

超高效液相色谱-串联质谱法测定知母主根和须根中18种成分

邵志愿¹, 黄琪^{1,2}, 吴德玲^{1,2*}, 张伟^{1,2}, 李露¹, 廖延武¹

(1. 安徽中医药大学药学院安徽省现代中药重点实验室, 合肥 230012;

2. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 安徽亳州 236816)

[摘要] 目的: 建立超高效液相色谱-串联质谱法分析知母主根和须根中螺甾皂苷类(知母皂苷A I, 知母皂苷A II, 知母皂苷A III, 知母皂苷III, 菝葜皂苷元), 呋甾皂苷(新知母皂苷B II, 知母皂苷B II, 知母皂苷B III, 知母皂苷I a, 知母皂苷I, 知母皂苷C, 知母皂苷E), 黄酮(淫羊藿次苷I, 宝藿苷I), 双苯吡酮(新芒果苷、芒果苷、异芒果苷), 氢醌糖苷(β -熊果苷)5类共18种成分的方法, 从而分析不同来源知母主根和须根差异性, 为知母资源可持续发展提供参考。方法: 取样品0.25 g用稀乙醇25 mL回流提取30 min, 色谱分离采用Waters ACQUITY UPLC®BEH HILIC C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m), 流动相0.1%甲酸水-乙腈, 梯度洗脱, 体积流量0.2 mL·min⁻¹。采用电喷雾离子源(ESI⁺, ESI⁻), 多反应离子监测(MRM)进行检测, 利用外标法计算知母样品中所测成分的含量, 通过SMICA14.1软件对知母主根和须根样品间的差异进行分析。结果: 所测成分在各自的线性范围内呈良好的线性关系, 精密性、重复性、稳定性良好, 加样回收率在95.22%~101.42%, RSD均<4%。实验结果表明, 以18种成分为主成分进行多元统计分析时, 知母主根与须根有较大差异。结论: 该研究为知母须根资源再利用和知母质量控制提供了实验依据。

[关键词] 知母主根; 知母须根; 超高效液相色谱-串联质谱法

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0126-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201911

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200708.0949.001.html>

[网络出版日期] 2020-7-8 10:22

Determination of 18 Components in Main Root and Fibrous Root of *Anemarrhena asphodeloides* by UPLC-MS

SHAO Zhi-yuan¹, HUANG Qi^{1,2}, WU De-ling^{1,2*}, ZHANG Wei^{1,2}, LI Lu¹, LIAO Yan-wu¹

(1. School of Pharmacy, Anhui Provincial Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Anhui Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Bozhou 236816, China)

[Abstract] **Objective:** To establish ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the analysis of 18 components of five categories, namely spirosteroid saponins (timosaponin A I, timosaponin A II, timosaponin A III, anemarrhenasaponin III, sarsasapogenin), furostane saponins (anemarrhenasaponin I, anemarrhenasaponin I a, anemarsaponin E, officinalisinin I, timosaponin B- II, timosaponin B- III, anemarsaponin C), flavonoids (icarisin I, baohuoside I), bisphenone (meomangiferin, mangiferin, isomangiferin), and hydroquinone glycoside (β -arbutin), in order to analyze the differences between the main root and fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides* from different sources and provide reference for the sustainable development of *A. asphodeloides* resources. **Method:** 0.25 g sample was

[收稿日期] 20200627(010)

[基金项目] 2019年度安徽省自然科学基金青年项目(1908085QH372); 2018年度安徽高校自然科学重大项目(KJ2018ZD030); 2018年度安徽高校自然科学重点研究项目(KJ2018A0298)

[第一作者] 邵志愿, 在读硕士, 从事中药活性成分与质量标准研究, E-mail: szyzazy@163.com

[通信作者] * 吴德玲, 教授, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel: 0551-68129066, E-mail: dlwu7375@sina.com

refluxed and extracted with 25 mL dilute ethanol for 30 min. The chromatographic separation was carried out on Waters Acquity Uplc BEHHILI C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), with 0.1% formic acid water-acetonitrile as the mobile phase for gradient elution, and the volume flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. Electrospray ion source (ESI⁺, ESI⁻), and multi-reaction ion monitoring(MRM) were used for detection, external standard method was used to calculate the content of the tested components in medicinal samples, and SMICA14.1 software was used to analyze the differences between the main root and fibrous root samples of *A. asphodeloides*. **Result:** The tested components showed a good linear relationship in their respective linear ranges, with a good precision, repeatability and stability. The recovery rate of samples was between 95.22%-101.42%, and RSD was less than 4%. The experimental results showed great differences between the main root and fibrous root of *A. asphodeloides*, when the multivariate statistical analysis was carried out with 18 main components. **Conclusion:** This study provides experimental basis for the reuse of fibrous root of *A. asphodeloides* resources and the quality control of *A. asphodeloides*.

