

枸杞类胡萝卜素指纹图谱的建立及其抗氧化活性谱效关系研究[△]

王静*,王杰,阿娜尔,李彤,杨冬平,戴俊东,董玲[#](北京中医药大学生命科学院,北京 102488)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0575-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.11



摘要 目的 建立枸杞类胡萝卜素高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并考察其共有峰与抗氧化活性的谱效关系。方法 采用HPLC法进行检测,根据《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012版)建立34批不同产地枸杞类胡萝卜素的指纹图谱,并进行相似度评价和共有峰指认。以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率为指标,考察枸杞类胡萝卜素的体外抗氧化活性,并采用灰色关联度法分析枸杞类胡萝卜素各共有峰与抗氧化活性的谱效关系。结果 34批枸杞类胡萝卜素共有4个共有峰,相似度均不低于0.903;并指认出1号峰为玉米黄质、4号峰为玉米黄质双棕榈酸酯。其对DPPH自由基的清除率为1.792%~3.160%。枸杞类胡萝卜素各共有峰与DPPH自由基清除率均呈正相关,关联度均大于0.6;2号峰、4号峰(玉米黄质双棕榈酸酯)与DPPH自由基清除率的关联度均大于0.8。根据关联度确定各共有峰对DPPH自由基清除率的贡献大小依次为2号峰>4号峰(玉米黄质双棕榈酸酯)>1号峰(玉米黄质)>3号峰。结论 本研究成功建立了枸杞类胡萝卜素的HPLC指纹图谱,指认了2个共有峰,其中2号峰所代表化学成分和玉米黄质棕榈酸酯可能是枸杞类胡萝卜素抗氧化活性的物质基础。

关键词 枸杞;类胡萝卜素;指纹图谱;谱效关系

Establishment of carotenoid fingerprint in *Lycium barbarum* and study on its antioxidant activity spectrum-effect relationship

WANG Jing, WANG Jie, Anaer, LI Tong, YANG Dongping, DAI Jundong, DONG Ling (College of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of carotenoid in *Lycium barbarum*, and to investigate the spectrum-effect relationship between its common peak and antioxidant activity. **METHODS** HPLC method was adopted. The fingerprints of carotenoid in 34 batches of *L. barbarum* from different producing areas were established by *Similarity Evaluation System of TCM Fingerprint* (2012 edition), and similarity evaluation and common peak identification were carried out. Taking scavenging rate of DPPH free radical as index, *in vitro* antioxidant activity of carotenoid in *L. barbarum* was investigated. The spectrum-effect relationship between the common peaks of carotenoids in *L. barbarum* and antioxidant activity was analyzed by grey correlation method. **RESULTS** There were 4 common peaks in the fingerprints of carotenoids in 34 batches of *L. barbarum*, and the similarity was not less than 0.903. Peak 1 was identified as zeaxanthin, and peak 4 as zeaxanthin dipalmitate. The scavenging rates of them to DPPH free radical were 1.792%-3.160%. The common peaks of carotenoids in *L. barbarum* were positively correlated with scavenging rate of DPPH free radical, and the correlation degree was greater than 0.6; the correlation degree of peak 2 and peak 4 (zeaxanthin dipalmitate) with scavenging rate of DPPH free radical was greater than 0.8. According to the correlation degree, the contribution of each common peak to scavenging rate of DPPH free radical was determined as peak 2>peak 4 (zeaxanthin dipalmitate)>peak 1 (zeaxanthin)>peak 3. **CONCLUSIONS** In this study, HPLC fingerprint of carotenoid in *L. barbarum* is successfully established, and two common peaks are identified. The chemical components represented by peak 2 and zeaxanthin palmitate may be the material basis of antioxidant activity of carotenoid in *L. barbarum*.

