酯	0.758	7	0.769	8	0.757	8
欧前胡素	0.753	8	0.775	7	0.769	7

3 讨论

目前, 关于防风的药材质量标准研究大多为单一成分种类的测定, 且研究成分数量较少^[19-21]。本研究采用 HPLC-DAD 法同时测定防风中 6 种色原酮和 4 种香豆素成分的质量分数。在供试品溶液制备过程中, 本研究考察了超声和加热回流 2 种常用的提取方式, 以及不同提取溶剂、料液比、超声时间对防风中 10 种化学成分提取率的影响, 结果显示: 提取溶剂体积分数为 100% 甲醇、液料比为 1:30(质量体积比)、超声提取 60 min 时防风中化学成分提取率最高。在《中国药典》(2020 版) 和文献^[22-23] 的洗脱方法基础上进行优化, 发现当柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时基线平稳, 峰形良好, 各成分分离度高。该方法专属性强, 准确度和分离度良好, 能较全面有效地评价防风质量, 为其质量控制提供参考依据。

高质量道地药材不仅主要成分含量较高, 而且高活性成分含量也较高^[24]。由于不同产地生态环境因素的差异, 导致药用植物生理生化反应及体内代谢不同。体内次生代谢产物的形成和积累发生变化, 使得药材质量发生变化^[25], 但植物次生代谢产物的形成和积累不仅与生长环境有关, 也与其生长年限有关^[26]。本研究聚类分析结果也显示: 17 批防风药材呈现一定的区域性特征, 并且同一产地不同生长年限的药材之间也存在差异性, 内蒙古、吉林产地 2 年生防风药材中升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇质量分数和 10 种化学成分总质量分数明显高于其 1 年生防风药材, 说明防风药材质量不仅具有一定地域性, 同时其药材有效成分含量的高低也受到种植年限的影响。17 批防风药材中以吉林、内蒙古产区的 2 年生防风药材综合得分较高, 综合质量较优, 与河北产地的药材质量存在较大的差异。该结果与防风的道地药材主要分布于内蒙古扎鲁特旗以北和吉林西部的结论相符合^[27]。

本研究通过体外细胞试验表明: 不同产地的防风醇提物均能不同程度地降低 NO、IL-6 和 IL-1 β 的表达量。通过双变量相关性分析和灰色关联度分析发现: 升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇能显著降低 LPS 诱导的 RAW 264.7 炎症细胞上清液中 NO、IL-6、IL-1 β 的表达, 且与这 3 个细胞炎症指标的关联系数较大。有研究表明: 升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇通过抑制 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路减轻 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应^[28-30]。推测以上 5 个成分可能是防风抗炎活性的关键物质基础。

4 结论

本研究建立了防风药材多指标质量分数的测定方法, 并筛选出升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇为防风药理作用的关键活性成分。不同产地和不同生长年限防

风药材的化学成分质量分数、抗炎活性之间存在差异, 17批药材中以内蒙古和吉林的2年生防风药材综合质量较优, 因此入药时, 要充分考虑防风的产地和生长年限, 才能保证临床疗效的稳定性。

