

不同部位和不同产地加工方法的知母质量评价研究

赵小勤, 黄晓婧, 罗 霄, 高 鹏, 许 莉*

成都市药品检验研究院 国家药监局中药材质量监测评价重点实验室, 四川 成都 610045

摘要: 目的 采用 UPLC-QQQ-MS/MS 法同时测定不同部位和不同产地加工方法知母 *Anemarrhenae Rhizoma* 中 9 个成分的含量, 并比较其差异。方法 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.01% 甲酸溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min, 进样量 2 μL, 柱温 30 °C; 质谱采用电喷雾离子源、负离子模式 (ESI⁻), 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)。结果 知母中新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 E₁、知母皂苷 I 9 个成分在各自范围内呈良好的线性关系, 加样回收率 97.23%~100.76%。知母的 5 个不同部位中知母须根中芒果苷、异芒果苷的含量最高; 知母肉中知母皂苷 E₁、知母皂苷 BII、知母皂苷 I 含量最高; 知母头与知母片、知母肉成分差异较小。比较知母的不同产地加工方法, 趁鲜切片新芒果苷和知母皂苷 BII 的含量较高, 润切片芒果苷和知母皂苷 AIII 的含量较高。结论 知母须根具有一定的开发利用价值, 知母肉具有其存在的合理性; 知母产地加工, 可不切去知母头, 以减少工序, 提高知母根茎的综合利用率; 趁鲜切片可加速干燥, 降低饮片霉变风险。

关键词: 知母; UPLC-QQQ-MS/MS; 新芒果苷; 芒果苷; 异芒果苷; 知母皂苷 AII; 知母皂苷 AIII; 知母皂苷 BII; 知母皂苷 BIII; 知母皂苷 E₁; 知母皂苷 I

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)22-6990-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.22.026

Quality evaluation of *Anemarrhenae Rhizoma* for different parts and different processing methods

ZHAO Xiao-qin, HUANG Xiao-jing, LUO Xiao, GAO Peng, XU Li

Chengdu Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610045, China

Abstract: Objective To determine the contents of 9 components in *Anemarrhenae Rhizoma* for different parts and different processing methods by UPLC-QQQ-MS/MS method, and compared the differences. **Methods** The sample were separated on an Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase composed of 0.01% formic acid solution (A) - acetonitrile (B) with gradient elution. the flow rate was 0.4 mL/min and the injection volume was 2 μL. The column temperature was 30 °C. Multiple-reaction monitoring (MRM) scanning was employed for quantification in negative ion mode under electrospray ion. **Results** The nine components (neomangiferin, mangiferin, isomangiferin, timosaponin E₁, timosaponin BII, timosaponin BIII, anemarrhenasaponin I, timosaponin AII and timosaponin AIII) all showed good linear relationship in their respective ranges, the average recoveries of 9 components were 97.23%—100.76%. Among the five different parts of *Anemarrhenae Rhizoma*, the contents of mangiferin and isomangiferin were the highest in the fibrous root of *Anemarrhenae Rhizoma*, the contents of timosaponin E₁, timosaponin BII and anemarrhenasaponin I in *Anemarrhenae Rhizoma* with outer cork removed (called zhimurou) were the highest, there was little difference in the components among the apex in rhizome of *Anemarrhenae Rhizoma* (called zhimutou), *Anemarrhenae Rhizoma* pieces and zhimurou. Compared the different habitat processing methods of *Anemarrhenae Rhizoma*, the content of neomangiferin and imosaponin BII were higher in fresh-cut slices, while the content of mangiferin and timosaponin AIII were higher in traditional-cut slices. **Conclusion** The fibrous root of *Anemarrhenae Rhizoma* is valuable in development and utilization, and the existence of zhimurou is rational. Zhimutou can be reserved in the habitat processing of *Anemarrhenae Rhizoma*

收稿日期: 2021-05-06

基金项目: 2017 年国家药品计划抽验项目 (中检监督函<2017>61 号, 中央补助地方经费项目)

作者简介: 赵小勤 (1987—), 女, 主管中药师, 硕士, 从事中药材鉴定、中药质量分析。Tel: (028)85362592 E-mail: 358235392@qq.com

*通信作者: 许 莉 (1987—), 女, 副主任中药师, 博士, 从事中药品质评价研究。Tel: (028)85362592 E-mail: xulied1987@sina.com

in order to reduce the working procedure and improve the comprehensive utilization rate of the rhizome of *Anemarrhenae Rhizoma*. Fresh-cut slices can accelerate drying and reduce the risk of mildew.

