

· 药学基础 ·

## 基于<sup>1</sup>H-NMR植物代谢组学技术分析青海产区 枸杞子的化学特征

赵光跃<sup>1</sup>, 魏玉海<sup>1\*</sup>, 苏姗姗<sup>1</sup>, 喇红玲<sup>1</sup>, 严培瑛<sup>2</sup>, 李彩明<sup>2</sup>, 李震宇<sup>3\*</sup>

(1. 西宁海关技术中心 青海省食品安全研究重点实验室, 西宁 810001;

2. 青海师范大学 生命科学学院, 西宁 810001; 3. 山西大学 中医药现代研究中心, 太原 030006)

**[摘要]** 目的: 采用核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)植物代谢组学技术比较青海产区枸杞子与其他产区(宁夏、甘肃、新疆、内蒙古)枸杞子的化学成分差异。方法: 收集5个产区共97份枸杞子样本, 其中青海61个样本, 采用50%甲醇提取, 检测<sup>1</sup>H-NMR图谱, 结合多元统计分析, 对比青海产区枸杞子与其他产区枸杞子的化学差异性, 并对各产区样本的枸杞多糖进行含量测定(以无水葡萄糖计), 检测波长490 nm。结果: 枸杞子的<sup>1</sup>H-NMR图谱共检测到32个化学成分, 多元统计分析表明青海产区枸杞子与其他产区样本相比, 无明显分离趋势; 青海产区枸杞子与宁夏产区相比, 以及青海省6个不同地区的枸杞子相比, 重叠样品较多, 均不能显著分开。相似度结果表明, 大多数样品的相似度>0.85; 化合物的单变量分析结果显示, 除了蔗糖、葡萄糖、脯氨酸等个别代谢物在各产区样本中存在显著差异外, 其余代谢物在各产区样品中的含量分布基本一致。青海与其他产区样本中枸杞多糖含量无显著性差异, 且枸杞多糖含量与<sup>1</sup>H-NMR指认的小分子化合物的相关系数处于-0.2~0.4。结论: 采用<sup>1</sup>H-NMR植物代谢组学技术从整体化学组成上分析了青海产区枸杞子的化学特征, 并结合枸杞多糖含量测定, 显示青海产区枸杞子与其他产区枸杞子的化学差异较小。建立的基于<sup>1</sup>H-NMR的枸杞子质量评价方法可为其质控水平提升及种植产区选择提供科学依据。

**[关键词]** 枸杞子; 核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR); 化学差异; 代谢组学; 相似度; 多糖; Pearson相关性

**[中图分类号]** R22; R28; C37; O482.53; R931 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)17-0095-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201159

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200319.1904.006.html>

**[网络出版日期]** 2020-3-20 11:07

### Analysis on Chemical Characteristics of Lycii Fructus in Qinghai Province Based on <sup>1</sup>H-NMR Plant Metabolomics

ZHAO Guang-yue<sup>1</sup>, WEI Yu-hai<sup>1\*</sup>, SU Shan-shan<sup>1</sup>, LA Hong-ling<sup>1</sup>, YAN Pei-ying<sup>2</sup>,  
LI Cai-ming<sup>2</sup>, LI Zhen-yu<sup>3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Food Safety Research in Qinghai Province, Technical Center of Xining Customs, Xining 810001, China; 2. School of Life Sciences, Qinghai Normal University, Xining 810001, China; 3. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**[Abstract]** **Objective:** The chemical differences of Lycii Fructus samples from Qinghai, Ningxia, Gansu, Xinjiang and Inner Mongolia provinces were compared based on proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) plant metabolomics. **Method:** A total of 97 Lycii Fructus samples from five provinces were collected, including 61 samples in Qinghai, and extracted by 50% methanol for detecting. <sup>1</sup>H-NMR spectra were obtained and compared by multivariate statistical analysis for investigating the chemical differences of samples from

**[收稿日期]** 20191206(015)

**[基金项目]** 国家“十三五”重点研发计划项目(2017YFF021130304); 青海科技计划项目(2017-ZJ-762)

**[第一作者]** 赵光跃, 硕士, 工程师, 从事中药和食品研究, Tel: 0971-8231571, E-mail: zhgy56789@163.com

**[通信作者]** \* 魏玉海, 硕士, 高级工程师, 从事药品及食品中有害物质研究, Tel: 0971-8231571, E-mail: wyhouyou@sina.com;

\* 李震宇, 博士, 教授, 从事中药质量控制及活性成分研究, Tel: 0351-7018379, E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

Qinghai and other production areas. And the content of Lycii Fructus polysaccharides in all samples was determined with the wavelength of 490 nm (calculated by anhydrous glucose). **Result:** A total of 32 chemical components were detected in the Lycii Fructus extract by  $^1\text{H-NMR}$ . The multivariate statistical analysis revealed that there was no significant difference among the samples from five provinces. The difference between Lycii Fructus from Qinghai and Ningxia, as well as the samples among the six regions of Qinghai province were relatively small. The similarity values of the majority of samples were  $>0.85$ . Univariate analysis showed that no significant difference was observed for the most metabolites in Lycii Fructus collected from five provinces, except for sucrose, glucose, proline and so on. There was no significant difference in the content of Lycii Fructus polysaccharides between Qinghai and other provinces. And the correlation coefficient between the content of Lycii Fructus polysaccharides and the small molecular compounds identified by  $^1\text{H-NMR}$  was  $-0.2-0.4$ . **Conclusion:** In this study, chemical characteristics of Lycii Fructus in Qinghai province are analyzed from the holistic view by  $^1\text{H-NMR}$  plant metabolomics, in combination of polysaccharide determination, and the results show that there is no significant difference between samples from Qinghai and other four provinces. The quality evaluation method based on  $^1\text{H-NMR}$  established in this study can provide scientific basis for improving quality control level and selecting planting areas of Lycii Fructus.

