

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201703045

引文格式: 吴林菁, 冯华, 吴红梅, 等. 酢浆草的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(9):1195–1203  
WU LJ, FENG H, WU HM, et al. UPLC fingerprint of *Oxalis corniculata* [J]. *Guihaia*, 2017, 37(9):1195–1203

## 酢浆草的 UPLC 指纹图谱研究

吴林菁<sup>1,2</sup>, 冯 华<sup>3</sup>, 吴红梅<sup>2</sup>, 汤容容<sup>2</sup>, 王祥培<sup>2\*</sup>

(1. 贵州医科大学, 贵阳 550025; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 3. 遵义市药品检验所, 贵州 遵义 563000)

**摘要:** 酢浆草 (*Oxalis corniculata*) 为酢浆草科植物, 资源分布广泛, 全草均可入药。该研究为建立酢浆草超高效液相色谱指纹图谱, 采用乙腈-0.05% 醋酸水溶液梯度洗脱, 以 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量为 10 μL, 检测波长 280 nm, 柱温 25 °C 等色谱条件, 研究了 15 个不同产地 30 批酢浆草药材的指纹图谱。结果表明: 确立了 24 个共有峰, 相似度评价软件计算 30 批样品的相似度为 0.839~0.987; 应用聚类分析对各样品指纹图谱的共有峰峰面积统计分析得出, 除贵州剑河、贵州印江及贵州天柱 8 月 3 批样品外, 其余 27 批样品共有化学成分的含量较为接近。该研究结果表明建立的酢浆草 UPLC 指纹图谱方法简便、迅速、可靠, 较其 HPLC 指纹图谱有更高的灵敏度和分辨率, 极大地缩短了检测时间, 可用于酢浆草质量评价的快速分析。

**关键词:** 酢浆草, 超高效液相色谱, 指纹图谱, 聚类分析, 质量评价

中图分类号: Q946, R282.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)09-1195-09

## UPLC fingerprint of *Oxalis corniculata*

WU Lin-Jing<sup>1,2</sup>, FENG Hua<sup>3</sup>, WU Hong-Mei<sup>2</sup>, TANG Rong-Rong<sup>2</sup>, WANG Xiang-Pei<sup>2\*</sup>(1. *Guizhou Medical University*, Guiyang 550025, China; 2. *Guiyang College of Traditional Chinese Medicine*, Guiyang 550002, China; 3. *Zunyi Institute for Drug Control*, Zunyi 563000, Guizhou, China)

**Abstract:** In order to establish fingerprint analysis by UPLC for the quality control of *Oxalis corniculata*, and to provide comprehensive evaluation of their quality in different regions, the fingerprint of *O. corniculata* was established by UPLC. The similarity evaluation and cluster analysis were used to deal with the experimental data, in order to find out the similarities and differences among the 30 batches of *O. corniculata* from 15 different areas. The specific chromatogram of *O. corniculata* was obtained, and 24 common peaks were identified. Similarities of the 30 batches of samples were

收稿日期: 2017-03-31 修回日期: 2017-08-02

**基金项目:** 贵州省科技合作项目 (黔科合 LH 字 [2016]7368); 贵州省大学生创新创业训练计划项目 (201610660031); 遵义市创新人才团队培养项目 (遵市科合 [2016]7 号); 贵州省教育厅科技拔尖人才支持项目 (黔教合 KY 字 [2016]073); 贵州省高等教育科技创新团队项目 (黔教合人才团队字 [2014]31) [Supported by Science and Technology Cooperation Program of Guizhou Province of China (LH [2016]7368), Students' s Platform for Innovation and Entrepreneurship Training Program of Guizhou Province (201610660031), Innovative Talent Team Training Program of Zunyi City in Guizhou Province ([2016]7), Top Science and Technology Talent Support Program of Educational Department of Guizhou Province (KY [2016]073); Higher Education Science and Technology Innovation Team of Guizhou Province ([2014]31)].

**作者简介:** 吴林菁 (1987-), 贵州印江人, 硕士, 讲师, 主要从事中药资源鉴定与质量控制研究, (E-mail) 1252317471@ qq. com。

**通信作者:** 王祥培, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药及民族药品品质与资源开发研究, (E-mail) wxp0123@ 126. com。

0.839–0.987。The results of cluster analysis were the 27 batches of samples content of chemical components were closer, in addition to samples of Jianhe County, Yinjiang County of Guizhou Province and Tianzhu County of Guizhou Province in August. The establishment of UPLC fingerprint of *O. corniculata* can provide a more comprehensive and faster reference for the quality control of *Oxalis*. This method is simple, rapid and reliable. It has higher sensitivity and resolution than HPLC and greatly shortens the detection time.

**Key words:** *Oxalis corniculata*, UPLC, fingerprint, cluster analysis, quality evaluation

酢浆草 (*Oxalis corniculata*) 广布于世界各地, 在我国主要分布于华北、华中、华南、贵州、云南和四川等地 (国家中医药管理局中华本草编委会, 1999)。酢浆草主要含黄酮类、有机酸类、酯类等成分, 全草均可入药, 具有清热解毒、平肝定惊、消炎止痛等功效 (贵州省药品监督管理局, 2003; 王海生等, 2011; 刘受先等, 2011)。有文献报道酢浆草具有保护肝损伤 (陈应康等, 2015; Sreejith et al, 2014)、降血脂 (马鸿军等, 2010)、抗焦虑 (Sai et al, 2011) 及抗炎镇痛 (崔珺等, 2015, 2016) 等药理作用。由于我国是一个多地形、多气候、生态环境差异较大的国家, 尤其是西南地区, 特殊的地理环境及气候, 对于资源分布广泛的酢浆草的药效是否会造成一定的影响, 不同生境条件下的酢浆草质量差异是否明显, 都是一个值得探讨的问题。前期研究已发现鲜品酢浆草的横切面显微特征可作为鲜品酢浆草的显微鉴别依据, 但将其粉末显微特征作为鉴别依据还值得商榷 (吴林菁等, 2013)。课题组已建立了 10 批贵州产酢浆草药材及其混淆品的 HPLC 指纹图谱 (冯华等, 2014)。但是, 由于其分析时间过长、耗能高、分离效率较低, 且样品量较少, 未能较为全面的表征分布广泛的酢浆草药材成分。因此, 仅通过 HPLC 的指纹图谱研究结果来判定药材化学成分的整体性还不够科学合理, 还需借助更为快速、准确的研究方法对酢浆草质量进行综合评价 (刘幼嫔等, 2014; 高青等, 2016)。