Key words: *Anemarrhenae Rhizoma*; UPLC-QQQ-MS/MS; neomangiferin; mangiferin; isomangiferin; timosaponin E₁; timosaponin BII; timosaponin BIII; anemarrhenasaponin I; timosaponin AII; timosaponin AIII

知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎^[1], 入药始载于《神农本草经》^[2]。知母苦寒质润、滋清兼备, 为重要的传统大宗药用品种之一, 古代经典方桂枝芍药知母汤、玉女煎、升陷汤、达原饮、二冬汤等均含知母^[3]。

目前药典收载的知母产地加工方法为: 采挖新鲜知母的根茎, 除去须根及泥沙, 晒干, 习称“毛知母”; 或除去外皮, 晒干, 习称“知母肉”^[4]; “毛知母”或“知母肉”药材经中药材饮片公司收购再润切炮制成饮片(以下简称“润切片”), 但因栽培知母根茎较肥大且富含黏液质, 完全晒干需数月, 此间知母内部极易腐败变质, 严重影响其安全性和有效性。经产地调研发现^[5], 随着产地加工机械化水平的不断提高, 近年来在栽培知母主产地安徽亳州十九里镇和河北安国兴起趁鲜切片的加工方法, 该方法可实现知母的快速干燥, 有效避免内部质量变坏。但趁鲜切片和传统润切片相比, 其内部有效成分有何变化, 目前尚未见报道。栽培知母须根较为发达, 其须根量是根茎采收量的 30%左右^[6], 在产地加工时作为非药用部位常被弃之不用, 造成了大量的资源浪费和环境污染; 经实地调研, 在知母趁鲜切片时, 药农常把知母根茎顶部较嫩部位(以下简称“知母头”)也切去不用; 在加工知母肉的时候, 外皮作为非药用部位被除去不用。但笔者在产地调研中发现, 栽培知母主产区不少药农将这些非药用部位收集起来售卖给收购商, 其流向和用途未知。这些知母的非药用部位与药用部位有效成分有何差异? 有无药用价值? 是否可以作为资源开发利用? 是值得思考的问题。现代研究认为, 知母中最主要的生物活性物质群为甾体皂苷和双苯吡酮类成分^[9-11], 其具有抗炎^[12-15]、抗血小板聚集^[16-18]、降血糖^[19-20]、调血脂^[21-22]、改善老年痴呆症患者的学习和记忆能力^[23-25]等药理活性。本实验基于 UPLC-QQQ-MS-MS 法, 同时测定知母不同部位和不同产地加工方法的甾体皂苷类(知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 E₁、知母皂苷 I)和双苯吡酮类(新芒果苷、芒果苷、异芒果苷)9 个成分的含量, 并结合多元变量统计分析软件对结果进行分析, 探寻知母不同部位和不同产地加工方法的物质成分差异, 以期合理加工和综合

利用知母资源提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1290 型超高效液相色谱仪、6470 三重四级杆质谱仪、MassHunter 工作站(Agilent 公司, 美国); 可变速高速旋转粉碎机(FRITSCH 公司, 德国); BAO-80A 精密鼓风干燥箱(施都凯仪器设备上海有限公司), ME240E 电子天平(Mettler Toledo 公司, 瑞士); XPE26 电子天平(Mettler Toledo 公司, 瑞士); SK250H 超声仪(上海科导超声仪器有限公司); Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪(Millipore 公司, 美国)。

1.2 材料

对照品芒果苷(批号 111607-201503, 质量分数 98.4%)、知母皂苷 BII(批号 111839-201505, 质量分数 94.4%)对照品购自中国食品药品检定研究院; 新芒果苷(批号 16042232, 质量分数 99.73%)、异芒果苷(批号 MUST16100905, 质量分数 99.81%)、知母皂苷 AII(批号 MUST16112415, 质量分数 99.59%)、知母皂苷 AIII(批号 MUST16020108, 质量分数 98.78%)、知母皂苷 BIII(批号 MUST17022210, 质量分数 96.93%)、知母皂苷 E₁(批号 MUST17031401, 质量分数 99.15%)、知母皂苷 I(批号 MUST16112412, 质量分数 99.43%)对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司。

乙腈为色谱纯, 德国 Merck 公司; 甲酸为质谱级, 美国 Fisher 公司; 水为实验室自制超纯水。知母药材样品均为实地采集, 经成都市食品药品检验研究院罗霄副主任中药师鉴定为百合科知母 *A. asphodeloides* Bge. 的根及根茎, 样品信息见表 1、2。

表 1 5 批不同部位的知母样品

Table 1 Five batches of sample information for research different parts of *Rhizoma Anemarrhenae*

编号	种植方式	采集地点
BW1	栽培	河北安国博野县南杨村
BW2	栽培	河北安国博野县南杨村
BW3	栽培	河北易县西陵镇丁家沟
BW4	栽培	河北易县西陵镇太和保村
BW5	栽培	安徽亳州十九里镇十九里村

表 2 7 批不同产地加工方法的知母样品

Table 2 Seven batches of sample information for research different processing methods of *Rhizoma Anemarrhenae*