[Key words] main root of *Anemarrhena asphodeloides*; fibrous root of *A. asphodeloides*; UPLC-MS

知母具有清热泻火、润燥生津的作用^[1]。现代研究表明,知母及其提取物在对阿尔兹海默症(AD)模型动物的学习记忆方面有明显的良好作用的效果^[2],知母皂苷在抗炎反应、抗神经细胞凋亡方面有明显的作用^[3]。知母具有改善和增强小鼠记忆细胞的作用,LEE等^[4]人从知母中分离得到的知母皂苷AIII,发现其可改善小鼠的学习和记忆缺陷。课题组前期研究发现,知母中总皂苷提取物对乙酰胆碱酯酶具有一定的抑制作用,提示其可能具有潜在的抗老年痴呆的活性。明继阳等^[5]研究知母在百虎汤复方中的作用,发现知母在复方中可以显著增强降温的效果,尤其对高热症解热作用作用突出,此外还有研究表明知母有降血脂、降血糖、抑制胆碱酯酶、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等作用^[6-13]。魏树奇等^[14]通过对知母的主根和须根所含主要成分做了植化和药理实验,证明了知母须根的所含主要成分与主根的完全一致,其药理作用与主根相同。

超高效液相色谱-串联质谱法作为一项新兴发展的色谱技术,具有高效、分离能力高、选择性强、灵敏度高等诸多优点,在化学成分分析领域有着无可替代的优势,逐渐成为实验室重要的复杂化学成分检测手段之一^[15-19]。液质联用技术可以对知母主根和须根的化学成分进行系统性和整体性的对比研究,结合多元统计分析方法对实验数据进行分析,寻找存在于知母主根和须根组别间的差异性成分,本实验使用液质联用技术结合多元统计分析方法,对知母主根和须根样品进行分析,从整体上分析知母主根和须根对化学成分的影响,寻找差异化合物,并观察其在知母主根和须根中的变化趋势。知母的须根比较发达,其须根量约占根茎采收量的

30%^[20]。因此对知母须根的研究不仅符合新能源开发利用的理念,还提高了中药知母资源的利用率,符合中药资源可持续发展理念,为知母须根后期研究打下良好的基础。

1 材料

SCIEX Triple Quad™ 4500型LC-MS/MS系统(上海爱博才思仪器),UPLC-8040型液相色谱(日本岛津),Waters ACQUITY UPLC®BEH HILIC C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),LFP-800A型莱芙高速多功能高速粉碎机(浙江省永康市红太阳机电有限公司),MSA6型1/100万电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),HH-6型恒温水浴锅(江苏国华电器有限公司),美国PALL进口滤膜(0.22 μm,天津市领航实验设备股份有限公司),Milli-Q Advantage A10型一体式超纯水机(美国Milipore公司)。

芒果苷,新芒果苷,异芒果苷,知母皂苷Ⅲ,菝葜皂苷元,知母皂苷AⅠ,知母皂苷AⅡ,知母皂苷AⅢ,新知母皂苷BⅡ,知母皂苷BⅡ,知母皂苷BⅢ,知母皂苷I,知母皂苷Ia,知母皂苷C,知母皂苷E,淫羊藿次苷I,宝藿苷I(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为MUST-18040123, MUST-17042232, MUST-18072905, MUST-18042404, MUST-17081402, MUST-18032820, MUST-19021301, MUST-19040108, MUST-18041103, MUST-18052605, MUST-18032209, MUST-18032402, MUST-18042403, MUST-18041604, MUST-18040705, MUST-18102120, MUST-18042203);β-熊果苷(成都德斯特生物科技有限公司,批号DST180713-031),各对照品纯度均>98%。色谱级乙腈(美国Fisher公司),

色谱级甲酸(阿拉丁公司),屈臣氏专业蒸馏水(深圳屈臣氏蒸馏水有限公司),其他试剂均为分析级。

知母主根和须根样品采自河北省安国及易县,安徽省亳州市等地,经安徽中医药大学刘守金教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* 主根和须根。样品信息详见表1。

表1 知母样品信息

Table 1 Information of *Anemarrhena asphodeloides* sample

知母主根编号	知母须根编号	采集地	采集时间
S-1	X-1	亳州十九里镇马寨村	2018-03-12
S-2	X-2	亳州十九里镇马寨村	2018-03-12
S-3	X-3	亳州十九里镇陈小庙村	2018-03-12
S-4	X-4	亳州十九里镇陈小庙村	2018-03-12
S-5	X-5	亳州十九里镇马小楼村	2018-03-12
S-6	X-6	亳州十九里镇马小楼村	2018-03-12
S-7	X-7	亳州十九里镇沈营村	2018-03-13
S-8	X-8	亳州十九里镇沈营村	2018-03-13
S-9	X-9	亳州十九里镇柳庄	2018-03-13
S-10	X-10	亳州十九里镇柳庄	2018-03-13
S-11	X-11	亳州十九里镇高庄村	2018-03-13
S-12	X-12	亳州十九里镇权庄	2018-03-13
S-13	X-13	安国西陵镇三尖峪村	2018-11-05
S-14	X-14	安国西陵镇三尖峪村	2018-11-05
S-15	X-15	安国西陵镇太平峪村	2018-11-05
S-16	X-16	安国西陵镇太平峪村	2018-11-05
S-17	X-17	安国市焦庄乡焦庄村	2018-11-06
S-18	X-18	安国市焦庄乡焦庄村	2018-11-06
S-19	X-19	安国市焦庄乡樊庄	2018-11-06
S-20	X-20	安国市焦庄乡樊庄	2018-11-06