超高效液相色谱指纹图谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC), 是一种以超细色谱柱填料为核心的新型色谱分离分析技术, 相较于常规 HPLC, UPLC 具有更好的检测分析效果 (刘国雄等, 2017; 周新等, 2008; 曾慧婷等, 2017)。因此, 为了更为全面的表征酢浆草药材成分, 探索资源分布广泛的酢浆草药材专属性的指纹图谱特征, 本研究建立了 15 个不同产地 30 批酢浆草药材的 UPLC 指纹图

谱测定方法, 为酢浆草的快速、准确质量评价提供参考依据, 也为今后酢浆草的开发利用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器、试剂与材料

Agilent-1290 型超高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), AG135 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。甲醇为分析纯 (天津科密欧试剂公司), 乙腈为色谱纯 (美国天地试剂公司), 水为娃哈哈纯净水。酢浆草药材主要采自贵州及其他省份, 所有材料经贵阳中医学院王祥培教授鉴定确定为酢浆草科酢浆草 (*Oxalis corniculata*) 植物。具体产地见表 1。

### 1.2 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> (1.8 μm, 2.1 mm × 100 mm) 色谱柱; 以乙腈 (A)–0.05% 醋酸水溶液 (B) 为流动相。梯度洗脱程序如下: 0~2.5 min, 95%~83% B; 2.5~6 min, 83%~78% B; 6~8 min, 78%~76% B; 8~10 min, 76%~74% B; 10~13 min, 74%~63% B; 13~18 min, 63%~29% B; 18~21 min, 29%~0% B。检测波长为 280 nm, 柱温为 25 °C, 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 2 μL。

### 1.3 制备供试品溶液

精确称取酢浆草粉末 1 g (过 6 号筛), 加入乙醇 50 mL, 超声提取 3 次, 第 1、第 2 次每次提取 30 min, 第 3 次为 20 min, 滤过, 取续滤液, 合并, 水浴蒸干, 用乙醇溶解残渣并定容至 10 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液即得供试品溶液。

### 1.4 方法学考察

1.4.1 精密度 取产地为北京的酢浆草 (S1 号) 供试品溶液, 按“1.2 色谱条件”连续进样 6 次, 以共有色谱峰 (15 号) 为参比峰, 分别计算共有色谱峰的相对

表 1 30 批酢浆草药材样品的来源和相似度

Table 1 Resources and similarity of 30 batches of *Oxalis corniculata*

编号 No.	采收时间 (年. 月. 日) Harvest time (Year. Month. Day)	采收地点 Harvest place	海拔 Altitude (m)	相似度 Similarity
S1	2011.11.9	北京安捷伦科技大学旁 Near by Beijing Agilent Technologies University	40.9	0.968
S2	2011.8.1	贵州省天柱县清浪村路边 Qinglang Village roadside of Tianzhu County of Guizhou Province	300.3	0.901
S3	2011.10.1	贵州省天柱县清浪村路边 Qinglang Village roadside of Tianzhu County of Guizhou Province	300.3	0.933
S4	2011.10.7	贵州省剑河县城郊 Suburbs of Jianhe County of Guizhou Province	486.2	0.949
S5	2011.10.7	贵州省剑河县城郊 Suburbs of Jianhe County of Guizhou Province	487.5	0.964
S6	2011.10.7	贵州省剑河县城郊 Suburbs of Jianhe County of Guizhou Province	490.1	0.959
S7	2011.10.9	四川省成都中医药大学温江校区 Wenjiang campus of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine of Sichuan Province	538.0	0.931
S8	2011.10.11	贵州省都匀市河边 Riverside of Duyun City of Guizhou Province	772.4	0.987
S9	2011.10.11	贵州省都匀市百子桥 Baizibridge of Duyun City of Guizhou Province	780.2	0.973
S10	2011.10.11	贵州省都匀市西山公园 Xishan Park of Duyun City of Guizhou Province	789.5	0.940
S11	2011.10.13	贵州省金沙县罗家湾镇 Luojiawan Town of Jinsha County of Guizhou Province	841.3	0.973
S12	2011.10.13	贵州省金沙县石板水镇 Shibanshui Town of Jinsha County of Guizhou Province	889.9	0.973
S13	2011.10.4	贵州省遵义市凤凰山 Phoenix Mountain of Zunyi City of Guizhou Province	884.3	0.960
S14	2011.8.3	贵州省贵阳市乌当区东风镇 Dongfeng Town of Wudang District of Guiyang of Guizhou Province	989.4	0.911
S15	2011.10.1	贵州省贵阳市乌当区东风镇 Dongfeng Town of Wudang District of Guiyang of Guizhou Province	989.4	0.971
S16	2011.10.11	贵州省龙里县人民路 People's Road of Longli County of Guizhou Province	1 076.0	0.986
S17	2011.10.11	贵州省龙里县火车站 Train station of Longli County of Guizhou Province	1 081.0	0.918
S18	2011.7.28	贵州省龙里县湾寨中学 Wanzai Middle School of Longli County of Guizhou Province	1 102.0	0.973
S19	2011.10.16	贵州省清镇市人民广场 People's Square of Qingzhen City of Guizhou Province	1 245.5	0.916
S20	2011.10.16	贵州省清镇市市政府花园 Garden of City Government of Qingzhen of Guizhou Province	1 254.8	0.982
S21	2011.10.16	贵州省清镇市小区花园 Garden in residential quarters of Qingzhen City of Guizhou Province	1 260.7	0.971
S22	2011.10.22	贵州省兴义市万峰林 Wanfenglin of Kingyi City of Guizhou Province	1 179.0	0.975

