

宁夏枸杞甜菜碱提取物高效液相色谱指纹图谱研究

廖国玲^{1,2}, 张自萍^{*1}, 郭 荣¹

(1. 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏大学, 银川 750021;

2. 宁夏医学院药检系, 银川 750021)

摘 要:建立宁夏枸杞甜菜碱提取物高效液相色谱指纹图谱,为鉴别不同来源的宁夏枸杞提供依据。以 10 批宁夏不同产地的宁夏枸杞主栽品种“宁杞 号”样品建立枸杞甜菜碱提取物指纹图谱共有模式,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行数据处理,对 15 批不同来源的枸杞样品进行了分析。结果表明:8 个特征峰构成了宁夏枸杞甜菜碱提取物的色谱指纹图谱,不同产地、不同品种的枸杞样品甜菜碱提取物指纹图谱存在差异;建立的枸杞甜菜碱提取物高效液相色谱(HPLC)指纹图谱对不同产地、不同品种枸杞的鉴别有参考价值。

关键词:宁夏枸杞;甜菜碱;高效液相色谱;指纹图谱;共有模式;相似度

中图分类号:O657.7⁺2

文献标识码:A

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)是我国传统名贵药材,具有增强免疫力、降血脂、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[1,2],集中种植在宁夏、新疆、河北、内蒙等地区,以宁夏所产枸杞最为地道^[3]。然而,如何有效鉴别、评价地道宁夏枸杞尚缺乏科学合理的方法。色谱指纹图谱技术在中药质量控制方面的应用^[4,5]为枸杞鉴定开辟了新思路。

甜菜碱是枸杞子中主要活性成分之一,可促进脂肪分解代谢,具有抗脂肪肝的作用^[6,7]。梁逸曾等^[8]对三个枸杞子样品的甜菜碱、类胡萝卜素提取液进行了指纹图谱方面的研究。本文以 10 批宁夏不同产地的宁夏枸杞主栽品种“宁杞 号”建立枸杞甜菜碱提取物指纹图谱共有模式,探讨枸杞甜菜碱提取物色谱指纹图谱用于不同产地、不同品种枸杞鉴定的可行性。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和材料

CBM-20A 高效液相色谱仪(日本,岛津公司),SPD-20A 检测器,二元梯度泵,江苏汉邦 Lichrospher NH₂ 250 ×4.6 mm (5 μm) 色谱柱,LC-Solution 色谱工作站,Milli-Q A10 型纯水仪(MILLIPORE)。

甜菜碱对照品购自中国药品生物制品检定所,乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯。

本研究以宁夏、新疆、内蒙古、河北等宁夏枸杞主产区大面积种植的优质品种“宁杞 号”2005 年夏季盛果期果实及参比品种“大麻叶”和“宁杞 号”同期的果实为材料,为尽可能减小田间管理水平对枸杞品质的影响,在采样时尽量选择枸杞树龄、植株密度、水肥条件、枝条修剪水平和成熟度一致的样品,所有枸杞样品均由宁夏农科院枸杞研究所采集、提供。枸杞样品来源见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取甜菜碱对照品 10.0 mg,用超纯水溶解定容于 10 mL 容量瓶中,制成 1.0 mg·mL⁻¹ 甜菜碱标准对照品溶液。色谱分析时,溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

收稿日期:2006-12-19

修回日期:2007-04-03

基金项目:教育部科学技术项目(No. 204148);宁夏自然科学基金重大项目(No. 2003ZD01);宁夏大学自然科学基金项目

通讯联系人:张自萍,女,博士,副教授,硕士生导师,主要从事西部特色天然产物研究。

1.2.2 供试品溶液制备^[9] 精密称取过 40 目筛的干燥枸杞粉 2.000 g,以甲醇为溶剂,于 73~75 ℃ 加热回流提取 1 h,冷后过滤,分次洗涤残渣和滤器,合并滤液和洗液,40 ℃ 减压浓缩至干。超纯水溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,即得枸杞样品供试品溶液。色谱分析时,溶液均过 0.45 μm 微孔滤膜。

Table 1 The origins of samples

Sample No.	Origin
1	NanLiang farm of Yinchuan in Ningxia
2	Research Institute for Gouqi of Yinchuan in Ningxia
3	Enhe village of Zhongning county in Ningxia
4	Zhenluo village of Zhongwei county in Ningxia
5	Heicheng village of Guyuan city in Ningxia
6	Lujiaying of Huinong county in Ningxia
7	Qingshuihe of Tongxin county in Ningxia
8	Garden and forest farm of Yinchuan in Ningxia
9	Hexi town of Tongxin county in Ningxia
10	Zhouta village of Zhongning county in Ningxia
11	Tuoli village of Jinghe county in Ningxia
12	Shahai village of Hangjinhouqi in Neimenggu
13	Julu county in Hebei
14	Damaye
15	NQ-

