

化学模式识别分析白及不同采收期 次生代谢产物动态变化特征

秦亚东^{1,2}, 汪荣斌^{1,2}, 方凤满^{2*}, 李林华¹

¹安徽中医药高等专科学校药学系; ²安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241002

摘要:为研究白及栽培品不同采收期特征差异次生代谢产物及其动态变化规律。采用高效液相色谱法(HPLC)建立白及指纹图谱并测定 gastrodin, militarine 含量, 利用主成分分析(PCA)及最小偏二乘分析(PLS-DA)对指纹图谱进行化学模式识别, 从16个共有峰中识别7个特征化学成分为不同采收季节主要特征差异成分。利用高效液相-高分辨质谱技术(HPLC-HRMS)鉴定为葡萄糖苷类成分(gastrodin)、苜蓿酯类成分(blestroside, militarine, gymnoside V)以及菲类成分(4-甲氧基菲-2,7-二醇, benzylhydrophenanthrene 3, coelonin)。结果显示7个主要差异成分随季节呈现不同动态变化规律, gastrodin 和 militarine 在不同采收期含量差异较大。本研究为指导白及采收时期及内在质量评价提供理论依据。

关键词:白及; 采收期; 高效液相色谱-高分辨质谱; 指纹图谱; 次生代谢产物; 质量评价

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)1-0011-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.1.002

Characteristics research on dynamic changes of secondary metabolites in *Bletilla striata* for different harvest time combined with chemical pattern recognition

QIN Ya-dong^{1,2}, WANG Rong-bin^{1,2}, FANG Feng-man^{2*}, LI Lin-hua¹

¹Department of pharmacy, Anhui college of Traditional Chinese Medicine;

²College of life sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241002, China

Abstract: To analyze the characteristic secondary metabolites and its dynamic change rule of cultivated *Bletilla striata* collected from different harvest time. The chemical fingerprints of 24 *Bletilla striata* samples collected from different harvest time was established by high performance liquid chromatography (HPLC) and the content of gastrodin, militarine were determined. Principal components analysis (PCA) and partial least squares-discriminate analysis (PLS-DA) were carried out on the HPLC fingerprints, 16 common peaks were marked in the HPLC fingerprint, furthermore, 7 characteristic secondary metabolites were found and identified (glucosides: gastrodin; benzyl ester: blestroside, militarine, gymnoside V; phenanthrenes: 4-methoxyphenanthrene-2,7-diol, coelonin, benzylhydrophenanthrene 3) by HPLC-high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS). Results indicated that these 7 chemical compounds were the characteristic secondary metabolites and showed different changes with seasons. The results were demonstrated to be very useful for guiding harvest time and quality assessment of *Bletilla striata*.

Key words: *Bletilla striata*; harvest time; HPLC-HRMS; fingerprint; secondary products; quality assessment

白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎, 具收敛止血、消肿生肌之功^[1], 作为临床常用药材, 具悠久的药用历史。白

及主要含有联苜蓿类、菲类、菲醌类、联苯并菲类、黄酮类及2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苜蓿酯类等化学物质^[2,6,7], 现代研究表明这些次生代谢产物在抗菌^[3,4]、抗肿瘤^[5,6]、抗炎^[7]等方面不断显示新的活性。

近年来由于市场对白及的需求量增加, 野生白及资源遭到了掠夺性采挖, 面临灭绝的危险, 市场供

收稿日期: 2019-09-03 接受日期: 2019-12-03

基金项目: 安徽省高校重点科研项目(KJ2018A0789); 安徽省高校优秀青年人才支持计划(gxyq2017209); 安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目(gxbjZD2016106)

