

知母及其不同炮制品的指纹图谱建立与抗氧化活性的谱-效关系研究^Δ

贾毓欣^{1*}, 刘海帆^{1,2}, 司明东¹, 李新蕊¹, 宋军娜¹, 郑玉光¹, 马东来^{1,3#}(1.河北中医学院/河北省中药炮制技术创新中心, 石家庄 050091; 2.中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 3.河北省高校中药组方制剂应用技术研发中心, 石家庄 050200)

中图分类号 R282;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)22-2706-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.22.04

摘要 目的:建立知母及其不同炮制品乙醇提取物和丙酮提取物的指纹图谱,并考察其与抗氧化活性的谱-效关系。方法:分别采用高效液相色谱法(HPLC)和高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD),色谱条件分别为色谱柱 Thermo BDS Hypersil C₁₈、流动相乙腈-0.2%醋酸水溶液、流速1.0 mL/min、柱温30 ℃、检测波长258 nm、进样量10 μL以及色谱柱 XDB-C₁₈、流动相乙腈-0.2%醋酸水溶液(梯度洗脱)、流速0.9 mL/min、柱温30 ℃、雾化器温度40 ℃、氮气流速1.6 mL/min、进样量10 μL。分别以芒果苷、知母皂苷B II为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》绘制20批知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物的指纹图谱并进行相似度评价,标定共有峰。以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率为指标,考察20批知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物的抗氧化活性。以DPPH自由基清除率为因变量、共有峰峰面积为自变量,采用偏最小二乘回归法分别分析知母乙醇提取物和丙酮提取物与抗氧化活性的谱-效关系。结果:从20批知母炮制品乙醇提取物指纹图谱中标定出共有峰8个(M1~M8),指出芒果苷(色谱峰M7);相似度为0.389~1.000;从丙酮提取物指纹图谱中标定出共有峰7个(S1~S7),指出知母皂苷B II(色谱峰S5);相似度为0.044~0.999。20批知母及其炮制品乙醇提取物的DPPH自由基清除率为21.23%~81.39%,生知母显著低于盐知母、酒知母($P<0.001$);丙酮提取物的DPPH自由基清除率为49.73%~83.78%,生知母显著高于盐知母、酒知母、炒知母($P<0.001$)。知母乙醇提取物图谱中峰M2~M7的标准化回归系数均大于0,与抗氧化活性成正相关;仅峰M7的变量重要性投影(VIP)值大于1。知母丙酮提取物图谱中峰S4~S7的标准化回归系数均大于0,与抗氧化活性成正相关;VIP值大小排序依次为峰S5>S6>S4,且VIP值均大于1。结论:成功建立知母乙醇提取物和丙酮提取物的指纹图谱。芒果苷(峰M7)可能是知母乙醇提取物抗氧化作用的主要药效物质;知母皂苷B II(峰S5)、峰S6、峰S4可能是知母丙酮提取物抗氧化作用的主要药效物质。

关键词 知母;乙醇提取物;丙酮提取物;抗氧化活性;谱-效关系;偏最小二乘回归法

Establishment of Fingerprint and Spectrum-effect Relationship Study on Anti-oxidation Activity of *Anemarrhena asphodeloides* and Its Different Processed Products

JIA Yuxin¹, LIU Haifan^{1,2}, SI Mingdong¹, LI Xinrui¹, SONG Junna¹, ZHENG Yuguang¹, MA Donglai^{1,3}(1.Hebei University of TCM/Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050091, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 3. Hebei Higher Education Institute Applied Technology Research Center on TCM Formula Preparation, Shijiazhuang 050200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of ethanol extract and acetone extract from *Anemarrhena asphodeloides* and its different processed products, and to investigate the spectrum-effect relationship between the fingerprint and the antioxidant activity. METHODS: HPLC method and HPLC-ELSD method were adopted. The determination was performed on Thermo BDS Hypersil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% acetic acid at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 258 nm. The sample size was 10 μL. The determination was performed on XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.9 mL/min. The column temperature was 30 ℃. The temperature of atomizer was 40 ℃ and the flow rate of N₂ was 1.6 mL/min. The sample size was 10 μL. Using mangiferin and timosaponin B II as reference, *Fingerprint Similarity Evaluation System of TCM Chromatogram* (2004A edition) was adopted to draw the fingerprint of ethanol extract and acetone extract from 20 batches of *A. asphodeloides* and its different

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81803762);河北省重点研发计划项目(No.19276414D);河北省高校百名优秀创新人才支持计划(No.SLRC2019044);河北省现代农业产业技术体系创新团队项目(No.HBCT2018060205);河北中医学院大学生创新创业训练计划立项项目(No.201814432009)

