

基于 HPLC 指纹图谱及聚类分析对 不同产地枸杞质量评价研究

李小亭, 李瑞盈, 相海恩, 赵志磊, 刘秀华

(河北大学质量技术监督学院, 河北保定 071002)

摘要: 基于指纹图谱与系统聚类分析方法对不同产地枸杞进行质量评价。利用高效液相色谱法 (HPLC) 建立 8 个不同产地枸杞的指纹图谱, 使用相似度评价软件及 SPSS19.0 软件进行数据处理, 对不同产地的枸杞样品进行分析。结果表明, 不同产地枸杞的黄酮类物质指纹图谱具有专属性, 其中中宁、青海、新疆 3 个产地的枸杞指纹图谱相似度较高, 分别为 1、0.963、0.956, 聚类分析也将这三个产地的枸杞聚在一起。青海、新疆产枸杞与中宁枸杞质量相似, 可以作为枸杞药材新来源。HPLC 指纹图谱结合聚类分析法能够对枸杞的产地识别及质量评价提供参考。

关键词: 枸杞; 指纹图谱; 聚类分析; 质量评价

文章编号: 1673-9078(2012)9-1251-1253

Study on Quality Evaluation of *Lycium chinense* from Different Areas by HPLC Fingerprint and Cluster Analysis

LI Xiao-ting, LI Rui-ying, XIANG Hai-en, ZHAO Zhi-lei, LIU Xiu-hua

(College of Quality and Technical Supervision, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: HPLC fingerprint of *Lycium chinense* and the cluster analysis was used to evaluate *Lycium chinense* from different areas. The chromatographic fingerprints of *Lycium chinense* from 8 different origins were established by HPLC. "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM" and SPSS 19.0 was applied to analyzing *Lycium chinense* samples from different regions. Results showed that fingerprints of flavonoids in *Lycium chinense* from different areas were specific, and the high similarities of the samples from Zhongning, Qinghai and Xinjiang were 1, 0.963 and 0.956, respectively, and they also got together in cluster analysis. *Lycium chinense* produced in Qinghai and Xinjiang were so similar to that in Zhongning, which could be the new source for medicine use. The method of HPLC fingerprint bonded with cluster analysis was able to provide a reference for the discrimination and quality evaluation of *Lycium chinense*.

Key words: *Lycium chinense*; fingerprint; cluster analysis; quality evaluation

枸杞 (*Lycium chinense*) 为茄科枸杞属的多分枝灌木植物, 是我国传统名贵药材。研究表明枸杞具有增强免疫力、抗肿瘤、抗衰老、降血脂、抗氧化、增加造血功能、抗脂肪肝等方面的药理作用^[1-3]。

《中国药典》目前明确指出入药者为宁夏枸杞^[4]。近年来对枸杞的研究多集中于枸杞多糖的提取分离上, 其指纹图谱研究较少。聂国朝等对枸杞的甜菜碱、类胡萝卜素提取液进行了指纹图谱研究, 认为可以用中药材化学指纹图谱来进行枸杞品种识别和真伪鉴定^[5,6]。廖国玲等对枸杞的甜菜碱、黄酮类化合物提取液进行了指纹图谱研究, 可为鉴别不同来源的宁夏枸杞提供依据^[7-9]。

鉴于植物化学成分较为复杂, 色谱指纹图谱作为一种综合的、量化的色谱鉴定手段, 在中药质量控

制和鉴别中都起到重要作用^[10-13]。系统聚类分析是一种无管理、无指导的模式识别方法, 可将一些观察对象依据某些特征加以归类。化学模式识别技术根据物质所含化学成分用计算机对其进行分类或描述, 已广泛应用于中药指纹图谱研究^[14-17], 而对枸杞指纹图谱进行模式识别分析未见报道。

本文采用高效液相色谱法对 8 个不同产地枸杞进行了指纹图谱和聚类分析的模式识别研究, 为不同产地枸杞的鉴别与质量评价提供新的途径。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司, 包括 Waters 600E 四元泵, 2998 光电二极管矩阵检测器, Empower 色谱工作站); KQ-500E 型数控超声波清洗器 (昆山

收稿日期: 2012-05-10

市超声仪器有限公司)；超纯水机 (Human)；电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司)；飞鸽牌离心机；干燥箱；研钵。

1.2 试剂

乙腈 (HPLC 级, RCILabscan 公司), 乙酸 (优级纯, 天津北联精细化学品开发有限公司), 甲醇 (HPLC 级, Fisher 公司), 二次去离子水。标准品芦丁购自郑州 Lion 公司。

1.3 样品

枸杞样品分别来源于宁夏中宁(NY), 青海(QH), 新疆(XJ), 宁夏非原产地域(NF), 内蒙(NM), 陕西(SX), 吉林(JL), 河北(HB), 每产地 6 个批次。

2 实验方法

2.1 供试液制备

2.1.1 标准品溶液制备

精密称取芦丁标准品适量, 以甲醇定容于 10 mL 容量瓶中, 置超声波清洗器中混匀, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 备用。

