



韩雪,曾庆鸿,孔娇,等.基于指纹图谱与多元统计方法优化白及提取工艺[J].黑龙江农业科学,2021(10):107-111,112.

# 基于指纹图谱与多元统计方法优化白及提取工艺

韩雪<sup>1</sup>,曾庆鸿<sup>2</sup>,孔娇<sup>1</sup>,杨丽丽<sup>1</sup>,宋智琴<sup>1</sup>,吴明开<sup>1</sup>

(1. 贵州省农业科学院 现代中药材研究所/贵州省农作物品种资源研究所/贵州省农业生物技术重点实验室,贵州 贵阳 550006;2. 贵州省农业科技发展中心,贵州 贵阳 550006)

**摘要:**为确定白及的最佳提取工艺,以白及为试验材料,建立基于 HPLC 指纹图谱的白及化学成分提取优化工艺。运用指纹图谱技术对白及提取工艺方法进行最优筛选,联合应用单因素分析法以及其他统计学方法考察了提取的甲醇浓度、温度、提取时间和药材粒度对提取效果的影响。建立了白及的指纹图谱,选择了 16 个特征峰,且确定了白及最佳提取工艺为采用过 6 号筛的白及粉末以 80% 浓度甲醇在 55 ℃ 水浴加热 3.0 h。通过单因素分析以及曲线拟合的结果可以推测,甲醇浓度、温度、提取时间和药材粒度对于提取结果均有影响。该工艺稳定可靠,简便易行,可以在一定程度上对白及的品质进行评价。

**关键词:**指纹图谱;工艺优化;单因素分析;曲线拟合;HPLC

贵州珍稀道地药材白及是兰科植物白及(*Bletilla striata*)的干燥块茎,白及具有收敛止血,消肿生肌功效,用于内外出血诸证及痈肿、烫伤、手足皲裂等<sup>[1]</sup>。主产于贵州、四川、湖北等地,以贵州产量最大,质量最好<sup>[2]</sup>。白及为名贵的止血材料,其药理作用主要包括抗菌、活血止血、促进创伤愈合、促进胃肠道黏膜损伤的修复、促进骨髓造血、抗病毒、抗肿瘤等<sup>[3-6]</sup>。白及的应用广泛,其中的多糖成分现被应用于食品添加剂,美容产品等。在贵州一些地区,白及还被用于制作白及酒。白及的化学成分主要包括联苕类、二氢菲类、联菲类、联菲醚类、菲并吡喃类、联苕葡萄糖苷类、多糖类、甾体、三萜、木质素、萜醌等<sup>[6-9]</sup>,化学成分非常丰富,种类繁多。而目前对中药白及的提取工艺研究主要集中在白及多糖类成分的提取<sup>[10-12]</sup>,忽略了白及中其他类成分对白及品质的影响,对于白及中非多糖类成分,联苕类、二氢菲

类等被认为是白及的主要有效成分,其乙醇部位,乙酸乙酯部位,氯仿部位均被发现具有良好的药理活性<sup>[13-16]</sup>。

中药指纹图谱技术广泛用于中药材的质量评价与整体性的研究,用来评价中药材中主要成分的种类及其含量<sup>[17-19]</sup>,而白及中的化学成分种类繁多,类型复杂<sup>[20-21]</sup>,单一的以一种成分或以白及胶作为结果评价白及的提取工艺稍显不足,不能全面地反映不同提取工艺对白及中有效成分的富集,而基于中药指纹图谱技术对白及提取工艺进行优化,能够全面地反映提取液中有效成分的变化,从而确定白及的最佳提取工艺。因此,本试验通过单因素分析和其他统计学方法考察了白及提取工艺中的 4 个影响因素,建立了基于 HPLC 指纹图谱的白及化学成分提取优化工艺,以期进一步提高白及中化学成分提取的生产效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白及药材来自贵州省农业科学院现代中药材研究所资源圃,原植物经由贵阳中医学院何顺志教授鉴定为兰科白及属植物白及(*Bletilla striata*)。