* 硕士研究生。研究方向:临床中药学。E-mail:499472038@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药质量分析与控制。电话:0311-89926350。E-mail:mdl_hebei@aliyun.com

processed products to confirm common peaks. Using scavenging rate of 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) radical as index, antioxidant activities of ethanol extract and acetone extract from 20 batches of *A. asphodeloides* and its processed products were investigated. Using scavenging rate of DPPH radical as dependent variable, common peak area as independent variable, PLSR was used to analyze the spectrum-effect relationship of ethanol extract and acetone extract from *A. asphodeloides* with antioxidant activity. RESULTS: Eight peaks (M1-M8) were identified in the fingerprints of ethanol extracts from 20 batches of processed *A. asphodeloides*. Mangiferin (chromatogram peak M7) was identified with similarity of 0.389-1.000; seven common peaks (S1-S7) and timosaponin B II (peak S5) were identified in the fingerprint of acetone extract, and the similarity was 0.044-0.999. DPPH radical scavenging rate of ethanol extract from 20 batches of *A. asphodeloides* and its processed products was 21.23% - 81.39%, and *A. asphodeloides* was significantly lower than salt-processed *A. asphodeloides* with salt wine-processed *A. asphodeloides* ($P < 0.001$); and that of acetone extract was 49.73% - 83.78%, and *A. asphodeloides* was significantly higher than stir-baked *A. asphodeloides* with salt, wine or fire ($P < 0.001$). The standardized regression coefficients of peaks M2-M7 in the spectrum of ethanol extract from *A. asphodeloides* were all greater than 0, which was positively correlated with antioxidant activity. Only the variable importance projection (VIP) value of peak M7 was greater than 1, which had an important contribution. The standardized regression coefficients of peaks S4-S7 in the acetone extract spectrum of *A. asphodeloides* were greater than 0, and were positively correlated with antioxidant activity. The order of VIP values was peak S5 > S6 > S4, and the VIP values were all greater than 1. CONCLUSIONS: The fingerprint of the different processed products *A. asphodeloides* and its antioxidant activity spectral effect relationship were successfully established; mangiferin (peak M7) may be the main antioxidant substance of ethanol extract from *A. asphodeloides*. Timosaponin B II (peak S5), peak S6 and peak S4 may be the main antioxidant substance in acetone extract from *A. asphodeloides*.

KEYWORDS *Anemarrhena asphodeloides*; Ethanol extract; Acetone extract; Antioxidant activity; Spectrum-effect relationship; Partial least squares regression

知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎, 具有清热泻火、生津润燥之功效; 现代药理研究表明, 知母具有抗炎、抗血小板聚集、抗肿瘤等作用^[1]。知母始载于《神农本草经》^[2], 药用历史悠久, 主产于我国河北、山西、山东、陕西等地, 其主要化学成分有黄酮类、甾体皂苷类、木质素类和有机酸类等^[3-5]。临床常用的炮制品有盐知母、酒知母和炒知母等, 不同炮制品间化学成分含量或药效活性各有差异, 这主要与不同炮制方法所致化学成分变化各不相同有关^[6-7]。但目前有关知母炮制品的研究多集中在化学成分分析或药理活性等单一研究上^[8-9], 鲜有将化学成分与药理活性相结合以探讨知母及其炮制品药效物质基础的谱-效关系的研究。

中药作为一个复杂整体, 仅通过指纹图谱或单一药效活性评价其质量优劣是不全面的^[10-11]。中药谱效关系是将中药指纹图谱中的多组分变化与其药效活性相关联, 对中药进行综合评价, 以避免单一指标评价的片面性。因此, 本文基于前期研究成果^[12], 以知母乙醇提取物和丙酮提取物为对象, 建立知母不同厂家、不同炮制品的指纹图谱; 在抗氧化活性研究基础上, 利用偏小二乘回归法(PLSR)分析指纹图谱共有峰与抗氧化活性的谱-效关系, 以期为进一步阐明知母抗氧化活性的药效物质基础提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent-1260 型高效液相色谱仪, 含紫外检测器和蒸发光散射检测器(ELSD)(美国 Agilent 公司);

UV-2600 型紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司); ME204E 型电子天平(德国 Sartorius 公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q 型超纯水仪(美国 Milipore 公司)。

1.2 药品与试剂

芒果苷对照品(批号: P04M9F60454, 纯度: $\geq 98.0\%$)、知母皂苷 B II 对照品(批号: R14D9F77658, 纯度: $\geq 98.0\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, 美国 Sigma 公司, 批号: STBD2362V, 纯度: $> 98.0\%$); 乙腈和醋酸等均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为自制超纯水。

炒知母饮片、酒知母饮片、盐知母饮片和生知母饮片均经河北中医学院中药鉴定与炮制教研室郑玉光教授鉴定为百合科植物知母 *A. asphodeloides* Bge. 的干燥根茎, 饮片标本保存于河北中医学院药材标本室。样品来源信息见表 1。

表 1 样品来源信息

Tab 1 Source information of samples

编号	样品	来源	编号	样品	来源
Z1	生知母饮片	仁医堂中医馆	Z11	炒知母饮片	同仁堂药店
Z2	盐知母饮片	仁医堂中医馆	Z12	酒知母饮片	同仁堂药店
Z3	酒知母饮片	仁医堂中医馆	Z13	生知母饮片	九九九中药材药店
Z4	炒知母饮片	仁医堂中医馆	Z14	盐知母饮片	九九九中药材药店
Z5	生知母饮片	懋生宝中药材店铺	Z15	炒知母饮片	九九九中药材药店
Z6	盐知母饮片	懋生宝中药材店铺	Z16	酒知母饮片	九九九中药材药店
Z7	酒知母饮片	懋生宝中药材店铺	Z17	生知母饮片	宸瑜药业有限公司
Z8	炒知母饮片	懋生宝中药材店铺	Z18	盐知母饮片	宸瑜药业有限公司
Z9	生知母饮片	同仁堂药店	Z19	炒知母饮片	宸瑜药业有限公司
Z10	盐知母饮片	同仁堂药店	Z20	酒知母饮片	宸瑜药业有限公司