* 通信作者 E-mail: ffm1974@mail.ahnu.edu.cn

应主要依靠人工栽培品。众所周知,药用植物次生代谢产物的含量与产地、环境、采收时期及加工等因素关系密切,代谢产物的种类及含量可能会对临床疗效产生影响。已有文献报道白及主要有效成分含量与海拔高度关系密切^[8]、野生与栽培品中天麻素(gastrodin, GAS)和 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苜基]-2-异丁基苹果酸酯(militarine, MIL)含量存在较大差异^[9];同时学者对不同产地白及指纹图谱及多指标含量进行测定的基础上对白及质量评价及栽培品质量研究进行了有益尝试^[9-11]。但对白及不同采收期,差异次生代谢产物及其动态变化规律研究尚未见报道。本文利用 HPLC 建立白及栽培品不同采收期次生代谢产物指纹图谱,结合化学模式识别不同采收期特征差异成分及其动态变化规律,同时采用高效液相色谱-高分辨质谱(HPLC-HRMS)技术对特征差异次生代谢产物进行定性分析,阐明特征差异代谢产物随季节变化规律,以期为指导白及采收期及内在质量评价提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(Agilent, USA)、Shimadzu LC-20AD 型高效液相色谱仪(Kyoto, Japan)、AB Sciex Triple TOF 5600 型高分辨串联质谱仪(AB SCIEX, America)、DV215CD 型 Discovery 电子天平(Ohaus, USA)、JK-250DB 型超声波清洗仪(合肥金尼克机械制造有限公司)、Minispin 型台式离心机(Eppendorf, Germany)。

1.2 材料

引种安徽省南陵县何湾镇野生白及,经安徽中医药高等专科学校汪荣斌副教授鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.,栽培于安徽中医药高等专科学校药苑,栽培 3 年后,自 2014 年 11 月起每间隔半个月采集地下块茎,样品编号信息见表 1。按《中国药典》方法^[1]除去泥土及须根后,置沸水煮 15 min,晒至半干,除去外皮,晒干,粉碎后过 40 目筛,装密封袋置 4 °C 冰箱中储存备用。

表 1 白及样品信息及两个主要差异性成分的含量(mg/g)

Table 1 The detailed information of samples and content(mg/g) of two marker compounds

样品编号 Sample No.	采集时间 Collection date	天麻素 GAS	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苜基]- 2-异丁基苹果酸酯 MIL	季节 Season
S1	2014. 11. 15	3. 51	11. 09	1
S2	2014. 11. 29	3. 73	10. 07	1
S3	2014. 12. 13	4. 22	12. 09	1
S4	2014. 12. 29	4. 87	9. 01	1
S5	2015. 1. 15	5. 68	11. 09	1
S6	2015. 1. 29	4. 13	9. 88	1
S7	2015. 2. 12	3. 99	14. 10	2
S8	2015. 3. 1	4. 86	11. 79	2
S9	2015. 3. 14	5. 46	15. 09	2
S10	2015. 3. 30	5. 21	12. 65	2
S11	2015. 4. 15	5. 67	16. 09	2
S12	2015. 4. 30	6. 79	15. 30	2
S13	2015. 5. 15	4. 28	15. 11	3
S14	2015. 5. 30	4. 05	12. 22	3
S15	2015. 6. 16	3. 40	18. 12	3
S16	2015. 6. 30	2. 07	17. 30	3
S17	2015. 7. 14	2. 24	19. 09	3
S18	2015. 7. 31	2. 57	18. 96	3
S19	2015. 8. 17	2. 38	20. 14	4

续表 1 (Continued Tab. 1)

样品编号 Sample No.	采集时间 Collection date	天麻素 GAS	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]- 2-异丁基苹果酸酯 MIL	季节 Season
S20	2015. 8. 28	2. 19	22. 58	4
S21	2015. 9. 15	1. 84	24. 09	4
S22	2015. 9. 29	2. 51	19. 01	4
S23	2015. 10. 14	2. 25	22. 09	4
S24	2015. 11. 2	3. 26	17. 88	4

1.3 试药和试剂

GAS(批号:110807-201605)对照品购自中国食品药品检定研究院、MIL(批号:lot16122231)对照品购自上海远慕生物科技有限公司;乙腈、甲酸为色谱级(TEDIA, USA)、水为实验室自制超纯水、其余试剂为市售分析纯。

2 方法和结果

2.1 供试品溶液的制备

精密称取白及粉末约 0.5 g,置于 15 mL 具塞离心管中,精密加入 60% (V:V) 甲醇-水溶液 10 mL,控制超声温度不超过 20 °C,超声 1 h 后离心处理(3 000 rpm)5 min,上层溶液过 0.22 μm 微孔有机滤膜,取续滤液,备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定 GAS、MIL 对照品适量,分别置于 10

mL 棕色容量瓶中,加 60% (V:V) 甲醇-水溶液定容至刻度。精密量取 GAS、MIL 对照品溶液适量混合,摇匀后为混合对照品溶液,分别过 0.22 μm 微孔有机滤膜,取续滤液,备用。

