

基于花色苷元组分分析的黑枸杞原产地溯源方法研究

燕宇真, 王慧春, 曾 阳*, 王自超*

青海师范大学生命科学院, 西宁 810099

摘要:采用高效液相色谱法测定了不同产地黑枸杞样品中的花色苷元的组分。发现黑枸杞中花色苷元种类丰富,且矮牵牛的含量最高,为 5 776.42 ~ 14 858.52 mg/kg,说明黑枸杞具有很好的营养价值和生物活性。另外,黑枸杞中的花色苷元含量因黑枸杞的产地不同而呈现出较大的差异,因此可用于多元统计分析来进行黑枸杞原产地溯源。分析结果显示,黑枸杞花色苷元组分分析结合主成分分析和聚类分析,可用于黑枸杞原产地的溯源,识别能力和预判率均达到了 100.0%。

关键词:黑枸杞;花色苷元;多元统计分析;原产地溯源

中图分类号:Q946.91

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0030-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.006

Establishing a method to trace geographical origins of *Lycium ruthenicum* Murray based on the analysis of its anthocyanin aglycone compositions

YAN Yu-zhen, WANG Hui-chun, ZENG Yang*, WANG Zi-chao*

School of Life science, Qinghai Normal University, Xining 810099, China

Abstract:High performance liquid chromatography was used to measure anthocyanin aglycone compositions in *Lycium ruthenicum* Murray from different regions. It was observed that *Lycium ruthenicum* Murray has most all the anthocyanidin in nature, with petunidin having the highest level about 5 776.42-14 858.52 mg/kg, indicating *Lycium ruthenicum* Murray has good nutritional value and biological activity. In addition, the contents of anthocyanin aglycone varied greatly due to different geographical origins, suggesting that anthocyanin aglycone compositions can be used to distinguish *Lycium ruthenicum* Murray from different geographical origins using multivariate statistical analysis which showed a recognition ability of 100.0% and a prediction ability of 100.0%. The results showed that analysis of anthocyanin aglycone compositions combined with principal component and linear discriminant analysis could be a good method to trace the geographical origin of *Lycium ruthenicum* Murray.

Key words:*Lycium ruthenicum* Murray; anthocyanin aglycones; multivariate statistical analysis; tracing geographical origins

黑枸杞(*Lycium ruthenicum* Murry)为茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium* L.)植物。其果实中含有大量的功能性物质,例如花色苷、矿物质元素、多糖、氨基酸、多糖等^[1],因此被藏药经典《晶珠本草》记载并常被用来治疗心脏病、月经不调等病症^[2]。在黑枸杞果实所含有的功能性物质中,花色苷具有抗氧化、抗肿瘤、抗心血管病等多种功能^[3]。此前有学者对黑枸杞中的花色苷结构进行分析,发现黑枸杞中的花色苷均呈现为结合态,即在花青素 B 环的 3'

与 5'键上结合了各类糖基^[2,4]。这种结构能够保护黑枸杞果实高寒、干旱、强紫外光照射的条件下不受到损害^[4],但是它却降低了黑枸杞的功能性质,因为有报道指出,结合态花色苷的功能活性远低于花色苷苷元^[5,6]。但还未见有关于黑枸杞花色苷元组分的相关报道。

黑枸杞广泛分布在我国西北地区,例如青海、新疆、甘肃、内蒙古、宁夏等省份^[2]。其中,青海省是黑枸杞的主要产地,其独特的地理及气候环境使得青海黑枸杞中含有更多的功能性物质^[2,4]。从而青海黑枸杞相较于其他省份的黑枸杞具有更好的品质及更高的价格^[2]。这直接导致在市场售卖及消费过程中,青海黑枸杞被乱贴标签、以次充好的现象屡禁不止,其他产地的黑枸杞摇身一变成了价高质优