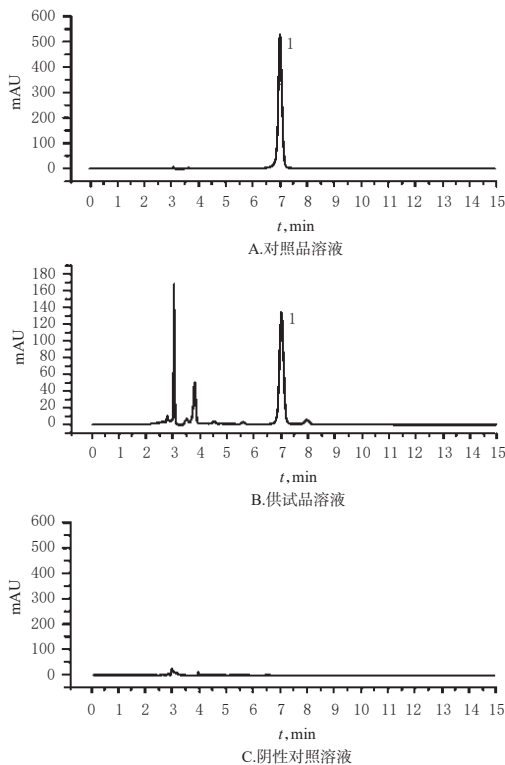
2 方法与结果

2.1 知母乙醇提取物 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 知母乙醇提取物供试品溶液的制备 参考2020年版《中国药典》(一部)方法^[1],精密称取知母或其炮制品饮片粉末(过60目筛,下同)0.1 g,置于具塞锥形瓶中,加入70%乙醇50 mL,称定质量,超声(功率:400 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷至室温,再次称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,混匀,过0.45 μm滤膜,即得知母乙醇提取物供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 取芒果苷对照品适量,精密称定,用70%乙醇定容于50 mL量瓶中,制成质量浓度为50.2 μg/mL的对照品溶液。

2.1.3 色谱条件与系统适用性考察 色谱柱:Thermo BDS Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%冰醋酸水溶液(15:85, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;检测波长:258 nm;进样量:10 μL。取芒果苷对照品溶液、知母乙醇提取物供试品溶液(编号:Z4)和阴性对照溶液(70%乙醇),按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,芒果苷色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.50,拖尾因子介于0.95~1.05之间;按芒果苷峰计理论板数均大于6 000,且阴性对照无干扰,详见图1。



注:1. 芒果苷

Note: 1. mangiferin

图1 HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.4 精密度试验 取同一批次的知母乙醇提取物供试品溶液(编号:Z4)适量,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。结果,以芒果苷峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.23%和1.03%(n=6),表明方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一批次的知母乙醇提取物供试品溶液(编号:Z4)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,以芒果苷峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.19%和1.94%(n=6),表明知母乙醇提取物供试品溶液在室温下放置24 h的稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批次样品(编号:Z4)粉末1.0 g,共6份,精密称定,按“2.1.1”项下方法制备乙醇提取物供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,以芒果苷峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.20%和2.27%(n=6),表明方法重复性良好。

2.1.7 知母乙醇提取物的指纹图谱研究 取20批知母及其炮制品适量,按“2.1.1”项下方法制备乙醇提取物供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将所得色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》中,以Z1图谱为参照图谱,设置时间窗口为0.1 min,对指纹图谱中的共有峰进行多点校正,匹配生成20批知母及其炮制品乙醇提取物的叠加指纹图谱;并采用平均数法生成对照指纹图谱(R1),详见图2。从20批知母及其炮制品乙醇提取物的HPLC指纹图谱中标定出共有峰8个(M1~M8);与芒果苷对照品的HPLC分析结果(见图1A)对比,指认峰M7为芒果苷。

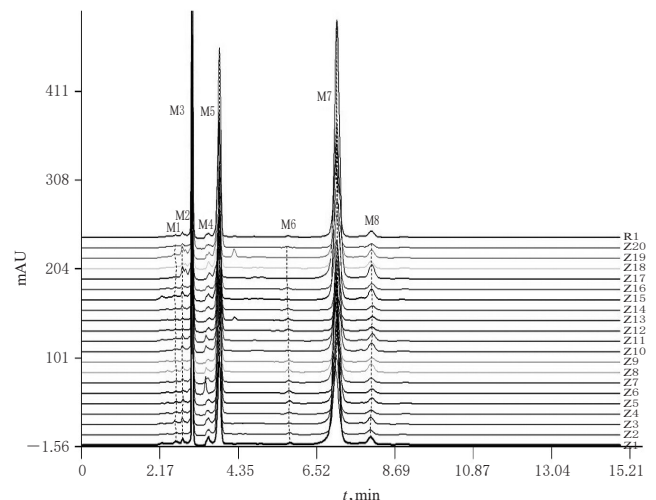


图2 20批知母及其炮制品乙醇提取物的叠加指纹图谱与对照指纹图谱

Fig 2 Superimposed fingerprint and control fingerprint of ethanol extract from 20 batches of *A. asphodeloides* and its processed products

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》对20批知母及其炮制品乙醇提取物的指纹图谱进行相似度评价。结果,20批知母及其炮制品乙醇提取物的相似度为0.389~1.000,说明知母及其不同炮制品乙醇提取物的化学成分存在明显差异,详见表2。