2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈ column(50×4.6 mm,1.8 μm),保护柱:Agilent SB-C₁₈ column(5×2.1 mm,1.8 μm);流动相为溶剂 A:0.1% 甲酸乙腈,溶剂 B:0.1% 甲酸水溶液;梯度洗脱,0~10 min,溶剂 A 由 5%→20%,10~18 min,溶剂 A 由 20%→30%,18~23 min,溶剂 A 30%,23~30 min,溶剂 A 由 30%→33%,30~45 min,溶剂 A 由 33%→60%;流速 0.3 mL/min,柱温 30 °C,检测波长 285 nm,进样量 5 μL,典型色谱图如图 1 所示。

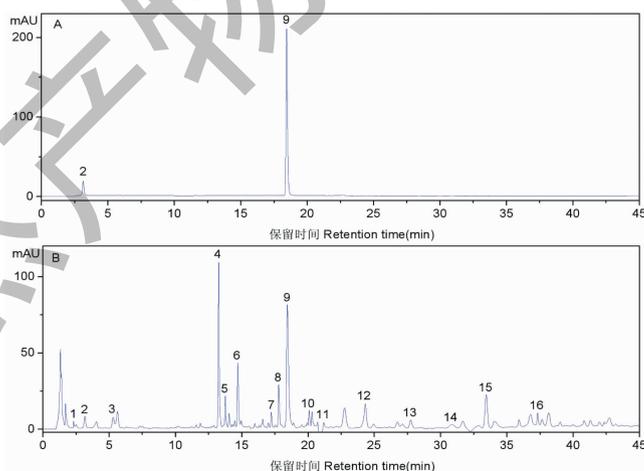


图 1 混合对照品(A)及白及典型样品(B) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of two mixed standards(A) and representative HPLC chromatograms of sample(B)

注:1. 天麻素;2. 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯。Note:1. GAS,2. MIL.

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验

取 S5 样品,按上述条件制备供试品溶液,重复进样 6 次,记录各共有峰峰面积及保留时间,以 MIL

色谱峰为参照,各共有峰相对峰面积及相对保留时间的 RSD 值均小于 0.21% 和 0.72%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验

取 S5 样品,按上述条件制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录各共有峰峰面积和保留时间,以 MIL 色谱峰为参照,各共有峰相对峰面积及相对保留时间 RSD 值分别小于 0.25% 和 1.24%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验

取 S5 号样品 6 份,按上述条件制备供试品溶液,按上述条件获取 6 份供试品指纹图谱,记录各共有峰峰面积和保留时间,以 MIL 色谱峰为参照,各

共有峰相对峰面积及相对保留时间 RSD 值分别小于 0.46% 和 1.57%,表明重复性符合指纹图谱要求。

2.5 指纹图谱的建立

白及样品按上述方法处理并进行测定。数据以 AIA 格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件(中国药典委员会,2004A 版),以 S1 号样品为参照,时间窗宽度为 0.1,采用中位数法,经多点校正、自动匹配共生成共有峰 16 个。285 nm 检测波长下指纹图谱叠加图如图 2。

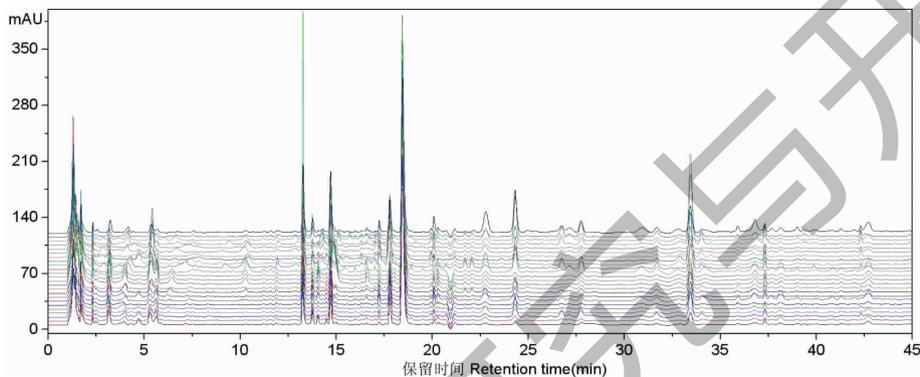


图 2 24 批白及样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of the 24 batches of *Bletilla striata* samples