供试乙腈、甲醇为色谱纯,超纯水为自制。

供试仪器包括 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)、纯水机(四川优普超纯科技有限公司)、电热套(泰斯特公司)、AUW220D-SHIMADZ 电子天平、KQ2200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、铁架台等。

收稿日期:2021-07-07

**基金项目:**贵州省科技厅黔科合服企([2020]4008);贵州省农业农村厅贵州省中药材现代产业技术体系建设专项(GZ-CYTX2020-0202);贵州省农业科学院项目(黔农科院成培计[2020]2号);贵州省农业科学院乡村振兴科技支撑项目;贵州省科技厅项目(黔科合成果[2019]4316号);贵州省科技计划项目(黔科合成果[2018]4602);贵州省科技厅项目(黔科合平台人才[2017]5712);贵州省科技厅项目(黔科合[2016]支撑2832号);黔农科院青年科技基金([2021]21号)。

**第一作者:**韩雪(1994—),男,硕士,研究实习员,从事中药学方向研究。E-mail:wimgdezkl@163.com。

**通信作者:**吴明开(1970—),男,博士,研究员,从事植物生态学与药用植物资源多样性保护与利用等研究。E-mail:bywmk1999@163.com。

1.2 方法

1.2.1 供试样品的制备 将白及粉末置于圆底烧瓶中,按照表 1 中的因素条件水浴回流提取,依次考察提取溶剂浓度、药材粉碎粒度、提取时间以及提取温度对提取效果的影响。提取液补足损耗,定容至 50 mL,用 0.22 μm 滤膜过滤备用。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为美国安捷伦色谱柱(Agilent 5 HC-18 250 mm×4.6 mm),流动相为乙腈-水,梯度洗脱程序:0~15 min,10%~28%乙腈;15~20 min,28%~36%乙腈;20~25 min,36%~39%乙腈;25~30 min,39%~45%乙腈;30~50 min,45%~70%乙腈;50~55 min,70%~10%乙腈;进样量为 10 μL;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长为 270 nm;柱温为 25 ℃。

表 2 各因素试验水平设计

试验代号	因素水平	试验代号	因素水平	试验代号	因素水平	试验代号	因素水平
S1	A1B1C1D1	S6	A4B1C1D1	S11	A4B5C1D1	S16	A4B5C2D1
S2	A2B1C1D1	S7	A4B2C1D1	S12	A4B5C2D1	S17	A4B5C2D2
S3	A3B1C1D1	S8	A4B3C1D1	S13	A4B5C3D1	S18	A4B5C2D3
S4	A4B1C1D1	S9	A4B4C1D1	S14	A4B5C4D1	S19	A4B5C2D4
S5	A5B1C1D1	S10	A4B5C1D1	S15	A4B5C5D1	S20	A4B5C2D5

1.2.4 精密度试验 按上述方法制备好供试样品之后,连续进样 6 次,得到指纹图谱。

1.2.5 稳定性试验 按上述方法制备好供试品之后,分别在 0,2,4,6,8 和 12 h 时进样,得到指纹图谱。

1.2.6 重复性试验 分别按照上述方法平行制备 6 份供试品,进样后得到指纹图谱。

1.2.7 曲线拟合 将甲醇浓度、提取温度、提取时间和白及粒度等因素作为自变量,其对应的峰面积作为因变量,在 SPSS 22.0 软件中进行线性函数、对数函数、二次函数、三次函数、幂函数、S 函数、增长函数和指数函数的拟合。

1.2.8 数据分析 运用 SPSS 22.0 软件,以不同处理条件得到的各指纹图谱特征峰的总面积为因变量,进行单因素 ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取工艺下的白及指纹图谱

本试验得到的指纹图谱方法稳定可靠,精密度试验特征峰的峰面积 RSD%是 0.06~0.09。特征峰保留时间的 RSD%是 0.15~2.31,表明该

表 1 工艺优化因素与水平

水平	A 甲醇 浓度/%	B 温度/℃	C 提取 时间/h	D 药材 粒度/号
1	20	25	2.0	2
2	40	35	2.5	3
3	60	45	3.0	4
4	80	55	3.5	5
5	100	65	4.0	6