**[Key words]** Lycii Fructus; proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ); chemical difference; metabolomics; similarity; polysaccharides; Pearson correlation

枸杞子为茄科植物宁夏枸杞的干燥成熟果实<sup>[1]</sup>,《神农本草经》将其列为上品,具有滋肝补肾、益精明目的功效。文件《卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知》将枸杞子列入“既是食品又是药品的物品名单”,使得枸杞子备受临床医家与食品家的广泛关注。枸杞子含有丰富的营养成分,包括氨基酸、糖类、黄酮类、多酚类等<sup>[2]</sup>。宁夏枸杞在我国分布最为广泛,种植规模较大的地区主要有宁夏、甘肃、青海、新疆及内蒙古5个省区<sup>[3]</sup>。其中,宁夏回族自治区是我国传统的枸杞子主产区之一,而青海省枸杞子产量大,是新兴种植区。

目前,关于不同产区的枸杞子质量对比研究主要有基于HPLC指纹图谱的相似性分析<sup>[4]</sup>,单一成分(玉米黄素、玉米黄素双棕榈酸酯和 $\beta$ -胡萝卜素等<sup>[5]</sup>)的含量比较,浸出物、多糖、甜菜碱的含量比较<sup>[6]</sup>等。植物代谢组学技术基于分析菌群指标,以高通量检测为手段,有整体观的研究思路,适合于中药复杂体系的分析。与液相色谱检测方法相比较,核磁共振(NMR)技术的优势在于样本的无损检测、可检测无紫外吸收以及色谱柱上不保留的化合物,此外,还可根据图谱中峰型、耦合常数等信息推测信号峰所对应的代谢物结构<sup>[7]</sup>。目前,核磁共振氢谱( $^1\text{H-NMR}$ )与代谢组学技术相结合已被广泛用于不同产地的药材评价方面,如黄芪<sup>[8]</sup>、款冬花<sup>[9]</sup>、人参<sup>[10]</sup>等。

本研究拟基于 $^1\text{H-NMR}$ 植物代谢组学技术,建立枸杞子的 $^1\text{H-NMR}$ 指纹图谱,并采用多元统计分析,从整体性角度,分析青海与其他产区(宁夏、甘肃、新疆、内蒙古)枸杞子的化学成分差异,旨在明确青海产区枸杞子的质量特征,为其质控水平提升和种植产区选择提供参考。

## 1 材料

Avance III型核磁共振仪(德国Bruker公司,质子频率600.13 MHz),Milli-Q型超纯水机(美国密理博公司)。

氘代甲醇(德国Merck公司),3-(三甲基硅基)氘代丙酸钠(TSP,美国Cambridge Isotope Laboratories公司),氘代氢氧化钠(瑞士Armar公司),重水(美国Norell公司),亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸、琥珀酸、谷氨酰胺、柠檬酸、天冬氨酸、天冬酰胺、甜菜碱、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、棉子糖、酪氨酸、尿嘧啶核苷、肉桂酸、富马酸、苯丙氨酸、甲酸、葫芦巴碱均购自生物工程(上海)股份有限公司,试剂均为分析纯。

收集了青海、甘肃、新疆、内蒙古及宁夏5个省区共97份不同产地的枸杞子样本,经西宁海关技术中心魏玉海工程师鉴定为宁夏枸杞 *Lycium barbarum* 的干燥成熟果实,样本均保存在西宁海关技术中心,详细信息见表1。

表1 不同产区枸杞子的样品信息、相似度分析及多糖质量分数

Table 1 Sample information, similarity analysis and polysaccharide content of Lycii Fructus from different regions