编号	种植方式	采集地点
JG1	野生	河北赤城县龙文乡山坡地
JG2	野生	山西孟县中北村山坡地
JG3	野生	山西涞源县团圆村大丘峰
JG4	野生	山西寿阳县司家沟山坡地
JG5	栽培	山西万荣县皇甫乡黏土地
JG6	栽培	河北博野县南杨村沙地
JG7	栽培	河北西陵镇丁家沟村山坡地

2 方法与结果

2.1 样品的处理

2.1.1 不同部位知母样品处理 分别取表 1 中同一株知母, 剪下须根(知母须, 部位 1), 将剩余部位随机分为 3 份; 第 1 份切取根茎顶部 3 cm, 切片(知母头, 部位 2); 第 2 份整体切片(知母片, 部位 3); 第 3 份刮取知母皮(知母皮, 部位 4), 将去皮的知母根茎切片(知母肉, 部位 5)。所有样品 60 °C 烘干(水分含量低于 11%), 打粉, 过三号筛, 备用。

2.1.2 不同产地加工方法知母样品处理 取表 2 中每批知母, 随机分为 2 份, 一份趁鲜切片, 60 °C 烘干(以下简称“鲜切片”); 一份自然晒干(毛知母), 取一半毛知母洒水喷淋软化润切为知母片(毛知母润切片, 以下简称“润切片”), 60 °C 烘干。所有样品, 打粉, 过三号筛, 备用。

2.2 色谱和质谱条件^[26]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 30 °C; 流动相为 0.01% 甲酸溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱程序: 0~3 min, 93% A; 3~7.5 min, 93%~87% A; 7.5~8 min, 87%~78% A; 8~11 min, 78%~65% A; 11~12.5 min, 65%~55% A; 12.5~18 min, 55%~20% A; 18~20 min, 20%~5% A; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量为 2 μL。

2.2.2 质谱条件 质谱采用电喷雾离子源(ESI); 负离子模式; 多反应监测(MRM); 干燥气温度: 350 °C; 干燥气体积流量: 8 L/min; 雾化器压力: 25 psi (1 psi=6.895 kPa); 离子源喷雾电压: 3 000 V; EMV: 750。各成分质谱参数见表 3。混合对照品溶液、供试品溶液的总离子流图见图 1。

2.3 对照品储备液的制备

精密称取新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母

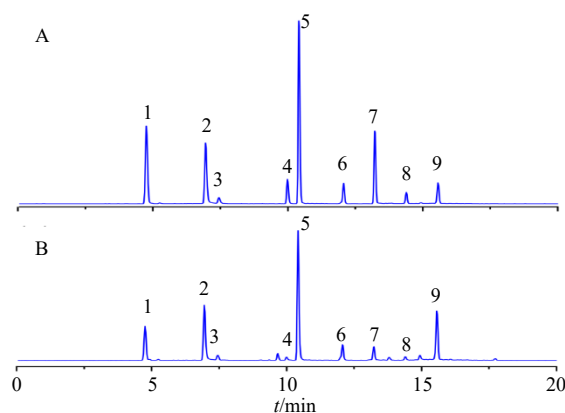
表 3 9 种成分的质谱参数

Table 3 UPLC-ESI-MS/MS data of 9 Components

成分	<i>t_R</i> /min	母离子/ <i>m/z</i>	裂解电压/V	碎片离子/ <i>m/z</i>	碰撞能/eV
新芒果苷	4.754	583.2	190	331.1 [*] ; 301.1	40; 42
芒果苷	6.948	421.3	110	301.3 [*] ; 331.5	21; 21
异芒果苷	7.444	421.2	110	301.1 [*] ; 331.2	24; 21
知母皂苷 E ₁	9.995	935.3	280	773.4 [*] ; 611.2	46; 51
知母皂苷 BII	10.417	919.2	270	757.4 [*] ; 595.3	54; 56
知母皂苷 BIII	12.073	901.2	270	739.5 [*] ; 577.3	46; 51
知母皂苷 I	13.231	757.5	210	595.4 [*] ; 161.0	31; 36
知母皂苷 AII	14.397	755.2	220	593.4 [*] ; 161.0	38; 40
知母皂苷 AIII	15.576	739.5	220	577.5 [*] ; 161.9	38; 40

*为定量碎片离子

* quantitative fragment ion



1-新芒果苷 2-芒果苷 3-异芒果苷 4-知母皂苷 E₁ 5-知母皂苷 BII 6-知母皂苷 BIII 7-知母皂苷 I 8-知母皂苷 AII 9-知母皂苷 AIII
1-neomangiferin 2-mangiferin 3-isomangiferin 4-timosaponin E₁ 5-timosaponin BII 6-timosaponin BIII 7-anemarrhenasaponin I 8-timosaponin AII 9-timosaponin AIII

图 1 混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的总离子流图

Fig. 1 Total-ion chromatography of mixed reference substances solution (A) and sample solution (B)

皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 E₁、知母皂苷 I 对照品适量, 分别加 50% 甲醇配制成 2.054、1.568、1.591、1.528、1.931、3.247、1.534、3.157、3.874 mg/mL 的对照品储备液, 在 4 °C 下避光保存。