2.6 定量分析

参照文献^[9-11],利用外标一点法对 GAS 和 MIL 进行定量计算,结果见表 1 所示。由表 1 直观分析可见,GAS 在 Class1 (S1 ~ S6,冬季)和 Class2 (S7 ~ S12,春季)样品中的含量高于 Class3 样品 (S13 ~ S18,夏季)和 Class4 (S19 ~ S24,秋季),GAS 在冬、春季节平均含量是夏、秋季节的 1.76 倍,全年最高含量是最低含量的 3.69 倍;而 MIL 则相反,其在 Class3 和 Class4 样品中的含量高于 Class1 和 Class2 样品,MIL 在夏、秋季节的平均含量是冬、春季节的 1.53 倍,全年最高含量是最低含量的 2.67 倍。

2.7 液质条件及特征峰定性分析

使用岛津 Shimadzu LC-20AD 型 HPLC 进行色谱分离,色谱条件同“2.3”项;LC-Q-TOF-MS 系统,采用电喷雾离子源(ESI)进行正(PI)、负离子(NI)模式全扫描,扫描范围 m/z 50 ~ 1 500;喷雾电压 4.5 kV,离子源温度 500 °C,去簇电压 100 V,气帘气压 (N_2): 35 psi,雾化气压 (N_2): 55 psi,辅助气压 (N_2): 60 psi。

应用 LC-Q-TOF-MS 技术,按上述色谱分离条件

及质谱条件,对白及指纹图谱中 7 个特征峰进行分析,结果见表 2 所示。利用 Agilent Mass Hunter version B.0400 软件对总离子流图中的准分子离子峰进行提取,色谱峰 2、9 利用化学对照品比对;其余化合物利用精确相对分子质量、二级碎片信息和文献报道比对^[13]进行初步鉴定。结果显示特征峰按化学结构分为葡糖糖苷类:色谱峰 2(4-羟甲基苯基-葡萄糖苷,gastrodin);苯酯类:色谱峰 4(4-(葡萄糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯,blestroside)、色谱峰 9(1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯,militarine)、色谱峰 11(1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-(4-O-肉桂酰基)葡萄糖苷,gymnoside V);萜类:色谱峰 12(3,5-二羟基-1-甲氧基-9,10 二氢菲,coelonin)、色谱峰 14(苄基氢菲 3,benzylhydrophenanthrene 3)、色谱峰 13(4-甲氧基菲-2,7-二醇,4-methoxyphenanthrene-2,7-diol)。

2.8 多元统计分析

为更加客观、直接的阐明不同采集时间白及次生代谢产物的差异性,利用 SIMCA-P 软件进行 PCA、PLS-DA 分析,其得分图可以提供可视化的白

表 2 特征色谱峰初步定性结果

Table 2 The tentative identification information of characteristic peaks

峰号 Peak No.	保留时间 t_R	分子式 Formula	模式 Mode	误差 Error (ppm)	二级碎片 MS ² ion	鉴定结果 Identification
2	3.18	C ₁₄ H ₁₉ O ₉	[M + COOH] ⁻ 331.102 2	-3.3	285.098 2, 123.043 7 ^[15]	Gastrodin
4	13.26	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	[M-H] ⁻ 457.171 1	-0.9	431.095 1 ^[12,15]	Blestroside
9	18.45	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₇	[M-H] ⁻ 725.266 7	0.8	457.171 7 ^[12,15]	Militarine
11	21.18	C ₄₉ H ₆₂ O ₂₄	[M-H] ⁻ 1 033.355 7	-0.1	585.199 1, 765.261 2, 853.296 3	Gymnoside V
12	24.86	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	[M-H] ⁻ 241.085 9 [M + H] ⁺ 243.099 8	-4.5/ -6.9	198.063 2, 211.044 6, 209.056 7, 228.076 4	Coelonin
13	27.76	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	[M-H] ⁻ 239.071 3	-1.8	167.050 4, 168.066 0, 196.047 8	4-methoxyphenanthrene-2,7-diol
14	31.68	C ₂₁ H ₁₆	[M + K] ⁺ 307.088 4	0.4	-	Benzylhydrophenanthrene 3

及样品分类情况,载荷图能够直观的分析对白及样品分类起主要作用的变量信息。将白及 24 个采集时间点的 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积导入 SIM-CA-P 11.5 软件,经归一化处理后进行 PCA 分析,结果见图 3。由图 3 可知,不同采集时间白及样品 Class1、Class2 与 Class3 和 Class4 区分良好,但 Class3 和 Class4 难以达到有效区分,表明不同采集时间白及次生代谢产物存在差异。其中 Class1 样