1.2.3 样品分析测定 按照表 1 中的因素水平,先给定 B、C、D,确定出 A 因素的最佳条件,再在确定 C、D 以及得到 A 的最佳条件之后进行 B 因素的确定,以此类推,最后确定最佳条件(表 2)。

方法精密度良好;稳定性试验特征峰峰面积 RSD%是 0.08~0.66。特征峰保留时间的 RSD%是 0.26~2.71,表明该方法稳定性良好;重复性试验特征峰的峰面积 RSD%是 0.04~0.26。特征峰保留时间的 RSD%是 0.26~1.77,表明该方法重复性良好。

分别由 20 个样品得到的结果如图 1,其中,S1~S5 为提取甲醇浓度的考察,S6~S10 为提取温度的考察,S11~S15 为提取时间的考察,S16~S20 为白及粒度的考察。在经过比较之后发现,80%甲醇浓度,55 ℃水浴加热 3.0 h,提取粒度为能过 6 号筛的白及粉末最终得到的指纹图谱特征峰最多,且特征峰的峰面积大(图 2),得到了优化提取工艺之后的白及指纹图谱以及 16 个特征峰。

各因素对白及指纹图谱特征峰总面积影响结果如图 3 所示,各因素峰总面积平均数和标准差详见表 3,可以发现温度对应的峰面积最小,但是标准差较其他因素较大,说明温度的组内变异较大,可以推测温度的改变对峰面积影响会有较大的差异性,而时间对应组的标准差远小于其他组,说明时间的组内变异较小,可以推测提取时间的长短对峰面积影响较小。