No.	产地	相似度	多糖质量 分数/%	No.	产地	相似度	多糖质量 分数/%
1	青海共和县恰卜恰镇	0.974	4.21	41	青海都兰县宗加镇	0.918	2.95
2	青海乌兰县铜普镇	0.952	4.28	42	青海都兰县宗加镇	0.914	3.40
3	青海乌兰县铜普镇	0.806	7.66	43	青海都兰县宗加镇	0.938	7.13
4	青海乌兰县铜普镇	0.942	3.83	44	青海都兰县宗加镇	0.936	3.72
5	青海乌兰县铜普镇	0.916	2.42	45	青海都兰县宗加镇	0.887	2.49
6	青海乌兰县铜普镇	0.903	2.68	46	青海都兰县巴隆乡	0.908	8.11
7	青海乌兰县铜普镇	0.931	1.91	47	青海都兰县巴隆乡	0.946	8.55
8	青海德令哈市怀头他拉镇	0.934	2.19	48	青海都兰县巴隆乡	0.878	4.80
9	青海德令哈市怀头他拉镇	0.978	4.62	49	青海都兰县香日德镇	0.950	6.58
10	青海德令哈市怀头他拉镇	0.896	2.86	50	青海都兰县诺木洪农场中心街	0.915	2.67
11	青海德令哈市怀头他拉镇	0.909	4.49	51	青海都兰县诺木洪农场工副业大队烘干厂	0.899	1.99
12	青海德令哈市怀头他拉镇	0.956	4.99	52	青海都兰县诺木洪农场中心街	0.897	2.59
13	青海德令哈市怀头他拉镇	0.947	4.90	53	青海都兰县诺木洪农场中心街	0.945	3.11
14	青海德令哈市怀头他拉镇	0.945	6.14	54	青海都兰县诺木洪农场中心街	0.951	1.76
15	青海德令哈市怀头他拉镇	0.907	6.51	55	青海都兰县诺木洪农场中心街	0.822	2.98
16	青海德令哈市怀头他拉镇	0.967	4.41	56	青海都兰县诺木洪农场中心街	0.922	2.04
17	青海德令哈市怀头他拉镇	0.869	4.85	57	青海都兰县诺木洪农场	0.932	3.70
18	青海德令哈市怀头他拉镇	0.840	5.14	58	青海都兰县宗加镇诺木洪农场派出所旁	0.955	6.51
19	青海德令哈市怀头他拉镇	0.944	3.64	59	青海都兰县诺木洪农场工副业大队	0.954	3.92
20	青海大柴旦马海村	0.912	6.12	60	青海都兰县察苏镇西沙滩村	0.962	3.31
21	青海大柴旦马海村	0.935	4.23	61	青海都兰县诺木洪商店	0.946	6.04
22	青海大柴旦马海村	0.923	6.90	62	甘肃张掖市临泽县鸭暖镇	0.961	2.87
23	青海大柴旦马海村	0.941	4.00	63	甘肃玉门市下西号乡塔尔湾村	0.951	2.97
24	青海大柴旦马海村	0.914	3.42	64	甘肃中宁县恩和镇红梧山村	0.951	4.19
25	青海格尔木市昆仑经济开发区	0.945	2.81	65	甘肃白银市靖远县五合镇	0.952	5.32
26	青海格尔木市昆仑经济开发区	0.942	3.80	66	甘肃酒泉市瓜州县三道沟镇	0.882	5.67
27	青海格尔木市昆仑经济开发区	0.875	2.31	67	内蒙古巴彦淖尔市乌拉特前旗先锋镇	0.898	4.94
28	青海格尔木市昆仑经济开发区	0.936	3.18	68	新疆精河县托里乡2大队	0.935	3.67
29	青海格尔木市大格勒乡	0.945	3.09	69	新疆精河县北地中村2队	0.937	3.24
30	青海格尔木市大格勒乡	0.836	3.57	70	新疆精河县城关村2队	0.873	3.42
31	青海格尔木市大格勒乡	0.902	2.97	71	新疆精河县托里乡2大队	0.946	3.03
32	青海大柴旦马海村	0.924	5.28	72	新疆精河县托里乡2大队	0.921	4.25
33	青海都兰县诺木洪枸杞产业园区	0.793	6.16	73	新疆精河县托里乡3大队	0.875	4.06
34	青海都兰县诺木洪枸杞产业园区	0.944	7.97	74	新疆精河县北地东村	0.895	3.36
35	青海都兰县诺木洪枸杞产业园区	0.946	4.10	75	新疆精河县皇宫村	0.949	3.54
36	青海都兰县诺木洪枸杞产业园区	0.939	2.04	76	新疆精河县东风队	0.967	4.55
37	青海都兰县宗加镇	0.915	2.24	77	内蒙古巴彦淖尔市杭锦后旗陕坝镇	0.903	4.03
38	青海都兰县宗加镇	0.918	3.91	78	内蒙古巴彦淖尔市杭锦后旗沙海镇	0.961	5.02
39	青海都兰县宗加镇	0.927	3.03	79	内蒙古巴彦淖尔市杭锦后旗沙海镇	0.884	5.78
40	青海都兰县宗加镇	0.921	3.39	80	内蒙古巴彦淖尔市乌拉特前旗先锋镇	0.968	6.09

续表1

No.	产地	相似度	多糖质量 分数/%	No.	产地	相似度	多糖质量 分数/%
81	内蒙古巴彦淖尔市杭锦后旗沙海镇	0.921	4.25	90	宁夏固原市原州区三营镇鸭儿沟	0.954	5.33
82	内蒙古巴彦淖尔市杭锦后旗沙海镇	0.875	4.06	91	宁夏银川市贺兰县农垦暖泉农场	0.880	2.05
83	内蒙古巴彦淖尔市乌拉特前旗先锋镇	0.895	3.36	92	宁夏银川市西夏区农垦南梁农场	0.893	4.28
84	内蒙古土默特左旗察素齐镇站南街	0.949	3.54	93	宁夏银川市西夏区芦花台园林场	0.959	5.19
85	内蒙古土默特左旗察素齐镇站南街	0.967	4.55	94	宁夏石嘴山市平罗县农垦沙湖农场	0.968	2.08
86	内蒙古土默特左旗察素齐镇站南街	0.903	4.03	95	宁夏吴忠市同心县下马关镇	0.945	3.49
87	内蒙古土默特左旗察素齐镇站南街	0.961	5.02	96	宁夏吴忠市巴浪湖农场	0.961	4.99
88	宁夏中卫市中宁县红梧山大地生态基地	0.884	5.78	97	宁夏吴忠市红寺堡区	0.888	4.70
89	宁夏中卫市中宁县舟塔乡康滩村	0.968	6.09				