KEYWORDS *Lycium barbarum*; carotenoid; fingerprint; spectrum-effect relationship

枸杞为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实,是我国传统名贵中药材,具有悠久的药用历史。《本草纲目》载曰:“枸杞,补肾生精,养肝,明目,令

[△] 基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划重大(重点)项目(No.2018BCF01002)

* 硕士。研究方向:中药标准化。E-mail:17864189673@163.com

[#] 通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:中药标准化。E-mail:dongling@bucm.edu.cn

人长寿”^[1],其药用价值备受历代医家的推崇。现代研究发现,枸杞中主要活性成分为多糖、类胡萝卜素及其衍生物,其次还有生物碱类、黄酮类化合物^[2-3]。现代药理学研究表明,枸杞的活性成分具有抑菌、降血脂、降血糖、抗衰老等药理作用^[4]。其中,枸杞类胡萝卜素具有清除羟自由基、超氧自由基和过氧化氢的能力^[5-7]。但是,具体是枸杞类胡萝卜素中哪种成分发挥上述作用,尚不明确。

中药谱效关系研究将指纹图谱与中药药效相结合,可更全面评价中药药效物质基础^[6]。基于此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立枸杞类胡萝卜素的指纹图谱,并借助灰色关联分析,研究指纹图谱中共有峰与抗氧化活性的谱效关系,以期为进一步阐明枸杞类胡萝卜素抗氧化活性的药效物质基础提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究主要仪器有1206型HPLC仪(美国Agilent公司),SB25-12DTDN型数控超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司),SQP型万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],TU-1810型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 主要药品与试剂

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)试剂(批号201424)、玉米黄质双棕榈酸酯对照品(批号Z08M10H82528,纯度 $\geq 95\%$)、玉米黄质对照品(批号K13D8S50509,纯度 $\geq 85\%$)、叶黄素对照品(批号F07A9M66853,纯度 $\geq 98\%$)、 β -类胡萝卜素对照品(批号T28A9H60248,纯度 $\geq 98\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯,二氯甲烷、无水乙醇、丙酮为分析纯,水为纯净水。

本研究采集了不同产地枸杞样品34批(编号S1~S34,样品来源信息见表1),经北京中医药大学中药学院孙志蓉教授鉴定为茄科植物枸杞*L. barbarum* L.的干燥成熟果实。

表1 枸杞样品来源信息

编号	产地	编号	产地	编号	产地
S1	甘肃	S13	宁夏	S25	青海
S2	甘肃	S14	宁夏	S26	青海
S3	甘肃	S15	宁夏	S27	青海
S4	甘肃	S16	宁夏	S28	青海
S5	甘肃	S17	宁夏	S29	青海
S6	甘肃	S18	宁夏	S30	青海
S7	甘肃	S19	宁夏	S31	青海
S8	甘肃	S20	宁夏	S32	青海
S9	甘肃	S21	宁夏	S33	新疆
S10	内蒙古	S22	宁夏	S34	新疆
S11	内蒙古	S23	宁夏		
S12	内蒙古	S24	宁夏		

2 方法与结果

2.1 枸杞类胡萝卜素的制备

将枸杞药材粉碎,过筛,取细粉2 g,精密称定,加正己烷-无水乙醇-丙酮-二氯甲烷(体积比10:6:7:7)40 mL,超声(频率60 kHz,功率300 W)20 min,振摇30 min,在避光条件下皂化12 h;收集上层溶液,下层样品重复上述提取工艺,直至下层无色;合并多次提取的上层溶液,加入20 g无水硫酸钠脱水过滤,于35℃浓缩蒸干,再于真空冻干成粉末,即得枸杞类胡萝卜素^[9]。

2.2 色谱条件

色谱柱为YMC C₃₀(250 mm×4.6 mm,5 μm);以二氯甲烷-甲基叔丁基醚(体积比1:1)为流动相A、甲醇-乙腈-水(体积比84:11:5)为流动相B,进行梯度洗脱(0~22 min,70%B;22~50 min,50%B;50~55 min,70%B);流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,检测波长为517 nm,进样量为20 μL。