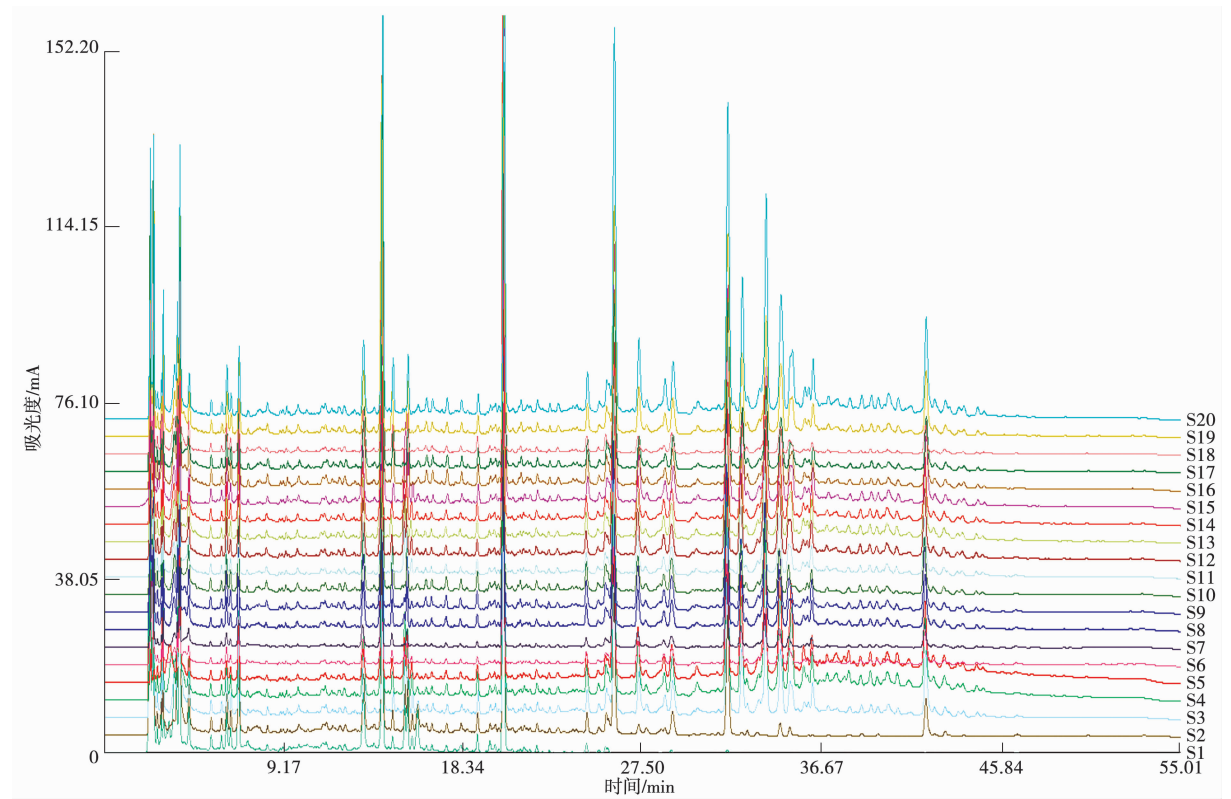


图 1 不同提取工艺条件下白及的 HPLC 指纹图谱

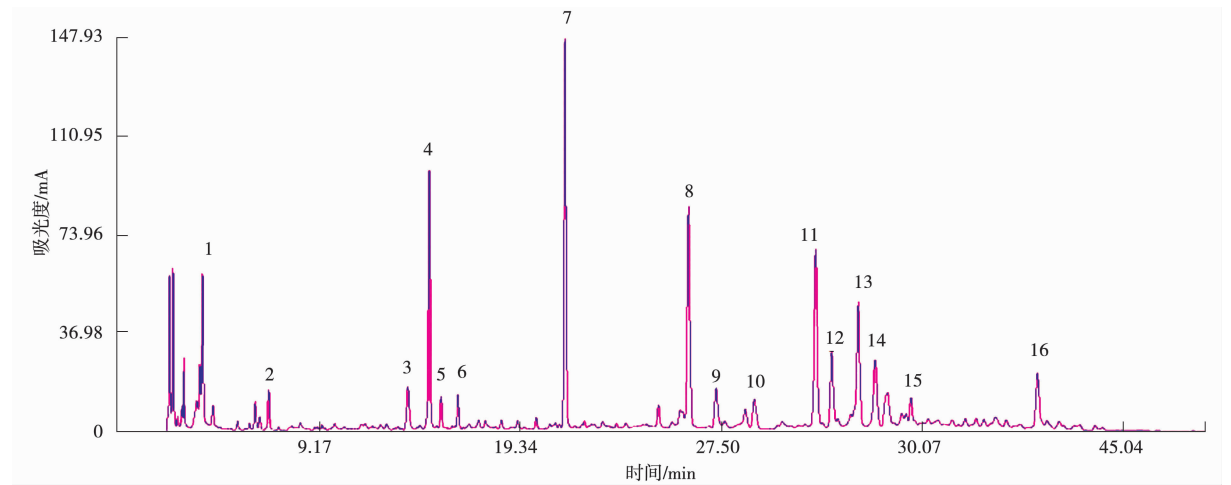


图 2 白及提取工艺优化后指纹图谱

表 3 各因素特征峰总面积平均数和标准差	
因素	特征峰总面积
浓度	$3519.96 \pm 1010.54$
温度	$2594.65 \pm 1389.96$
时间	$3944.19 \pm 418.34$
粒度	$3936.62 \pm 1178.97$

由图 3 可以看出,时间因素对峰面积的影响较小,与表 3 结果一致,而温度和粒度因素出现了

峰面积先低后高的情况,甲醇浓度因素出现了先高后低的情况,因此可以推测,在工艺优化的过程中,温度、粒度、甲醇浓度等因素对提取结果的影响非简单的线性关系。基于此对工艺优化的4个因素的结果进行了曲线的拟合,由表 4 拟合结果可以看到,温度、粒度、甲醇浓度因素都是在二次函数和三次函数的拟合结果较好,可以推测,在一定程度内温度越高提取效率越高,但是由于白及

成分复杂,且多糖类成分含量较高,在特定温度下,这些多糖类成分相互作用,形成致密的结构,阻碍内容物的溶出,降低提取效率。同样的,在一定范围内粒度越细溶出率越高,但是在特定粒径大小下,容易被多糖类成分粘黏成块,阻碍内容物的溶出,降低提取效率。而对于甲醇浓度而言,白及中成分复杂,由于相似相溶的原理,过高或过低的浓度只能提取出某一极性段的成分,所以在甲醇水比例合适的情况下,才能够溶出更多的成分,增加提取效率。