## 2 方法与结果

### 2.1 <sup>1</sup>H-NMR 检测

**2.1.1 样品制备** 精密称取液氮研磨后的样品粉末 500 mg 置于 10 mL 离心管中,分别加入水和甲醇 3 mL,加盖涡漩混匀 1 min,超声提取 25 min(功率 250 W,频率 50 kHz),于转速 3 500 r·min<sup>-1</sup>室温离心 25 min(离心半径 12.5 cm),转移上清液至 25 mL 锥形种子瓶中,用旋转蒸发器减压浓缩至干。用氘代甲醇 400 μL 与缓冲重水(将 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶于重水中,以氘代氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0,并含 0.1% TSP)400 μL 复溶,溶解液转移至 1.5 mL 离心管中,于转速 13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min(离心半径 8.5 cm),移取上清液 600 μL 于核磁管中,待测。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 分别称取亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等对照品约 5 mg,溶解于 600 μL 的缓冲重水中,转移至核磁管中,待测。

**2.1.3 检测条件** 样品 25 °C 于核磁共振仪上测定,扫描数设定 64 次,谱宽 12 345.679 Hz,脉冲间隔 D1 为 1 s,延迟时间 5.0 s,相调节、基线调节及峰校正均为手动。采用 noesyppr1d 序列,压制水峰,用氘代甲醇进行锁场,内标为 TSP。

**2.2 数据分析** <sup>1</sup>H-NMR 图谱采用 MestReNova (version 9.0.1) 进行处理。以 δ 0.01 积分段对化学位移区间 δ 0.80~9.60 进行积分,其中 δ 4.70~5.10(残余水峰)和 δ 3.35~3.38(残余甲醇峰)不进行积分。积分数据进行归一化后,采用 SIMCA-P 14.0 软件进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)。对 <sup>1</sup>H-NMR 图谱中信号未完全重叠的物质通过积分面积进行单变量分析,将积分后的数据导入 GraphPad Prism 6.01 软件中作柱状图,并在 SPSS 21.0 软件中进行单因素方差分析, P < 0.05 表示

有显著性差异。

采用相关系数法计算各样本相似度,以青海产区枸杞子 <sup>1</sup>H-NMR 图谱生成的平均图谱作为对照图谱,各积分段所对应的相对峰面积记为 x<sub>i</sub>,其余产区样本相应积分段的相对峰面积记为 y<sub>i</sub>(x 和 y 总数相同),计算相似度(R)。代谢物相对含量的变异系数采用 3 种不同的方法计算,变异系数 1 等于四分位数间距(QR = P<sub>75</sub> - P<sub>25</sub>)除以中位数(M),P<sub>25</sub> 为把某一代谢物在所有样品中的含量由小到大排列,第 1 个 1/4 区间的末端,即下四分位数的位置,P<sub>75</sub> 为第 3 个 1/4 区间的末端,即上四分位数的位置;变异系数 2 等于极差(R<sub>极差</sub> = X<sub>max</sub> - X<sub>min</sub>)除以 M, X<sub>max</sub> 为某一代谢物在所有样品中含量的最大值, X<sub>min</sub> 为某一代谢物在所有样品中含量的最小值;变异系数 3 = 标准偏差/平均值<sup>[11-13]</sup>,其数值的大小可以反映某一代谢物在不同地区枸杞子中的含量变化范围。

$$R = \frac{\sum_{i=1}^{8381} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{8381} (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^{8381} (y_i - \bar{y})^2}} \quad (0 \leq R \leq 1)$$

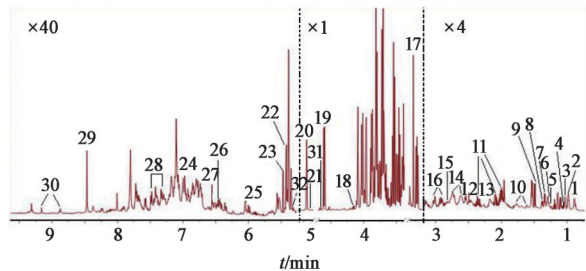
**2.3 <sup>1</sup>H-NMR 图谱的指认** 枸杞子 50% 甲醇提取物的 <sup>1</sup>H-NMR 图谱大致可以分为 3 个区域, δ 1.0~3.0 为氨基酸和有机酸区, δ 3.0~5.5 为部分氨基酸和大部分糖的区域, δ 5.5~9.5 为芳香区。通过分析化学位移、耦合常数、峰型等信息,结合对照品,人类代谢组数据库(HMDB)和生物核磁共振数据库(BMRB),并参照文献[14],共检测到枸杞子样本中 32 个化合物,包括氨基酸 12 个、有机酸 5 个、糖类 7 个、其他类 8 个。从图谱分析情况来看,枸杞子中信号最高的化合物为葡萄糖,其化学位移包括 δ 5.21(d, J = 3.6 Hz), δ 4.60(d, J = 8.4 Hz)等;此外,糖区鉴定的化合物还包括了蔗糖、棉子糖、甘露糖及 2 个未鉴定的糖类(δ 5.22, δ 4.66)。详见表 2 和图 1。

表2 枸杞子中主要代谢物的<sup>1</sup>H-NMR信号归属

Table 2 <sup>1</sup>H-NMR signal attribution of main metabolites in Lycii Fructus