品(S1 ~ S6,冬季)和 Class2(S7 ~ S12,春季)分布在得分图左侧,t[1]象限负值区域,说明冬、秋两季白及样品次生代谢产物与夏、秋两季差异明显;Class3 样品(S13 ~ S18,夏季)和 Class4(S19 ~ S24,秋季)分布在得分图右侧,t[1]象限正值区域,但夏季和秋季白及样品彼此交叉,未能达到有效区分,说明夏、秋两季白及样品内次生代谢产物差异不明显。

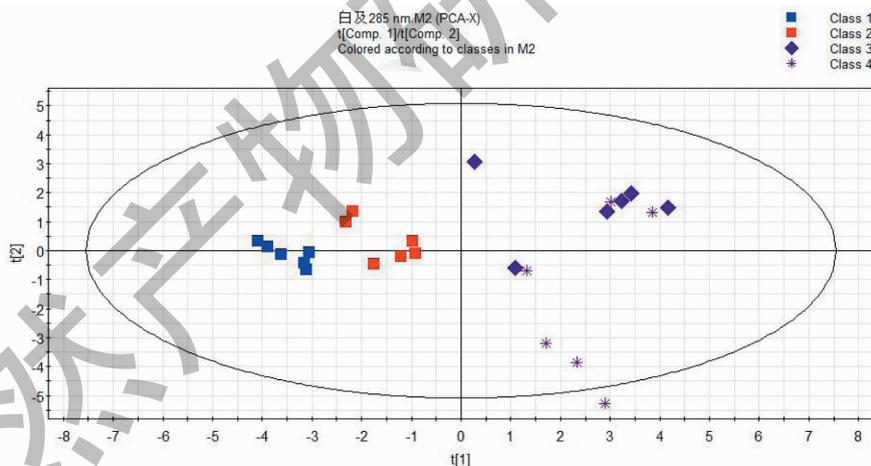


图 3 同采集时间白及样品 PCA 得分图

Fig. 3 Scores plot of PCA of *Bletilla striata* samples

为明确不同采集时间白及样品次生代谢产物的差异性化学成分,缩小组内差异,进一步采用有监督模式的偏最小二乘判别分析(PLS-DA),建立不同采集时间白及分类模型。由 PLS-DA 得分图,由图 4A 可知,Class1 样品(S1 ~ S6,冬季)分布在最右侧,t[1]象限正值和 t[2]象限负值所组成的区域内;Class2(S7 ~ S12,春季)分布在得分图右侧,t[1]象

限正值与 t[2]象限正值所组成的区域内,Class1 和 Class2 以及与其他样品区分效果较好,说明 Class1 和 Class2 之间以及与其他分类样品中次生代谢产物差异明显;Class3 和 Class4 分布在得分图左侧,t[1]象限负值区域,同样彼此交叉,未能实现有效区分,说明 Class3 和 Class4 次生代谢产物差异不明显。