续表1

编号 No.	采收时间 (年.月.日) Harvest time (Year. Month. Day)	采收地点 Harvest place	海拔 Altitude (m)	相似度 Similarity
S23	2011.10.22	贵州省兴义市云南街 Yunnan Street of Xingyi City of Guizhou Province	1 280.9	0.963
S24	2011.10.22	贵州省兴义市坪东大道 Pingdong Road of Xingyi City of Guizhou Province	1 282.8	0.934
S25	2011.10.9	贵州省六枝县小区花园 Garden in residential quarters of Liuzhi County of Guizhou Province	1 344.0	0.981
S26	2011.10.9	贵州省六枝县火车站 Train station of Liuzhi County of Guizhou Province	1 355.1	0.967
S27	2011.10.9	贵州省六枝县火车站附近 Near by the train station of Liuzhi County of Guizhou Province	1 390.1	0.949
S28	2011.10.9	贵州省安顺市职业技术学院 Anshun Vocational College of Guizhou Province	1 379.0	0.955
S29	2011.9.25	云南省石林风景区 Stone Forest Scenic Area of Yunnan Province	1 769.0	0.971
S30	2011.10.5	贵州省印江县天堂镇 Tiantang Town of Yinjiang County of Guizhou Province	600.0	0.839

保留时间及相对峰面积。考察结果:各共有峰的相对峰面积 RSD 及相对保留时间均 $<3\%$ ,符合指纹图谱的要求,表明 UPLC 仪器精密度高。

**1.4.2 重复性** 取 S8 号(贵州都匀)药材,制备供试品溶液 6 份,按“1.2 色谱条件”进行测定,以共有色谱峰(15 号)为参比峰,分别计算共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。考察结果表明各共有峰的相对保留时间及相对峰面积 RSD 均 $<2\%$ ,表明该方法重复性良好,适用于酢浆草 UPLC 指纹图谱的分析。

**1.4.3 稳定性** 取 S25 号(贵州六枝)供试品,按照“1.2 色谱条件”分别在 0、1、2、6、12、24 h 进样测定,以共有色谱峰(15 号)为参比峰,分别计算共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。考察结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 $<3\%$ ,说明符合指纹图谱的要求。这表明所制备的供试品溶液在 24 h 内稳定。

## 2 结果与分析

### 2.1 指纹图谱的建立

取 30 批酢浆草供试样品,按照“1.3”的方法制备供试品溶液,在“1.2”的色谱条件下分别进行样品检测,并记录 UPLC 色谱图。将 30 批酢浆草药材

的 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)软件中,参照 S1 号样品的图谱,设定时间漂移值为 0.1,用中位数法自动匹配谱峰,生成对照指纹图谱。叠加图谱及对照图谱如图 1 所示。在各批次样品的图谱中,选择峰位相对居中,峰面积较大,且所有样品共有的 15 号色谱峰为参比峰,以其保留时间为 1,标定了 24 个共有指纹峰,并对各共有色谱指纹峰的相对保留时间及相对峰面积进行计算,结果 RSD 值均 $<3.0\%$ ,符合指纹图谱的分析要求。如表 2、表 3 所示。

### 2.2 相似度评价

设定对照图谱相似度为 1,计算得出各样品 UPLC 图谱的相似度(表 1)。15 个产地 30 批酢浆草样品的相似度为 0.839~0.987,表明本研究各批次酢浆草样品的质量相对稳定,叠加 UPLC 特征图谱(图 1)表明:不同产地的酢浆草化学成分基本一致,但在量上各成分却存在一定差异。根据相似度计算结果得出,样品 S30(产地贵州印江)相似度较低,其余 14 个产地 29 批样品相似度则较高(相似度 $>0.9$ )。

### 2.3 聚类分析

聚类分析是一种探索性的数据分析手段,目前已广泛应用于中药鉴别、质量评价和品种分类等方面的统计分析(徐锋等,2013)。

表 2 30 批酢浆草指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in fingerprint of 30 batches of *Oxalis corniculata*