化合物	名称	δ <sub>H</sub>	化合物	名称	δ <sub>H</sub>
1	脂类物质	0.89(m), 1.28(m)	17	甜菜碱 <sup>1)</sup>	3.28(s)
2	亮氨酸 <sup>1)</sup>	0.96(d, J=6.6 Hz), 0.97(d, J=6.6 Hz)	18	6-磷酸葡萄糖酸	4.15(d, J=7.8 Hz)
3	异亮氨酸 <sup>1)</sup>	0.94(t, J=7.2 Hz)	19	β-葡萄糖 <sup>1)</sup>	4.60(d, J=8.4 Hz)
4	缬氨酸 <sup>1)</sup>	1.01(d, J=6.9 Hz), 1.06(d, J=6.9 Hz)	20	α-葡萄糖 <sup>1)</sup>	5.21(d, J=3.6 Hz)
5	乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷	1.24(t, J=7.2 Hz)	21	甘露糖 <sup>1)</sup>	5.16(d, J=1.2 Hz)
6	propane-1,1,2-triol	1.28(d, J=6.0 Hz)	22	蔗糖 <sup>1)</sup>	5.40(d, J=3.6 Hz), 4.15(d, J=7.8 Hz)
7	苏氨酸 <sup>1)</sup>	1.34(d, J=6.6 Hz), 4.28(m)	23	棉子糖 <sup>1)</sup>	5.42(d, J=3.6 Hz), 5.06(d, J=3.6 Hz)
8	3-amino-propane-1,1,2-triol	1.38(d, J=6.6 Hz), 1.07(dd, J=2.4, 7.2 Hz)	24	酪氨酸 <sup>1)</sup>	6.92(d, J=8.4 Hz), 7.06(d, J=8.4 Hz)
9	丙氨酸 <sup>1)</sup>	1.49(d, J=7.2 Hz)	25	尿嘧啶核苷 <sup>1)</sup>	5.91(d, J=4.8 Hz), 5.89(d, J=7.8 Hz)
10	精氨酸 <sup>1)</sup>	1.66(m), 1.73(m), 1.92(m)	26	肉桂酸 <sup>1)</sup>	6.46(d, J=14.4 Hz)
11	脯氨酸 <sup>1)</sup>	2.01(m), 2.08(m), 2.34(m)	27	富马酸 <sup>1)</sup>	6.56(s)
12	琥珀酸 <sup>1)</sup>	2.50(s)	28	苯丙氨酸 <sup>1)</sup>	7.33(m), 7.42(m), 7.47(m)
13	谷氨酰胺 <sup>1)</sup>	2.15(m), 2.45(m)	29	甲酸 <sup>1)</sup>	8.47(s)
14	柠檬酸 <sup>1)</sup>	2.61(d, J=13.8 Hz), 2.75(d, J=13.8 Hz)	30	葫芦巴碱 <sup>1)</sup>	9.16(s), 8.88(d, J=7.8 Hz), 4.47(s)
15	天冬氨酸 <sup>1)</sup>	2.86(dd, J=7.8, 17.4 Hz)	31	未知物-1	4.66(d, J=7.8 Hz)
16	天冬酰胺 <sup>1)</sup>	2.92(dd, J=7.8, 17.4 Hz), 3.02(dd, J=3.6, 16.8 Hz)	32	未知物-2	5.22(d, J=3.6 Hz)

注: <sup>1)</sup>与对照品图谱对比指认的化合物。s. 单峰; d. 双重峰; t. 三重峰; m. 多重峰; dd. 双二重峰。



图中×后面表示放大倍数

图1 枸杞子的典型<sup>1</sup>H-NMR

Fig. 1 Typical <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Lycii Fructus

**2.4 多元统计分析** 枸杞子<sup>1</sup>H-NMR图谱中含有大量的化学指纹信息,由于样本数较多,直观比较难以准确揭示样本之间的化学差异,故借助多元统计分析手段对青海产区与其他产区的枸杞子进行比较。对97份样本的<sup>1</sup>H-NMR图谱进行PCA处理,由主成分1(PC1:17.7%)和主成分2(PC2:14.7%)构成的散点图可知,除个别离群样本外,5个不同产区的枸杞子样本分布较为集中,产区之间无明显分离趋势,见图2(A),说明不同产区枸杞子样本之间的化学差异较小。有监督的PLS-DA处理结果同样显示,青海产区枸杞子与其余4个产区的样本没有明显分离趋势,见图2(B)。

宁夏是我国传统而且道地的枸杞子主产区,而

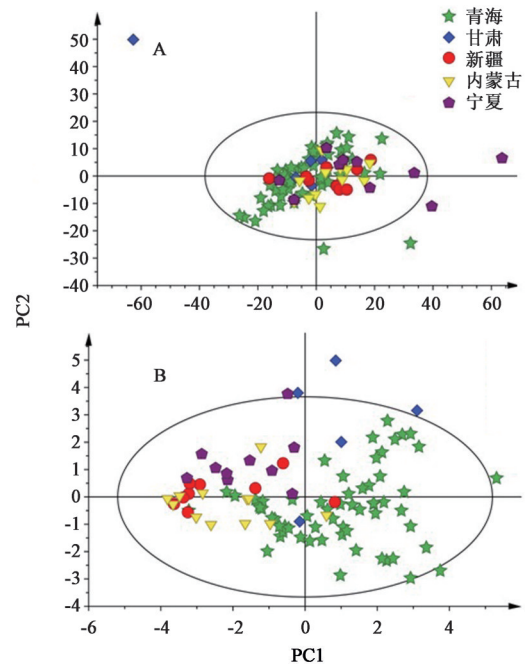


图2 不同产区枸杞子<sup>1</sup>H-NMR图谱的PCA散点(A)及PLS-DA散点(B)