收稿日期:2018-10-31 接受日期:2019-05-21

基金项目:国家自然科学基金(81460652);青海省基础研究项目(2017-ZJ-774);青海师范大学科研基金

*通信作者 Tel: 86-013997098645; E-mail: zy-3 @ 263. net, zichao. wang@ snnu. edu. cn

的青海黑枸杞,严重损害了消费者及种植者的利益^[2]。造成这一现象的原因除了与相关法律法规不完善有关以外,最重要的是缺乏黑枸杞原产地的追溯机制。因此,本研究选取青海、甘肃、新疆、内蒙古、宁夏五省的黑枸杞,在分析其花色苷元组分的基础上,通过采用多元统计分析,来建立黑枸杞原产地的溯源办法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑枸杞采自青海格尔木,甘肃金塔,新疆和田,内蒙古阿拉善,宁夏永宁。经过青海师范大学生命科学学院陈振宁教授鉴定为 *Lycium ruthenicum* Murray。飞燕草、矢车菊、矮牵牛、天竺葵、芍药和锦葵色素以及芦丁标品购自美国 Sigma 公司。甲醇、乙腈、甲酸,三氟乙酸水为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

美国热电 UltiMate 3000 液相色谱仪, DZF-6030 型真空干燥箱, UV-754 分光光度计。

1.3 样品处理

样品采集后迅速-20℃冷冻并运至实验室,真

$$\text{总花色苷} = \frac{(A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5} \times MW \times DF \times V}{\epsilon \times l \times M}$$

其中: A_{510} 为 510 nm 处的吸光值; A_{700} 为 700 nm 处的吸光值; MW 为 449.2 (矢车菊-3-葡萄糖苷分子量); DF 为待测液稀释倍数; V 为待测液体积 (mL); ϵ 为消光系数 (29600 L/mol·cm); l 为光路长度 (cm); M 为样品重量 (g)。总花色苷含量以 mg/g 表示。

1.6 花色苷元组分测定

采用王二雷等^[6]的方法,利用酸解法去掉黑枸杞花色苷的糖苷,取提取液 1 mL 加入到 10 mL 2.5 mol/L HCl 溶液中酸解,于 100℃条件下反应 1 h,取出后迅速冷却至常温后备用。再将反应液过 Amberlite XAD-7HP 大孔树脂柱,先用 500 mL 去离子水 (含 0.01% HCl) 以 1 mL/min 的流速进行洗脱以便去除糖类等杂质,再用 300 mL 60% 的乙醇水溶液 (含 0.01% HCl) 进行洗脱,收集乙醇洗脱液并旋转蒸发浓缩,之后真空冷冻干燥备用。

采用中国农业行业标准 (NY/T 2640-2014)^[8] 中的规定的高效液相色谱仪法测定黑枸杞花色苷元的组分,取 1 g 花色苷元干粉用 50% 乙醇溶液溶解 2 h,过 0.22 μm 有机滤膜备用。流动相为 A 为 1% 甲酸水溶液, B 为 1% 甲酸乙腈溶液。洗脱梯

空冷冻干燥后,粉碎过 80 目筛备用。

1.4 总黄酮测定

采用娄舒婷^[7]的方法测定黑枸杞中总黄酮的含量。取 2 g 黑枸杞粉末,用 30 mL 50% 乙醇水溶液于 50℃水浴中浸提 2 h。之后取 1 mL 提取液,加 70% 乙醇水溶液至 5 mL,加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀后静置 6 min;再加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,摇匀后放置 6 min;加入 10% NaOH 溶液 4 mL,最后加入蒸馏水至 10 mL,摇匀后静置 15 min,之后于 510 nm 波长下测定吸光度。同时以 0、0.1、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL 芦丁溶液按照上述步骤试验,测定结果绘制标准曲线并计算总黄酮含量,黑枸杞样品中总黄酮含量以 mg/g 表示。

1.5 总花色苷测定

采用娄舒婷^[7]的方法测定黑枸杞中总花色苷的含量。取 0.5 mL 提取液,分别用 pH1.0 的氯化钾-盐酸缓冲液和 pH4.5 的醋酸钠-醋酸缓冲液定容于 10 mL,避光处理 30 min 后分别于 510 和 700 nm 处测量吸光值。总花色苷含量按以下公式计算:

度为 0~2 min:92~88% A;2~5 min:88~82% A;5~10 min:82~80% A;10~12 min:80~75% A;12~15 min:75~70% A;15~18 min:70~55% A;18~20 min:55~20% A;20~30 min:20~92% A。流速为 0.8 mL/min,检测波长为 525 nm,柱温 35℃。取六种天然花青素标品制得 0.5~50 mg/L 的系列标准工作溶液,进行液相色谱分析。其中飞燕草、矢车菊、天竺葵、芍药和锦葵色素的检出限为 0.15 μg/g,矮牵牛色素的检出限为 0.5 μg/g。花色苷元含量以 mg/kg 表示。

1.7 统计分析

每组实验重复 3 次,数据用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 19.0 统计软件进行组间差异显著性 ANOVA 分析及多元统计分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 黑枸杞样品中总黄酮以及总花色苷含量

花色苷是一类水溶性的黄酮类物质^[2]。因此本研究首先测定了黑枸杞样品中的总黄酮以及总花色苷含量,测定结果见表 1。发现青海黑枸杞中两者的含量最高,其次为甘肃黑枸杞,之后是内蒙古和

新疆黑枸杞,这两个省份的黑枸杞总黄酮和总花色苷含量相近,无显著差异,宁夏黑枸杞的含量则最少。总黄酮和总花色苷的含量因产地的不同呈现较大差异,这与黑枸杞产地当地的地域及气候原因有关^[2,4]。较大的昼夜温差、少雨以及较长的日照时间均能促进花色苷的合成及累积^[9,10]。此外,黑枸杞适更在碱性土壤中生长^[11]。Wang等^[2]总结指出青海黑枸杞的产地具有较大的昼夜温差、降雨较少、光照时间长,且属于碱性土地,而新疆和内蒙古两省黑枸杞的产地具有较相近的地理及气候条件。因此青海黑枸杞含有最高的总黄酮及总花色苷,而新疆

与内蒙古两省黑枸杞中两者的含量相似。说明青海黑枸杞相较于其他产地的黑枸杞具有更好的品质。尽管总黄酮以及总花色苷含量因黑枸杞的产地不同而呈现较大的差异,但是不同产地黑枸杞中总花色苷在总黄酮中的占比却相同,为8.0%左右。这说明不同产地的黑枸杞均具有相同的基因类型。此外,通过对比黑枸杞与其他报道的果蔬中的总花色苷发现,黑枸杞中的总花色苷要比诸如包括树莓、蓝莓和甜菜在内的其他果蔬要高。这说明黑枸杞,尤其是青海黑枸杞具有作为天然花色苷的重要来源的潜力。

表1 黑枸杞样品中总黄酮、总花色苷以及各花色苷苷元含量

Table 1 Contents of total flavonoids and anthocyanins and anthocyanin aglycones in the samples

样品种类 True category	总黄酮 Total flavonoids (mg/g)	总花色苷 Total anthocyanins (mg/g)	天竺葵 Pelargonidin (mg/kg)	矢车菊 Cyanidin (mg/kg)	锦葵 Malvidin (mg/kg)	飞燕草 Delphinidin (mg/kg)	矮牵牛 Petunidin (mg/kg)
宁夏 Ningxia	20.75 ± 1.52 ^d	1.76 ± 0.09 ^d	6.53 ± 0.46 ^e	13.44 ± 1.06 ^d	78.46 ± 0.17 ^e	353.53 ± 5.36 ^e	5 776.42 ± 110.20 ^e
新疆 Xinjiang	35.65 ± 2.35 ^c	2.69 ± 0.13 ^c	12.10 ± 1.61 ^d	20.75 ± 2.86 ^c	117.67 ± 5.97 ^d	415.61 ± 11.06 ^d	94 69.94 ± 403.57 ^d
内蒙古 Neimenggu	36.93 ± 1.26 ^c	3.01 ± 0.11 ^c	18.86 ± 0.91 ^e	22.60 ± 1.41 ^d	142.30 ± 5.54 ^d	454.31 ± 6.19 ^e	10 678.37 ± 559.03 ^e
甘肃 Gansu	46.22 ± 3.24 ^b	3.71 ± 0.15 ^b	23.08 ± 0.36 ^b	25.93 ± 1.17 ^b	169.59 ± 4.16 ^b	539.51 ± 4.61 ^b	13 618.72 ± 467.26 ^b
青海 Qinghai	59.45 ± 3.43 ^a	4.55 ± 0.31 ^a	26.26 ± 1.15 ^a	30.81 ± 1.93 ^a	191.49 ± 5.97 ^a	554.73 ± 9.13 ^a	14 858.52 ± 549.02 ^a

注:每列数值中具有不同上标字母的表示存在显著差异($P < 0.05$)。

Note: Data with the same superscript in the same column are not significantly different ($P < 0.05$).