编号 Code	相对保留时间 Relative retention time (min)																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15(S)	16	17	18	19	20	21	22	23	24
S1	0.053	0.109	0.216	0.281	0.333	0.356	0.421	0.501	0.659	0.733	0.772	0.825	0.911	0.989	1.000	1.077	1.158	1.231	1.567	1.615	1.709	1.943	2.211	2.303
S2	0.059	0.119	0.228	0.289	0.333	0.358	0.422	0.508	0.658	0.735	0.773	0.831	0.915	0.991	1.000	1.081	1.159	1.232	1.568	1.612	1.708	1.946	2.212	2.302
S3	0.052	0.111	0.215	0.279	0.332	0.356	0.432	0.505	0.700	0.734	0.782	0.826	0.912	0.996	1.000	1.079	1.157	1.233	1.565	1.611	1.711	1.944	2.209	2.304
S4	0.052	0.105	0.215	0.280	0.332	0.357	0.421	0.509	0.657	0.733	0.773	0.825	0.910	0.992	1.000	1.076	1.158	1.235	1.566	1.613	1.710	1.945	2.213	2.301
S5	0.061	0.207	0.313	0.310	0.333	0.357	0.420	0.508	0.661	0.736	0.775	0.827	0.913	0.990	1.000	1.075	1.156	1.232	1.566	1.623	1.709	1.943	2.214	2.312
S6	0.053	0.110	0.215	0.282	0.333	0.358	0.421	0.506	0.670	0.743	0.773	0.827	0.914	0.988	1.000	1.078	1.155	1.231	1.569	1.611	1.710	1.946	2.211	2.304
S7	0.072	0.131	0.235	0.308	0.352	0.362	0.442	0.508	0.671	0.596	1.021	0.825	0.911	0.989	1.000	1.076	1.159	1.234	1.568	1.612	1.711	1.944	2.210	2.302
S8	0.053	0.012	0.216	0.281	0.333	0.356	0.421	0.509	0.659	0.733	0.772	0.825	0.916	0.987	1.000	1.079	1.156	1.231	1.567	1.614	1.709	1.834	2.211	2.303
S9	0.052	0.109	0.218	0.280	0.335	0.358	0.422	0.508	0.658	0.735	0.781	0.829	0.923	0.991	1.000	1.092	1.157	1.232	1.565	1.612	1.709	1.946	2.212	2.301
S10	0.052	0.112	0.216	0.279	0.452	0.355	0.420	0.511	0.700	0.734	0.772	0.826	0.912	0.987	1.000	1.079	1.158	1.236	1.568	1.613	1.712	1.943	2.209	2.304
S11	0.121	0.105	0.215	0.285	0.332	0.357	0.424	0.598	0.659	0.735	0.793	0.828	0.911	0.988	1.000	1.076	1.156	1.243	1.567	1.613	1.720	1.569	2.210	2.303
S12	0.051	0.107	0.312	0.281	0.336	0.399	0.421	0.505	0.668	0.734	0.773	0.825	0.915	0.990	1.000	1.075	1.168	1.231	1.566	1.618	1.711	1.945	2.211	2.305
S13	0.056	0.236	0.213	0.286	0.333	0.358	0.423	0.508	0.670	0.736	0.561	0.829	0.911	0.989	1.000	1.074	1.159	1.231	1.569	1.616	1.710	1.946	2.212	2.308
S14	0.061	0.121	0.236	0.279	0.342	0.366	0.420	0.510	0.701	0.734	0.772	0.835	0.912	0.987	1.000	1.079	1.172	1.235	1.574	1.611	1.711	1.944	2.209	2.314
S15	0.053	0.109	0.216	0.281	0.333	0.356	0.421	0.509	0.655	0.733	0.771	0.825	0.921	0.986	1.000	1.077	1.157	1.231	1.567	1.611	1.709	1.945	2.223	2.305
S16	0.051	0.107	0.218	0.281	0.338	0.353	0.422	0.507	0.658	0.735	0.773	0.846	0.915	0.991	1.000	1.078	1.157	1.236	1.566	1.612	1.708	1.879	2.212	2.302
S17	0.052	0.111	0.216	0.279	0.332	0.356	0.420	0.509	0.700	0.754	0.771	0.821	0.913	0.987	1.000	1.083	1.158	1.233	1.565	1.610	1.709	1.944	2.209	2.304
S18	0.071	0.135	0.244	0.283	0.352	0.367	0.441	0.509	0.653	0.733	0.776	0.828	0.911	0.989	1.000	1.076	1.160	1.238	1.568	1.611	1.710	1.946	2.213	2.303
S19	0.051	0.107	0.213	0.285	0.333	0.357	0.420	0.506	0.658	0.738	0.773	0.825	0.913	0.990	1.000	1.075	1.156	1.262	1.576	1.610	1.721	1.945	2.211	2.302
S20	0.561	0.131	0.236	0.280	0.353	0.368	0.433	0.508	0.673	0.733	0.773	0.827	0.911	0.988	1.000	1.074	1.155	1.231	1.565	1.611	1.710	1.944	2.210	2.304
S21	0.051	0.106	0.213	0.282	0.330	0.357	0.422	0.505	0.658	0.734	0.774	0.826	0.915	0.991	1.000	1.075	1.159	1.232	1.578	1.611	1.712	1.945	2.211	2.303
S22	0.053	0.109	0.216	0.281	0.333	0.352	0.421	0.509	0.659	0.753	0.772	0.825	0.910	0.989	1.000	1.078	1.158	1.242	1.567	1.613	1.725	1.943	2.212	2.305
S23	0.051	0.105	0.218	0.280	0.333	0.358	0.422	0.520	0.655	0.733	0.781	0.823	0.913	0.995	1.000	1.079	1.157	1.232	1.566	1.612	1.713	1.946	2.212	2.302
S24	0.052	0.111	0.216	0.279	0.334	0.356	0.425	0.509	0.702	0.732	0.775	0.826	0.912	0.989	1.000	1.085	1.158	1.235	1.565	1.611	1.715	1.856	2.209	2.304
S25	0.052	0.105	0.215	0.280	0.332	0.357	0.421	0.509	0.653	0.733	0.773	0.826	0.914	0.992	1.000	1.076	1.163	1.236	1.568	1.614	1.710	1.945	2.223	2.303
S26	0.058	0.107	0.213	0.286	0.336	0.357	0.420	0.507	0.658	0.738	0.772	0.825	0.913	0.990	1.000	1.079	1.158	1.232	1.566	1.621	1.711	1.926	2.211	2.304
S27	0.071	0.131	0.243	0.291	0.353	0.369	0.442	0.508	0.670	0.736	0.773	0.827	0.916	0.989	1.000	1.076	1.160	1.231	1.569	1.611	1.712	1.953	2.210	2.304
S28	0.051	0.107	0.213	0.281	0.333	0.357	0.423	0.512	0.656	0.734	0.782	0.826	0.925	0.990	1.000	1.075	1.158	1.238	1.575	1.615	1.711	1.945	2.211	2.303
S29	0.050	0.111	0.216	0.279	0.330	0.350	0.420	0.509	0.700	0.734	0.772	0.828	0.916	0.989	1.000	1.079	1.178	1.241	1.565	1.611	1.712	1.945	2.209	2.305
S30	0.082	0.135	0.245	0.301	0.352	0.367	0.451	0.523	0.659	0.752	0.792	0.842	0.931	0.923	1.000	1.090	1.158	1.235	1.587	1.516	1.731	1.856	2.230	2.320

指纹图谱的共有色谱峰代表的是不同样品所含有的相同化学成分,其峰面积即为共有化学成分的含量。本研究采用聚类分析的组间连接法,样品间距离的计算方法为余弦距离,以各样品共有峰的峰面积为变量,导入 SPSS20.0 软件对 15 个不同产