2.2 工艺验证

按上述方法,取白及过 6 号筛粉末 2 g,加入 80% 甲醇水溶液 40 mL,水浴 55 ℃ 加热 3.0 h,趁

热过滤,过 0.22 μm 滤膜,平行 3 组,测得峰面积 RSD% 为 0.98,表明该方法稳定可靠。

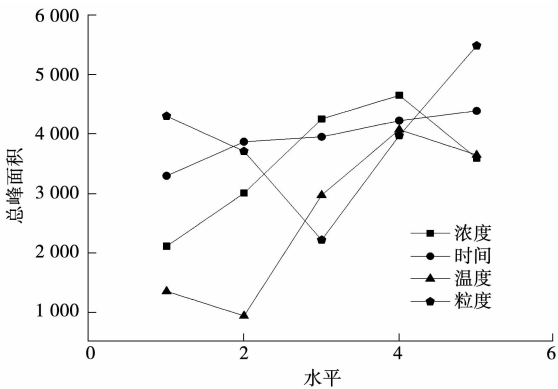


图 3 不同因素下白及指纹图谱特征峰总面积

表 4 各因素特征峰曲线拟合结果

项目	R <sup>2</sup>				F				P			
	粒度	浓度	时间	温度	粒度	浓度	时间	温度	粒度	浓度	时间	温度
线性	0.126	0.522	0.920	0.773	0.431	3.279	34.272	10.208	0.558	0.168	0.010	0.050
对数	0.028	0.684	0.976	0.722	0.085	6.507	119.675	7.785	0.790	0.084	0.002	0.068
二次	0.842	0.919	0.960	0.781	5.319	11.307	24.130	3.572	0.158	0.081	0.040	0.219
三次	0.850	0.999	0.981	0.986	1.882	255.311	17.177	23.315	0.481	0.046	0.175	0.151
幂	0.007	0.751	0.972	0.647	0.021	9.049	104.903	5.493	0.894	0.057	0.002	0.101
S	0.005	0.831	0.961	0.500	0.014	14.703	74.501	2.995	0.915	0.031	0.003	0.182
增长指数	0.070	0.572	0.897	0.707	0.226	4.012	26.113	7.235	0.667	0.139	0.014	0.074

注:深色区域为曲线拟合强相关,浅色区域为曲线拟合相关,无色为曲线拟合不相关。

2.3 单因素结果分析

由表 5 ANOVA 分析结果可知,F 值为 1.782,P 值为 0.191,大于 0.05,说明几个因素之间没有显著性差异,表明提取浓度、提取时间、提取温度和粒度在一定程度上对最终的提取结果影响无统计学差异,LSD 检验结果如表 6 所示,除了时间与温度以及时间与粒度之间的 P 值接近 0.05 以外,其余组间均无显著性差异,可见在优化提取工

艺的时候,每一个因素对最后的结果均有一定程度上的影响。

表 5 单因素 ANOVA 分析结果

项目	平方和	自由度	均方	F	P
组间	6040017.135	3	2013339.045	1.782	0.191
组内	18072798.990	16	1129549.937		
总计	24112816.130	19			

表 6 LSD 检验结果

(I)分组	(J)分组	平均值差值	标准误差	P	95%置信区间	
					下限	上限
浓度	温度	-424.23400	672.17555	0.537	-1849.1825	1000.7145
	时间	925.31000	672.17555	0.188	-499.6385	2350.2585
	粒度	-416.66720	672.17555	0.544	-1841.6157	1008.2813
温度	浓度	424.23400	672.17555	0.537	-1000.7145	1849.1825
	时间	1349.54400	672.17555	0.062	-75.4045	2774.4925

表 6 (续)