5 参考文献

- [1] CHEN Yanchun, CHEN Zhiling, WANG Gan, *et al.* The effects of *Saposhnikovia divaricata* aqueous extracts on the inflammation and intestinal microflora in allergic rhinitis mice[J/OL]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2022: 1052359[2023-11-10]. doi: 10.1155/2022/1052359.
- [2] URBAGAROVA B M, SHULTS E E, TARASKIN V V, *et al.* Chromones and coumarins from *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. growing in Buryatia and Mongolia and their cytotoxicity[J/OL]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, **261**: 112517[2023-11-10]. doi: 10.1016/j.jep.2019.112517.
- [3] SUN Yan, JIANG Peng, JIANG Yikai, *et al.* New chromones from the roots of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. with anti-inflammatory activity[J/OL]. *Bioorganic Chemistry*, 2023, **134**: 106447[2023-11-10]. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106447.
- [4] MATUSIEWICZ M, BACZEK K B, KOSIERADZKA I, *et al.* Effect of juice and extracts from *Saposhnikovia divaricata* root on the colon cancer cells caco-2 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(18): 4526 – 4549.
- [5] YANG Min, WANG Congcong, WANG Wenle, *et al.* *Saposhnikovia divaricata*-an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2020, **26**(11): 873 – 880.
- [6] KREINER J, PANG E, LENON G B, *et al.* *Saposhnikovia divaricata*: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2017, **15**(4): 255 – 264.
- [7] 郝佳, 刘宇航, 殷洁, 等. 不同磷浓度对土壤理化性质及防风生长和药材品质的影响[J]. 华南农业大学学报, 2022, **43**(3): 59 – 67.
HAO Jia, LIU Yuhang, YIN Jie, *et al.* Effects of different phosphorus concentrations on soil physicochemical property, growth and medicinal materials quality of *Saposhnikovia divaricata* [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2022, **43**(3): 59 – 67.
- [8] 郭旭, 田新, 郝佳, 等. 不同产地防风色原酮含量与土壤因子的关系[J]. 华南农业大学学报, 2020, **41**(4): 30 – 37.
GUO Xu, TIAN Xin, HAO Jia, *et al.* Relationships between *Saposhnikovia divaricata* chromone content and soil factors in different regions[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2020, **41**(4): 30 – 37.
- [9] LI Yazhen, CHEN Jiahong, TSAI Chengfang, *et al.* Anti-inflammatory property of imperatorin on alveolar macrophages and inflammatory lung injury [J]. *Journal of Natural Products*, 2019, **82**(4): 1002 – 1008.
- [10] ERDENEBILEG S, SON Y J, KIM M, *et al.* *Saposhnikovia divaricata* root and its major components ameliorate inflammation and altered gut microbial diversity and compositions in DSS-induced colitis[J/OL]. *Integrative Medicine Research*, 2023, **12**(4): 100998[2023-11-10]. doi: 10.1016/j.imr.2023.100998.
- [11] WEI Jianxu, ZHANG Xiaomeng, LI Yuan, *et al.* Novel application of bergapten and quercetin with anti-bacterial, osteogenesis-potentiating, and anti-inflammation tri-effects [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2021, **53**(6): 683 – 696.
- [12] DUAN Juan, HU Xuantao, LI Tao, *et al.* Cimifugin suppresses NF-kappaB signaling to prevent osteoclastogenesis and periprosthetic osteolysis[J/OL]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, **12**: 724256[2023-11-10]. doi: 10.3389/fphar.2021.724256.
- [13] ZHU Chan, YANG Yang, SONG Yizhi, *et al.* Mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of xanthotoxin [J]. *The European Journal of Neuroscience*, 2023, **58**(7): 3605 – 3617.
- [14] LIN Yimu, XIAO Shuyi, YAO Wei, *et al.* Molecular photoacoustic imaging for early diagnosis and treatment monitoring of rheumatoid arthritis in a mouse model [J]. *American Journal of Translational Research*, 2021, **13**(8): 8873 – 8884.
- [15] JIN Shangyi, LI Mengtao, FANG Yongfei, *et al.* Chinese registry of rheumatoid arthritis (CREDIT): II . prevalence and risk factors of major comorbidities in Chinese patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2017, **19**(1): 251 – 259.
- [16] KONG Chaojun, JIA Longfei, JIA Jianping. γ -mangostin attenuates amyloid- β 2-induced neuroinflammation and oxidative stress in microglia-like BV2 cells via the mitogen-activated protein kinases signaling pathway[J/OL]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, **917**: 174744[2023-11-10]. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174744.
- [17] LEE Y T, YUNUS MHM, UGUSMAN A, *et al.* Natural compounds affecting inflammatory pathways of