地、不同海拔的 30 批酢浆草样品进行系统聚类分析,比较不同产地共有化学成分的含量是否存在差异。聚类结果见图 2。

当判别条件距离为 20 时,系统将 30 批酢浆草样品分为两类,S2、S5、S30 三批样品被归为一类,其余

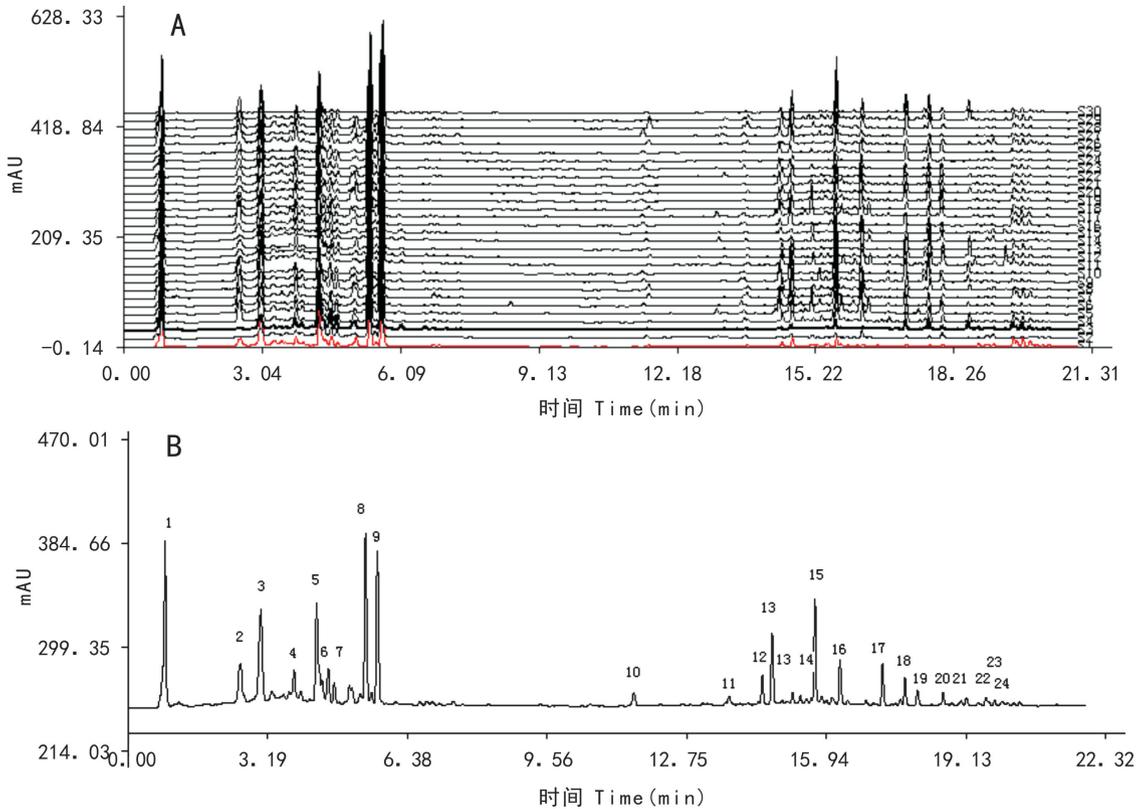


图 1 30 批酢浆草的叠加 UPLC 特征图谱(A)及对照图谱(B)

Fig. 1 UPLC-fingerprint (A) and reference-fingerprint (B) of 30 batches of *O. corniculata*

27 批样品聚为一类。其中, S2(产地贵州天柱)、S5(产地贵州剑河)、S30(产地贵州印江)的相似度依次为 0.901、0.964、0.839, S2 与 S30 较为接近且均较低, 而 S5 的相似度较高。从采收时间看, S2 与其同产地(贵州天柱)10 月采收的样品 S3 并未归在同一类, 从采收地点看 S5 与其同产地(贵州剑河)样品 S4、S6 也未归在同一类。综上所述表明, 贵州天柱产酢浆草受其采收时间的影响, 其共有化学成分的含量会产生一定波动; 而贵州剑河产酢浆草的共有化学成分含量与其产地未呈现一定规律性; 该文中其他产地样品共有化学成分具有很好的相似性, 且含量较为接近。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 提取方法的考察

本研究首先考察了供试品的制备方法, 分别对甲醇、70%甲醇、乙醇、70%乙醇四种提取溶剂进行了考察, 结果以乙醇提取的样品溶液图谱出峰信息

量较大, 且基线较为平稳。其次考察了回流和超声提取两种提取方式, 结果两种提取方式的 UPLC 色谱图差异不明显, 但考虑回流提取较为繁琐, 耗时较长, 最终确定超声方法进行提取; 同时还考察了超声提取 30 min(超声 1 次)、80 min(超声 3 次, 第 1、第 2 次每次为 30 min, 第 3 次 20 min)、120 min(超声 4 次, 每次 30 min) 三个提取提取时间, 结果以超声提取 80 min(超声 3 次, 第 1、第 2 次每次为 30 min, 第 3 次 20 min) 的图谱信息量较丰富、提取较完全。

#### 3.2 色谱条件的优化

本研究考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%醋酸三种流动相体系, 结果以乙腈-0.05%醋酸体系的色谱峰较多, 且峰形和分离度效果都较好。比较了两种超高效液相色谱柱 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub>(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) 和 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub>(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 的色谱图, 结果显示 Agilent ZORBAX RRHD

表 3 30 批酢浆草指纹图谱共有峰相对峰的面积

Table 3 Relative peak areas of common peaks in fingerprint of 30 batches of *Oxalis corniculata*