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(过三号筛)0.25 g,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇25 mL,称定质量,回流提取0.5 h,放冷,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取适量新知母皂苷BⅡ,知母皂苷BⅡ,知母皂苷BⅢ,知母皂苷I a,知母皂苷I,知母皂苷C,知母皂苷E,知母皂苷A I,知母皂苷AⅡ,知母皂苷AⅢ,知母皂苷Ⅲ,菝葜皂苷元,淫羊藿次苷I,宝藿苷I,新芒果苷,芒果苷,异芒果苷对照品置100 mL量瓶中,用稀乙醇

溶解,制成质量浓度均为100 mg·L⁻¹的混合对照品溶液,即得。

2.2 液相色谱和质谱条件

2.2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相0.1%甲酸水(A)-乙腈(B);梯度洗脱(0~5 min, 10%~30%B; 5~8 min, 30%~46%B; 8~10 min, 46%~90%B; 10~18 min, 90%B; 18~20 min, 90%~100%B; 20~25 min, 100%B; 25~30 min, 100%~10%B);流速0.2 mL·min⁻¹,柱温30 °C,进样量2 μL。

2.2.2 质谱条件 离子化模式为ESI⁺,ESI⁻;质谱扫描方式为多反应监测模式(MRM);雾化气氮气,3 L·min⁻¹;干燥气氮气,15 L·min⁻¹;ESI⁺模式离子喷雾电压5 500 V;ESI⁻模式离子喷雾电压-4 500 V;离子源温度450 °C;喷雾气压力275 kPa;辅助加热气压力275 kPa;气帘气压力241 kPa;碰撞气压力62 kPa。优化后对照品的质谱参数见表2。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系,最低检测限(LOD),最低定量限(LOQ)考察 按2.1项下制备的混合对照品溶液,稀释至不同浓度梯度,按2.2项下方法进样,以对照品峰面积Y为纵坐标,质量浓度X(mg·L⁻¹)为横坐标,进行线性回归,结果18种成分的r均>0.999,表明线性关系良好。取混合对照品溶液,稀释成一系列不同浓度的对照品溶液,按2.2项下方法进样分析,取信噪比(S/N≥10)为LOQ,信噪比(S/N≥3)为LOD,结果见表3。

2.3.2 精密度考察 取已知浓度的混合对照品溶液,按2.2项下方法进样,连续进样6次,以峰面积计算,各测定成分的峰面积RSD在1.5%~3.1%,表明实验仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性考察 按2.1.1项下方法制备供试品溶液,分别在0,4,8,12,24,48 h按2.2项下方法进样,以峰面积计算,各测定成分的RSD在1.5%~2.9%,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.3.4 重复性考察 精密称定6份同一批次样品,按2.1.1项下方法制备供试品溶液,按2.2项下方法进样,以含量计算,各测定成分的RSD在1.7%~2.9%,表明本实验方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率考察 精密称定9份同一批次样品(S1)0.125 g,分别精密加入高、中、低3个浓度混合对照品溶液,按2.1.1项下方法制备供试品溶液,按2.2项下方法进样,测定各成分含量,计算各成分加样回收和RSD。结果见表4。

表2 对照品优化后的质谱参数

Table 2 Optimization of mass spectrum parameters of standard

成分	离子对(m/z)		碎裂电 压/V	碰撞电 压/V	成分	离子对(m/z)		碎裂电 压/V	碰撞电 压/V
	母离子	子离子				母离子	子离子		
新芒果苷	583.2[M-H] ⁻	330.9 ¹⁾	-165	-45	新知母皂苷B II	919.5[M-H] ⁻	433.0 ¹⁾	-167	-60
		493.3					595.3		
异芒果苷	421.2[M-H] ⁻	330.8 ¹⁾	-142	-31	淫羊藿次苷 I	529.4[M-H] ⁻	366.9 ¹⁾	-150	-25
		301.1					368.2		
知母皂苷A II	755.2[M-H] ⁻	593.3 ¹⁾	-200	-46	芒果苷	423.2[M+H] ⁺	301.1 ¹⁾	160	20
		221.3					357.1		
知母皂苷 III	757.3[M-H] ⁻	595.3 ¹⁾	-200	-46	知母皂苷 A I	579.5[M+H] ⁺	301.0 ¹⁾	66	28
		433.2					273.2		
知母皂苷 I	757.4[M-H] ⁻	529.3 ¹⁾	-170	-46	知母皂苷 A III	758.6[M+H] ⁺	579.5 ¹⁾	95	21
		609.5					417.5		
知母皂苷 I a	771.4[M-H] ⁻	609.5 ¹⁾	-160	-44	知母皂苷 E	903.2[M+H-MeOH] ⁺	417.3 ¹⁾	66	28
		435.4					741.2		
知母皂苷 B III	901.6[M-H] ⁻	739.8 ¹⁾	-160	-60	菝葜皂苷元	417.3[M+H] ⁺	273.2 ¹⁾	114	28
		577.2					285.4		
知母皂苷 C	902.5[M-H] ⁻	740.7 ¹⁾	-165	-54	宝藿苷 I	515.1[M+H] ⁺	369.2 ¹⁾	163	18
		417.3					314.2		
知母皂苷 B II	919.7[M-H] ⁻	757.6 ¹⁾	-160	-60	β-熊果苷	274.3[M+H] ⁺	256.3 ¹⁾	90	29
		579.3					106.1		

