

不同产地枸杞中主要类胡萝卜素的聚类分析

Cluster analysis on carotenoids contents in *Lycium barbarum* L fruits from different origins

曲云卿 张同刚 刘敦华

QU Yun-qing ZHANG Tong-gang LIU Dun-hua

(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

(Institute of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

摘要:采用分光光度法、高效液相色谱法测定新疆精河、甘肃白银、宁夏南梁、宁夏中宁、宁夏惠农、内蒙古乌拉特前旗先锋镇、宁夏固原、青海柴达木 8 个产地的枸杞干果中类胡萝卜素、玉米黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯的含量。结果表明:利用高效液相色谱法检测枸杞中 3 种主要类胡萝卜素的含量快捷、方便,可以在 20 min 内对 3 种类胡萝卜素定性、定量。青海枸杞的类胡萝卜素、玉米黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯含量最高。聚类分析将 8 个产地的枸杞分成了两大类,中宁、固原、青海的枸杞为一大类,其他产地的枸杞为一大类。

关键词:枸杞;产地;类胡萝卜素;聚类分析

Abstract: Objective: The content of carotenoids, zeaxanthin, β -carotene, zeaxanthin dipalmitate of *Lycium barbarum* L. dried fruit in eight areas (Jinghe of Xinjiang, Baiyin of Gansu, Nanliang of Ningxia, Zhongning of Ningxia, Huinong of Ningxia, Wulateqianqi Pioneer Town of Neimeng, Guyuan of Ningxia, Chaidamu of Qinghai) was determined by spectrophotometry and HPLC. Result: The method of HPLC to detect three major carotenoids of *Lycium barbarum* L. was simple and fast. The three major carotenoids could be qualitatively and quantitatively within 20 min. The content of carotenoids, zeaxanthin, β -carotene, zeaxanthin dipalmitate of *Lycium barbarum* L. dried fruit in Qinghai was the highest in eight areas. The *Lycium barbarum* L. in eight areas was divided into two categories by cluster analysis. The *Lycium barbarum* L. in Zhongning, Guyuan, Qinghai was a category, the other was a category.

Keywords: *Lycium barbarum* L.; origins; carotenoids; cluster analysis

枸杞又名枸杞子、杞子、枸牙子,是茄科茄亚科枸杞族枸杞属植物。中国主要分布在宁夏、新疆、甘肃、青海、内蒙古等地,其中宁夏枸杞最著名^[1]。枸杞作为药食同源植物^[2],

已被广泛用在食品工业中。目前中国市场上已开发出枸杞酒、枸杞饮料、枸杞保健品等产品^[3,4]。

不同产地的枸杞的品质差异很大。其理化成分、营养成分和生理活性成分的含量存在差异^[5],其价格也有较大差异。但有一些商家为了追求更高的利润,将不同产地枸杞进行混掺、掺假,严重损害了消费者的利益。因此,有必要对不同产地的枸杞的有效成分进行比较和分析。

类胡萝卜素是枸杞中的主要色素,也是枸杞中的重要活性成分之一,具有抗氧化、抗肿瘤等作用。枸杞果实中含有 β -胡萝卜素、玉米黄素和多种类胡萝卜素酯,其中玉米黄素双棕榈酸酯是枸杞中含量最高的类胡萝卜素^[6]。 β -胡萝卜素具有维生素 A 的活性,玉米黄素具有多种生理功能,如抗氧化、清除自由基、保护视力等^[7,8]。目前,对于枸杞中类胡萝卜素的研究主要集中在类胡萝卜素的提取方法优化^[9],不同成熟期枸杞类胡萝卜素的变化上^[6],因此本研究将对不同产地的枸杞中类胡萝卜素的比较分析作为研究内容。

本研究拟采用分光光度法和高效液相色谱法测定新疆、甘肃、南梁、中宁、惠农、内蒙、固原、青海 8 个不同产地的枸杞干果中的类胡萝卜素总量、 β -胡萝卜素、玉米黄素和玉米黄素双棕榈酸酯的含量,并进行聚类分析。旨在今后区分不同产地枸杞,提高枸杞质量提供一些技术参考,同时对指导枸杞种植以及建立枸杞质量标准有着重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