编号 Code	相对峰面积 Relative peak areas																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15(S)	16	17	18	19	20	21	22	23	24
S1	0.247	0.290	0.129	0.101	0.085	0.244	0.059	0.104	0.021	0.101	0.141	0.140	0.351	0.025	1.000	0.075	0.155	0.084	0.496	0.571	0.316	0.846	0.689	0.705
S2	0.246	0.288	0.131	0.099	0.086	0.249	0.058	0.102	0.023	0.102	0.147	0.141	0.352	0.027	1.000	0.076	0.154	0.090	0.492	0.575	0.315	0.848	0.691	0.706
S3	0.248	0.287	0.135	0.102	0.087	0.255	0.058	0.105	0.025	0.100	0.143	0.142	0.353	0.025	1.000	0.078	0.153	0.083	0.496	0.572	0.317	0.845	0.693	0.708
S4	0.250	0.288	0.134	0.098	0.088	0.246	0.066	0.104	0.031	0.101	0.144	0.139	0.350	0.026	1.000	0.074	0.152	0.081	0.495	0.577	0.314	0.847	0.690	0.713
S5	0.249	0.289	0.132	0.099	0.087	0.253	0.059	0.103	0.022	0.099	0.143	0.138	0.356	0.026	1.000	0.079	0.156	0.079	0.493	0.572	0.314	0.843	0.691	0.706
S6	0.250	0.289	0.135	0.097	0.096	0.251	0.057	0.103	0.024	0.105	0.142	0.137	0.355	0.024	1.000	0.078	0.160	0.080	0.495	0.578	0.318	0.856	0.688	0.708
S7	0.248	0.287	0.130	0.102	0.087	0.255	0.058	0.101	0.021	0.104	0.143	0.142	0.354	0.025	1.000	0.085	0.154	0.084	0.496	0.582	0.327	0.845	0.690	0.705
S8	0.251	0.289	0.136	0.098	0.085	0.246	0.056	0.102	0.021	0.101	0.145	0.139	0.351	0.035	1.000	0.074	0.152	0.081	0.495	0.573	0.316	0.847	0.695	0.703
S9	0.249	0.289	0.132	0.099	0.088	0.253	0.060	0.103	0.022	0.099	0.141	0.138	0.352	0.026	1.000	0.079	0.156	0.079	0.493	0.583	0.314	0.849	0.691	0.709
S10	0.250	0.291	0.135	0.096	0.085	0.251	0.059	0.115	0.025	0.100	0.152	0.138	0.355	0.024	1.000	0.079	0.151	0.082	0.493	0.571	0.317	0.846	0.688	0.706
S11	0.247	0.290	0.129	0.101	0.089	0.244	0.056	0.104	0.024	0.104	0.141	0.140	0.356	0.023	1.000	0.074	0.155	0.084	0.496	0.574	0.315	0.856	0.689	0.705
S12	0.246	0.286	0.131	0.103	0.086	0.249	0.058	0.102	0.021	0.102	0.146	0.140	0.359	0.027	1.000	0.076	0.154	0.080	0.500	0.573	0.314	0.848	0.691	0.708
S13	0.248	0.287	0.131	0.102	0.097	0.255	0.053	0.101	0.022	0.100	0.141	0.142	0.353	0.025	1.000	0.075	0.153	0.083	0.496	0.572	0.317	0.845	0.689	0.708
S14	0.249	0.288	0.134	0.099	0.085	0.246	0.056	0.102	0.023	0.105	0.144	0.139	0.351	0.026	1.000	0.075	0.152	0.081	0.495	0.575	0.316	0.847	0.690	0.712
S15	0.247	0.289	0.142	0.098	0.087	0.253	0.055	0.103	0.021	0.099	0.141	0.138	0.351	0.026	1.000	0.079	0.156	0.079	0.493	0.572	0.314	0.848	0.691	0.706
S16	0.250	0.293	0.135	0.097	0.086	0.251	0.059	0.105	0.022	0.100	0.145	0.139	0.352	0.027	1.000	0.078	0.150	0.080	0.492	0.571	0.318	0.846	0.698	0.706
S17	0.248	0.287	0.131	0.102	0.088	0.255	0.058	0.101	0.025	0.106	0.143	0.142	0.353	0.024	1.000	0.075	0.154	0.083	0.496	0.576	0.317	0.865	0.690	0.725
S18	0.249	0.287	0.144	0.099	0.085	0.246	0.056	0.101	0.021	0.101	0.144	0.139	0.361	0.025	1.000	0.074	0.152	0.081	0.497	0.583	0.316	0.847	0.690	0.703
S19	0.251	0.299	0.132	0.098	0.087	0.253	0.068	0.102	0.023	0.099	0.141	0.138	0.353	0.028	1.000	0.078	0.156	0.079	0.496	0.577	0.314	0.849	0.691	0.706
S20	0.250	0.289	0.135	0.099	0.086	0.251	0.056	0.103	0.021	0.100	0.142	0.139	0.352	0.034	1.000	0.078	0.151	0.082	0.493	0.574	0.319	0.846	0.689	0.705
S21	0.249	0.287	0.132	0.097	0.083	0.253	0.059	0.103	0.022	0.099	0.147	0.138	0.351	0.026	1.000	0.076	0.156	0.079	0.495	0.572	0.316	0.847	0.693	0.704
S22	0.250	0.288	0.138	0.099	0.086	0.251	0.071	0.105	0.022	0.100	0.142	0.139	0.352	0.029	1.000	0.078	0.163	0.080	0.493	0.573	0.317	0.846	0.688	0.706
S23	0.257	0.290	0.129	0.101	0.085	0.244	0.059	0.104	0.026	0.106	0.141	0.140	0.350	0.028	1.000	0.075	0.155	0.084	0.496	0.571	0.318	0.845	0.689	0.705
S24	0.250	0.289	0.135	0.099	0.086	0.251	0.058	0.113	0.031	0.100	0.152	0.139	0.352	0.025	1.000	0.078	0.150	0.085	0.497	0.576	0.317	0.846	0.688	0.703
S25	0.248	0.287	0.131	0.103	0.087	0.255	0.058	0.101	0.022	0.109	0.143	0.142	0.354	0.025	1.000	0.075	0.154	0.083	0.496	0.572	0.314	0.843	0.692	0.705
S26	0.249	0.288	0.134	0.109	0.089	0.246	0.056	0.101	0.027	0.101	0.144	0.139	0.351	0.026	1.000	0.084	0.152	0.081	0.495	0.573	0.312	0.847	0.690	0.704
S27	0.249	0.289	0.132	0.099	0.087	0.253	0.063	0.123	0.021	0.099	0.161	0.138	0.355	0.026	1.000	0.079	0.156	0.089	0.494	0.578	0.324	0.848	0.691	0.706
S28	0.251	0.287	0.155	0.098	0.086	0.251	0.059	0.103	0.024	0.100	0.142	0.139	0.352	0.028	1.000	0.078	0.150	0.080	0.493	0.571	0.317	0.846	0.688	0.701
S29	0.247	0.290	0.129	0.102	0.095	0.244	0.067	0.104	0.023	0.111	0.143	0.141	0.351	0.041	1.000	0.095	0.155	0.084	0.496	0.575	0.316	0.849	0.689	0.705
S30	0.256	0.288	0.141	0.108	0.086	0.249	0.058	0.108	0.035	0.106	0.141	0.140	0.356	0.025	1.000	0.076	0.157	0.086	0.494	0.593	0.336	0.858	0.691	0.711