注: ¹⁾为定量离子。

表3 线性回归方程及定量限和检测限

Table 3 LOD and LOQ, Linear regression equation

成分	回归方程	r	线性范围/mg·L ⁻¹	LOD/μg·L ⁻¹	LOQ/μg·L ⁻¹
新芒果苷	Y=801 038X+571 465	0.999 3	0.18~45.2	2.813	5.625
异芒果苷	Y=9 000 000X+4 000 000	0.999 5	0.16~40.8	2.500	5.000
知母皂苷 A II	Y=1 132.4X+3 046.7	0.999 1	0.20~52.0	3.125	6.250
知母皂苷 III	Y=56 497X+59 513	0.999 1	0.28~40.3	2.188	8.752
知母皂苷 I	Y=1 696.4X+1 694.4	0.999 3	0.16~40.0	1.250	7.500
知母皂苷 I a	Y=3 059.2X+1 607.1	0.999 4	0.08~20.0	1.250	3.750
知母皂苷 B III	Y=125 110X+78 577	0.999 7	0.20~50.0	3.100	9.300
知母皂苷 C	Y=152 531X+107 196	0.999 4	0.18~46.8	4.200	8.400
知母皂苷 B II	Y=125 110X+78 577	0.999 3	0.16~40.1	1.600	8.000
新知母皂苷 B II	Y=8 046.2X+821.31	0.999 4	0.17~42.4	2.656	7.968
淫羊藿次苷 I	Y=788 719X+1 000 000	0.999 1	0.20~52.0	1.563	7.815
芒果苷	Y=16 773X+17 140	0.999 2	0.15~39.2	1.172	7.032
知母皂苷 A I	Y=184 568X+4 000 000	0.999 4	0.17~44.4	1.329	9.303
知母皂苷 A III	Y=13 655X-4 794.8	0.999 3	0.15~39.6	2.344	9.376
知母皂苷 E	Y=546 480X-200 646	0.999 2	0.16~40.0	2.500	10.000
菝葜皂苷元	Y=408 768X-36 671	0.999 5	0.17~42.4	1.328	7.968
宝藿苷 I	Y=30 851X-8 622.9	0.999 4	0.16~40.8	1.250	8.750
β-熊果苷	Y=193 400X+4 000 000	0.999 1	0.27~68.0	2.109	8.436

表4 知母样品中各测定成分的加样回收率考察 (n=3)

Table 4 Investigation results of sample recovery rate of each determination component of *Anemarrhena asphodeloides* (n=3)

成分	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%	成分	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
新芒果苷	0.863	0.640	1.500	99.77	0.9	知母皂苷Ⅲ	0.725	0.526	1.243	100.53	1.8
	0.860	0.860	1.712				0.724	0.725	1.458		
	0.858	1.120	1.986				0.726	0.852	1.594		
异芒果苷	0.338	0.200	0.540	99.05	1.8	淫羊藿次苷 I	0.112	0.080	0.190	98.77	2.6
	0.340	0.340	0.672				0.113	0.115	0.230		
	0.334	0.400	0.728				0.110	0.136	0.242		
知母皂苷 A II	0.986	0.500	1.482	99.62	0.6	芒果苷	0.675	0.462	1.130	100.43	3.1
	0.980	1.000	1.974				0.675	0.675	1.342		
	0.990	1.200	2.193				0.678	0.852	1.564		
知母皂苷 B II	6.250	4.565	10.812	99.05	1.6	知母皂苷 A I	1.072	0.868	1.920	97.45	1.9
	6.256	6.362	12.619				1.075	1.075	2.102		
	6.252	7.694	13.730				1.072	1.340	2.400		
新知母皂苷 B II	0.478	0.316	0.780	98.07	2.2	知母皂苷 A III	0.712	0.564	1.250	97.93	2.3
	0.475	0.480	0.951				0.710	0.710	1.412		
	0.480	0.573	1.050				0.712	0.872	1.580		
知母皂苷 B III	0.125	0.095	0.215	96.18	2.9	知母皂苷 E	0.435	0.284	0.708	98.87	2.8
	0.122	0.125	0.240				0.438	0.440	0.885		
	0.126	0.165	0.290				0.440	0.627	1.060		
知母皂苷 I	0.212	0.186	0.392	95.22	1.9	菝葜皂苷元	1.550	1.200	2.758	100.19	0.5
	0.216	0.220	0.421				1.546	1.552	3.100		
	0.215	0.256	0.460				1.548	1.826	3.370		
知母皂苷 I a	0.700	0.562	1.253	97.97	1.0	宝藿苷 I	0.125	0.104	0.228	101.42	2.5
	0.696	0.700	1.374				0.125	0.125	0.255		
	0.701	0.826	1.516				0.126	0.162	0.290		
知母皂苷 C	0.135	0.118	0.250	96.95	1.2	β-熊果苷	0.250	0.200	0.442	98.01	2.5
	0.135	0.136	0.265				0.252	0.250	0.504		
	0.132	0.182	0.310				0.250	0.325	0.566		

