

宁夏枸杞黄酮类化合物HPLC指纹图谱研究

张自萍¹, 廖国玲^{1,2}, 李弘武^{1*}

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

2. 宁夏医学院 药检系, 宁夏 银川 750004)

摘要:目的 建立宁夏枸杞黄酮类化合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。方法 以10个宁夏不同产地的宁夏枸杞主栽品种“宁杞1号”样品建立枸杞黄酮类化合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个不同来源的枸杞样品进行了分析。结果 本研究建立的方法重现性较好, 16个特征峰构成了宁夏枸杞黄酮类化合物色谱指纹图谱的特征; 不同产地、不同品种的枸杞样品黄酮类化合物组成与量存在差异。结论 所建立的枸杞黄酮类化合物的HPLC指纹图谱对不同产地、不同品种枸杞的鉴别具有参考价值。

关键词: 宁夏枸杞; 黄酮类化合物; 高效液相色谱; 指纹图谱; 共有模式; 相似度

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)01-0103-03

HPLC Fingerprint of flavonoids from *Lycium barbarum*

ZHANG Zi-ping¹, LIAO Guo-ling^{1,2}, LI Hong-wu¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources

in Western, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Department for Drug Control,

Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, China)

Abstract: **Objective** To establish chromatographic fingerprint of flavonoids from *Lycium barbarum* by HPLC and distinguish the *Fructus Lycii* from different habitats. **Methods** The mutual mode was established depending on ten *Fructus Lycii* samples from different growing areas in Ningxia. The software “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica” was applied to analyzing 15 *Fructus Lycii* samples from different habitats. **Results** The established chromatographic fingerprint method had good repeatability; 16 peaks are characteristic of HPLC fingerprints of flavonoids and flavonoids of *Fructus Lycii* from different habitats were quite different in content and constituent. **Conclusion** This chromatographic fingerprint spectrum of flavonoids could be used to distinguish *Fructus Lycii* from different habitats.

Key words: *Lycium barbarum* L.; flavonoids; HPLC; fingerprint; mutual mode; similarity

宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 是我国传统名贵药材, 具有增强免疫力、抗氧化、抗肿瘤等多方面的药理作用, 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道地^[1]。然而, 如何有效鉴别、评价道地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^[2,3], 为枸杞鉴定开辟了新思路。梁逸曾等^[4]采用HPLC法对3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研究。黄酮类化合物是枸杞中主要的抗氧化活性成分之一^[5], 张颖等^[6]研究表明不同产地枸

杞黄酮的量有显著差异。本实验以10个宁夏不同产地的宁夏枸杞主栽品种“宁杞1号”建立枸杞黄酮类化合物指纹图谱共有模式, 探讨枸杞黄酮类化合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 仪器和试剂

主要仪器有CBM—20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司), SPD—20A 检测器, LC-Solution 色谱工作站, Milli-Q A10 型纯水仪(MILLIPORE), KQ—500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。主

* 收稿日期: 2007-03-26

基金项目: 教育部科学技术项目(204148); 宁夏大学自然科学基金项目; 宁夏自然科学基金重大项目(2003ZD01)

作者简介: 张自萍(1970—), 女, 博士, 宁夏大学副教授, 硕士生导师, 主要从事天然产物研究。

Tel: (0951)2062813 E-mail: zipingzhang@163.com

要试剂中甲醇、乙腈为进口色谱纯,其他均为分析纯。绿原酸、芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所。

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 I 号”2005 年夏季盛果期果实及参比品种“大麻叶”和“宁杞 II 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,枸杞样品由宁夏农科院枸杞研究所采集,经宁夏枸杞工程研究中心枸杞研究所安巍高级工程师鉴定。枸杞样品来源见表 1。

表 1 枸杞样品来源

Table 1 Origins of samples

样品号	来源	样品号	来源
1	宁夏银川南梁农场	9	宁夏同心河西镇
2	宁夏银川枸杞研究所	10	宁夏中宁舟塔乡
3	宁夏中宁恩和乡	11	新疆精河县托里乡
4	宁夏中卫镇罗乡	12	内蒙杭锦旗后旗沙海乡
5	宁夏固原黑城乡	13	河北巨鹿县
6	宁夏惠农路家营	14	大麻叶
7	宁夏同心清水河	15	宁杞 II 号
8	宁夏银川园林场		