- osteoarthritis[J/OL]. *Antioxidants*, 2022, **11**(9) [2023-11-10]. doi: 10.3390/antiox11091722.
- [18] 何江, 尚芳红, 李隆云, 等. 佛手指纹图谱的建立及抗氧化谱效关系研究[J]. 中草药, 2023, **54**(23): 7841 – 7852.
HE Jiang, SHANG Fanghong, LI Longyun, *et al.* Establishment of fingerprints and spectrum-effect relationship of antioxidant activity of *Citri sarcodactylis fructus* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2023, **54**(23): 7841 – 7852.
- [19] 杨琳琳, 李千, 王璇, 等. 生长方式及年限对防风品质影响研究[J]. 中国中药杂志, 2023, **48**(15): 4106 – 4114.
YANG Linlin, LI Qian, WANG Xuan, *et al.* Effects of growth patterns and years on quality of *Saposhnikoviae radix* samples [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2023, **48**(15): 4106 – 4114.
- [20] 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.
ZHANG Jinhua, LIN Tianfeng, ZHANG Yu, *et al.* Calibration on chromone reference extract and application on quality control of *Saposhnikoviae radix* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, **46**(21): 5658 – 5664.
- [21] 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.
WANG Hao, GUO Lingge, SHANG Xingpu, *et al.* Based on appearance and index components to study on standards of commodity classes of *Saposhnikovia radix* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, **51**(20): 5320 – 5327.
- [22] BATSUKH Z, TOUME K, JAVZAN B, *et al.* Metabolomic profiling of *Saposhnikoviae radix* from Mongolia by LC-IT-TOF-MS/MS and multivariate statistical analysis [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2020, **74**(1): 170 – 188.
- [23] WANG Simao, QIAN Yuexin, SUN Mengxiao, *et al.* Holistic quality evaluation of *Saposhnikoviae radix* (*Saposhnikovia divaricata*) by reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography coupled with ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry-based untargeted metabolomics [J]. *Arablan Journal of Chemistry*, 2020, **13**(12): 8835 – 8847.
- [24] 孟祥才, 邓代千, 杜虹韦, 等. 高品质道地药材的科学内涵[J]. 中草药, 2023, **54**(3): 939 – 947.
MENG Xiangcai, DENG Daiqian, DU Hongwei, *et al.* Scientific connotation of high-quality genuine medicinal materials [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2023, **54**(3): 939 – 947.
- [25] CHEN Bingrui, ZOU Hui, ZHANG Boyang, *et al.* Distribution pattern and change prediction of *Saposhnikovia divaricata* suitable area in china under climate change[J/OL]. *Ecological Indicators*, 2022, **143**[2023-11-10]. doi: 10.1016/j.ecolind.2022.109311.
- [26] YIP Kaman, XU Jun, ZHOU Shanshan, *et al.* Characterization of chemical component variations in different growth years and tissues of *morinda officinalis radix* by integrating metabolomics and glycomics [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, **67**(26): 7304 – 7314.
- [27] 郭梅, 安琪, 申亚君, 等. 基于多指标—测多评结合信息熵-响应面法的防风药材质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2021, **46**(10): 2537 – 2546.
GUO Mei, AN Qi, SHEN Yajun, *et al.* Quality evaluation of *Saposhnikoviae radix* based on QAMS combined with information entropy-response surface method [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, **46**(10): 2537 – 2546.
- [28] LIU Guiming, XIE Jing, SHI Yurui, *et al.* Sec-O-glucosylhamaudol suppressed inflammatory reaction induced by LPS in RAW 264.7 cells through inhibition of NF-kappaB and MAPKs signaling[J/OL]. *Bioscience Reports*, 2020, **40**(2): BSR20194230[2023-11-10]. doi: 10.1042/BSR20194230.
- [29] LIU Aimin, ZHAO Wei, ZHANG Buxin, *et al.* Cimifugin ameliorates imiquimod-induced psoriasis by inhibiting oxidative stress and inflammation via NF-kappaB/MAPK pathway[J/OL]. *Bioscience Reports*, 2020, **40**(6): BSR20200471[2023-11-10]. doi: 10.1042/BSR20200471.
- [30] KONG Xiangying, LIU Chunfang, ZHANG Cun, *et al.* The suppressive effects of *Saposhnikovia divaricata* chromone extract on rheumatoid arthritis via inhibition of nuclear factor-kappaB and mitogen activated protein kinases activation on collagen-induced arthritis model [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, **148**(3): 842 – 850.