枸杞:2014 年分别从新疆精河、甘肃白银、南梁、中宁、惠农、内蒙乌拉特前旗先锋镇、固原、青海柴达木 8 个产地取得枸杞干果作为样品。在当地种植园采摘,每个产地随机取 500 g 样品,烘干,装入自封袋备用。

丙酮、石油醚:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

作者简介:曲云卿(1988—),女,宁夏大学在读硕士研究生。

E-mail:705737176@qq.com

通讯作者:刘敦华

收稿日期:2014-12-09

无水硫酸钠:分析纯,烟台市双双化工有限公司;

甲醇、正己烷、二氯甲烷:色谱纯,天津市大茂化学试剂厂;

乙腈:色谱纯,天津市光复精细化工研究所。

1.1.2 主要仪器设备

电热鼓风恒温干燥箱:101-3型,上海东星建材试验设备有限公司;

高效液相色谱仪:AGILENT 1100型,配有自动进样器,安捷伦公司;

色谱柱:ZORBAX Edipse XDB-C18反相色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),安捷伦公司;

集热式恒温磁力搅拌器:DF-101S型,巩义市予华仪器有限公司;

旋转蒸发器:RE-52AA型,上海亚荣生化仪器厂;

离心机:Cence-L550型,湘仪离心机仪器有限公司;

循环水式多用真空泵:SHB-III型,郑州长城科工贸有限公司;

电子天平:AL204型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

紫外可见分光光度计:T6新世纪型,北京普析通用仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 枸杞样品前处理 将不同产地的枸杞放入烘箱中,于40℃下,干燥至恒重。

精确称取约2g枸杞放入研钵中,加入少量的蒸馏水,研磨成糊状。倒入离心管中,用蒸馏水将研钵冲洗干净,洗液合并到离心管中。于3000 r/min离心3 min,弃去上清液(若上清液表面漂浮着枸杞籽,将种子取出重新研磨)。加入10 mL丙酮,于3000 r/min离心3 min,将上清液倒入分液漏斗。残渣中加入适量抗氧化剂(0.01% BHT),于35℃下,以丙酮和石油醚(1:2)混合试剂作为提取溶剂,对残渣进行4次提取,每次提取15 min,提取至无色。合并提取液,倒入分液漏斗。加入少量的蒸馏水,洗去水溶性杂质,弃去水层。加入适量的无水硫酸钠干燥。将有机层于38℃条件下进行旋转真空浓缩至干^[10]。全过程需避光操作^[11]。

1.2.2 类胡萝卜素的测定方法 将1.2.1处理好的样品用石油醚溶解,定容至10 mL^[12],需避光操作。450 nm处测定吸光值。根据Beer-Lambert定律,每克枸杞样品中类胡萝卜素含量(mg/g)按式(1)计算^[13]:

$$m = \frac{A \times V \times 1000}{2480 \times 100 \times m_1} \quad (1)$$

式中:

m ——样品中类胡萝卜素含量,mg/g;

A ——检测到的枸杞样品的吸光值;

V ——样品液体积,mL;

2480——在1 cm光程长的比色杯中1 g/L枸杞样品提取液的理论吸收值;

m_1 ——枸杞样品的质量,g。

1.2.3 主要类胡萝卜素的 HPLC 测定方法

(1) 标准溶液的配制:用电子天平准确称取β-胡萝卜素1 mg、玉米黄素1 mg和玉米黄素双棕榈酸酯2 mg,加少量二氯甲烷溶解,用流动相定容至10 mL,分别配成100、200 μg/mL的标准溶液,避光操作,-30℃避光保存备用。

(2) 将1.2.1处理好的样品用流动相溶解,定容至10 mL,避光操作,备用。

(3) 色谱条件:柱温:25℃;流动相:甲醇:正己烷:二氯甲烷:乙腈=15:20:20:40(体积比),等度洗脱;检测波长:450 nm;进样量:10 μL;流速:1.0 mL/min。保留时间定性。峰面积定量。