2.2 知母丙酮提取物的HPLC-ELSD指纹图谱研究

2.2.1 知母丙酮提取物供试品溶液 参考2020年版《中国药典》(一部)方法^[1],称取知母及其炮制品饮片粉末(过60目筛,下同)0.15 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入30%丙酮100 mL,称定质量,超声(功率:400 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷至室温,再次称定质量,用30%丙酮补足减失的质量,摇匀,过0.45 μm滤膜,即得丙酮提取物供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 取知母皂苷B II对照品适量,精密称定,用30%丙酮定容于50 mL量瓶中,得质量浓度为0.49 mg/mL的对照品溶液。

2.2.3 色谱条件与系统适用性考察 色谱柱:XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%冰醋酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min,5% A;5~15 min,5% A→35% A;15~20 min,35% A→100% A;20~25 min,100% A);柱温:30 ℃;流速:0.9 mL/min;雾化器温度:40 ℃;氮气流速:1.6 mL/min;进样量为:10 μL。取知母皂苷B II对照品溶液、知母丙酮提取物供试品溶液(编号:Z4)和阴性对照溶液(30%丙酮),按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,知母皂苷B II的色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.50,拖尾因子介于0.95~1.05之间;按知母皂苷B II峰计理论板数均大于

10 000,且阴性对照无干扰,详见图3。

2.2.4 精密度试验 取同一批次的知母丙酮提取物供试品溶液(编号:Z4)适量,按“2.2.3”项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果,以知母皂苷B II峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.17%和0.89%(n=6),表明方法精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取同一批次的知母丙酮提取物供试品溶液(编号:Z4)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,以知母皂苷B II峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.22%和1.65%(n=6),表明知母丙酮提取物供试品溶液在室温下放置24 h的稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批次的样品(编号:Z4)粉末1.0 g,共6份,精密称定,按“2.2.1”项下方法制备丙酮提取物供试品溶液,再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,以知母皂苷B II峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.32%和2.07%(n=6),表明方法重复性良好。

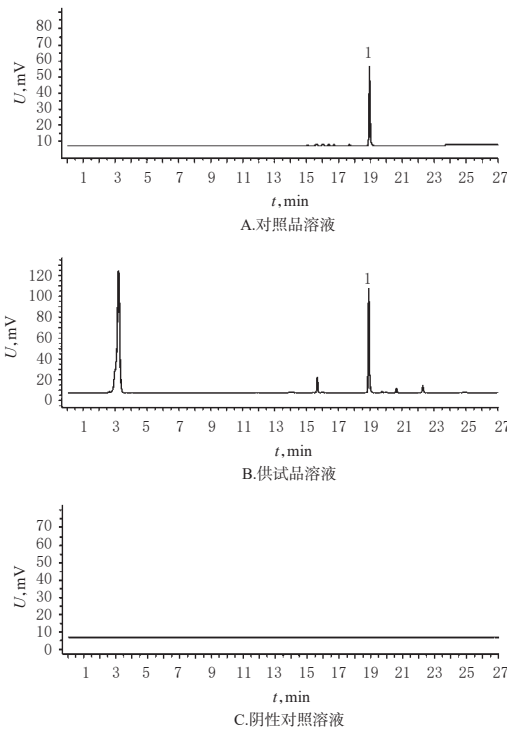
2.2.7 知母丙酮提取物的指纹图谱研究 取20批知母及其炮制品适量,按“2.2.1”项下方法制备丙酮提取物供试品溶液,再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》中,按“2.1.8”项下方法生成知母炮制品丙酮提取物的叠加指纹图谱和对照指纹谱图(R2),详见图4。从20批知母及其炮制品丙酮提取物的指纹图谱

表2 20批知母及其炮制品乙醇提取物指纹图谱的相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation results of fingerprints of ethanol extract from 20 batches of *A. asphodeloides* and its processed products