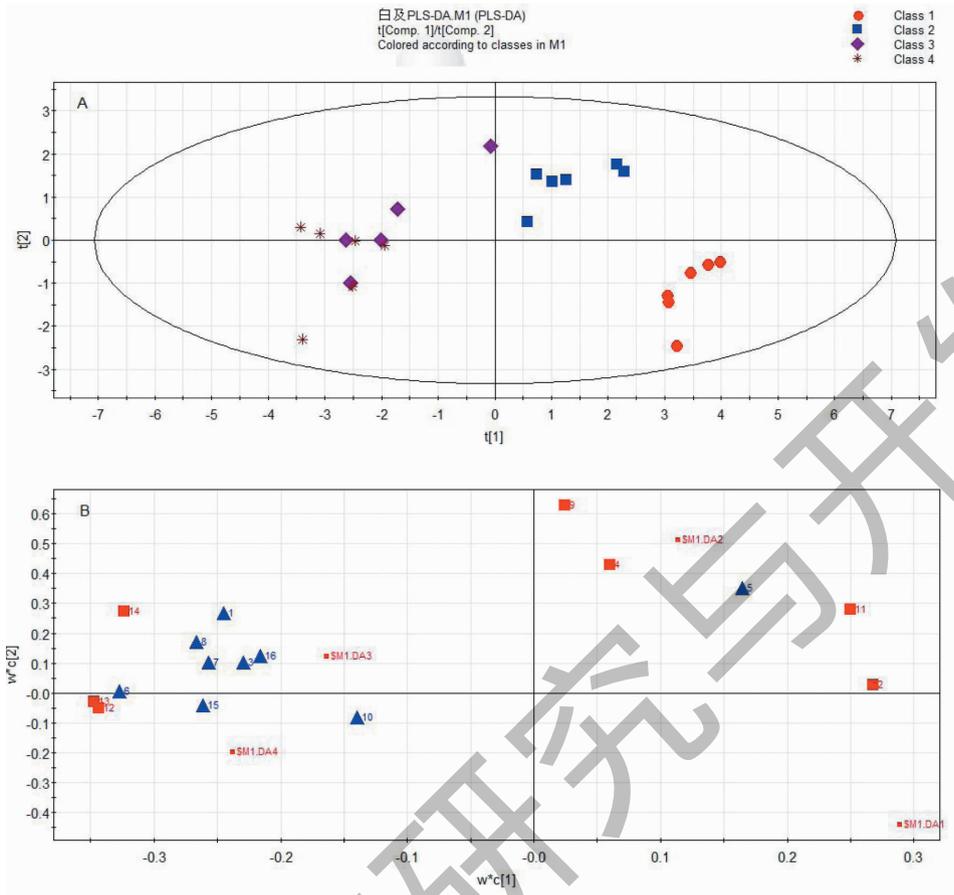


图 4 不同采集时间白及样品 PLS-DA 得分图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 4 Scores plot of PLS-DA and Loading plot of PLS-DA of *Bletilla striata* samples

由载荷图 4B 可知,在 $t[1]$ 方向,变量色谱峰 2 (gastrodin)、11 (gymnoside V) 对样品向 $t[1]$ 正值方向分布起到积极作用,说明色谱峰 2、11 由 $t[1]$ 正值向负值方向其峰面积有不断变小的趋势;而变量色谱峰 12 (coelonin)、13 (4-甲氧基菲-2,7-二醇)、14 (苜基氢菲 3) 对样品向 $t[1]$ 负值方向分布起到积极作用,其峰面积由 $t[1]$ 正值向负值方向其峰面积有不断变大的趋势,与 GAS 含量分析结果一致。在 $t[2]$ 方向,变量 4 (blestroside)、9 (militarine) 对样品向 $t[2]$ 正值方向分布起到积极作用,是引起样品在 $t[2]$ 方向分散的主要变量。有图 4B 可见,Class3 和 Class4 分布相互交叉,区分效果不明显,表明上述变量在 Class3 和 Class4 两类中差异不明显,这与《中国药典》记载白及夏、秋季节采集的要求^[1] 相一致。综上,白及样品在由冬季-春季-夏、秋季生长过程中菲类化合物 (4-甲氧基菲-2,7-二醇、benzylhydrophenanthrene 3、coelonin) 的含量有不断增加的趋势;糖苷类化合物 (gastrodin) 及苜酯类化合物 (gym-

noside V) 的含量则不断变小的趋势,在冬、春季含量高;苜酯类化合物 (blestroside、militarine) 的含量有不断升高的趋势,在夏、秋季含量最高。

所建立 PLS-DA 模型的 $R^2X = 0.936$, $R^2Y = 0.851$, $Q^2 = 0.828$,表明模型稳定,预测能力强。上述变量色谱峰 2 (gastrodin)、11 (gymnoside V)、12 (coelonin)、13 (4-甲氧基菲-2,7-二醇)、14 (benzylhydrophenanthrene 3)、4 (blestroside)、9 (militarine) 的 Variable Important Plot (VIP) 值均大于 1,根据变量 VIP 值大于 1 作为特征变量的原则,上述 7 个变量可作为白及在不同采集时期重要特征变量以及不同采集时期的主要差异化学成分,这些差异性化学成分为不同采集时期白及内在质量差异的物质基础。

3 讨论

众所周知,药用植物次生代谢产物是药效发挥的主要物质载体,积极探索并阐明药材在不同采收时间次生代谢产物累积差异及药材质量的形成规律具有重要意义。因此,针对白及栽培品不同采收时