2.1.2 供试品溶液制备

枸杞样品在 65 °C 下干燥 4 h 取出, 用研钵研碎。准确称取枸杞粉末 5.0 g (精确至 0.0001 g) 于 50 mL 量瓶中, 加甲醇约 40 mL, 30 °C 超声提取 30 min, 冷却至室温, 定容, 摇匀, 静置, 取上清液, 10000 r/min 离心 20 min, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液为供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters Atlantis T3 C18 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm) 分析柱; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 流速 0.6 mL/min; 运行时间 55 min; 检测波长 310 nm。

梯度洗脱程序如表 1 所示:

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	水/%	乙腈/%	10% 乙酸/%
0	90.0	5.0	5.0
14	80.9	14.1	5.0
40	55.5	39.5	5.0
50	90.0	5.0	5.0

2.3 枸杞黄酮类化合物 HPLC 图谱测定

分别吸取标准品和供试品溶液 (大于 20 μL), 按照 2.2 的色谱条件进样, 记录色谱图如图 1。其中 11 号峰为芦丁, 选择其作为内参照峰。

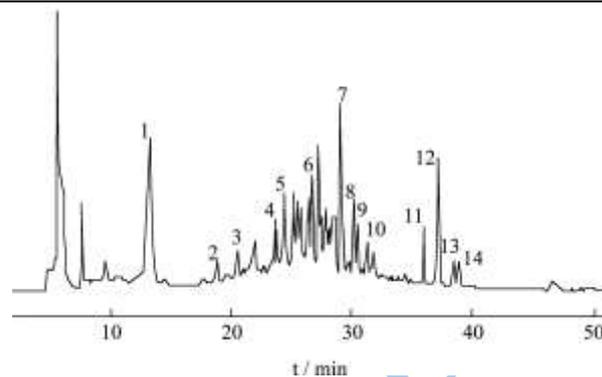


图 1 中宁枸杞黄酮类化合物色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of flavonoids in NY *Lycium chinense*

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度

取同一供试品溶液, 平行进样 6 次, 记录色谱图, 内参照物芦丁的相对保留时间 RSD 为 0.08%, 相对峰面积的 RSD 为 2.13%, 表明精密度良好。

2.4.2 稳定性

将供试品溶液保存在 4 °C 条件下, 取同一供试品溶液分别在 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h 检测, 记录色谱图, 芦丁的相对保留时间 RSD < 0.07%, 相对峰面积 RSD < 2.15%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

3 结果与分析

3.1 枸杞黄酮类化合物指纹图谱

使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版) 对每个产地样品的指纹图谱进行分析, 得到每个产地的对照图谱, 如图 2。

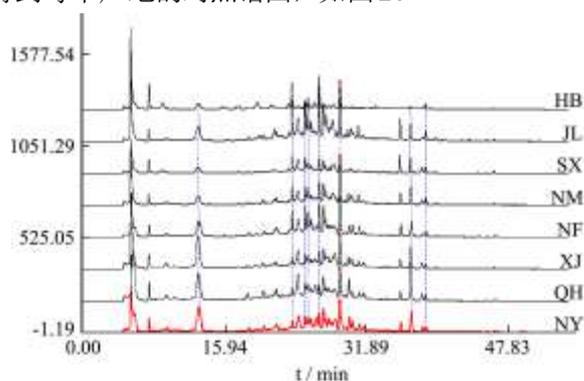


图 2 各产地枸杞对照图谱

Fig.2 Reference fingerprint of *Lycium chinense* from different origins

计算每个产地 6 批样品间的相似度, 见表 2, 其相似度值均大于 0.95, 以每个产地的对照图谱作为该产地枸杞的特征指纹图谱。

3.2 相似度分析

使用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对8个产地枸杞的对照图谱数据进行分析,以NY为参考图谱计算相似度,结果如表3所示。

表2 同产地样品相似度计算结果

批次	NY	QH	XJ	NF	NM	SX	JL	HB
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0.998	0.999	0.999	0.984	0.998	0.988	0.998	0.999
3	0.999	0.997	0.998	0.998	0.993	0.988	0.998	0.994
4	0.995	0.997	0.997	0.992	0.993	0.994	0.999	0.996
5	0.997	0.997	0.989	0.990	0.989	0.992	0.999	0.998
6	0.993	0.998	0.980	0.981	0.988	0.982	0.998	0.991

表3 8个产地枸杞对照图谱相似度计算结果

	NY	QH	XJ	NF	NM	SX	JL	HB
相似度	1	0.963	0.956	0.881	0.852	0.777	0.753	0.59

由表3可见,不同产地枸杞的指纹图谱相似度存在差异。根据与NY相似度的大小,可将样品分为四类: I类相似度大于95%, II类相似度为85~94%, III类相似度为75~84%, IV类低于75%。NY、QH、XJ产地枸杞指纹图谱相似度均大于95%,为I类; NF、NM产地枸杞指纹图谱相似度处于85~95%,为II类; SX、JL产地枸杞指纹图谱相似度处于75~85%,为III类; HB与NY相似度最低,为59%,将其归为IV类。