Eclipse Plus C<sub>18</sub>(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱的分离度和峰形效果较好, 图谱基线较平稳。考察柱温分别为 20、25、30、35 °C 时对色谱峰分离度的影响, 结果在柱温 25 °C 时分离度效果较好。比较流速 0.1、0.15、0.2、0.3、0.5 mL · min<sup>-1</sup> 对色谱图峰形的影

响, 结果以流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup> 的色谱图峰形对称。对 210、230、254、280、310、360 nm 不同波长进行考察, 发现在 280 nm 下图谱的信息较为全面, 各色谱峰响应值较高, 基线较为平稳, 故选择 280 nm 作为检测波长。

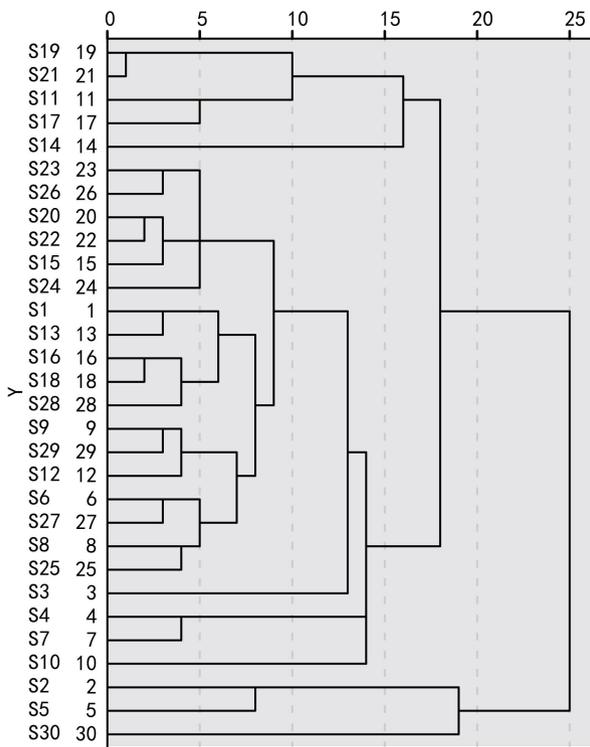


图 2 30 批酢浆草药材 UPLC 指纹图谱  
共有峰峰面积的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis on UPLC fingerprint peak areas of  
common peaks from 30 batches of *Oxalis corniculata*

### 3.3 酢浆草指纹图谱评价

影响药材质量的因素主要包括生态环境、采集时间、生长年限、加工方法和药用部位的选择以及指标性成分或有效成分的含量、贮藏、包装、运输等。由于生态环境和采收时期等的变化,其化学成分常处于一种动态变化中,所以药材质量的影响因素和复杂性增加。目前已有文献报道不同产地酢浆草的刺槐素-6-C- $\beta$ -D-葡萄糖苷含量差异较大(刘受先等,2011),但仅以单一化学成分尚不足以说明化学成分复杂的酢浆草的内部品质,同时所测定的酢浆草药材的产地应更为广泛和具体,以利于为综合评价资源分布广泛的酢浆草质量提供更为可靠的科学依据。本研究首次建立了酢浆草 UPLC 指纹图谱,与 HPLC 指纹图谱相比较,UPLC 的分析时间明显缩短,流动相的消耗减少,而且灵敏度高、分离效率高。相似度评价分析结果显示,不同产地、不同海拔的酢浆草指纹图谱相似度除贵州印江产的

样品 S30 为 0.839,其余 29 批产地均在 0.900 以上,说明除贵州印江产地外,其余 14 个产地间的化学成分具有很好的相似性。共有峰峰面积的聚类分析结果表明,15 个不同产地、不同海拔酢浆草药材共有化学成分的含量不具有一定的生态环境及海拔规律性,并初步说明酢浆草生长适应能力较强,其化学成分受地域环境差异的影响较小,但为保证酢浆草药材质量,必须规范其适宜产地及采收期,关于酢浆草药材质量与其生态环境及采收时间的相关性还有待进一步深入研究论证。本研究为全面评价酢浆草药材质量提供了更为高效、快速、灵敏且节能环保的检测方法。