2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称取枸杞类胡萝卜素粉末1.0 g置于锥形瓶中,加入二氯甲烷5 mL溶解,滤过;取滤液2 mL,置于10 mL量瓶中,以无水乙醇定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 精密称取玉米黄质双棕榈酸酯、玉米黄质对照品各1.0 mg,置于同一10 mL量瓶中,以无水乙醇溶解并定容,即得混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取枸杞类胡萝卜素粉末(编号S18样品)1.0 g,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件连续进样6次。以4号峰(玉米黄质双棕榈酸酯,该峰分离度良好、峰面积大且稳定)为参照,记录各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.4%,相对峰面积的RSD均小于3.2%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性考察 取枸杞类胡萝卜素粉末(编号S18样品)1.0 g,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,于室温放置0、2、4、8、12、24 h后,按“2.2”项下色谱条件进样测定。以4号峰为参照,记录各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.6%,相对峰面积的RSD均小于3.1%,表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.4.3 重复性考察 取枸杞类胡萝卜素粉末(编号S18样品)1.0 g,共6份,按“2.3.1”项下方法平行制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定。以4号峰为参照,记录各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.5%,相对峰面积的RSD均小于4.3%,表明该方法重复性良好。

2.5 枸杞类胡萝卜素HPLC指纹图谱的生成、相似度评价和共有峰指认

2.5.1 指纹图谱的生成 取34批枸杞类胡萝卜素粉末各1.0 g,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定。采用《中药色谱指纹图谱相似性评价系统》(2012版)对34批枸杞类胡萝卜素的HPLC图进行分析,得到枸杞类胡萝卜素HPLC对照指纹图谱(R)和叠加指纹谱图,详见图1、图2。

2.5.2 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似性评价系统》(2012版)进行相似度评价。结果显示,34批枸

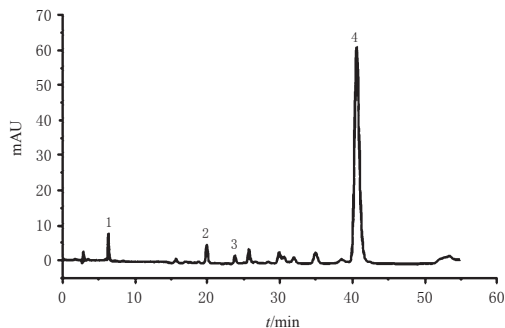
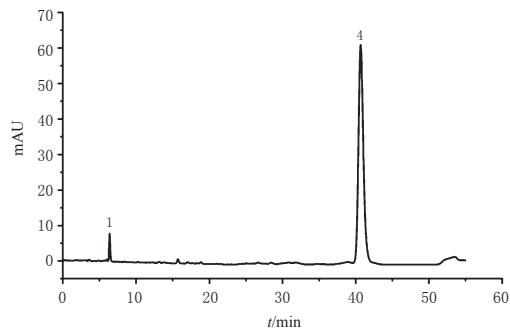


图1 枸杞类胡萝卜素的HPLC对照指纹图谱(R)



1: 玉米黄质; 4: 玉米黄质双棕榈酸酯

图3 混合对照溶液的色谱图

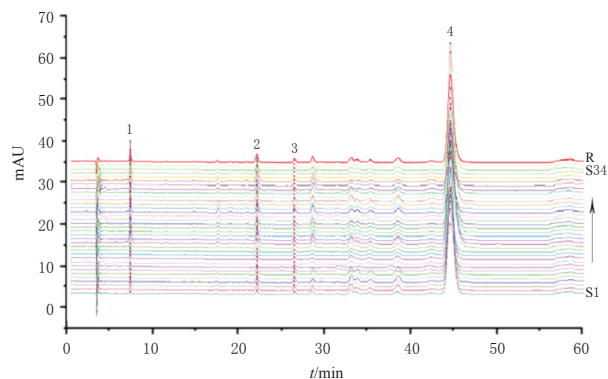


图2 34批枸杞类胡萝卜素的HPLC叠加指纹图谱

枸杞类胡萝卜素的HPLC图整体峰形一致,相似度均不低于0.903,提示不同产地枸杞中类胡萝卜素成分差异较小,具有较好的一致性。结果见表2。

表2 34批枸杞类胡萝卜素的相似度评价结果

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.975	S13	0.984	S25	0.927
S2	0.903	S14	0.991	S26	0.931
S3	0.945	S15	0.913	S27	0.929
S4	0.999	S16	0.972	S28	0.938
S5	0.921	S17	0.981	S29	0.999
S6	0.942	S18	0.997	S30	0.982
S7	0.908	S19	0.954	S31	0.974
S8	0.921	S20	0.957	S32	0.991
S9	0.919	S21	0.943	S33	0.993
S10	0.901	S22	0.981	S34	0.965
S11	0.947	S23	0.934		
S12	0.961	S24	0.991		