3.3 系统聚类分析

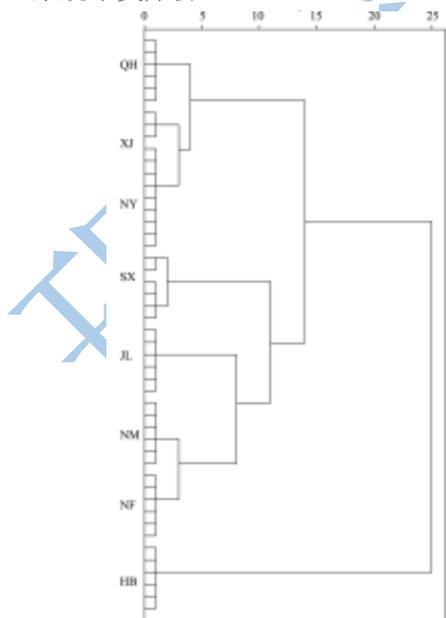


图3 样品系统聚类分析图

Fig.3 The cluster analysis of the samples

应用SPSS软件对每个产地枸杞对照图谱的共有

峰峰面积进行系统聚类分析。采用组间链接法,以夹角余弦作为样品相似度的测度,聚类结果如图3。

从图中可以看到聚类趋势,首先阈值最底层被划分为一类的样品来自同一产地,能够较好地各自聚在一起成为一类。随着阈值的增大, I类枸杞QH、XJ与NY聚为一类, II类枸杞NM与NF先聚在一起,再依次与III类枸杞JL、SX聚为一类; IV类枸杞HB自成一类。聚类趋势与相似度计算结果一致,两种方法的结果得到了相互验证。

4 结论

4.1 指纹图谱是现代分析常用的手段之一,它能够较充分的提取物质独特的信息。系统聚类分析作为化学计量学方法的一种,能够找到隐藏在众多共性下的差异,对提取的数据进行充分的多元分析。二者结合起来使用为枸杞的产地识别及质量评价提供了新的思路 and 模式。

4.2 本试验以地理标志产品中宁枸杞为参照,利用高效液相色谱建立了不同产地枸杞的黄酮类物质指纹图谱,使用中药指纹图谱软件进行分析,结果表明同一产地的样品之间相似度高,每个产地指纹图谱共有模式稳定可靠、专属性强;根据与中宁枸杞相似度的大小,我们可以将不同产地枸杞的质量分为四个等级。此外,利用系统聚类分析对指纹图谱得到的共有特征峰信息进行分析,结果表明同一产地和质量相近的枸杞在聚类时能够聚为一类。聚类分析的结果与相似度分析基本一致,为枸杞的产地识别和质量评价提供了新思路。《中国药典》中规定只有宁夏枸杞可入药,而根据分析结果发现青海、新疆产枸杞与中宁枸杞质量相似,因此可以考虑作为枸杞药材的新来源。

参考文献

- [1] 宗灿华,田丽梅.枸杞子药理学作用概况[J].牡丹江医学院学报,2002,23(4):49-50
- [2] 钱彦丛,宇文萍.枸杞子的化学成分及药理研究新进展[J].中医药学报,2000,28(4):33-35
- [3] 何进,阎淳泰,梁运祥.枸杞果是化学成分研究概况[J].中国野生植物资源,1997,16(1):8-11
- [4] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2010
- [5] 聂国朝.3种枸杞的HPLC-DAD图谱比较[J].福建林学院学报,2004,24(2):162-164
- [6] 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
- [7] 廖国玲,张自萍,郭荣.宁夏枸杞甜菜碱提取物高效液相色谱

- 谱指纹图谱研究[J].分析科学学报,2007,23(6):642-646
- [8] 张自萍,廖国玲,郭荣.宁夏枸杞高效液相色谱指纹图谱研究[J].中成药,2007,29(11):1566-1570
- [9] 张自萍,廖国玲,李弘武.宁夏枸杞黄酮类化合物 HPLC 指纹图谱研究[J].中草药,2008,39(1):103-105
- [10] 黄景怡,钟振声.蒲公英抑菌提取液氯仿萃取部位高效液相色谱指纹图谱的研究[J].现代食品科技,2010,26(1):46-48
- [11] 郑恒,魏日胞,陈香美.中药质量标准与中药指纹图谱[J].中国医院药学杂志,2003,23(2):112-113
- [12] 康福中,张立新,高木珍,等.中药色谱指纹图谱技术及应用前景[J].中国兽药杂志,2005,39(9):37-40
- [13] 刘军红,廖国玲.中药指纹图谱的研究综述[J].农业科学研究,2009,30(2):32-34
- [14] 刘江,陈兴福,杨文钰,等.川产麦冬野生资源 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J].中草药,2010,4(11):1875-1881
- [15] 宋小妹,杨新杰,王薇,等.珠子参的HPLC指纹图谱及模式识别[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):59-62
- [16] 杨树声,连翘HPLC指纹图谱的建立及其化学模式识别研究[J].西部中医药,2011,24(11):23-25
- [17] 王敏,潘书权,李翔,等.高效液相色谱-二极管阵列检测法指纹图谱和聚类分析用于黄芪质量评价[J].华北国防医药,2010,22(3):219-221