2 结果与分析

2.1 不同产地的枸杞中类胡萝卜素含量

类胡萝卜素是枸杞中的重要活性成分之一,具有抗氧化的作用。由图1可知,不同产地的枸杞中类胡萝卜素的含量差异很大,含量由高到低依次为:青海>中宁>固原>内蒙>南梁>新疆>甘肃>惠农。青海枸杞的类胡萝卜素含量最高,可达2.10 mg/g,惠农枸杞的类胡萝卜素含量最低,为0.41 mg/g,两者之间差了5倍。由此可知,不同产地枸杞中类胡萝卜素的含量差异显著。类胡萝卜素是枸杞的主要色素,其含量直接影响枸杞的颜色,从而间接影响枸杞的感官品质。

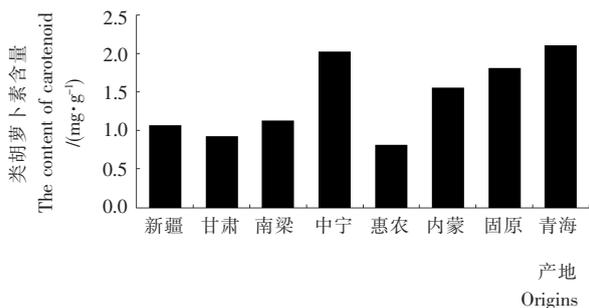


图1 不同产地的枸杞中类胡萝卜素含量

Figure 1 The contents of carotenoids of Lycium barbarum L. in different areas

2.2 高效液相色谱法检测枸杞中的主要类胡萝卜素

2.2.1 标准曲线的建立 将玉米黄素标准品、β-胡萝卜素标准溶液分别稀释到5,10,25,50,100 μg/mL。将玉米黄素双棕榈酸酯标准品稀释到20,50,80,100,200 μg/mL,重复测定3次。绘制标准曲线。根据信噪比S/N=3,测得3种类胡萝卜素的检出限,结果见表1。由表1可知,在相应的线性浓度范围内, R^2 均大于0.9995,呈良好的线性关系,可以满足定量分析的要求。3种类胡萝卜素标准品及惠农枸杞样品的色谱图见图2、3。对比图2和图3,发现玉米黄素、β-胡萝卜素和玉米黄素双棕榈酸酯的标准品和样品的出峰时间一致,峰型良好,符合定量检测的要求^[6]。

表 1 3 种类胡萝卜素标准品的标准方程、相关系数及检出限

Table 1 Standard curve of three kinds of carotenoids

类胡萝卜素标准品	标准方程	相关系数	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	检出限/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
β -胡萝卜素	$y=7.964 \times 10^{-6}x-1.2 \times 10^{-3}$	0.999 9	5~100	0.02
玉米黄素	$y=4.715 \times 10^{-6}x+2.52 \times 10^{-2}$	0.999 9	5~100	0.04
玉米黄素双棕榈酸酯	$y=1.494 \times 10^{-5}x-1.978 7$	0.999 5	20~200	0.12

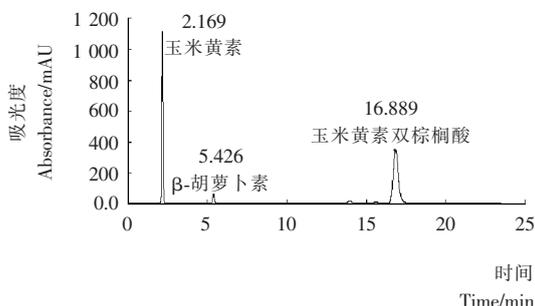


图 2 标准品色谱图

Figure 2 Chromatogram of standards

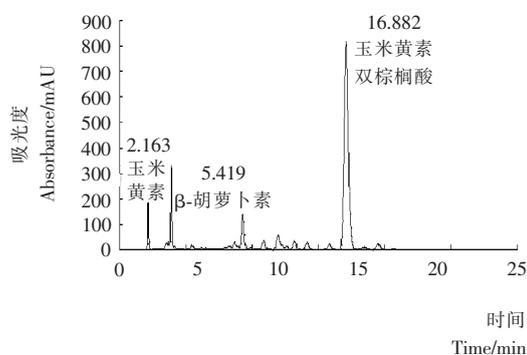


图 3 惠农枸杞样品色谱图

Figure 3 Chromatogram of the *Lycium barbarum* L. in Huinong

2.2.2 方法准确性试验 分别取 3 种标准品混合溶液,重复进样 6 次。发现 3 种标准品的色谱峰保留时间波动不超过 0.1 min。记录 3 种标准品的峰面积,计算得玉米黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯的峰面积 RSD 分别为 0.27%, 0.21%, 0.19%, 表明试验精密度良好。