2.4 供试品溶液的制备

取本品粉末约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 50 mL, 称定质量, 超声处理 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 0.1 mL 置

50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.5 线性关系、最低检出限 (LOD) 和最低定量限 (LOQ)

分别精密吸取新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 EI、知母皂苷 I 对照品储备液

适量, 置同一量瓶中, 加 50% 甲醇逐级稀释成系列对照品溶液, 精密吸取 2 μ L, 按“2.2”项色谱和质谱条件进行测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 相应峰面积为纵坐标 (Y) 作线性回归, 绘制标准曲线。逐步稀释对照品溶液, 以信噪比 (S/N) 3 为 LOD, $S/N10$ 为 LOQ, 结果见表 4。

表 4 9 种成分线性回归方程、相关系数、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 4 Regression equations, liner ranges, correlation coefficients, LOD, and LOQ of nine compounds

成分	回归方程	相关系数	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
新芒果苷	$Y=391.05 X-189.31$	0.999 9	26.22~6 555.06	0.46	1.53
芒果苷	$Y=276.17 X-4298.8$	0.999 8	9.87~2 468.66	0.28	0.93
异芒果苷	$Y=2 259.4 X-3 216.6$	0.999 5	0.81~203.26	0.11	0.37
知母皂苷 EI	$Y=169.24 X-320.65$	0.999 6	1.60~400.66	0.38	1.27
知母皂苷 BII	$Y=156.98 X+12902$	0.999 6	58.85~14 712.80	2.06	6.87
知母皂苷 BIII	$Y=262.1 X-677.43$	0.999 8	1.90~475.80	0.41	1.37
知母皂苷 I	$Y=528.03 X-945.44$	0.999 8	1.97~493.05	0.45	1.50
知母皂苷 AII	$Y=329.31 X+198.11$	0.999 7	0.39~97.40	0.08	0.27
知母皂苷 AIII	$Y=280 X+2652.2$	0.999 7	2.44~610.38	0.64	2.13

2.6 精密度试验

取同一对照品溶液连续进样 6 次, 记录峰面积。新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 EI、知母皂苷 I 峰面积的 RSD 分别为 0.68%、0.98%、1.21%、1.25%、0.45%、0.96%、1.51%、2.19%、1.83%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一样品 (BW3, 知母片) 6 份, 按“2.4”项下方法平行制备供试品溶液, 进样。测得新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 EI、知母皂苷 I 的质量分数平均值分别为 37.97、8.47、1.43、0.31、1.65、62.35、2.83、2.85、3.41 mg/g, RSD 值分别为 0.65%、0.78%、1.23%、1.37%、1.05%、0.84%、1.24%、0.95%、0.67%, 表明方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于 0、4、8、16、24 h, 按“2.2”项色谱和质谱条件进行分析, 测得新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 EI、知母皂苷 I 的峰面积, RSD 值分别为 0.25%、0.38%、1.25%、0.87%、1.32%、0.58%、1.01%、1.35%、1.24%,

表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

精密称取已测定 9 种成分含量的同一知母样品 9 份, 每份取约 0.1 g。取新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 EI、知母皂苷 I 对照品适量配制适当质量浓度的对照品溶液, 以样品中各成分量的 50%、100%、150% 加入样品粉末中, 平行制备 3 份, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样分析。结果新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 EI、知母皂苷 I 的平均回收率分别为 99.87%、98.15%、97.23%、98.65%、100.76%、99.24%、98.43%、98.37%、97.53%, RSD 值分别为 1.67%、1.78%、2.33%、1.49%、1.85%、1.75%、2.14%、2.61%、2.57%。

2.10 样品测定

分别精密称取各批次知母样品粉末, 每批约 0.2 g, 依照“2.4”项所述方法制备供试品溶液, 每批平行制定 3 份, 精密吸取供试品溶液 2 μ L, 按“2.2”项测定条件进行分析, 以标准曲线法分别计算各样品中新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 AII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 EI、知母皂苷 I 的含量, 结果见表 5、6。

表 5 5 批不同部位知母的样品含量测定结果 ($n=3$)Table 5 Determination results of five batches of *Rhizoma Anemarrhenae* for research different parts ($n=3$)