编号	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12	Z13	Z14	Z15	Z16	Z17	Z18	Z19	Z20
Z1	1.000	0.762	0.998	0.780	0.972	0.718	0.932	0.919	0.653	0.956	0.900	0.641	0.564	0.714	0.991	0.863	0.980	0.861	0.996	0.643
Z2	0.762	1.000	0.797	0.999	0.889	0.995	0.944	0.953	0.988	0.915	0.966	0.985	0.964	0.996	0.831	0.984	0.619	0.985	0.770	0.985
Z3	0.998	0.797	1.000	0.814	0.983	0.757	0.950	0.939	0.695	0.971	0.923	0.684	0.610	0.753	0.996	0.890	0.966	0.888	0.994	0.685
Z4	0.780	0.999	0.814	1.000	0.902	0.993	0.952	0.961	0.982	0.926	0.973	0.979	0.956	0.993	0.847	0.988	0.641	0.988	0.788	0.979
Z5	0.972	0.889	0.983	0.902	1.000	0.856	0.989	0.984	0.808	0.995	0.974	0.799	0.737	0.853	0.992	0.956	0.907	0.954	0.973	0.800
Z6	0.718	0.995	0.757	0.993	0.856	1.000	0.917	0.930	0.993	0.889	0.949	0.991	0.977	0.998	0.793	0.968	0.566	0.969	0.724	0.992
Z7	0.932	0.944	0.950	0.952	0.989	0.917	1.000	0.998	0.882	0.994	0.994	0.874	0.823	0.915	0.965	0.986	0.842	0.986	0.935	0.875
Z8	0.919	0.953	0.939	0.961	0.984	0.930	0.998	1.000	0.895	0.993	0.997	0.888	0.840	0.927	0.958	0.990	0.825	0.990	0.924	0.888
Z9	0.653	0.988	0.695	0.982	0.808	0.993	0.882	0.895	1.000	0.843	0.916	1.000	0.993	0.995	0.736	0.945	0.490	0.947	0.663	1.000
Z10	0.956	0.915	0.971	0.926	0.995	0.889	0.994	0.993	0.843	1.000	0.988	0.834	0.777	0.884	0.982	0.971	0.880	0.969	0.957	0.835
Z11	0.900	0.966	0.923	0.973	0.974	0.949	0.994	0.997	0.916	0.988	1.000	0.910	0.866	0.946	0.944	0.995	0.796	0.995	0.904	0.911
Z12	0.641	0.985	0.684	0.979	0.799	0.991	0.874	0.888	1.000	0.834	0.910	1.000	0.995	0.994	0.726	0.940	0.477	0.942	0.652	1.000
Z13	0.564	0.964	0.610	0.956	0.737	0.977	0.823	0.840	0.993	0.777	0.866	0.995	1.000	0.980	0.656	0.902	0.389	0.904	0.575	0.995
Z14	0.714	0.996	0.753	0.993	0.853	0.998	0.915	0.927	0.995	0.884	0.946	0.994	0.980	1.000	0.789	0.968	0.560	0.968	0.720	0.995
Z15	0.991	0.831	0.996	0.847	0.992	0.793	0.965	0.958	0.736	0.982	0.944	0.726	0.656	0.789	1.000	0.916	0.948	0.913	0.991	0.727
Z16	0.863	0.984	0.890	0.988	0.956	0.968	0.986	0.990	0.945	0.971	0.995	0.940	0.902	0.968	0.916	1.000	0.746	0.999	0.869	0.940
Z17	0.980	0.619	0.966	0.641	0.907	0.566	0.842	0.825	0.490	0.880	0.796	0.477	0.389	0.560	0.948	0.746	1.000	0.744	0.974	0.478
Z18	0.861	0.985	0.888	0.988	0.954	0.969	0.986	0.990	0.947	0.969	0.995	0.942	0.904	0.968	0.913	0.999	0.744	1.000	0.867	0.942
Z19	0.996	0.770	0.994	0.788	0.973	0.724	0.935	0.924	0.663	0.957	0.904	0.652	0.575	0.720	0.991	0.869	0.974	0.867	1.000	0.652
Z20	0.643	0.985	0.685	0.979	0.800	0.992	0.875	0.888	1.000	0.835	0.911	1.000	0.995	0.995	0.727	0.940	0.478	0.942	0.652	1.000

中标定出共有峰7个(S1~S7),与知母皂苷B II对照品的HPLC分析结果(见图3A)比对,指认峰S5为知母皂苷B II。



注:1.知母皂苷B II
Note: 1. timosaponin B II

图3 HPLC-ELSD图

Fig 3 HPLC-ELSD chromatograms

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》对20批知母及其炮制品丙酮提取物的指纹图谱进

表3 20批知母及其炮制品丙酮提取物指纹图谱的相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation results of fingerprint of acetone extract from 20 batches of *A. asphodeloides* and its processed products