1.2.3 色谱分析条件 通过对波长、流动相、流速、洗脱方式的优化,确定了枸杞甜菜碱提取物色谱分析条件:乙腈-水(85:15,V/V)为流动相;等度洗脱;流速 0.7 mL·min⁻¹;检测波长 195 nm;柱温 25 ℃;进样量 5 μL。

2 结果与讨论

2.1 枸杞甜菜碱提取物指纹图谱

对 15 批枸杞样品进行 HPLC 分析,所有组分在 40 min 内洗脱出柱,典型色谱图如图 1 所示。对照品甜菜碱保留时间为 16.58 min,与供试品 8 个共有特征峰中的 5 号峰保留时间一致,确定 5 号峰为甜菜碱峰。选择 5 号峰为内参照峰,其它共有特征峰对内参照峰的保留时间和峰面积计算其相对保留时间(R_{RT})以及相对峰面积(R_A),总峰面积对单个峰面积计算峰面积百分比(%),结果见表 2。

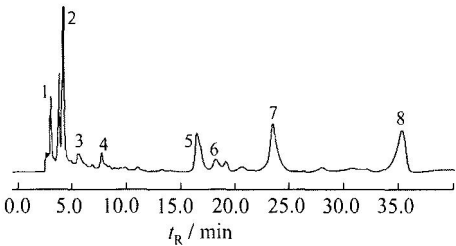


Fig. 1 Chromatogram of sample 3[#]

2.2 数据处理

使用国家药典委“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行数据处理。对宁夏不同产地的 10 批“宁杞 1 号”样品色谱图进行汇总比较,计算机辅助计算得到宁夏枸杞甜菜碱提取物色谱特征的对照指纹图谱即共有模式见表 3,以此模式为基准,以余弦夹角和相关系数作为测度(以相对峰面积计算),计算每个样品色谱图与之比较的相似度,结果见表 4。

2.3 色谱分析条件优化

选择不同比例的乙腈-水为流动相,进行流速、柱温优化,结果表明:乙腈-水(85:15,V/V),柱温:30 ℃,流速 0.7 mL·min⁻¹,分离度较好,可达到基线分离。

甜菜碱结构中无共轭体系,但在低紫外区(190~220 nm)有吸收,本研究借鉴文献^[10]报道,应用 NH₂ 色谱柱,未经衍生化处理,保留了枸杞中甜菜碱提取物的原始成分,通过比较 193、195、210 nm 三个不同波长处的色谱图,结果表明:195 nm 处色谱峰信息丰富,各组分均有较大吸收,最后确定的色谱分析波长为 195 nm。

2.4 精密度实验

取 1[#] 样品的供试品溶液,连续进样 5 次,记录色谱图,其共有峰相对保留时间 RSD<0.9%,相对峰面积 RSD 为 2.0%~3.2%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性实验

取 1[#] 样品的供试品溶液 ,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样 ,记录色谱图 ,其共有峰相对保留时间 RSD < 0.79 % ,相对峰面积 RSD 为 1.8 % ~ 3.13 % ,表明供试品在 24 h 内稳定。

2.6 重现性实验

制备 5 份 1[#] 样品的供试品溶液 ,进样并记录色谱图 ,主要共有峰相对保留时间 RSD < 0.84 % ,相对峰面积 RSD 为 2.6 % ~ 4.2 % ,符合指纹图谱要求 ,表明方法重现性良好。

Table 2 Relative area and area (%) of characteristic peaks of 15 Lycium barbarum L. samples