序号	部位	样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
			新芒果苷	芒果苷	异芒果苷	知母皂苷 E _I	知母皂苷 BII	知母皂苷 BIII	知母皂苷 I	知母皂苷 AII	知母皂苷 AIII
1	知母头	BW1	29.54	3.90	0.54	3.00	74.50	1.06	4.31	0.22	3.11
2		BW2	22.27	3.68	0.51	3.30	67.60	1.01	3.35	0.19	1.55
3		BW3	19.32	6.56	1.09	2.38	65.31	0.94	2.54	0.15	1.06
4		BW4	35.29	10.82	1.40	2.97	70.10	0.77	5.14	0.42	3.52
5		BW5	26.95	6.68	0.74	2.93	71.30	0.73	3.04	未检出	1.59
6	知母须	BW1	21.31	25.94	6.86	1.15	3.60	1.04	0.32	0.11	0.46
7		BW2	7.40	9.34	3.14	1.04	1.20	0.64	0.43	0.50	2.54
8		BW3	6.82	12.24	3.35	0.60	未检出	0.64	0.28	0.45	2.96
9		BW4	15.34	38.48	10.37	1.02	未检出	0.61	0.49	0.05	0.92
10		BW5	15.37	19.65	5.15	0.76	未检出	1.08	0.41	0.37	2.08
11	知母片	BW1	24.03	3.42	0.75	3.02	70.70	1.43	4.12	0.27	3.74
12		BW2	21.79	3.74	0.47	2.46	68.30	1.95	3.46	0.28	5.45
13		BW3	19.85	2.59	0.59	2.84	62.20	2.80	3.42	0.31	1.64
14		BW4	33.66	4.94	0.96	3.57	65.60	1.04	4.45	0.43	2.58
15		BW5	23.82	5.01	1.43	3.02	73.40	0.75	3.13	未检出	1.64
16	知母肉	BW1	25.28	3.03	0.27	3.84	80.30	1.07	5.07	0.25	4.71
17		BW2	23.30	3.26	0.29	3.50	91.20	1.97	5.14	0.54	5.09
18		BW3	20.91	1.86	0.16	3.71	102.60	4.12	5.06	0.03	1.11
19		BW4	35.57	5.16	0.51	3.21	76.90	0.92	5.30	0.07	1.05
20		BW5	28.43	2.61	0.29	4.57	81.60	1.52	4.95	0.08	1.48
21	知母皮	BW1	16.09	7.81	1.12	2.49	52.50	1.03	2.76	0.27	2.85
22		BW2	20.00	4.39	0.63	2.64	51.30	1.65	2.77	0.54	2.97
23		BW3	16.67	3.44	0.88	1.92	33.10	2.06	1.51	0.47	1.26
24		BW4	24.48	8.87	1.18	2.03	35.00	1.03	2.69	0.27	2.27
25		BW5	18.93	6.19	2.00	1.54	14.40	0.99	0.96	0.34	2.16

表 6 7 批不同产地加工方法的样品含量测定结果 ($n=3$)Table 6 Determination results of seven batches of *Rhizoma Anemarrhenae* for research different processing methods ($n=3$)

序号	加工方式	样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
			新芒果苷	芒果苷	异芒果苷	知母皂苷 E _I	知母皂苷 BII	知母皂苷 BIII	知母皂苷 I	知母皂苷 AII	知母皂苷 AIII
1	鲜切片	JG1	34.30	4.55	0.86	5.06	75.28	1.11	8.37	0.34	2.90
2		JG2	35.12	4.99	0.97	2.46	62.85	1.13	4.11	0.15	1.91
3		JG3	42.10	4.54	0.89	2.71	72.13	1.13	6.87	0.19	2.80
4		JG4	26.40	4.52	0.77	3.80	101.97	2.26	11.20	0.06	3.26
5		JG5	21.72	5.07	0.90	2.25	56.90	1.28	5.59	未检出	2.75
6		JG6	26.11	4.76	0.86	2.87	85.07	1.29	5.01	0.39	3.77
7		JG7	37.43	4.55	0.49	5.93	119.16	5.64	0.71	4.98	3.32
8	毛知母	JG1	14.04	18.95	1.77	3.23	74.93	2.47	6.02	0.81	8.12
9		JG2	10.59	21.66	4.02	1.22	47.07	3.09	4.57	1.00	20.75
10		JG3	12.09	14.98	2.96	2.97	59.59	3.55	7.77	0.85	12.92
11		JG4	3.89	15.34	2.78	3.00	80.10	5.32	11.00	0.26	19.29
12		JG5	2.67	11.33	2.05	2.38	48.83	4.66	5.83	0.26	11.62
13		JG6	8.09	12.71	2.41	2.28	53.17	5.85	4.44	2.40	24.84
14		JG7	4.15	22.03	4.07	3.29	69.78	11.39	4.39	1.25	14.30
15	润切片	JG1	8.35	22.47	2.05	4.20	54.52	2.20	6.13	1.98	13.94
16		JG2	4.51	23.54	2.70	1.64	40.26	2.18	4.37	2.76	30.68
17		JG3	3.99	20.44	3.50	2.67	59.41	3.75	9.17	1.94	24.18
18		JG4	1.81	17.15	3.01	3.11	75.73	5.36	11.20	0.45	30.48
19		JG5	0.95	16.30	3.07	2.61	54.98	4.84	7.07	0.30	10.08
20		JG6	4.27	14.81	2.69	1.19	39.74	2.49	4.35	2.64	32.99
21		JG7	2.73	24.11	4.36	2.46	62.37	9.57	4.87	1.14	16.12