取枸杞样品,按 1.2.1 样品处理方法对样品进行前处理,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样 10 μL , 计算得玉米黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯的峰面积 RSD 分别为 1.27%, 1.96%, 2.04%, 表明枸杞样品溶液在 12 h 内稳定性较好。

取同一种枸杞样品 3 份,按 1.2.1 样品处理方法对样品进行平行前处理,分别进样 10 μL , 按照外标法定量,计算得玉米黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯含量的 RSD 分别为 1.33%, 0.92%, 1.17%, 表明本方法重现性良好。

精密称取 4 份 2 g 左右的枸杞,第 1 份为空白,在另外 3

份中分别准确加入浓度分别为 50, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 3 种类胡萝卜素标准品各 1 mL, 按照 1.2.1 方法将 4 份样品进行处理,重复测定 5 次,测定标样回收率。计算得玉米黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯的回收率分别为 96.6%, 90.8%, 103.9%。本试验的精密度、稳定性、重现性、回收率表现良好,说明本方法可以满足不同产地枸杞干果中玉米黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯的定量要求。

2.2.3 不同产地枸杞中几种主要类胡萝卜素含量测定结果

不同产地的枸杞样品按 1.2.1 方法进行处理,按 1.2.3 方法测定,平行测定 3 次,结果见表 2。由表 2 可知,枸杞中 3 种类胡萝卜素含量从高到低,依次是:玉米黄素双棕榈酸酯 > 玉米黄素 > β -胡萝卜素。其中,玉米黄素双棕榈酸酯的含量是枸杞中最主要的类胡萝卜素,是类胡萝卜素存在的主要形式,可以作为枸杞的特征类胡萝卜素。其它类胡萝卜素酯的含量较少,且类胡萝卜素酯生理活性意义不大^[14],所以本试验没有进行研究。

不同产地的枸杞中 β -胡萝卜素含量最高的是青海产的,含量为 18.61 $\mu\text{g}/\text{g}$,而枸杞是自然界中 β -胡萝卜素含量最高的物质之一,青海产的枸杞可以作为 β -胡萝卜素的天然来源之一。不同产地枸杞中玉米黄素含量最高的也是青海产的枸杞,含量为 179.81 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。枸杞中,玉米黄素和 β -胡萝卜素可以合成玉米黄素双棕榈酸酯,而且具有重要的生理活性^[15],

表 2 不同产地枸杞类胡萝卜素含量测定结果

Table 2 The content of carotenoids in wolfberry of different origins 2

产地	β -胡萝卜素/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	玉米黄素/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	玉米黄素双棕榈酸酯/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	类胡萝卜素/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
新疆	10.31	84.70	0.82	1.06
甘肃	9.24	42.30	0.72	0.92
南梁	12.91	50.60	0.91	1.13
中宁	11.73	145.04	1.55	2.02
惠农	10.73	157.01	0.62	0.81
内蒙	6.15	60.57	1.12	1.55
固原	16.38	100.40	1.43	1.81
青海	18.61	179.81	1.57	2.10
平均值	12.01	102.55	1.09	1.38
标准差	3.97	52.31	0.38	0.59

其含量是评价枸杞品质的一项重要指标。从这个角度来说,青海产的枸杞是最好的。

2.3 聚类分析

使用 SPSS 19.0 软件对不同产地的枸杞中 β -胡萝卜素、玉米黄素、玉米黄素双棕榈酸酯和类胡萝卜素的含量进行了系统聚类分析,结果见图 4。聚类分析是将样品按照品质特性相似程度逐渐聚合在一起,相似度最大的优先聚合在一起,最终按照类别的综合性质多个品种聚合,从而完成聚类分析的过程^[16]。由图 4 可知,中宁、固原、青海的枸杞的相似程度较高,新疆、甘肃、南梁、惠农、内蒙古的相似程度较高。所以,8 个不同产地的枸杞干果样品一共分为两大类,其中中宁、固原、青海的枸杞样品为第一大类,其余 5 个产地的枸杞为第二大类。