期样品建立 HPLC 指纹图谱,按采收季节对样品进行分类,结合化学计量学分析方法,发现不同采收期样品在 PCA、PLS-DA 分类中 Class1 样品、Class2 样品与夏、秋两季样品能有效区分;而 Class3 和 Class4 样品彼此交叉严重,难以获得有效区分,说明 7 个特征变量成分在夏、秋两季差异不如与春、冬两季明显。需要说明的是利用二极管阵列检测器同时检测 254、270、285 nm 指纹图谱,254、270 nm 下无监督 PCA 分类模式难以将不同季节样品进行有效区分,故本文采用 285 nm 建立指纹图谱。7 个特征变量中色谱峰 2、11、12、13 和 14 对样品在不同季节分布影响显著;变量色谱峰 4 和 9 主要是引起样品在 t [2] 方向分散的主要特征变量。有文献报道在大鼠血清中检测到 MIL、GAS 和 blestroside 原型产物^[14,15],说明这些入血成分与不同临床药效可能存在一定的相关性。

本研究采用 HPLC 技术建立化学指纹图谱,结合化学计量学方法得到 7 个特征变量,并利用 LC-HRMS 联用技术初步鉴定了 7 个特征变量,阐明了不同采收时期白及差异性化学物质基础,并初步理清了 7 个特征化学成分在不同季节含量的变化趋势,其结果与《中国药典》中描述的夏、秋季采集相一致,在一定程度上验证了夏、秋季采集的合理性;随着白及次生代谢产物不断被发现以及这些单体化合物在抗肿瘤、抗炎、抗菌等方面的作用不断被阐明,根据 7 个特征化学成分动态变化规律以及临床治疗目的,提高这些药效成分在白及药材中的含量,保证临床用药效果,为更加科学的控制采收时期和合理的制订白及药材质量标准提供理论依据和参考。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典;第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:103.
- Zhao YX, Deng YR, Zhang XJ, et al. Advances in chemical constituents and pharmacology of Genus *Bletilla* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1137-1145.
- Qian CD, Jiang FS, Yu HS, et al. Antibacterial biphenanthrenes from the fibrous roots of *Bletilla striata* [J]. J Nat Prod, 2015, 78: 939-943.
- Jiang S, Wan K, Lou HY, et al. Antibacterial bibenzyl derivatives from the tubers of *Bletilla striata* [J]. Phytochemistry, 2019, 162: 216-223.
- Sun AJ, Pang SQ, Wang GQ. Separation of chemical constituents from *Bletilla striata* and their antitumor activities [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2016, 47(1): 35-38.
- Sun AJ, PANG SQ, Wang GQ. Chemical Constituents from *Bletilla striata* and anti-tumour activities [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2016, 51: 101-104.
- Lin CW, Hwang TL, Chen FA, et al. Chemical constituents of the Rhizomes of *Bletilla formosana* and their potential anti-inflammatory activity [J]. J Nat Prod, 2016, 79: 1911-1921.
- Chi MY, Huang Y, Li YJ, et al. Correlation between altitude and nine kinds of main components in *Bletilla Rhizoma* from guizhou province [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2016, 22(16): 36-39.
- Zhou HT, Chen ZM, Zhao YF, et al. Study on the quality of wild and cultivated *Bletilla striata* from different producing areas [J]. Asia-Pac Trad Med (亚太传统医药), 2019, 15(3): 50-54.
- Chi MY, Huang Y, Li YJ, et al. Fingerprint of *Bletillae Rhizoma* by UPLC coupled with chemometrics methods [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2016, 22(14): 51-56.
- Wang AM, Yan Y, Lan B, et al. Simultaneous determination of nine chemical marks of *Bletillae Rhizoma* by ultra performance liquid chromatography [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 2051-2055.
- Mei CY, Xiang WY, Yang W, et al. Simultaneous determination of six components in *Bletilla striata* by UPLC-MS/MS [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 1233-1237.
- Tang YF, Ruan CF, Ying C, et al. Research progress on chemical constituents and medical functions in plants of *Bletilla* Rehb. f. [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 2864-2872.
- Chen H, Wang CQ, Xia T, et al. Study on the absorbable components and metabolism of *Bletilla striata* effective parts in the intestine based on rat intestinal perfusion model [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 772-778.
- Yang C, Xia T, Wang CQ, et al. Using the UPLC-ESI-Q-TOF MS^E method and intestinal bacteria for metabolite identification in the non-polysaccharide fraction from *Bletilla striata* [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(11): e4637.