Fig. 2 PCA scatter plot (A) and PLS-DA scatter plot (B) of <sup>1</sup>H-NMR spectra of Lycii Fructus from five producing areas

青海为新兴产区,目前产量较大。故选择宁夏产区枸杞子为参照,进一步采用多元统计分析方法比较

青海产区和宁夏产区枸杞子的化学差异。从图3(A) (PC1: 19.7%, PC2: 12.8%) 及图3(B) ( $R^2X=0.343$ ,  $R^2Y=0.714$ ,  $Q^2=0.394$ ,  $R^2$ 表示模型的拟合程度,  $Q^2$ 表示模型的预测程度)可知,二组枸杞子样本明显重叠,无分离趋势。青海枸杞子种植区域广泛,进一步采用多元统计分析方法比较青海省6个不同地区枸杞子样本的化学差异,结果PCA处理(PC1: 21.9%, PC2: 13.7%)显示,6个不同地区的枸杞子样本无分离趋势,说明青海省内6个不同地区的枸杞子化学差异不明显,见图4。

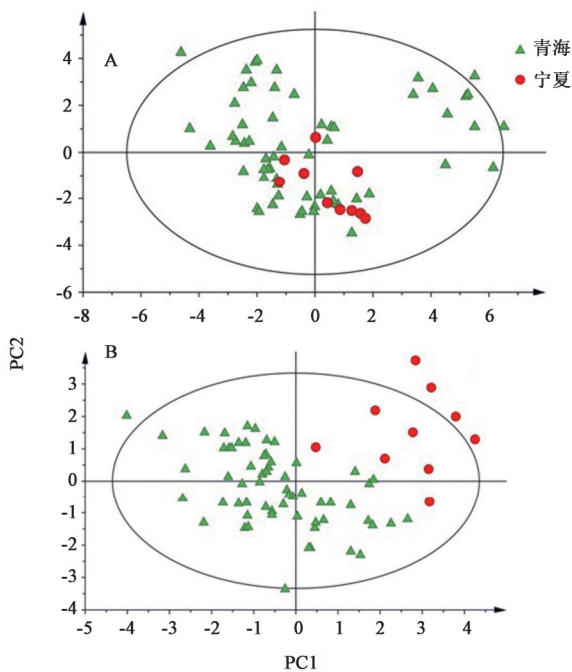


图3 青海与宁夏产区枸杞子<sup>1</sup>H-NMR图谱的PCA散点(A)及PLS-DA散点(B)

Fig. 3 PCA scatter plot (A) and PLS-DA scatter plot (B) of <sup>1</sup>H-NMR spectra of Lycii Fructus from Qinghai and Ningxia

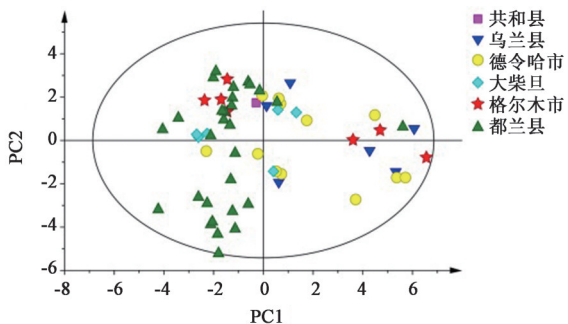


图4 青海产区枸杞子<sup>1</sup>H-NMR图谱的PCA散点  
Fig. 4 PCA scatter plot of <sup>1</sup>H-NMR spectra of Lycii Fructus from Qinghai