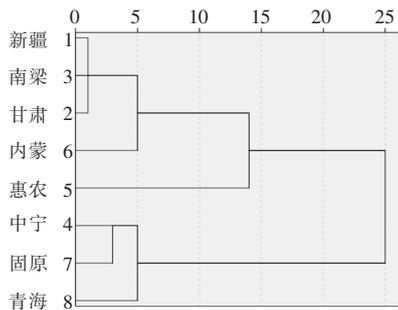


图 4 不同产地枸杞样品聚类分析图

Figure 4 The clustering diagram of *Lycium barbarum* L. in different areas

3 结论

本试验利用高效液相色谱法测枸杞中 β -胡萝卜素、玉米黄素、玉米黄素双棕榈酸酯的含量,该方法快捷、简便,可在 20 min 内使枸杞样品中的 β -胡萝卜素、玉米黄素、玉米黄素双棕榈酸酯完全分离,可以定性、定量分析枸杞中 3 种类胡萝卜素。

通过研究了解不同产地枸杞中主要类胡萝卜素的含量差异,这与不同产地的气候条件有着密切的关系,但是环境因素只起着一定的影响作用。研究表明,遗传因素的差异决定了不同产地的枸杞品质的差异性,其中,青海枸杞 β -胡萝卜素、玉米黄素、玉米黄素双棕榈酸酯的含量是 8 个产地中最高的。

聚类分析的结果显示,中宁、固原、青海的枸杞聚为一大类,其他产地的枸杞聚为一类,说明中宁、固原、青海的枸杞中主要类胡萝卜素含量相似性较大,而与其他产地枸杞比较差异相对较大,从而区分明显。

参考文献

1 姚霞. 中国枸杞属植物不同种质资源的研究及紫花地丁的化学成

分研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2010.

- 2 唐华丽,孙桂菊,陈忱. 枸杞多糖的化学分析与降血糖作用研究进展[J]. 食品与机械,2013,29(6):244~247.
- 3 顾春风. 枸杞冰淇淋的研制[J]. 食品与机械,2000(1):24.
- 4 程云辉,文新华. 百合枸杞复合保健饮料的研制[J]. 食品与机械,2000(6):10~11.
- 5 雷建刚,刘敦华,郭进. 不同产地枸杞干果品质的差异性研究[J]. 现代食品科技,2013,29(3):494~497.
- 6 李赫,陈敏,马文平. 不同成熟期枸杞中类胡萝卜素含量的变化规律[J]. 中国农业科学,2006,39(3):599~605.
- 7 van den Berg H, Faulks R, Fernando H G, et al. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000(80): 880~912.
- 8 卢艳杰,姚惠源. 黄体素、玉米黄素及其生理功能研究现状[J]. 食品与发酵工业,2003,29(2): 81~85.
- 9 张业辉,张桂,孙卫东,等. 枸杞中类胡萝卜素的提取研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(11):84~86.
- 10 李赫. 枸杞类胡萝卜素的分析方法及其加工过程中变化的研究[M]. 北京:中国农业大学,2006.
- 11 Oliver J, Palou A. Chromatographic determination of carotenoids in foods[J]. Journal of Chromatography A, 2000(881): 543~555.
- 12 康保珊,赵文恩,焦风云. 不同提取溶剂系统对类胡萝卜素总含量的影响[J]. 食品工业科技,2007(1):84~86.
- 13 Hart D J, Scott K J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK [J]. Food Chemistry, 1995(54): 101~111.
- 14 张晓煜. 宁夏优质枸杞形成的环境条件研究[D]. 北京:中国农业大学,2003.
- 15 徐昌杰,张上隆. 植物类胡萝卜素的生物合成及其调控[J]. 植物生理学通讯,2000, 36(1): 64~70.
- 16 高惠璇. 应用多元统计分析[M]. 北京:北京大学出版社出版,2005.