(I)分组	(J)分组	平均值差值	标准误差	P	95%置信区间	
					下限	上限
时间	粒度	7.56680	672.17555	0.991	-1417.3817	1432.5153
	浓度	-925.31000	672.17555	0.188	-2350.2585	499.6385
	温度	-1349.54400	672.17555	0.062	-2774.4925	75.4045
粒度	粒度	-1341.97720	672.17555	0.063	-2766.9257	82.9713
	浓度	416.66720	672.17555	0.544	-1008.2813	1841.6157
	温度	-7.56680	672.17555	0.991	-1432.5153	1417.3817
	时间	1341.97720	672.17555	0.063	-82.9713	2766.9257

3 结论

不同的提取条件对白及指纹图谱的特征峰影响较大,说明该指纹图谱可以很好地评价白及中的化学成分,也为白及的品质及质量控制提供试验基础。

在工艺优化的过程中发现,溶剂浓度的改变对白及中提取出的化学成分种类改变影响较大,从指纹图谱 S1~S5 中可以明显看到甲醇浓度低时,提取液的指纹图谱中的特征峰与非特征峰数量明显少于高浓度甲醇的提取液,而其他因素对白及提取液中特征峰与非特征峰的含量影响较大,对于白及提取工艺而言,影响因素非常多,是综合多因素的最终结果,这与上述统计学分析结果也相符。

不同的提取工艺对白及中不同类型化学成分有较大影响,而本研究所确定的提取工艺稳定可靠,并且可以较好地对白及中的化学成分进行评价。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典,一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020.

[2] 张燕君,孙伟,何艳,等. 白及属植物资源评价与可持续利用的现状与展望[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(22): 4397-4403.

[3] 万大群,赵仁全,刘海,等. 白及的成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2017, 26(2): 93-96.

[4] 饶文龙,张浩,张嘉玮,等. 白及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(8): 91-93.

[5] 俞林花,史海霞,聂志强,等. 芦荟和白及创面愈合的药理作用比较[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1450-1452.

[6] 汤逸飞,阮川芬,应晨,等. 白及属植物化学成分与药理作用

研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(19): 2864-2872.

[7] 马先杰,崔保松,韩少伟,等. 中药白及的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1578-1584.

[8] 鄢艳,关焕玉,王爱民,等. 黔产白及的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 57-60.

[9] 孙爱静,庞素秋,王国权. 中药白及化学成分与药理活性研究进展[J]. 环球中医药, 2016, 9(4): 507-511.

[10] 朱珊梅,陈海鹰,范正达. 白及胶的制剂学研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(24): 3130-3135.

[11] 徐玲玲,赵明阳,张倩,等. 白及胶的提取及含量测定[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2018, 21(6): 68-71.

[12] 卢少海,马山,周长征. 正交试验法优化白及胶提取工艺[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(10): 847-848.

[13] 周海婷,陈志敏,李文兵,等. 野生与栽培白及 HPLC 指纹图谱建立及天麻素与 militarine 含量测定[J]. 中药材, 2018, 41(11): 2527-2533.

[14] 杨红燕,项微微,李玲燕. HPLC 法指纹图谱在山慈菇真伪鉴别中的应用[J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(1): 72-73.

[15] 赵菲菲,杨馨,徐丹,等. 白及非多糖组分的止血作用及其机制的初步研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(8): 1121-1126.

[16] 吴梅,田守征,郑永仁,等. 白及苦味成分的分离、鉴定及抗炎药效学初研[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 372-374.

[17] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.

[18] 陈林伟,秦昆明,徐雪松,等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望[J]. 中草药, 2014, 45(21): 3041-3047.

[19] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.

[20] 朱环,张丽萍,王江聪,等. 人工栽培与野生白及化学成分差异的多元统计分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(6): 1045-1049.

[21] 陈长芬,蒋赛,娄华勇,等. 黔产白及中糖苷类化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(20): 4879-4883.



陈思宇,芮蕊,王澍.乙酸和丙酸对玛咖种子萌发的影响[J].黑龙江农业科学,2021(10):112-116.