2.2 黑枸杞样品中花色苷苷元的种类及含量

通过酸解去掉糖苷之后,黑枸杞样品中的花色苷苷元测定结果见表1。天然存在的花色苷苷元有6种^[12],包括天竺葵、矢车菊、锦葵、矮牵牛、飞燕草以及芍药色素。从表1可发现黑枸杞样品中花色苷苷元除芍药色素之外,其他的苷元全部都含有,其基本结构见图1,说明黑枸杞样品中的花色苷苷元种类丰富,从而具有很高的营养价值。

Wang等报道指出,黑枸杞中的花色苷的种类为13种,其中绝大部分的花色苷为结合态^[2,4],即花色苷苷元B环的3'和5'上链接着糖苷,可以对黑枸杞在生长过程中起到保护作用,避免强紫外线等恶劣因素的伤害^[4]。本文研究发现,经过酸解之后黑枸杞花色苷的糖苷键全部断裂,花色苷苷元与糖苷分离,形成了独立的花色苷苷元,即花青素。

但酸解过程中对花色苷苷元是否有破坏以及破坏的程度还需进一步研究。另外,由于结合态花色苷的功能活性远低于花色苷苷元^[5,6],因此可以推测酸解过程会增强黑枸杞的功能活性,这为黑枸杞的进一步开发利用提供了科学依据。

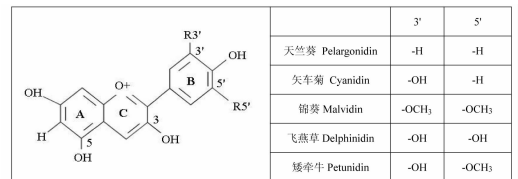


图1 黑枸杞样品中花色苷苷元的基本结构

Fig. 1 Basic structure of anthocyanin aglycones in the samples

通过对黑枸杞样品中花色苷苷元的定量分析(见表1),发现矮牵牛的含量最高,为5 776.42 ~ 14 858.52 mg/kg;其次依次为飞燕草、锦葵、矢车菊和飞燕草,但是后几种花色苷苷元的含量均远小于矮牵牛(6.53 ~ 554.73 mg/kg)。Li等^[13]指出矮牵牛苷元因为含有两个羟基结构,从而比包括锦葵在内的单羟基结构的花色苷苷元更具活性。因此不难推断黑枸杞具有很强的生物生理活性,这也解释了黑枸杞能够作为传统中药材而被藏药经典《晶珠本草》记载并常用于治疗各种疾病。另外,观察发现每种花色苷苷元的含量均按照宁夏、新疆、内蒙古、甘肃、青海的顺序递增,并不难理解这一顺序,因为如2.1中阐述的,黑枸杞中总黄酮及总花色苷含

量的变化也遵循这一顺序,造成这一现象的原因可能与黑枸杞产地当地的气候及地理条件有关^[2,4]。由于具有较强活性的矮牵牛在黑枸杞花色苷元中所含比例较大,达 95% 左右(表 1),因此黑枸杞尤其青海黑枸杞可被用于具体开发功能性食品或者相关药物。