2.5.3 共有峰的指认 取“2.3.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图(图3)。与图1和图2比对可知,34批枸杞类胡萝卜素的HPLC叠加指纹图谱中有4个共有峰,指认出1号峰为玉米黄质、4号峰为玉米黄质双棕榈酸酯。

2.6 枸杞类胡萝卜素的抗氧化活性考察

称取DPPH 19.72 mg,加无水乙醇溶解并稀释至0.001 9 mg/mL,避光低温保存。精密称取枸杞类胡萝卜素粉末1.0 g,置于锥形瓶中,按“2.3.1”项下方法制备溶液;取1 mL置于25 mL量瓶中,加水稀释,制成质量浓度

为0.6 mg/mL的样品溶液。精密移取样品溶液1 mL和DPPH溶液1 mL置于10 mL比色管中,避光反应20 min后,采用紫外分光光度计于517 nm波长处测定吸光度值 A_i ;另移取样品溶液1 mL和水1 mL置于10 mL比色管中,避光反应20 min后,采用上述方法测定吸光度值 A_j ;另移取DPPH溶液1 mL与水1 mL置于10 mL比色管中,避光反应20 min,采用上述方法测定吸光度值 A_0 。上述试验平行操作3次,取平均值,并计算DPPH自由基清除率。DPPH自由基清除率 $= [1 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$ 。结果显示,34批枸杞类胡萝卜素的DPPH自由基清除率为1.792%~3.160%,详见表3。

表3 34批枸杞类胡萝卜素的DPPH自由基清除率测定结果($n=3, \%$)

编号	DPPH自由基清除率	编号	DPPH自由基清除率
S1	2.189	S18	2.083
S2	2.110	S19	1.862
S3	2.611	S20	1.968
S4	1.792	S21	2.150
S5	2.101	S22	1.881
S6	3.160	S23	2.031
S7	1.864	S24	1.824
S8	2.005	S25	1.887
S9	1.864	S26	1.974
S10	1.946	S27	1.858
S11	2.101	S28	1.864
S12	1.792	S29	1.852
S13	2.073	S30	1.992
S14	3.010	S31	2.042
S15	3.160	S32	1.874
S16	2.110	S33	1.958
S17	1.834	S34	1.900

2.7 枸杞类胡萝卜素的抗氧化活性谱效关系研究

2.7.1 数据处理 参考文献[10]方法,将枸杞类胡萝卜素指纹图谱的共有峰与DPPH自由基清除率数据进行转化和归一化处理,再将归一化后的DPPH自由基清除率数据作为参考序列[记为 $Y_{(k)}$],将共有峰数据作为比较序列[记为 $X_{i(k)}$],计算参考序列与比较序列的灰色关联系数[记为 $A_{i(k)}$]^[11],计算公式为: $A_{i(k)} = [\Delta_{i(k)\min} + \rho \times \Delta_{i(k)\max}] / [\Delta_{i(k)} + \rho \times \Delta_{i(k)\max}]$,其中 ρ 表示分辨系数(通常取0.5), $\Delta_{i(k)} =$

$|Y_{(k)} - X_{i(k)}|$, i 表示枸杞类胡萝卜素指纹图谱中的共有峰编号($i=1,2,3,\dots$)。

2.7.2 灰色关联度分析 根据“2.7.1”项下处理后的结果,分别计算各参考序列与比较序列之间的灰色关联系数 $A_{i(k)}$ 的平均值,即灰色关联度。将关联度按大小排序所得的关联序,可直观反映枸杞类胡萝卜素指纹图谱中各共有峰对 DPPH 自由基清除率的贡献大小,揭示其主要药效物质;当关联度大于 0.6 时,表示该色谱峰代表的化学成分与药效指标有关联性;当关联度大于 0.8 时,表示该色谱峰代表的化学成分与药效指标有较大关联性^[10]。结果显示,枸杞类胡萝卜素中 4 个共有峰与 DPPH 自由基清除率均呈正相关,关联度均大于 0.6;2 号峰、4 号峰(玉米黄质双棕榈酸酯)与 DPPH 自由基清除率的关联度均大于 0.8。根据关联度,确定各共有峰(成分)对 DPPH 自由基清除率的贡献大小依次为 2 号峰 > 4 号峰(玉米黄质双棕榈酸酯) > 1 号峰(玉米黄质) > 3 号峰。结果见表 4。