2.11 样品测定结果统计分析

本研究以知母中 9 个化学成分的含量为变量, 采用多元变量统计分析软件 SIMCA 14.1 对 2.9 项下结果采用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 建立分析模型 (图 2、3)。从图 2 可看出, 不同部位知母样品知母头、知母肉、知母片聚为一类, 知母须和知母皮各聚为一类, 表明知母须与知母皮较接近, 而与其他部位差异较大。为进一步显示知母不同部位样品中化学成分的含量特征, 绘制了不同部位 9 种化学成分的平均含量雷达图, 见图 4。由于各成分含量存在一定差异, 将各成分含量乘以相应系数进行修正, 具体系数: 新芒果苷为 3、芒果苷为 8、异芒果苷为 30、知母皂苷 E₁ 为 20、知母皂苷 BII 为 1、知母皂苷 BIII 为 40、知母皂苷 I 为 15、知母皂苷 AII 为 265、知母皂苷 AIII 为 20。

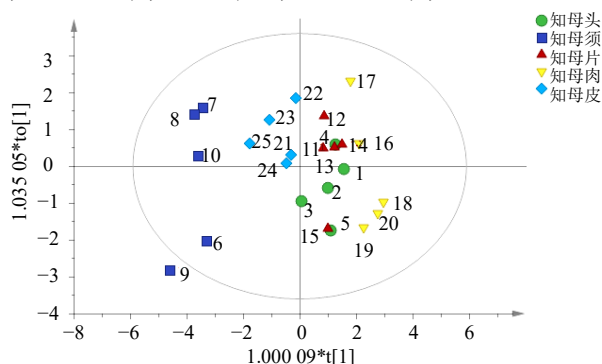


图 2 不同部位 OPLS-DA 得分散点图

Fig. 2 OPLS-DA score scatter plot of different parts

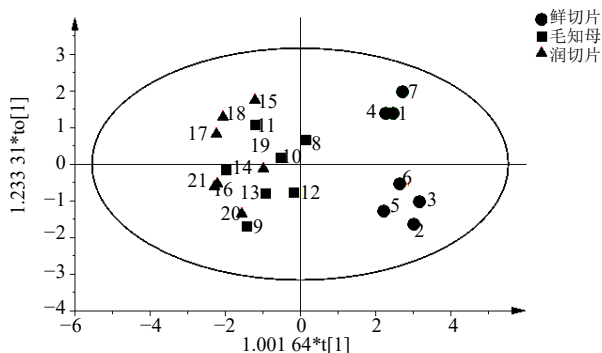


图 3 不同产地加工方法 OPLS-DA 得分散点

Fig. 3 OPLS-DA score scatter plot of different habitat processing methods

由图 4 可见, 知母须中新芒果苷、知母皂苷 AIII、知母皂苷 E₁、知母皂苷 BIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 I 6 个成分含量在 5 个部位中最低, 其中 3 批未检出具有重要药理活性的主要化学成分知母皂苷 BII; 但其芒果苷、异芒果苷含量在 5 个部位中

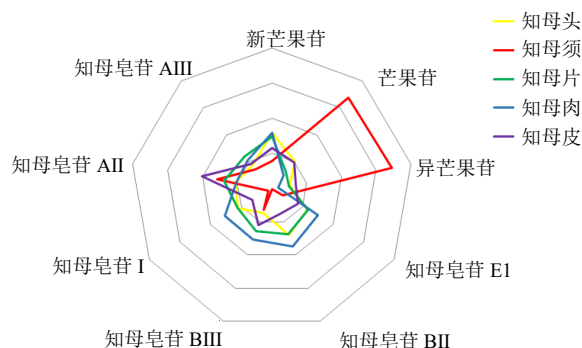


图 4 不同部位各成分平均含量雷达图

Fig. 4 Radar chart of different parts

最高。知母皮中新芒果苷、知母皂苷 AIII、知母皂苷 E₁、知母皂苷 BII、知母皂苷 I 的含量在 5 个部位中仅比知母须高, 比知母头、知母肉、知母片都低。而去皮去须的知母肉中知母皂苷 E₁、知母皂苷 BII、知母皂苷 I 含量在 5 个部位中最高。由图 3 可见, 不同产地加工方法的知母样品鲜切片聚为一类, 毛知母和润切片聚为一类。为进一步显示知母不同产地加工样品中化学成分的含量特征, 绘制了不同产地加工方法知母样品中 9 种化学成分的平均含量雷达图, 见图 5。由于各成分含量存在一定差异, 将各成分含量乘以相应系数进行修正, 具体系数: 新芒果苷为 8, 芒果苷为 4, 异芒果苷为 20, 知母皂苷 E₁ 为 25, 知母皂苷 BII 为 1, 知母皂苷 BIII 为 12, 知母皂苷 I 为 10, 知母皂苷 AII 为 65, 知母皂苷 AIII 为 4。由图 5 可知, 鲜切片中新芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 E₁ 三者含量较毛知母、润切片高, 而其余成分均较毛知母、润切片中低。