2 方法和结果

2.1 色谱分析条件:通过对波长、流动相、体积流量、洗脱方式的优化确定了枸杞黄酮类化合物的色谱分析条件为岛津 V P-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相 A:乙腈-水-醋酸(5:94.5:0.5);流动相 B:乙腈-水-醋酸(70:29.5:0.5);梯度洗脱;体积流量 0.5 mL/min;检测波长 342 nm;柱温 30 °C;进样量 5 μL。

2.2 样品溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备:精密称取绿原酸、芦丁对照品适量于 10 mL 量瓶中,少量甲醇溶解,50%乙醇定容,分别制成 0.2 mg/mL 的绿原酸、芦丁对照品贮备液,对照品溶液由此稀释得到。

2.2.2 供试品溶液的制备:精密称取过 16 目筛的枸杞颗粒 2.000 g,石油醚回流脱脂,残渣中加入 80% 乙醇 30 mL,60 °C 超声提取两次,每次 30 min,滤过,合并滤液,减压浓缩,浓缩液经 HPD-600 型大孔树脂,蒸馏水洗脱除去水溶性杂质后,50% 乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液为供试品溶液。

2.3 精密度试验: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 < 0.2%,相对峰面积 RSD 为 0.5%~3.0%,表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验:取 1# 样品的供试品溶液,分别在

0、2、4、8、12 h 进样,记录色谱图,其共有峰相对保留时间 RSD < 0.2%,相对峰面积 RSD 为 1.1%~2.8%,表明供试品在 12 h 内稳定。

2.5 重现性试验:制备 5 份 1# 样品的供试品溶液,进样并记录色谱图,其共有峰相对保留时间 RSD < 0.7%,相对峰面积 RSD 为 1.6%~4.3%,符合指纹图谱要求,表明方法重现性良好。

2.6 枸杞黄酮类化合物指纹图谱:对 15 个枸杞样品进行 HPLC 分析,所有组分均在 55 min 内洗脱出柱,1~12 号样品存在 16 个共有特征峰(占总峰面积的 90% 以上),典型色谱图见图 1。对照品绿原酸保留时间为 29.94 min,芦丁为 46.37 min,与供试品 16 个共有特征峰中的 12 号和 16 号峰保留时间一致,确定 12 号和 16 号峰分别为绿原酸和芦丁。选择 16 号峰为内参照峰。

2.7 数据处理:使用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行数据处理。以宁夏不同产地的 10 个“宁杞 I 号”样品色谱图为基础,计算机辅助计算得到宁夏枸杞黄酮类化合物色谱特征的对照指纹图谱即共有模式,以此模式为基准,以夹角余弦和相关系数作为测度,计算每个样品色谱图与之比较的相似度,结果见表 2。

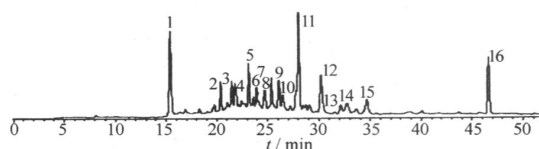


图 1 3 号样品色谱图

Fig 1 Chromatogram of sample No. 3

表 2 15 个枸杞样品相似度评价结果

Table 2 Similarity of 15 samples of Fructus Lycii

样品号	夹角余弦	相关系数	样品号	夹角余弦	相关系数
1	0.98	0.97	9	0.97	0.96
2	0.96	0.92	10	0.98	0.95
3	0.99	0.97	11	0.98	0.95
4	0.92	0.89	12	0.90	0.79
5	0.98	0.96	13	0.84	0.60
6	0.98	0.95	14	0.82	0.82
7	0.97	0.91	15	0.82	0.79
8	0.98	0.94			

3 讨论

3.1 流动相的选择:本实验过程中,选择了甲醇-0.4% 磷酸水溶液和乙腈-0.5% 醋酸两种流动相体系,进行梯度洗脱试验(0~14 min, 100%~86% A; 14~40 min, 86%~70% A; 40~55 min, 70%~0% A)。结果表明:乙腈-0.5% 醋酸为流动相梯度洗脱,在 55 min 内能对组分进行很好地分离。

3.2 检测波长选择: 本实验在200~700 nm 进行波长扫描, 经筛选后比较了样品在256、286、320、342、370 nm 的色谱图, 发现342 nm 处色谱峰信息丰富, 各峰分离情况良好, 各组分均有较大吸收, 最后确定色谱分析波长为342 nm。