表 4 枸杞类胡萝卜素中共有峰(成分)与其抗氧化活性的相关性分析结果

峰号	关联度	关联序	对应化学成分
2号峰	0.877	2	未知
4号峰	0.862	3	玉米黄质棕榈酸酯
1号峰	0.722	5	玉米黄质
3号峰	0.714	6	未知

3 讨论

指纹图谱法利用其能够显示药材多种成分含量,并能特征性地表达药材成分复杂性的特殊优势,成为当前最有效、最快捷的中药质量控制与评价方法^[12]。鉴于此,本课题组从整体角度出发,采用 HPLC 法,建立了 34 批枸杞类胡萝卜素的指纹图谱及对照指纹图谱,确定了 4 个共有峰,计算得相似度为 0.903~0.999;通过与对照品进行比对,指认出了 1 号峰为玉米黄质、7 号峰为玉米黄质双棕榈酸酯。这为枸杞类胡萝卜素的质量控制与评价提供了参考依据。

其次,笔者在枸杞类胡萝卜素 HPLC 指纹图谱共有峰与其抗氧化活性数据量化的基础上,采用灰色关联度分析法对枸杞类胡萝卜素指纹图谱共有峰与抗氧化活性进行相关性研究。结果显示,枸杞类胡萝卜素各成分均具有抗氧化活性,2 号峰(未知成分)和 4 号峰(玉米黄质双棕榈酸酯)与 DPPH 自由基清除率的关联度大于

0.8,由此可知,2 号峰所代表的化学成分和玉米黄质棕榈酸酯是枸杞类胡萝卜素抗氧化活性的主要物质基础。这一研究结果初步探明了枸杞类胡萝卜素抗氧化活性的物质基础,也为后续建立化学特征关联功效活性的评价方法来评价不同产地枸杞的质量奠定了基础。

综上所述,本研究成功建立了枸杞类胡萝卜素的 HPLC 指纹图谱,指认了 2 个共有峰,其中 2 号峰所代表化学成分和玉米黄质棕榈酸酯可能是枸杞类胡萝卜素抗氧化活性的物质基础。

参考文献

- [1] 李时珍.本草纲目:下册[M].北京:人民卫生出版社,1982:52.
- [2] 吴有锋,马世震,谭亮,等.柴达木枸杞化学成分的测定[J].中成药,2017,39(5):984-989.
- [3] 周晶,李光华.枸杞的化学成分与药理作用研究综述[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(6):93-95.
- [4] 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.
- [5] 雷建武,米佳,罗青,等.枸杞中类胡萝卜素及体外抗氧化活性研究[J].食品工业,2015,36(12):5-8.
- [6] 周丽,梁新乐,励建荣.类胡萝卜素抗氧化作用研究进展[J].食品研究与开发,2003,24(2):21-23.
- [7] 李洋,马文平,倪志婧.宁夏枸杞体外抗氧化机理研究[J].食品科学,2014,35(1):79-84.
- [8] 曾令军,林兵,宋洪涛.中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J].中国中药杂志,2015,40(8):1425-1432.
- [9] INBARAJ B S, LU H, HUNG C F, et al. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47(4/5):812-818.
- [10] 蒋思怡,宋小英,张丹丹,等.菝葜 UPLC 指纹图谱与其抗大鼠盆腔炎作用的谱效关系研究[J].中国中药杂志,2019,44(15):3323-3329.
- [11] 罗心遥.基于谱效关系的茯苓健脾药效物质基础研究[D].武汉:湖北中医药大学,2020.
- [12] 张森,陈龙,朱华,等.石仙桃药材 HPLC 指纹图谱的建立及聚类分析[J].中国药房,2019,30(13):1792-1795.

(收稿日期:2021-10-13 修回日期:2022-01-06)

(编辑:唐晓莲)