Sample No.		Peak No.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	RA	0.670	4.930	0.101	0.206	1.000	0.298	2.204	1.261
	Area(%)	6.28	46.2	0.95	1.93	9.37	2.8	20.66	11.81
2	RA	0.624	10.060	0.133	0.349	1.000	0.325	3.840	1.972
	Area(%)	3.41	54.96	0.72	1.91	5.46	1.78	20.98	10.78
3	RA	0.459	3.546	0.125	0.161	1.000	0.409	1.543	1.109
	Area(%)	5.5	42.46	1.49	1.93	11.97	4.9	18.47	13.27
4	RA	0.421	6.639	0.179	0.281	1.000	0.234	3.980	1.773
	Area(%)	2.9	45.77	1.23	1.94	6.89	1.61	27.43	12.22
5	RA	0.447	13.022	0.391	0.515	1.000	0.913	2.246	1.371
	Area(%)	2.25	65.42	1.96	2.59	5.02	4.59	11.28	6.89
6	RA	0.476	7.530	0.270	0.569	1.000	0.292	5.882	2.017
	Area(%)	2.64	41.75	1.5	3.15	5.54	1.62	32.61	11.18
7	RA	0.516	8.424	0.184	0.228	1.000	0.272	2.789	2.099
	Area(%)	3.33	54.3	1.19	1.47	6.45	1.76	17.98	13.53
8	RA	0.523	4.286	0.185	0.210	1.000	0.389	2.246	1.557
	Area(%)	5.03	41.22	1.78	2.02	9.62	3.74	21.61	14.97
9	RA	0.728	5.629	0.266	0.192	1.000	1.092	2.347	1.917
	Area(%)	5.53	42.74	2.02	1.46	7.59	8.29	17.82	14.56
10	RA	0.094	5.774	0.196	0.173	1.000	0.919	1.491	0.838
	Area(%)	0.9	55.06	1.87	1.65	9.54	8.77	14.22	7.99
11	RA	0.202	2.540	0.100	0.144	1.000	0.531	1.394	1.662
	Area(%)	2.67	33.54	1.32	1.9	13.2	7.01	18.41	21.95
12	RA	0.952	6.774	0.345	0.392	1.000	1.005	3.027	1.810
	Area(%)	6.22	44.26	2.25	2.56	6.53	6.56	19.78	11.83
13	RA	0.358	2.138	0.147	0.431	1.000	1.620	1.026	0.894
	Area(%)	4.71	28.07	1.94	5.66	13.13	21.27	13.48	11.74
14	RA	0.131	3.233	0.133	0.159	1.000	0.921	2.462	0.754
	Area(%)	1.49	36.77	1.52	1.8	11.37	10.48	28	8.58
15	RA	0.271	2.819	0.815	0.709	1.000	2.038	2.667	1.081
	Area(%)	2.38	24.73	7.15	6.22	8.77	17.88	23.39	9.49

Table 3 Mutual mode of Lycium barbarum L.

Peak No.	Relative retention time	Relative area of peak
1	0.178	0.496
2	0.249	6.984
3	0.334	0.203
4	0.461	0.289
5	1.000	1.000
6	1.108	0.514
7	1.414	2.857
8	2.130	1.591

2.7 样品指纹图谱分析

由表 2 可看出,15 批枸杞样品甜菜碱的提取物组成相同,含有 8 个共有峰。其中,新疆样品 5、8 号峰、河北样品 6 号峰、“宁杞 号”样品 3、4 号峰峰面积百分比为所有样品中最大;新疆、河北、大麻叶和宁夏中宁恩和样品甜菜碱峰面积百分比比较大。

2.8 枸杞甜菜碱提取物指纹图谱相似度分析

由表 4 可看出,宁夏不同产地样品、内蒙样品的甜菜碱提取物 HPLC 指纹图谱与共有模式相关性高,新疆样品、河北样品与共有模式相关性低;此外,“宁杞 号”样品与“大麻叶”、“宁杞 号”的相关性低。

Table 4 Similarity analysis results of 15 *Lycium barbarum* L. samples

Sample No.	Vectorial angle cosine method	Correlation coefficient method
1	0.996	0.996
2	0.998	0.998
3	0.989	0.990
4	0.988	0.981
5	0.970	0.967
6	0.963	0.939
7	0.996	0.996
8	0.988	0.987
9	0.989	0.989
10	0.984	0.975
11	0.933	0.899
12	0.995	0.996
13	0.851	0.762
14	0.952	0.923
15	0.849	0.765

3 结论

(1)“宁杞 号”和“宁杞 号”都是从宁夏原来栽培的枸杞当家品种“大麻叶”中选育出来的高产、优质新品种^[1],但“宁杞 号”在品质和产量方面不及“宁杞 号”,现已逐渐被淘汰。由于西北地区积温、无霜期、日照时数均高于河北,这种不同的气候和生长条件,导致了相同的“宁杞 号”品种在不同产地产生了化学成分上的差异。这种差异在所建立的宁夏枸杞甜菜碱提取物 HPLC 指纹图谱中体现了出来,宁夏本地的“宁杞 号”枸杞与新疆、河北“宁杞 号”枸杞差异大;同时,宁夏枸杞甜菜碱提取物 HPLC 指纹图谱中也体现出了不同品种间的差异:“宁杞 号”与“大麻叶”的相似度高于“宁杞 号”。说明枸杞中甜菜碱提取物色谱指纹图谱对枸杞药材的鉴别有意义。

(2)枸杞子具有多种药效,所含有有效成分很多,仅从某一类成分来评价不同产地、不同品种枸杞的质量不够全面。但我们所建立的宁夏枸杞甜菜碱提取物 HPLC 指纹图谱能为不同产地、不同品种枸杞的鉴定提供一定的参考,也为进一步研究宁夏枸杞的道地性奠定了基础。

参考文献:

[1] BAI Shou-ning(白寿宁). Study on *Lycium barbarum*. L (宁夏枸杞研究) [M]. Yinchuan(银川): Ningxia People's Publishing House(宁夏人民出版社),1998:552.