编号	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12	Z13	Z14	Z15	Z16	Z17	Z18	Z19	Z20
Z1	1.000	0.998	0.990	0.114	0.998	0.130	0.087	0.083	0.230	0.996	0.057	0.197	0.137	0.146	0.152	0.057	0.147	0.977	0.169	0.212
Z2	0.998	1.000	0.990	0.122	0.999	0.137	0.093	0.092	0.234	0.997	0.059	0.205	0.142	0.155	0.161	0.057	0.156	0.983	0.190	0.216
Z3	0.990	0.990	1.000	0.153	0.991	0.180	0.116	0.102	0.343	0.981	0.073	0.280	0.197	0.203	0.210	0.072	0.200	0.950	0.164	0.312
Z4	0.114	0.122	0.153	1.000	0.122	0.993	0.573	0.566	0.653	0.094	0.543	0.468	0.868	0.986	0.984	0.541	0.420	0.099	0.449	0.722
Z5	0.998	0.999	0.991	0.122	1.000	0.137	0.093	0.090	0.238	0.997	0.059	0.207	0.143	0.155	0.161	0.057	0.156	0.982	0.184	0.220
Z6	0.130	0.137	0.180	0.993	0.137	1.000	0.623	0.608	0.705	0.104	0.588	0.536	0.856	0.997	0.996	0.586	0.469	0.098	0.460	0.757
Z7	0.087	0.093	0.116	0.573	0.093	0.623	1.000	0.995	0.240	0.072	0.993	0.598	0.142	0.622	0.615	0.991	0.591	0.077	0.735	0.221
Z8	0.083	0.092	0.102	0.566	0.090	0.608	0.995	1.000	0.187	0.071	0.990	0.567	0.119	0.606	0.598	0.986	0.577	0.093	0.771	0.175
Z9	0.230	0.234	0.343	0.653	0.238	0.705	0.240	0.187	1.000	0.177	0.153	0.635	0.817	0.739	0.754	0.154	0.431	0.120	0.106	0.969
Z10	0.996	0.997	0.981	0.094	0.997	0.104	0.072	0.071	0.177	1.000	0.045	0.156	0.108	0.118	0.123	0.044	0.120	0.985	0.165	0.164
Z11	0.057	0.059	0.073	0.543	0.059	0.588	0.993	0.990	0.153	0.045	1.000	0.535	0.091	0.580	0.570	0.999	0.548	0.048	0.713	0.140
Z12	0.197	0.205	0.280	0.468	0.207	0.536	0.598	0.567	0.635	0.156	0.535	1.000	0.359	0.568	0.576	0.533	0.936	0.133	0.426	0.599
Z13	0.137	0.142	0.197	0.868	0.143	0.856	0.142	0.119	0.817	0.108	0.091	0.359	1.000	0.860	0.867	0.090	0.250	0.088	0.099	0.878
Z14	0.146	0.155	0.203	0.986	0.155	0.997	0.622	0.606	0.739	0.118	0.580	0.568	0.860	1.000	0.999	0.578	0.489	0.113	0.469	0.785
Z15	0.152	0.161	0.210	0.984	0.161	0.996	0.615	0.598	0.754	0.123	0.570	0.576	0.867	0.999	1.000	0.568	0.493	0.117	0.466	0.798
Z16	0.057	0.057	0.072	0.541	0.057	0.586	0.991	0.986	0.154	0.044	0.999	0.533	0.090	0.578	0.568	1.000	0.546	0.044	0.706	0.140
Z17	0.147	0.156	0.200	0.420	0.156	0.469	0.591	0.577	0.431	0.120	0.548	0.936	0.250	0.489	0.493	0.546	1.000	0.119	0.459	0.394
Z18	0.977	0.983	0.950	0.099	0.982	0.098	0.077	0.093	0.120	0.985	0.048	0.133	0.088	0.113	0.117	0.044	0.119	1.000	0.242	0.118
Z19	0.169	0.190	0.164	0.449	0.184	0.460	0.735	0.771	0.106	0.165	0.713	0.426	0.099	0.469	0.466	0.706	0.459	0.242	1.000	0.112
Z20	0.212	0.216	0.312	0.722	0.220	0.757	0.221	0.175	0.969	0.164	0.140	0.599	0.878	0.785	0.798	0.140	0.394	0.118	0.112	1.000

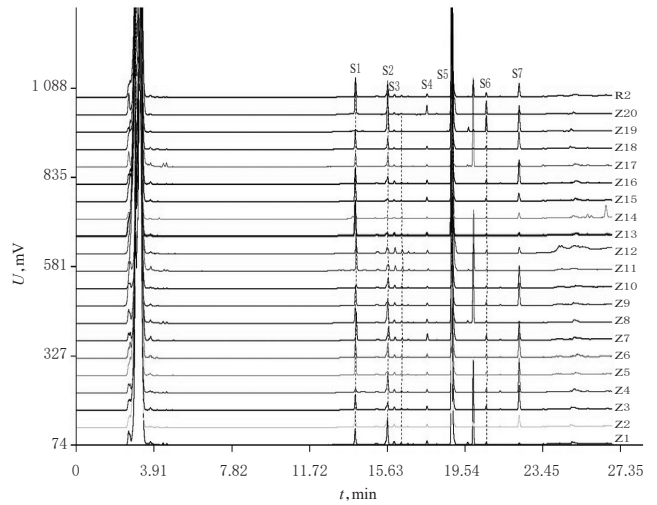


图4 20批知母及其炮制品丙酮提取物的叠加指纹图谱及对照指纹图谱

Fig 4 Superimposed and control fingerprint of acetone extract from 20 batches of *A. asphodeloides* and its processed products

行相似度评价。结果,20批知母及其炮制品丙酮提取物的相似度为0.044~0.999,说明知母及其不同炮制品丙酮提取物的化学成分存在明显差异,详见表3。

2.3 DPPH 自由基抗氧化活性的测定

在预试验基础上,本研究将知母乙醇提取物和知母丙酮提取物的浓度分别设定为3.8、2.1 g/mL(以提取物质量计)。参考刘爱朋等^[13]报道方法,分别精密量取知母乙醇提取物和丙酮提取物溶液2 mL,精密加入0.16 mmol/L DPPH 乙醇溶液1 mL,混匀,静置30 min,以

5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 用紫外-可见分光光度计在 517 nm 波长处测定吸光度(A_1)。另用水 2 mL 替换样品溶液, 与 DPPH 乙醇溶液混合后, 同法测定吸光度(A_0)。用水 1 mL 替换 DPPH 乙醇溶液, 与样品溶液混合后, 同法测定吸光度(A_2)。上述试验均平行操作 3 次, 取平均值, 并按下列公式计算 DPPH 自由基清除率: DPPH 自由基清除率 = $(A_1 - A_2) / A_0 \times 100\%$, 结果见表 4。

表 4 20 批知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物的抗氧化活性测定结果(%)

Tab 4 Antioxidant activity of ethanol extract and acetone extract from 20 batches of *A. asphodeloides* and its processed products (%)