3 讨论

知母须中新芒果苷、知母皂苷 AIII、知母皂苷 E₁、知母皂苷 BIII、知母皂苷 BII、知母皂苷 I 等 6 个成分含量在 5 个部位中最低, 其中 3 批未检出具

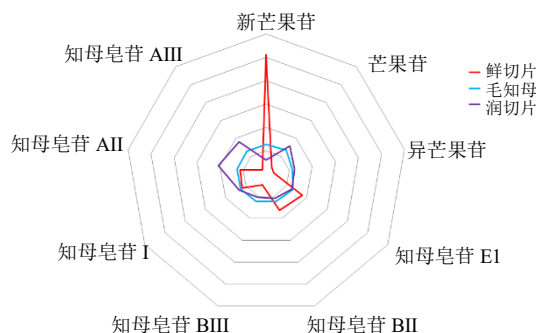


图 5 不同产地加工方式各成分平均含量雷达图

Fig. 5 Radar chart of different habitat processing methods

有抗氧化^[28-29]、抗血栓^[16]、抗抑郁^[30]、抗炎^[31-32]等重要药理活性的主要化学成分知母皂苷 BII, 可见知母须在产地加工中作为非药用部位弃去具有一定的合理性; 但其芒果苷、异芒果苷含量在 5 个部位中最高, 芒果苷也为知母具有抗炎^[31]、降血糖^[33]重要药理活性的主要化学成分。文献报道, 李丽丽等^[7]认为知母须根对糖氧剥夺损伤的 PC12 细胞具有保护作用, 廖振东等^[8]从知母须根中发现一个新的二苯甲酮类化合物并认为该化合物具有对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的神经保护活性。因此, 知母须具有一定的开发利用价值, 可考虑用于芒果苷提取、开发成方制剂以及保健品等。知母皮化学成分含量与知母须较接近, 而与知母头、知母肉、知母片差异较大; 其所含新芒果苷、知母皂苷 BII 等多个成分含量在 5 个部位中仅比知母须高, 比知母头、知母肉、知母片都低。而去皮去须的知母肉中知母皂苷 E_I、知母皂苷 BII、知母皂苷 I 含量在五个部位中最高, 其中知母皂苷 BII 在 9 个成分中含量最高且具有重要的药理活性成分, 因此, 知母肉的加工方法具有其存在的合理性。知母皮为加工知母肉的废弃物, 因加工知母肉需耗费大量人力, 产生的知母皮数量极少, 不具备开发利用的规模。因知母头与知母片差异较小, 笔者认为在加工过程可不必切去知母头, 以减少工序, 提高知母根茎的综合利用率。

对不同产地加工方法的知母样品进行分析发现, 新芒果苷的含量: 鲜切片>毛知母>润切片; 芒果苷的含量: 润切片>毛知母>鲜切片。笔者前期对 188 批知母样品中新芒果苷、芒果苷含量与水分进行相关性分析, 结果表明高含水率的情况下, 新芒果苷容易转化为芒果苷^[27]。笔者认为, 鲜切片因迅速脱水干燥, 新芒果苷含量高, 芒果苷含量低; 新鲜知母晒干变为毛知母过程脱水缓慢, 故部分新芒果苷转化为芒果苷; 毛知母洒水喷淋软化润切为饮片过程中含水率提高, 部分新芒果苷转化为芒果苷。经笔者前期文献调研, 芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 为知母中重要的药理活性成分^[26], 这三者也是知母中含量较高的化学成分。知母皂苷 BII 的含量: 鲜切片>毛知母≈润切片, 知母皂苷 AIII 的含量: 润切片>毛知母>鲜切片。鲜切片新芒果苷和知母皂苷 BII 的含量高, 润切片芒果苷和知母皂苷 AIII 的含量高, 其他 5 个成分变化无规律, 因此, 仅从 9 种化学成分的含量多少的角度无法评价