2.4 样品测定 取知母主根和知母须根样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下方法进样

分析,得到 18 种成分离子图峰面积,采用线性回归方程计算样品中 18 种成分含量,结果见表 5。

表5 知母主根和知母须根中 18 种成分含量测定

Table 5 Determination of 18 components in main root and fibrous root of *Anemarrhena asphodeloides*

%

编号	螺甾皂苷类					呋甾皂苷类					黄酮类		双苯吡酮类			氢醌糖苷类		
	知母皂苷 A I	知母皂苷 A II	知母皂苷 A III	知母皂苷 III	菝葜皂苷元	知母皂苷 I	知母皂苷 I a	知母皂苷 E	新知母皂苷 B II	知母皂苷 B II	知母皂苷 B III	知母皂苷 C	宝藿苷 I	淫羊藿次苷 I	新芒果苷		异芒果苷	芒果苷
S-1	0.86	0.79	0.57	0.58	1.24	0.17	0.56	0.35	0.39	5.02	0.10	0.11	0.10	0.09	0.69	0.27	0.54	0.20
S-2	1.36	0.75	0.65	0.52	1.53	0.18	0.61	0.37	0.30	4.04	0.10	0.12	0.11	0.08	0.36	0.28	0.61	0.21
S-3	1.57	0.95	0.86	0.56	1.74	0.49	0.83	0.60	0.37	4.63	0.13	0.16	0.10	0.10	0.30	0.32	0.45	0.20
S-4	2.00	1.20	1.10	0.60	1.67	0.34	1.49	0.52	0.41	5.31	0.13	0.15	0.10	0.10	0.33	0.33	0.41	0.20

续表5

编号	螺甾皂苷类					呋甾皂苷类							黄酮类		双苯吡酮类			氢醌糖苷类
	知母皂苷A I	知母皂苷A II	知母皂苷A III	知母皂苷III	菝葜皂苷元	知母皂苷I	知母皂苷I a	知母皂苷E	新知母皂苷B II	知母皂苷B II	知母皂苷B III	知母皂苷C	宝藿苷I	淫羊藿次苷I	新芒果苷	异芒果苷	芒果苷	β -熊果苷
S-5	1.93	1.18	0.65	0.64	1.75	0.90	1.43	0.56	0.33	5.39	0.15	0.19	0.10	0.09	0.43	0.30	0.48	0.21
S-6	0.71	1.31	0.34	0.55	1.26	0.30	0.74	0.62	0.33	5.03	0.48	0.56	0.10	0.07	0.58	0.31	0.54	0.14
S-7	0.78	1.32	0.46	0.61	1.53	0.20	0.87	0.46	0.44	5.39	0.33	0.32	0.10	0.09	0.73	0.41	0.55	0.19
S-8	1.08	1.23	0.43	0.52	1.58	0.18	0.85	0.44	0.29	4.59	0.34	0.35	0.11	0.10	0.49	0.36	0.60	0.10
S-9	0.56	1.10	0.32	0.56	1.52	0.18	0.59	0.50	0.32	4.58	0.40	0.38	0.10	0.07	0.40	0.37	0.58	0.13
S-10	0.10	1.06	0.13	0.89	1.28	0.40	0.98	0.50	0.48	7.73	0.08	0.08	0.13	0.10	0.83	0.11	0.51	0.29
S-11	0.12	0.71	0.11	0.62	1.79	0.33	0.69	0.57	0.35	4.71	0.07	0.07	0.09	0.09	0.77	0.15	0.56	0.56
S-12	0.12	0.59	0.12	0.71	1.54	0.44	0.56	0.57	0.34	4.62	0.07	0.08	0.13	0.07	1.09	0.17	0.50	0.75
S-13	0.21	0.54	0.17	0.68	2.01	0.33	0.64	0.64	0.42	4.66	0.06	0.07	0.13	0.09	1.08	0.19	0.51	0.82
S-14	0.44	0.52	0.28	0.65	1.77	0.33	0.58	0.77	0.48	5.09	0.08	0.09	0.13	0.08	1.22	0.24	0.48	0.80
S-15	1.38	0.88	0.64	0.85	1.52	0.58	0.98	0.73	0.39	5.27	0.09	0.10	0.13	0.07	0.81	0.27	0.44	0.34
S-16	0.90	0.67	0.27	0.90	2.03	0.41	0.60	0.60	0.39	5.63	0.07	0.08	0.11	0.09	0.46	0.24	0.53	0.60
S-17	1.02	0.66	0.62	0.56	1.50	0.45	0.56	0.38	0.35	3.95	0.10	0.12	0.13	0.09	0.16	0.31	0.44	0.11