编号	知母乙醇提取物	知母丙酮提取物	编号	知母乙醇提取物	知母丙酮提取物
Z1	36.52 ^{**Δ}	81.25 ^{**Δ}	Z11	60.89	63.51
Z2	79.09	58.83	Z12	21.23	62.75
Z3	69.55	68.31	Z13	22.50 ^{**}	79.13 ^{**Δ}
Z4	65.91	61.44	Z14	74.39	68.72
Z5	27.53 ^{**}	83.78 ^{**Δ}	Z15	69.00	67.09
Z6	76.99	59.34	Z16	31.73	62.31
Z7	71.73	68.36	Z17	37.51 ^{**}	77.62 ^{**Δ}
Z8	34.57	61.42	Z18	81.39	49.73
Z9	27.53 ^{**}	80.59 ^{**Δ}	Z19	72.04	66.27
Z10	81.36	60.97	Z20	34.02	61.92

注: 与同一来源的盐知母比较, * $P < 0.001$; 与同一来源的酒知母比较, [#] $P < 0.001$; 与同一来源的炒知母比较, ^Δ $P < 0.001$

Note: vs. salt-processed *A. asphodeloides* from same source, * $P < 0.001$; vs. wine-processed *A. asphodeloides* from same source, [#] $P < 0.001$; vs. fired *A. asphodeloides* from same source, ^Δ $P < 0.001$

由表 4 可知, 20 批知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物均具有清除 DPPH 自由基的能力。乙醇提取物中, 盐知母的清除能力最强, 酒知母的清除能力其次, 盐知母和酒知母的清除能力均高于炒知母和生知母, 经单因素方差分析发现, 生知母的 DPPH 自由基清除率均显著低于盐知母、酒知母($P < 0.001$); 除了仁医堂中医馆的生知母和炒知母, 其他来源的生知母与炒知母清除 DPPH 自由基的清除率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。丙酮提取物中, 生知母的清除 DPPH 自由基能力最强; 经单因素方差分析发现, 生知母的 DPPH 自由基清除率均显著高于盐知母、酒知母、炒知母($P < 0.001$)。

2.4 谱-效关系分析

参考文献方法^[14], 利用 SIMCA 14.1 软件, 以 20 批知母及其炮制品乙醇提取物或丙酮提取物的 DPPH 清除率为因变量, 共有峰的峰面积为自变量, 采用 PLSR 法分析, 计算标准化回归系数和变量重要性投影(VIP)值, 评价知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物与抗氧化活性的谱-效关系。

2.4.1 乙醇提取物的谱-效关系 知母及其炮制品乙醇提取物图谱中, 峰 M2~M7 的标准化回归系数均大于 0,

提示其与抗氧化活性成正相关^[15]; 仅色谱峰 M7 (芒果苷) 的 VIP 值大于 1, 提示其对抗氧化活性具有重要贡献^[16], 详见图 5。

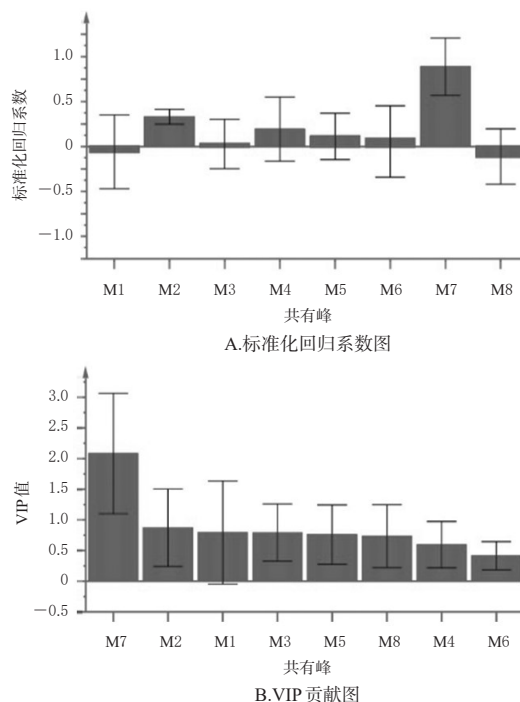


图 5 知母及其炮制品乙醇提取物的 PLSR 标准化回归系数图和 VIP 贡献图

Fig 5 PLSR standardized regression coefficient diagram and VIP contribution diagram of ethanol extract from *A. asphodeloides* and its processed products

2.4.2 丙酮提取物的谱-效关系 知母及其炮制品丙酮提取物图谱中, 峰 S4~S7 的标准化回归系数均大于 0, 提示其与抗氧化活性成正相关^[15]; VIP 值排序为色谱峰 S5 (知母皂苷 B II) > S6 > S4, 且 VIP 值均大于 1, 提示其对抗氧化活性具有重要贡献^[16], 详见图 6。

3 讨论

知母中富含多种药效成分, 本文以 2020 年版《中国药典》(一部) 规定的知母乙醇提取物和丙酮提取物为对象, 建立了其指纹图谱, 并对其相似度进行了评价。结果显示, 20 批知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物指纹图谱中分别标定出共有峰 8、7 个, 相似度分别为 0.389~1.000、0.044~0.999, 表明知母及其炮制品中化学成分有显著差异, 因此在临床应区别使用。

本文以 DPPH 自由基的清除率为抗氧化活性的药效学指标, 分析了知母及其不同炮制品乙醇提取物和丙酮提取物的抗氧化活性。结果显示, 知母不同炮制品的乙醇提取物和丙酮提取物的抗氧化能力存在显著差异, 盐知母乙醇提取物的抗氧化能力最强, 而生知母丙酮提取物的抗氧化能力最强。