### 参考文献:

- CHEN YK, LUO GZ, TIAN PY, et al, 2015. Protective effect of shui ethnic medicine *Oxalis corniculata* on liver injured by carbon tetrachloride in mice [J]. Chin J Mod Med, 25 (36):12-15. [陈应康,罗国忠,田培燕,等, 2015. 水酢浆草对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护性研究[J]. 中国现代医学杂志,25 (36):12-15.]
- CUI J, LIU XX, LI YT, et al, 2015. Comparison of effects and HPLC detection on different extracts of miao medicine *Oxalis corniculata* in Guizhou Province [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 21(2): 53-56. [崔珺,刘星星,李月婷,等, 2015. 贵州苗族药酢浆草不同溶剂提取物的药效比较及 HPLC 测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 21(2): 53-56.]
- CUI J, YANG YX, ZHENG L, et al, 2016. Effect of Anti-Inflammatory and analgesia activities of aqueous extracts of miao medicine *Oxalis corniculata* L. [J]. J Jiangxi Col Med, 41(4): 427-435. [崔珺,杨雅欣,郑林,等, 2016. 贵州苗族药酢浆草水提物的抗炎镇痛作用 [J]. 贵阳医学院学报, 41(4): 427-435.]
- FENG H, DENG LJ, WU LJ, et al, 2014. Identification study by HPLC fingerprint of *Oxalis corniculata* [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 25(10):2414-2416. [冯华,邓丽娟,吴林菁,等, 2014. 酢浆草高效液相色谱指纹图谱的鉴别研究 [J]. 时珍国医国药,25(10):2414-2416.]
- Food and Administration of Guizhou Province, 2003. Quality standard of Chinese herbal medicine and national medicinal herbs in Guizhou Province [M]. Guiyang: Guizhou Scientific and Technology Press: 366. [贵州省药品监督管理局, 2003. 贵州省中药材、民族药材质量标准 [M]. 贵阳:贵州科技出版社:366.]
- GAO Q, LIU Y, SONG BB, et al, 2016. Method conversion and validation between HPLC and UPLC [J]. J Pharm Anal, 36(7): 1279-1286. [高青,刘颖,宋彬彬,等, 2016. 超高效液相色谱与高效液相色谱方法转换及验证

- [J]. 药物分析杂志, 36(7):1279-1286.]
- LIU GX, LI H, ZHANG J, 2017. Rapid evaluation on quality control of *Ginkgo* leaves extract and preparations by UPLC fingerprint [J]. *Chin J Exp Trad Med Form*, 23(1):64-68. [刘国雄, 李华, 张军, 2017. UPLC 指纹图谱快速评价银杏叶提取物及制剂的质量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 23(1):64-68.]
- LIU SX, WU H, DENG ZQ, et al, 2011. Determination of acacetin-6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside in *Oxalis corniculata* L. of different regions by RP-HPLC [J]. *J Jiangxi Col Trad Chin Med*, 23(1):55-56. [刘受先, 吴欢, 邓志清, 等, 2011. RP-HPLC 测定不同产地酢浆草中刺槐素-6-C- $\beta$ -D-葡萄糖苷含量 [J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(1):55-56.]
- LIU YX, GU ZX, LU FL, et al, 2014. Establishment of high performance liquid chromatographic fingerprint of *Callicarpa nudiflore* on different harvesting time [J]. *Guihaia*, 34(2):174-178. [刘幼娴, 谷陟欣, 卢凤来, 等, 2014. 不同采收期裸花紫珠的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 广西植物, 34(2):174-178.]
- MA HJ, DING L, SHENG WZ, et al, 2010. Effect of the-abrownin extracted from *Oxalis corniculata* on the metabolism of blood lipidin hyperlipidmia rats [J]. *Chin J Trad Med Inform*, 2(16):177-178. [马鸿军, 丁良, 申文增, 等, 2010. 酢浆草对高脂血症大鼠血脂代谢的影响 [J]. 中国中医药咨讯, 2(16):177-178.]
- SAI ST, SANTOSH P, MANGALA L, et al, 2011. Anxiolytic effect of ethanolic of *Oxalis corniculata* L. in mice [J]. *Int J Pharm Biol Sci*, 2(3):288.
- SREEJITH G, JAYASREE M, LATHA PG, et al, 2014. Hepatoprotective activity of *Oxalis corniculata* L. ethanolic extract against paracetamol induced hepatotoxicity in wistar rats and its *in vitro* antioxidant effects [J]. *Ind J Exp Biol*, 52(2):147-152.
- The State Administration of Traditional Chinese Medicine Chineseherbal Medicine Editia, 1999. Chinese herbal medicine. [M]. Vol. 4. Shanghai: Shanghai Scientific and Technology Press:717-719. [国家中医药管理局中华本草编委会, 1999. 中华本草. [M] 第四卷. 上海:上海科学技术出版社:717-719.]
- WANG HS, WANG LS, FAN YJ, et al, 2011. Determination of total flavonoid in extract of *Oxalidis Corniculatae* by spectrophotometry [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 22(3):578-579. [王海生, 王隶书, 范艳君, 等, 2011. 酢浆草提取物中总黄酮含量的分光光度法测定 [J]. 时珍国医国药, 22(3):578-579.]
- WU LJ, NIE MH, FENG H, et al, 2013. Specificity research on microscopic identification of *Oxalis corniculata* [J]. *Chin J Exp Trad Med Form*, 19(2):133-137. [吴林菁, 聂明华, 冯华, 等, 2013. 酢浆草显微鉴别的专属性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 19(2):133-137.]
- XU F, YANG Y, SHU QE, et al, 2013. UPLC Fingerprint research of *Musa basjoo* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 19(15):111-114. [徐锋, 杨焯, 舒秋娥, 等, 2013. 芭蕉根的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 19(15):111-114.]
- ZENG HT, SHA XX, SU SL, et al, 2017. UPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Salvia miltiorrhiza* stems and leaves from different habitats [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 48(2):767-772. [曾慧婷, 沙秀秀, 宿树兰, 等, 2017. 不同产地丹参茎叶 UPLC 指纹图谱与化学模式识别研究 [J]. 中草药, 48(2):767-772.]
- ZHOU X, CHEN HM, BAI H, et al, 2008. Study on conversion method of HPLC and UPLC chromatographic conditions [J]. *J Anal Lab*, 27(4):56. [周新, 陈会明, 白桦, 等, 2008. HPLC 与 UPLC 色谱条件转换方法研究 [J]. 分析试验室, 27(4):56.]