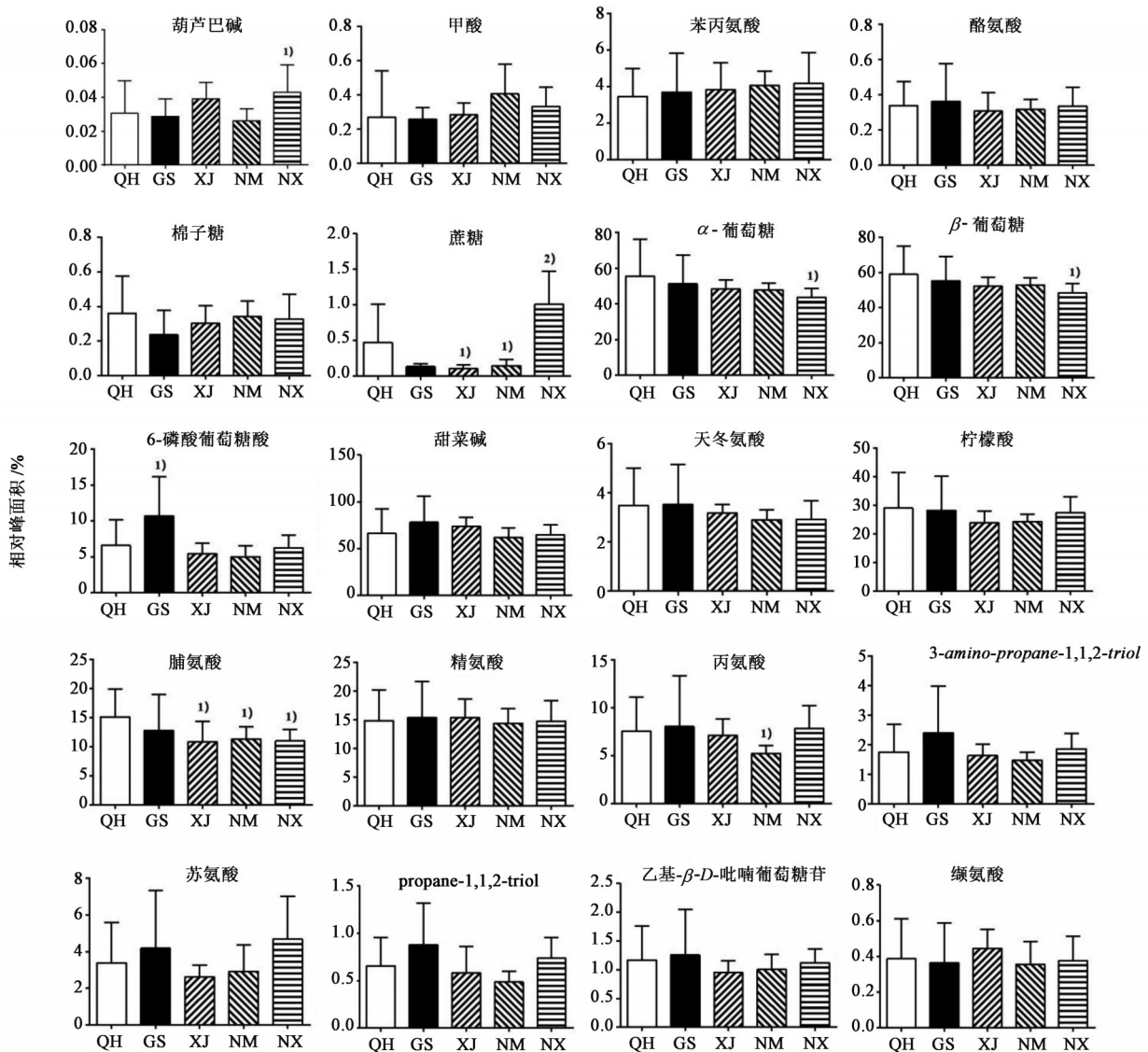
2.5 相似度分析 以收集到的青海所产61个枸杞子样本生成的平均图谱作为对照图谱,计算每个样

本与对照图谱的相似度,见表1。结果发现青海产区枸杞子样本与对照图谱的相似度在0.793~0.978,有48个样本的相似度>0.9,8个样本的相似度处于0.85~0.9,4个样本的相似度处于0.8~0.85,仅有33号样本的相似度(0.793)最低;其他产区样本与对照图谱的相似度均>0.85。说明青海产区枸杞子与其他产区枸杞子的化学组成差异较小。

2.6 单变量分析 对表2指认的代谢物中信号未重叠的20个化合物的相对质量分数进行单变量分析,见图5。从<sup>1</sup>H-NMR图谱来看,葡萄糖是枸杞子中含量最高的化合物,不同产区枸杞子之间葡萄糖含量差异不大,青海产区枸杞子葡萄糖略高,而宁夏产区枸杞子葡萄糖含量略低。蔗糖在不同产区枸杞子中的含量差异最大,宁夏产区枸杞子中蔗糖含量最高,其次是青海,其他产区枸杞子中蔗糖含量较低。与其他产区样本比较,青海所产枸杞子中氨基酸类成分脯氨酸含量最高;而内蒙古产区枸杞子中丙氨酸含量最低,酪氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、精氨酸、缬氨酸等其他氨基酸在不同产区枸杞子样本中无明显差异。有机酸类成分中的6-磷酸葡萄糖酸在甘肃地区枸杞子中含量最高,柠檬酸在各产区样本中无明显差异。此外,宁夏地区枸杞子中葫芦巴碱含量最高,显著高于青海地区。其余代谢物在不同产区枸杞子中的含量基本一致。虽然多元统计分析结果显示不同产区枸杞子差异较小,但单变量分析结果可以看出不同产区的枸杞子在部分化学成分含量上存在一定差异。

为了进一步量化同一成分在不同产区枸杞子中的含量分布差异,引入变异系数来定量描述不同化学成分的含量波动范围。3个变异系数各自排名前十分的重叠关系见图6;各成分变异系数见表3。结果发现蔗糖、甲酸、棉子糖、苏氨酸以及缬氨酸为3种方法共同发现的在样本间变异相对较大的5个成分。

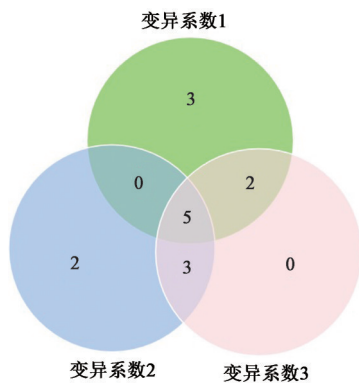
2.7 枸杞多糖含量测定 由于多糖是枸杞子中最重要的活性成分,但<sup>1</sup>H-NMR图谱仅能反映小分子化合物信息,因此,对97份枸杞子样本按GB/T 18672-2014附录A方法进行多糖含量测定,见表1。计算青海、宁夏、甘肃、新疆、内蒙古产区样本中枸杞多糖平均质量分数分别为4.20%,4.40%,6.08%,4.36%,3.78%,相互之间无显著性差异,说明从多糖含量来看,青海产区枸杞子与其他产区的质量差异不大。多糖与小分子物质均是枸杞子在生长过程中生物合成的产物,采用软件MetaboAnalyst 4.0和



QH.青海;GS.甘肃;XJ.新疆;NM.内蒙古;NX.宁夏;与青海产区相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$