2.3 黑枸杞原产地追溯机制的建立

主成分分析(PCA)以及聚类分析(LDA)常被用于基于果蔬中活性成分分析的原产地追溯机制建立,例如苹果、猕猴桃等^[2,13],并取得了良好的应用。因此,本研究首先对黑枸杞样品中花色苷元的含量进行了 PCA 分析。PCA 分析提取了 2 个主成分,其载荷见表 2。这 2 个主成分的总贡献率为 100.0%,见图 2。其中第 1 主成分的贡献率为 67.83%(图 2)。由表 2 可知,第 1 主成分中天竺葵、锦葵和飞燕草苷元贡献较大。第 2 主成分贡献率为 31.27%(图 2)。根据表 2,第 2 主成分中矮牵牛贡献较大。在 2.2 讨论中我们发现,矮牵牛苷元是黑枸杞样品中含量最大的花色苷元,其含量远大于天竺葵、锦葵以及飞燕草等其他花色苷元。但是在 PCA 分析中,矮牵牛苷元对第 1 主成分的贡献却不及其他含量较少的花色苷元。这可能是由于不光主要活性成分,次要活性成分也会对果蔬的原产地分类产生决定因素^[2,13]。另外,由图 1 我们发现,基于 PCA 提取的 2 个主成分分布,可以很好的将黑枸杞样品以原产地的不同而区分开来,所以黑枸杞样品种的花色苷元组分可以作为判别黑枸杞原产地的生物因子在实际应用中使用。

表 2 黑枸杞样品主成分分析提取 2 项主成分载荷图

Table 2 Loadings of the features in the first three principal components for the samples

指标 Indication	第一主成分 PC1	第二主成分 PC2
天竺葵 Pelargonidin	1	-0.03
矢车菊 Cyanidin	0.768	-0.641
锦葵 Malvidin	0.996	0.084
飞燕草 Delphinidin	0.921	0.390
矮牵牛 Petunidin	0.08	0.997

进一步,我们对黑枸杞样品中花色苷元的含量进行了 LDA 分析。基于 PCA 分析,我们将黑枸杞样品中检测到的五中花色苷元含量全部纳入到标记物中,LDA 分析得到了 2 个判别成分,其特征值、方差、正相关系数以及判别式函数系数见表 3,并且

LDA 分析的识别能力和预判率均达到了 100.0% (表 3 和表 4)。

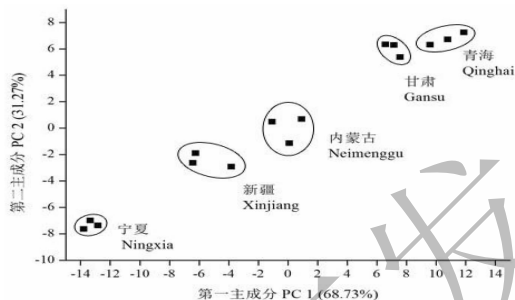


图 2 黑枸杞样品花色苷元 PCA 分析主成分得分图

Fig. 2 Plots of the anthocyanin aglycone composition in the samples investigated in PCA

表 3 黑枸杞样品聚类分析得到前 2 个判别成分的特征值、方差、正相关性以及函数系数

Table 3 Eigenvalues, explained variances, canonical correlations and coefficients of the variables in the first two discriminant functions

指标 Indication	第一判别成分 F1	第二判别成分 F2
特征值 Eigenvalue	109.919	24.407
方差 Explained variance(%)	81.8	18.2
正相关性 Canonical correlation	0.995	0.98
天竺葵 Pelargonidin	-0.825	-2.861
矢车菊 Cyanidin	-0.595	1.81
锦葵 Malvidin	1.31	1.407
飞燕草 Delphinidin	0.839	-0.838
矮牵牛 Petunidin	0.34	1.072

由表 3 可知,LDA 分析得到的 2 个判别成分,并占据了全部原始数据集包含的方差值。第 1 判别成分和第 2 判别成分分别占据了 81.8% 和 18.2% 的方差值。说明这两个判别成分能够充分揭示原始数据集包含的信息。根据 LDA 分析黑枸杞样品的二位分布图显示,LDA 分析将黑枸杞样品根据原产地的不同,分别划分为了宁夏组、新疆组、内蒙古组、甘肃组和青海组,见图 3。结果显示 LDA 分析可以将黑枸杞样品基于其原产地而进行很好的识别。结合 PCA 分析,可以说明黑枸杞样品中花色苷元组分分析结合 PCA 和 LDA 分析,可以作为黑枸杞原产地溯源的方法在实际应用中使用,从而保护消费者和种植者的利益,这对促进当地的农业繁荣和经济发展具有重要意义。但是正如学者此前报道^[1,2,4],果蔬中的酚类物质的合成以及累积收到诸多因素的