S-18	1.06	0.72	0.29	0.70	1.75	0.48	0.91	0.37	0.42	5.74	0.04	0.04	0.09	0.09	0.53	0.25	0.42	0.21
S-19	0.22	0.90	0.26	0.67	1.99	0.22	0.53	0.39	0.37	5.57	0.04	0.04	0.08	0.08	0.92	0.11	0.48	0.09
S-20	0.09	0.85	0.15	0.63	1.25	0.29	0.72	0.51	0.31	4.33	0.04	0.05	0.08	0.07	0.63	0.15	0.42	0.24
X-1	0.30	1.34	0.06	0.21	1.24	0.02	0.35	0.15	0.07	1.00	0.01	0.01	0.09	0.09	1.62	0.52	0.95	0.29
X-2	0.38	0.93	0.02	0.18	1.51	0.01	0.20	0.06	0.05	0.70	0.01	0.01	0.09	0.10	0.29	0.13	0.20	0.33
X-3	0.30	1.18	0.03	0.19	1.01	0.02	0.33	0.12	0.06	0.79	0.01	0.01	0.08	0.09	0.88	0.39	0.76	0.13
X-4	0.33	1.06	0.06	0.14	1.27	0.01	0.35	0.15	0.05	0.77	0.02	0.02	0.08	0.10	1.11	0.46	0.53	0.10
X-5	0.28	1.25	0.11	0.15	1.03	0.01	0.27	0.17	0.06	0.84	0.03	0.03	0.09	0.10	1.35	0.44	0.55	0.14
X-6	0.34	1.03	0.14	0.19	1.53	0.03	0.21	0.19	0.08	0.98	0.02	0.03	0.13	0.08	1.02	0.48	0.83	0.08
X-7	0.45	1.12	0.07	0.18	1.05	0.01	0.25	0.09	0.06	0.66	0.01	0.01	0.10	0.08	0.87	0.39	0.82	0.83
X-8	0.37	1.18	0.02	0.16	1.25	0.01	0.18	0.05	0.03	0.45	0.01	0.01	0.10	0.09	1.28	0.41	0.94	0.27
X-9	0.91	0.91	0.01	0.16	1.50	0.02	0.22	0.08	0.05	0.62	0.01	0.01	0.09	0.10	0.85	0.35	0.57	0.84
X-10	0.58	0.90	0.01	0.12	1.32	0.01	0.26	0.07	0.04	0.50	0.01	0.01	0.09	0.06	1.44	0.36	0.58	0.72
X-11	0.48	0.90	0.01	0.16	1.50	0.02	0.25	0.12	0.05	0.63	0.01	0.01	0.10	0.08	1.06	0.43	0.70	0.58
X-12	0.45	0.91	0.04	0.16	1.38	0.02	0.26	0.16	0.05	0.69	0.01	0.01	0.13	0.06	1.14	0.48	0.78	0.53
X-13	0.36	0.97	0.02	0.25	1.50	0.03	0.21	0.22	0.11	1.34	0.02	0.02	0.11	0.05	1.60	0.44	1.06	1.07
X-14	0.38	0.91	0.02	0.20	1.19	0.02	0.23	0.15	0.08	1.01	0.02	0.02	0.09	0.04	0.82	0.40	0.63	1.27
X-15	0.87	0.93	0.01	0.17	1.03	0.02	0.21	0.22	0.08	1.04	0.03	0.04	0.10	0.05	1.28	0.48	0.85	0.79
X-16	0.49	0.83	0.02	0.18	1.34	0.01	0.22	0.18	0.06	0.78	0.01	0.01	0.10	0.05	1.74	0.45	0.90	0.73
X-17	0.38	0.93	0.02	0.21	1.26	0.02	0.25	0.27	0.08	1.10	0.01	0.01	0.10	0.04	1.26	0.52	1.11	0.66
X-18	0.48	1.08	0.03	0.22	1.50	0.02	0.24	0.16	0.09	1.20	0.02	0.02	0.09	0.04	1.23	0.39	0.56	1.10
X-19	0.48	0.92	0.04	0.26	1.28	0.03	0.25	0.21	0.11	1.42	0.02	0.02	0.13	0.04	1.93	0.46	0.68	1.26
X-20	0.44	0.85	0.03	0.18	1.50	0.02	0.19	0.17	0.07	1.08	0.03	0.03	0.10	0.05	0.92	0.47	0.61	0.94