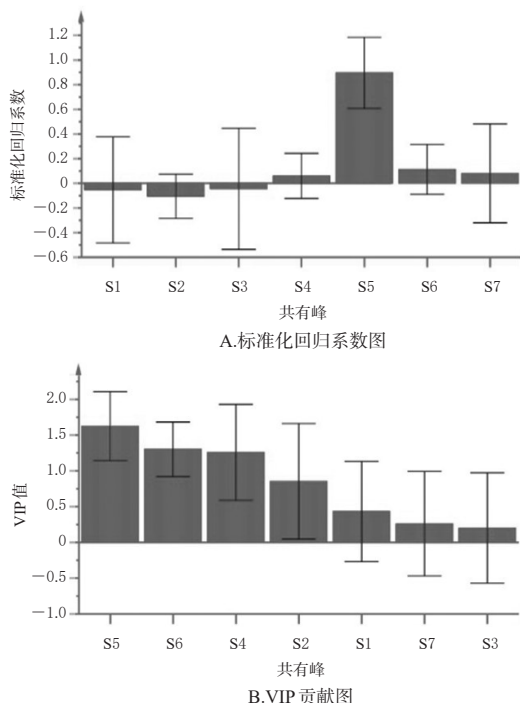


图6 知母及其炮制品丙酮提取物的PLSR标准化回归系数图和VIP贡献图

Fig 6 PLSR standardized regression coefficient diagram and VIP contribution diagram of acetone extract from *A. asphodeloides* and its processed products

为了进一步揭示知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物成分与抗氧化活性之间的内在联系,本文采用PLSR法分析了20批知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物的指纹图谱共有峰峰面积与抗氧化活性的谱-效关系。结果显示,知母乙醇提取物中仅芒果苷(M7)的标准化回归系数大于0且VIP值大于1,提示芒果苷可能是知母乙醇提取物抗氧化作用的主要药效物质;丙酮提取物中知母皂苷BⅡ(峰5)、峰6、峰4的标准化回归系数大于0且VIP值大于1,提示其可能是知母丙酮提取物抗氧化作用的主要药效物质,其中知母皂苷BⅡ的抗氧化活性最显著。

综上所述,本研究成功建立了知母及其炮制品乙醇提取物和丙酮提取物的指纹图谱,初步证实了芒果苷和知母皂苷BⅡ是知母及其炮制品抗氧化活性的药效重要物质基础。但本文在研究指纹图谱与抗氧化活性的谱-效关系时,只考察了共有峰与DPPH自由基清除活性的关联,并未考察非共有峰,这为今后的研究提供了思路,同时还有待于对未知成分进行鉴定和含量分析。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:222.
- [2] 顾观光. 神农本草经[M].北京:人民卫生出版社,1956:58.
- [3] 杜孟姣,陈坚平,余嘉贤,等.基于斑马鱼模型的知母皂苷BⅡ的血管保护作用及机制研究[J].中国药房,2020,31(7):811-815.
- [4] 赵琳琳,赵云平,魏静娜,等.正交试验优选知母酒制工艺[J].药物分析杂志,2018,38(11):2038-2043.
- [5] 李卫飞,许金凯,支美妆,等.基于正交设计和主成分分析、层次分析相结合的知母盐炙工艺优化[J].中华中医药杂志,2018,33(9):4167-4170.
- [6] 杨炳友,张晶,王姑师,等.知母中黄酮类化学成分研究[J].时珍国医国药,2017,28(4):793-795.
- [7] NIAN S, LIU E, FAN Y, et al. Orthogonal separation protocol for the simultaneous preparation of four medicinal active compounds from *Anemarrhena rhizoma* by sequential polyamide and macroporous resin adsorbent chromatography[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(16): 3195-3204.
- [8] 赵路路,刘菲菲,彭纓,等.高效液相色谱法考察不同炮制方法对知母中5种主要化学成分的影响[J].色谱,2012,30(12):1271-1275.
- [9] 闫丽,吴莹,高慧. HPLC-CAD法测定知母盐炙前后4种皂苷含量[J].现代中药研究与实践,2019,33(1):46-49.
- [10] 陈素娟,张艳秋,聂静,等.不同产地知母药材的含量测定及指纹图谱研究[J].西北药学杂志,2019,34(3):285-288.
- [11] 景永帅,张丹参,张瑞娟,等.提取方法对北沙参多糖性质及生物活性的影响[J].食品与机械,2017,33(10):149-153.
- [12] 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.
- [13] 刘爱朋,焦倩,郑玉光,等.皂角刺总黄酮提取工艺的优化及其抗氧化活性[J].中成药,2018,40(3):722-725.
- [14] 万丹,张水寒,沈冰冰,等.基于相关性分析的金银花和山银花正丁醇提取物的抗肿瘤活性谱-效关系研究[J].分析科学学报,2020,36(1):37-41.
- [15] 耿晓桐,王丰青,谢彩侠,等.基于HPLC指纹图谱技术的地黄块根抗氧化活性谱效关系研究[J].天然产物研究与开发,2019,31(11):1864-1872.
- [16] 黄潇,刘婧,吴建华,等.基于灰色关联法分析栀子提取物抗炎作用谱效关系[J].中成药,2020,42(1):233-237.

(收稿日期:2020-07-13 修回日期:2020-10-20)

(编辑:邹丽娟)