表4 黑枸杞样品 LDA 分析预判率

Table 4 Prediction results of LDA for the samples

样品种类 True category	预判率 Prediction ability (%)				
	宁夏 Ningxia	新疆 Xinjiang	内蒙古 Neimenggu	甘肃 Gansu	青海 Qinghai
宁夏 Ningxia	100	0	0	0	0
新疆 Xinjiang	0	100	0	0	0
内蒙古 Neimenggu	0	0	100	0	0
甘肃 Gansu	0	0	0	100	0
青海 Qinghai	0	0	0	0	100

总预判率 Total classification ability = 100.0%

影响,例如品种、成熟期、光照时间、昼夜温差、土壤环境、降雨等。因此,在后续研究中应该将更多的样品纳入到黑枸杞原产地溯源办法的建立中,以便得到更加科学和准确的溯源办法。

可用于进行多元统计分析来建立黑枸杞原产地溯源的办法。基于花色苷元组分分析,通过 PCA 和 LDA 分析发现能够很好的将黑枸杞按照原产地进行区分,别能力与预判率均达到 100.0%。这为黑枸杞交易过程中提供了一种科学的原产地溯源方法,能够保护消费者和种植者的利益,对促进当地农业繁荣和经济发展具有重要意义。

参考文献

- 1 Peng Q, Liu H, Lei H, et al. Relationship between structure and immunological activity of an arabinogalactan from *Lycium ruthenicum*[J]. Food Chem, 2016, 194:595-600.
- 2 Wang Z, Yan Y, Nisar T, et al. Comparison and multivariate statistical analysis of anthocyanin composition in *Lycium ruthenicum* Murray from different regions to trace geographical origins; the case of China[J]. Food Chem, 2018, 246:233-241.
- 3 Liobikas J, Skemiene K, Trumbeckaite S, et al. Anthocyanins in cardioprotection: a path through mitochondria[J]. Pharmacol Res, 2016, 18:556-599.
- 4 Zheng J, Ding C, Wang L, et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau[J]. Food Chem, 2011, 126:859-865.
- 5 Lee KW, Kim YJ, Kim DO, et al. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity[J]. J Agr Food Chem, 2003, 51:6516-65.
- 6 Wang EL, Chen JJ, Liu JB. Preparation of blueberry anthocyanin glycosides and aglycones and their antioxidant activity[J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2016, 32:175-182.
- 7 Lou ST. Research on the active ingredient and volatile components of *Lycium ruthenicum* Murr. [D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2015.

(下转第 151 页)

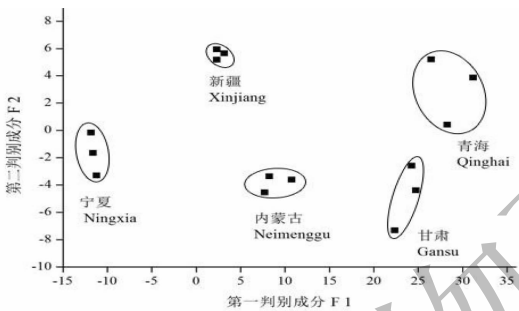


图3 黑枸杞样品 LDA 分析聚类效果图

Fig. 3 Plots of the anthocyanin aglycone composition in the samples investigated in LDA

3 结论

本文首先对不同产地的黑枸杞样品中总黄酮、总花色苷进行了测定,发现其二者含量因黑枸杞产地的不同而呈现较大的差异。其中,青海黑枸杞不论是总黄酮还是总花色苷含量均高于其他产地黑枸杞,说明青海黑枸杞具有更好的品质,可作为天然花色苷的重要来源。通过对黑枸杞中花色苷元的组分分析,发现所有黑枸杞样品中均含有矮牵牛、天竺葵、锦葵、飞燕草以及矢车菊等 5 种花色苷元,说明黑枸杞样品中花色苷元种类丰富,从而具有较高的营养价值。其中,矮牵牛的含量最高且远高于其他种类的花色苷元,因为矮牵牛相较于其他花色苷元具有更高的生物活性,所以黑枸杞具有较强的药用价值。此外,所有花色苷元的含量均因黑枸杞产地的不同而呈现出较大的差异,其变化趋势与总花色苷相同。基于此,黑枸杞花色苷元