由表5可见,知母主根(ZG)和知母须根(XG)中各类成分占样品总量的百分比有较大的差异,其

中知母主根中甾体皂苷类(SS)4.41%,呋甾皂苷类(FS)7.41%,黄酮类(S)0.19%,双苯吡酮类1.40%

(F), 氢醌糖苷类(HG)0.32%, 知母须根中甾体皂苷类(SS)3.00%, 呋甾皂苷类占1.39%(FS), 黄酮类(S)0.17%, 双苯吡酮类(F)2.34%, 氢醌糖苷类(HG)0.63%, 且知母主根和须根中甾体皂苷类(SS), 呋甾

皂苷类(FS), 氢醌糖苷类(HG)等成分, 两者具有极显著性差异($P < 0.01$), 双苯吡酮类(F)成分, 两者具有显著性差异($P < 0.05$), 黄酮类(S)成分, 两者无统计学意义, 结果见图1A。

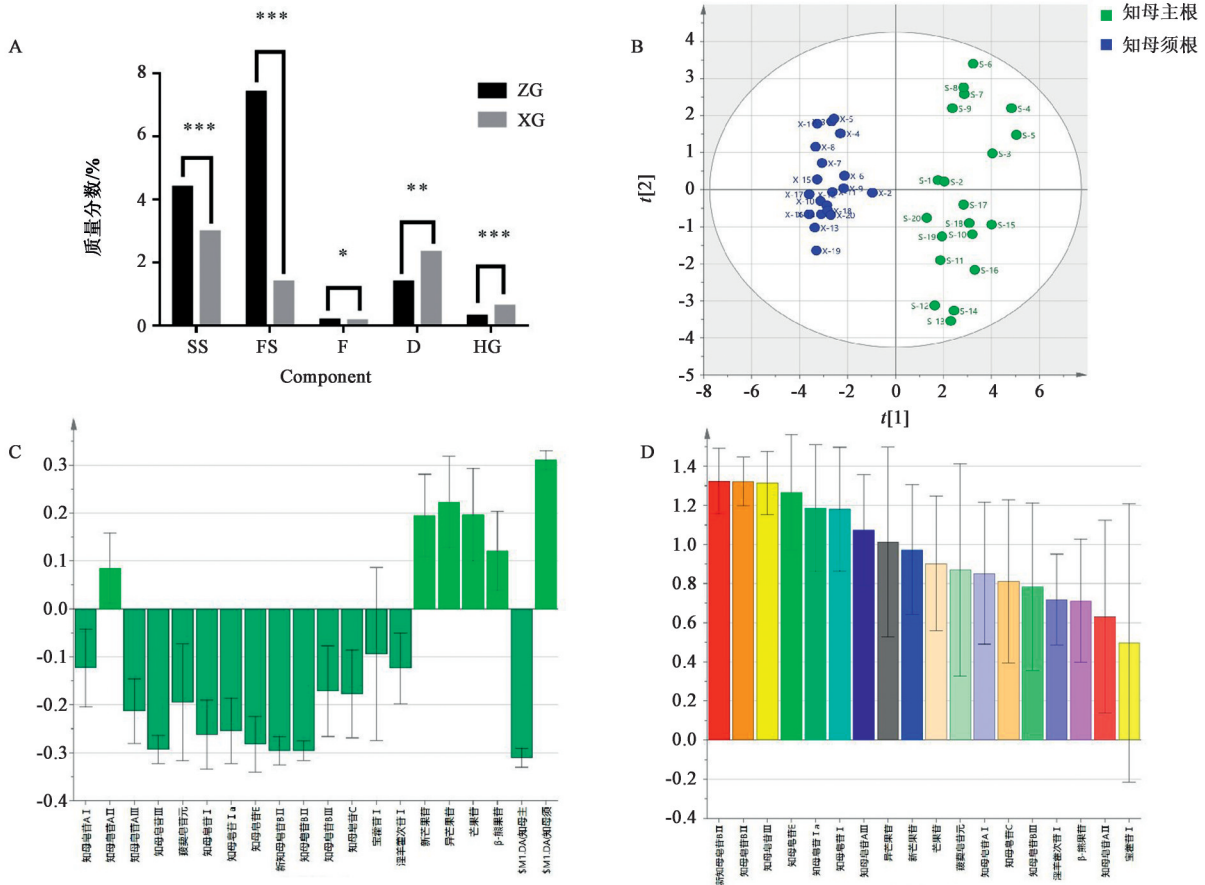


图1 知母不同样品及分类成分含量(A), 得分(B)及各成分载荷(C), 贡献(D)

Fig. 1 Component content (A) and score (B) of different *Anemarrhena asphodeloides*, loadings (C) and VIP (D) of different congenents

用SMICA14.1软件对表5中数据进行受监督的判别分析统计分析(OPLS-DA), 得到Scores图, 即图1B。通过分析二维得分图, 可知知母主根和须根样品聚成两类, 知母须根样品集中分布, 知母主根样品分散分布, 得知知母须根之间的离散度小于知母主根样品, 说明知母须根样品之间的差异性小于知母主根样品, 以18种成分为主成分对知母主根和须根进行OPLS-DA分析时, 知母主根和须根具有显著差异。

为确定各测定成分与知母主根和须根的关系, 使用SMICA14.1软件对表5中数据进行拟合后, 做Loadings图, 如图1C所示。通过分析二维载荷图, 可知知母皂苷A II, 新芒果苷, 芒果苷, 异芒果苷, β -熊果苷等成分与知母须根相关, 新知母皂苷B II, 知母皂苷B II, 知母皂苷III, 知母皂苷E, 知母皂苷I a, 知母皂苷I, 知母皂苷A III, 菝葜皂苷元, 知母

皂苷A I, 知母皂苷C, 知母皂苷B III, 淫羊藿次苷I, 宝藿苷I等成分与知母主根相关。

利用SMICA14.1软件对表5中数据中测定成分依据贡献值大小进行重新整合, 做VIP图, 即图2D。通过分析VIP图, 各成分的贡献率从大到小依次是新知母皂苷B II, 知母皂苷B II, 知母皂苷III, 知母皂苷E, 知母皂苷I a, 知母皂苷I, 知母皂苷A III, 异芒果苷, 新芒果苷, 芒果苷, 菝葜皂苷元, 知母皂苷A I, 知母皂苷C, 知母皂苷B III, 淫羊藿次苷I, β -熊果苷, 知母皂苷A II, 宝藿苷I。由图可知, VIP值大于1的成分对知母主根和须根差异性贡献最大, 因此对知母主根和须根差异性影响较大的成分主要是呋甾皂苷(新知母皂苷B II, 知母皂苷B II, 知母皂苷I a, 知母皂苷I, 知母皂苷E), 螺甾皂苷(知母皂苷A III, 知母皂苷III), 双苯吡酮(新芒果苷, 芒果苷、异芒果苷)类成分。