2 种产地加工方法的优劣。但鲜切片干燥迅速, 不容易发霉变质, 饮片质量和安全性更有保障, 笔者建议采用趁鲜切片的产地加工方法, 如用于治疗糖尿病等需芒果苷含量较高的饮片, 可通过改变生产工艺如增加知母饮片的浸泡时间等尝试实现, 如何优化知母产地加工方法和提取工艺, 有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 212-213.
- [2] 袁松. 彩色图解《神农本草经》[M]. 北京: 北京联合出版公司, 2015: 220.
- [3] 首批古代经典名方目录发布 [J]. 江苏中医药, 2018, 50(7): 1-10.
- [4] 金世元. 金世元中药材传统鉴别经验 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 23.
- [5] 赵小勤, 黄晓婧, 许莉, 等. 知母的本草考证和产地调研 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(4): 77-79.
- [6] 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.
- [7] 李丽丽, 黄琪, 彭代银, 等. 知母须根总皂苷提取工艺的优化及其对糖氧剥夺损伤的 PC12 细胞保护作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3087-3094.
- [8] 廖振东, 许凤清, 吴德玲, 等. 知母须根中 1 个新的二苯甲酮类化合物 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1392-1396.
- [9] 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.
- [10] 黄琪, 贾鹏晖, 吴德玲, 等. 知母产地加工与饮片炮制一体化工艺研究 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4760-4766.
- [11] 王颖异, 郭宝林, 张立军. 知母化学成分的药理研究进展 [J]. 科技导报, 2010, 28(12): 110-115.
- [12] Jin Lee E, Chung H J, Pyee Y, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression by niasol and broussonin A, two phenolic compounds from *Anemarrhena asphodeloides*, through NF-κB transcriptional regulation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chem Biodivers*, 2014, 11(5): 749-759.
- [13] Kim J Y, Shin J S, Ryu J H, et al. Anti-inflammatory effect of anemarsaponin B isolated from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* in LPS-induced RAW 264.7 macrophages is mediated by negative regulation of the nuclear factor-κB and p38 pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(7): 1610-1617.
- [14] 雷霞, 董文婷, 笔雪艳, 等. 知母各化学拆分组分的抗炎及免疫调节活性 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 1904-1907.

- [15] Shin J S, Noh Y S, Kim D H, *et al.* Mangiferin isolated from the Rhizome of *Anemarrhena Asphodeloides* Inhibits the LPS-Induced Nitric oxide and prostaglandin E2 Via the NF-KB inactivation in inflammatory macrophages [J]. *Nat Prod Sci*, 2008, 14(3): 206-231.
- [16] Lu W Q, Qiu Y, Li T J, *et al.* Antiplatelet and antithrombotic activities of timosaponin B-II, an extract of *Anemarrhena asphodeloides* [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, 38(7): 430-434.
- [17] 丛悦, 柳晓兰, 余祖胤, 等. 知母皂苷抑制血小板聚集的活性成分筛选及构效关系分析 [J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(11): 1370-1373.
- [18] Kang L P, Zhang J, Cong Y, *et al.* Steroidal glycosides from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* and their antiplatelet aggregation activity [J]. *Planta Med*, 2012, 78(6): 611-616.
- [19] 黄芳, 徐丽华, 郭建明, 等. 知母提取物的降血糖作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2005, 25(6): 332-335.
- [20] 朱建新, 冯亭亭, 张景, 等. 知母中 4 种成分及对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 中成药, 2018, 40(5): 1120-1123.
- [21] 付宝才, 林娟, 杨林海. 知母总皂苷对高脂血症大鼠肝脏低密度脂蛋白受体活性的影响 [J]. 医学综述, 2009, 15(14): 2226-2227.
- [22] 韩兵, 李春梅, 李敏, 等. 知母皂苷的降脂及抗动脉粥样硬化作用 [J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(11): 68-70.
- [23] Zhao X, Liu C M, Qi Y, *et al.* Timosaponin B-II ameliorates scopolamine-induced cognition deficits by attenuating acetylcholinesterase activity and brain oxidative damage in mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(6): 1455-1461.
- [24] 胡雅儿, 王子玫, 张永芳, 等. 老年痴呆症药物治疗的一条新途径: 知母皂苷元促进脑 M 受体生成改善记忆功能 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(2): 127-133.
- [25] 翁丽丽, 陈丽, 宿莹, 等. 知母化学成分和药理作用 [J]. 吉林中医药, 2018, 38(1): 90-92.
- [26] 赵小勤, 许莉, 文永盛, 等. UPLC-QQQ-MS/MS 法同时测定不同产地知母中 10 种成分 [J]. 中成药, 2020, 42(4): 980-985.
- [27] 赵小勤, 黄晓婧, 许莉, 等. 知母饮片的质量分析与研究 [J]. 中国药事, 2018, 32(10): 1349-1353.
- [28] Guo C R, Li L, Yang X L, *et al.* Protective effects of timosaponin B-II on high glucose-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37(1): 37-44.
- [29] 邓云, 马百平, 从玉文, 等. 知母皂苷 BII 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的原代大鼠神经细胞损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 244-247.
- [30] 路明珠, 张治强, 伊佳, 等. 知母皂苷 B-II 抗抑郁作用及其机制研究 [J]. 药学实践杂志, 2010, 28(4): 283-287.
- [31] Lu W Q, Qiu Y, Li T J, *et al.* Timosaponin B-II inhibits pro-inflammatory cytokine induction by lipopolysaccharide in BV₂ cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(9): 1301-1308.
- [32] Sun Y G, Du Y F, Yang K, *et al.* A comparative study on the pharmacokinetics of a traditional Chinese herbal preparation with the single herb extracts in rats by LC-MS/MS method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 81/82: 34-43.
- [33] 黄芳, 徐丽华, 郭建明, 等. 知母提取物的降血糖作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2005, 25(6): 332-335.

[责任编辑 时圣明]