[2] QIAN Yan-cong(钱颜丛), YU Wen-ping(宇文萍). Acta Chinese Medicine And Pharmacology(中医学报)[J],2000, 4:33.

[3] GAO Ye-xin(高业新), LI Xin-hu(李新虎). Acta Geoscientia Sinica(地球学报)[J],2003,24(2):193.

[4] XIE Pei-shan(谢培山). Chin. Tradit Pat. Med. (中成药)[J],2000,22(6):391.

[5] ZHOU Yu-xin(周玉新). Technological Researches on Fingerprints of Traditional Chinese Medicine(中药指纹图谱研究技术)[M]. Beijing(北京):Chemical Industry Press(化工出版社),2002:1.

[6] XIE Chen(谢忱), XU Li-zhen(徐丽珍), LI Xian-ming(李宪铭), LI Ke-ming(李克明), ZHAO Bao-hua(赵保华), YANG Shi-lin(杨世林). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志)[J],2001,26(5):323.

[7] ZHANG Yur-jin(张宇金) ,GAO Shi-yong(高世勇) , HE Li-wei(何立巍).Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition) (哈尔滨商业大学学报(自然科学版)) [J] ,2006 ,22(1) :13.

[8] LU Hong-mei(卢红梅) ,LIANG Yi-zeng(梁逸曾).Journal of Central South University. (Natural Sciences Edition) (中南大学学报(自然科学版)) [J] ,2005 ,36(2) :248.

[9] Chinese Pharmacopoeia(中国药典) [M]. Beijing(北京) :Chemical Industry Press(化工出版社) ,2005 :174.

[10] Young Geun Shin ,Kyung Hee Cho ,Jong Moon Kim ,et al.Journal of Chromatography A[J] ,1999 ,857(1-2) :331.

Study on High Performance Liquid Chromatography Fingerprint of Betaine from *Lycium barbarum* L .

LIAO Guo-ling^{1,2} , ZHANG Zi-ping^{*1} , GUO Rong¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China , Ningxia University , Yinchuan 750021 ;

2. Pharmacology and Medical Exam Dept of Ningxia Medical College , Yinchuan 750021)

Abstract : To establish chromatographic fingerprint of betaine from *Lycium barbarum* L . by HPLC and distinguish the *Fructus Lycii* from different habitats , the mutual mode was established depending on 10 batches of *Fructus Lycii* from different growing areas in Ningxia. “ Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM ” was used to analyze 15 batches of *Fructus Lycii* from different habitats. There were 8 characteristic peaks that constituted fingerprint characters of HPLC fingerprints of betaine , and betaines of *Fructus Lycii* from different habitats were quite different in content. This chromatographic fingerprint spectrum of betaine from *Lycium barbarum* L . could be used to distinguish *Fructus Lycii* from different habitats.

Keywords : *Lycium barbarum* L . ; Betaine ; HPLC ; Fingerprint ; Mutual mode ; Similarity

仪器信息网开展“ 网上仪器展 ”参展商资质认证工作

为了让仪器用户真正找到好的厂家和产品 ,维护广大用户和参展商的切身利益 ,避免不必要的纠纷 ,自 2007 年 3 月 1 日起仪器信息网开始对网上仪器展各参展商的资质进行认证。对于通过该认证的厂商本网将予以特殊标记 ,增加其产品在场中的 3I 指数 ,并给予额外的信用积分 ,信用积分越高 ,其产品排名越有优势 ,越容易得到用户的关注 ,成交机会也就越大 ! 未通过该认证的厂商将不能参加网上仪器展览。

认证内容主要包括 :厂家通过年检的营业执照 (副本) 、销售代理授权证书以及企业登记证等证书的原件扫描件。

目前仪器信息网已有 500 多家会员单位通过了本网的资质认证 ,“ 网上仪器展 ”已经真正成为了仪器行业最权威的仪器产品信息发布平台 !

如何让用户信任您 ? 如何买到满意放心的仪器 ? 赶快到仪器信息网来吧 ! 这些问题都将迎刃而解 !