3 讨论

本实验运用超高效液相色谱-串联质谱法技术同时测定不同来源的知母主根和须根中螺甾皂苷、呋甾皂苷、黄酮、双苯吡酮、氢醌糖苷类等成分含量。实验过程中对提取溶剂、提取方式分别进行考察,从而优化了溶液制备方法。样品提取过程中考察不同浓度甲醇、乙醇溶液的提取效果,最终选择对样品提取效果较好的稀乙醇作为溶剂,采用回流提取30 min可适当增大提取效率。从20批次知母主根和须根含量测定结果可以看出,知母主根和须根之间各测定成分含量差异较大,且不同样品间成分的各测定成分也具有一定差异,尤其知母主根和须根中甾体皂苷类、呋甾皂苷类、双苯吡酮类成分,两者具有显著性差异($P < 0.01$),虽然各批次知母主根和须根中测定成分种类相同,但同一成分在不同产地、批次的知母主根和须根间存在明显差异,因此推断出相同来源的知母主根和须根由于生长方式而导致各测定成分含量存在客观差异,进一步推动了知母须根资源再利用的可能性,本研究从知母主根和须根中测定氢醌糖苷类成分 β -熊果苷, β -熊果苷能有效地抑制皮肤中酪氨酸酶活性^[21],是美白化妆品中的主要原料,但 β -熊果苷可损伤细胞的细胞膜, β -熊果苷产生细胞毒性的作用与其易水解产生氢醌有关^[22]。本实验建立超高效液相色谱-串联质谱法同时测定知母主根和须根的含量测定方法,可用于知母主根和须根多指标成分质量研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:212.

[2] 梁冰,隋海娟,金英. 知母总皂苷对A β 1-42引起的老年大鼠学习记忆能力及海马炎症反应的影响[J]. 中国生化药物杂志,2012,33(2):117-120.

[3] 刘卓,金英,刘婉珠,等. 知母皂苷对脂多糖引起的大鼠学习记忆障碍和炎症反应的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(10):1362-1366.

[4] LEE B, JUNG K, KIM D H. Timosaponin A III, a saponin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, ameliorates learning and memory deficits in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 93(2):121-127.

[5] 明继阳,李洋,丁彦,等. 知母在白虎汤中解热作用的研究[J]. 中医药信息,2017,34(3):47-50.

[6] 钟可,王文全,靳风云,等. 知母的HPLC-ELSD指纹图谱研究[J]. 中草药,2016,47(15):2747-2750.

[7] 吴莹,高慧,宋泽璧. 盐知母不同有效部位改善链豚

佐菌素诱导2型糖尿病大鼠糖代谢的研究[J]. 现代药物与临床,2016,31(3):280-283.

[8] 刘健,喻凯,王明奎,等. 知母中officialisinin I降糖机制及中枢神经保护研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(2):782-785.

[9] 芮雯,吴妍,吉星,等. 知母降糖有效部位的提取工艺优选及成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):4-8.

[10] 谭希,潘会君,吴伟达,等. 知母皂苷A III抑制人脑胶质瘤增殖生长的机制研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(6):1160-1166.

[11] 陆璐,高裙裙,钱云霞,等. 芒果苷对 α -葡萄糖苷酶抑制作用[C]//第十三届全国光化学学术讨论会论文集,西安,2013:147.

[12] 欧阳石,孙莉莎,徐江平. 知母总皂苷对大鼠脑皮质乙酰胆碱酯酶的抑制作用[J]. 中国药理学杂志,2006,41(19):1472-1474.

[13] 翟云鹏,朱霞,鲁茜,等. 知母总皂苷改善糖尿病大鼠海马中乙酰胆碱酯酶的活性[J]. 神经药理学报,2012,2(1):1-9.

[14] 魏树奇,崔同淑,杨继凡,等. 知母须根与主根主要成分及药理作用的初步实验比较[J]. 中药材科技,1982(2):15-17.

[15] 郭忠会,贾志鑫,陈奎奎,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS分析何首乌提取物体内外成分[J]. 中国中药杂志,2018,43(13):2796-2805.

[16] 陈思颖,夏涛,郑林,等. UPLC-Q-TOF-MS/MS分析荭草花有效组分在大鼠血清和尿液中的原型成分及其代谢产物[J]. 中国中药杂志,2019,44(10):2156-2162.

[17] 王彩虹. 中药多成分药代动力学的新方法和策略研究[D]. 北京:北京协和医学院,2017.

[18] 肖日平. 基于UPLC-MS/MS的附子中六种生物碱含量分析及药代动力学研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.

[19] 解伟伟. 基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术溪黄草化学成分分析及冬凌草乙素体内外代谢研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2018.

[20] 黄琪,肖曦晨,金传山,等. 知母须根化学成分研究[J]. 安徽中医药大学学报,2018,37(2):81-84.

[21] 陆彬,楼鸳鸯,陈楚楚,等. 熊果苷抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究[J]. 湖南科技大学学报:自然科学版,2015,30(1):116-120.

[22] 张凤兰,苏哲,吴景,等. β -熊果苷和氢醌安全性评价及化妆品法规管理现状[J]. 环境与健康杂志,2017,34(11):1017-1020.

[责任编辑 顾雪竹]