3.3 样品指纹图谱分析: 从各样品色谱图可以看出, 15个样品的色谱峰都有以11号峰为分界线, 呈左侧峰密集右侧峰稀疏的分布特征。“宁杞I号”样品中, 河北样品有12个共有峰(缺少10、13、14、15号峰); “大麻叶”品种有13个共有峰(缺少4、8、13号峰); “宁杞II号”品种有14个共有峰(缺少3、4号峰)。值得一提的是河北样品2号色谱峰为所有样品中最高, 并且40 min 处出现了一个在其他样品中极低或无的色谱峰, 可认为该色谱峰是河北样品特有的特征峰。从芦丁和绿原酸色谱峰面积来看: “宁杞I号”样品中宁夏固原黑城乡、宁夏中宁恩和乡、宁夏银川南梁农场以及新疆样品中芦丁和绿原酸峰面积均较高, 内蒙和河北与宁夏其他地区“宁杞I号”枸杞样品中芦丁和绿原酸峰面积相差不大; “大麻叶”和“宁杞II号”枸杞品种中芦丁和绿原酸峰面积较低; 说明不同产地、不同品种枸杞黄酮类化合物指纹图谱共有峰的相对保留时间基本一致, 相对峰面积存在显著的差异。

3.4 枸杞样品相似度比较分析: 对相似度计算结果(表2)分析可知, 样品余弦夹角和相关系数计算结果基本一致。以10个宁夏不同产地的“宁杞I号”样品

建立的共有模式为对照指纹图谱, 与15个样品进行比较, “宁杞I号”样品中, 宁夏不同产地的枸杞样品间有较好的相关性, 但也存在差别, 宁夏中卫样品与共有模式的相关性略低; 新疆样品与共有模式的相关性较好; 内蒙样品和河北样品与共有模式相关性较低。此外, “大麻叶”和“宁杞II号”与“宁杞I号”品种间的相关性低。说明不同产地、不同品种间枸杞黄酮类化合物的组成存在差异, 也表明不同的气候条件和生长条件导致了相同品种在不同产地产生了化学成分上的差异。

枸杞子具有多种药理作用, 所含有效成分很多, 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。但所建立的宁夏枸杞黄酮类化合物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] 白寿宁. 宁夏枸杞研究 [M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1998.
- [2] 谢培山. 中药制剂色谱指纹图谱鉴别 [J]. 中成药, 2000, 22(6): 391-394.
- [3] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [4] 卢红梅, 梁逸曾. 枸杞的高效液相色谱指纹图谱 [J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2005, 36(2): 248-252.
- [5] 黄元庆, 鲁建华, 沈泳, 等. 枸杞总黄酮类化合物抗脂质过氧化研究 [J]. 卫生研究, 1999, 28(2): 115-116.
- [6] 张颖, 张立睦, 周红英, 等. 不同产地枸杞子中黄酮含量的测定 [J]. 中国中医药科技, 2004, 11(2): 102-103.

天山雪莲HPLC 指纹图谱研究

欧元^{1,2}, 袁晓凡^{1*}, 徐春明^{1,2}, 赵兵¹, 王晓东¹, 王玉春^{1*}

(1. 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 目的 建立天山雪莲药材的HPLC 指纹图谱, 为雪莲药材的快速质量控制提供依据。方法 以绿原酸、芦丁香苷、芦丁、木犀草素、芹菜素5种对照品为对照, 采用HPLC 法, 测定了10批次不同产地天山雪莲的色谱图, 确立参照指纹图谱。色谱条件: 色谱柱Diamondsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水(0.8% 醋酸, 0.2% 三乙胺, pH 3.5~4.0) 线性梯度洗脱, 柱温30℃, 检测波长270 nm, 记录时间30 min, 体积流量1.0 mL/min。结果 标示出天山雪莲的13个特征指纹峰。结论 该方法准确、重现性好, 为天山雪莲的指纹图谱质量控制提供了参考。

关键词: 天山雪莲; 指纹图谱; HPLC; 相似度

中图分类号: R 282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0105-04

* 收稿日期: 2007-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(20506027); 中国科学院西部行动高新技术项目(KGCX2-SW-506)

作者简介: 欧元(1982—), 女, 河北石家庄市人, 硕士研究生, 主要研究方向为中药指纹图谱。

* 通讯作者 袁晓凡 Tel: (010)62574372 E-mail: yuanxf99@yahoo.com