# 乙酸和丙酸对玛咖种子萌发的影响

陈思宇<sup>1</sup>,芮蕊<sup>2</sup>,王澍<sup>1</sup>

(1.西南林业大学 园林园艺学院,云南 昆明 650224;2.西南林业大学 土木工程学院,云南 昆明 650224)

**摘要:**为研究不同酚酸物质对玛咖发芽的影响,本试验以黑色和黄色玛咖为试材,用不同浓度的乙酸(5,10和15 mmol·L<sup>-1</sup>)和丙酸(0.5,1.0,2.0和4.0 mmol·L<sup>-1</sup>)溶液对玛咖种子进行处理,分别测量玛咖种子的发芽率、发芽势、发芽指数和胚芽生长情况。结果表明:与CK相比,经乙酸处理的黑色和黄色玛咖种子,随乙酸浓度的增加抑制种子萌发的作用逐渐增强、芽长变短。同时,低浓度的丙酸(0.5~1.0 mmol·L<sup>-1</sup>),对玛咖的发芽率有一定的促进作用,随着丙酸浓度的逐渐增大,玛咖种子的发芽率逐渐下降,芽长生长受到抑制。另外,黑色与黄色玛咖相比,黄色玛咖芽长的生长对乙酸的适应性更强,而黑色玛咖芽长的生长对丙酸的适应性更强。

**关键词:**黑色玛咖;黄色玛咖;乙酸;丙酸;种子萌发

玛咖(*Lepidium meyenii* Walp)属十字花科独行菜属,一年生或二年生草本植物<sup>[1]</sup>。前人研究发现,玛咖营养成分丰富且药用价值强,含有对

人体健康有利的不饱和脂肪酸<sup>[2]</sup>。不同种类的玛咖均含有玛咖烯和玛咖酰胺,具有抗疲劳、调节内分泌<sup>[3]</sup>等作用,并对呼吸疾病、抑郁症等有很好的治疗效果<sup>[4-6]</sup>。

酚酸类物质是目前公认的化感物质<sup>[7-8]</sup>(如香草酸、阿魏酸、丁香酸、香豆酸等)对植物生长有不同的影响。不同浓度的酚酸类物质对种子萌发的影响存在差异。杨延杰等<sup>[9]</sup>研究发现,邻苯二甲酸会促进萝卜种子萌发,且随着浓度的增大,促进

收稿日期:2021-06-20

基金项目:云南省农业基础研究联合专项农业联合青年项目(018FG001-073)。

第一作者:陈思宇(1994—),女,在读硕士,从事花卉理化特性的研究。E-mail:275543373@qq.com。

通信作者:王澍(1980—),男,博士,教授,从事土壤微生物研究。E-mail:61363661@qq.com。

## Optimizing the Extraction Process of *Bletilla striata* Based on Fingerprint and Multivariate Statistical Methods

HAN Xue<sup>1</sup>, ZENG Qing-hong<sup>2</sup>, KONG Jiao<sup>1</sup>, YANG Li-li<sup>1</sup>, SONG Zhi-qin<sup>1</sup>, WU Ming-kai<sup>1</sup>

(1. Institute of Modern Chinese Medical Materials, Guizhou Academy of Agricultural Sciences/Guizhou Institute of Crop Variety Resources/Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang 550006, China; 2. Guizhou Agricultural Science and Technology Development Center, Guiyang 550006, China)

**Abstract:** In order to determine the best extraction process of *Bletilla striata*, we used *Bletilla striata* as the experimental materials, to establish *Bletilla striata* HPLC fingerprint and optimize the extraction process. The fingerprinting technique was used to screen the optimal extraction process method of *Bletilla striata*, combined with single factor analysis and other statistical methods to investigate the extracted methanol concentration, temperature, extraction time and the size of the medicinal materials. The results showed that the fingerprint of *Bletilla striata* was established, and 16 characteristic peaks were selected. The optimal extraction process of *Bletilla striata* was determined to be *Bletilla striata* powder with No. 6 sieve and heated with 80% methanol in 55 °C water bath for 2.5 hours. Through the results of single factor analysis and curve fitting, it could be inferred that methanol concentration, temperature, extraction time and medicinal material particle size all had an impact on the extraction results. The process was stable and reliable, simple and easy to perform, and could evaluate the chemical composition and quality of *Bletilla striata* to a certain extent.

**Keywords:** fingerprint; process optimization; single factor analysis; curve fitting; HPLC