图5 部分代谢物在不同产区枸杞子中的相对峰面积

Fig. 5 Relative peak areas of some metabolites in Lycii Fructus from five provinces



图中重叠部分数字代表重叠的成分个数

图6 不同变异系数结果中排名前十的代谢物的重叠关系韦恩分析

Fig. 6 Venn diagram of overlap metabolites in top ten of three variation coefficient results

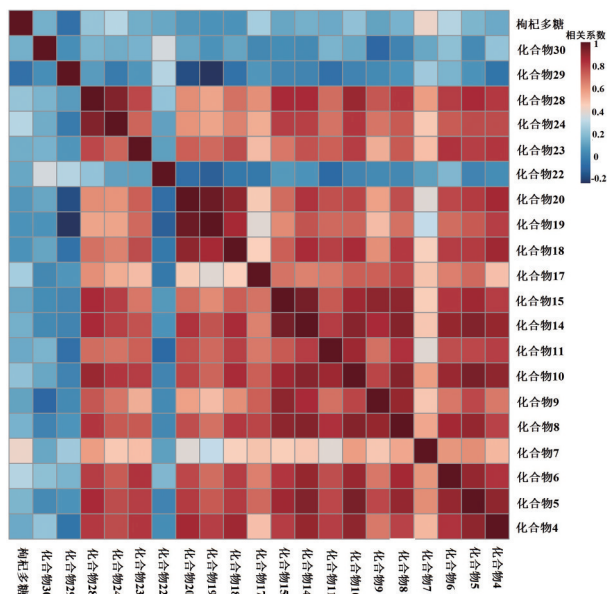
SPSS 21.0对枸杞多糖含量测定结果与<sup>1</sup>H-NMR图谱中信号未完全重叠的物质积分面积进行Pearson相关性分析,见图7。结果发现枸杞多糖与各代谢物的相关系数在-0.2~0.4,说明枸杞多糖与这些小分子化合物生物合成的相关性较低。

### 3 讨论

本研究采用<sup>1</sup>H-NMR代谢组学技术对青海产区的61个枸杞子样本与36个其他产区样本的化学差异进行比较,从<sup>1</sup>H-NMR所反映的化学信息来看,青海产区枸杞子与其他产区枸杞子化学差异不大,并且青海省不同地区的枸杞子差异也较小。相似度分析结果表明,大多数样本的相似度>0.85;化合物的单变量分析结果显示,除了个别代谢物,如蔗糖、

表3 部分代谢物相对质量分数在97份枸杞子样本中的变异系数  
Table 3 Variation coefficients of relative contents of 20 metabolites in 97 Lycii Fructus samples calculated by three different methods

代谢物	变异系数1	变异系数2	变异系数3
葫芦巴碱	0.251 5	1.819 2	0.458 2
甲酸	0.272 2	6.069 5	0.794 6
苯丙氨酸	0.291 8	1.809 0	0.407 0
酪氨酸	0.177 1	1.985 5	0.377 2
棉子糖	0.265 2	2.841 4	0.537 0
蔗糖	0.621 9	5.180 4	1.182 0
α-葡萄糖	0.109 5	2.403 4	0.332 4
β-葡萄糖	0.086 3	1.787 6	0.245 8
6-磷酸葡萄糖酸	0.178 9	3.167 9	0.521 4
甜菜碱	0.108 2	1.852 2	0.334 3
天冬氨酸	0.118 9	1.988 6	0.393 3
柠檬酸	0.113 2	2.283 2	0.379 1
脯氨酸	0.269 3	1.457 7	0.334 8
精氨酸	0.175 4	1.627 4	0.318 0
丙氨酸	0.238 9	1.894 8	0.445 7
3-amino-propane-1, 1, 2-triol	0.182 8	2.413 4	0.490 6
苏氨酸	0.383 5	2.638 1	0.623 6
propane-1, 1, 2-triol	0.251 1	1.969 7	0.448 1
乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷	0.136 2	2.368 6	0.458 3
缬氨酸	0.233 5	3.263 7	0.509 2



化合物编号同表2

图7 枸杞多糖质量分数与<sup>1</sup>H-NMR代谢物之间的Pearson相关性分析

Fig. 7 Pearson correlation analysis between polysaccharide content of Lycii Fructus and metabolites from <sup>1</sup>H-NMR spectra

葡萄糖、脯氨酸等在5个产区枸杞子中存在差异外,其余代谢物在样本中的含量分布基本一致。已有研究表明,植物体内的脯氨酸、可溶性糖(蔗糖、葡萄糖)等物质有抵御盐碱、低温胁迫环境的生理作用<sup>[15]</sup>,5个产区枸杞子中以上3种物质存在差异可能与不同省区的土壤盐碱度、环境温度不同有关。多糖是枸杞子的重要活性成分,但青海产区枸杞子与其他产区的多糖含量无显著性差异。因此,综合本研究结果来看,青海产区枸杞子与其他产区枸杞子的化学差异不大。

目前,2015年版《中国药典》中枸杞子的质量评价指标为枸杞多糖和甜菜碱。与已有研究中单独测定枸杞多糖<sup>[16]</sup>、甜菜碱<sup>[17]</sup>、酚酸类<sup>[18]</sup>等成分的含量不同,本研究建立的枸杞子<sup>1</sup>H-NMR图谱可以同时反映枸杞子中大量初级代谢产物的信息(氨基酸、有机酸和糖类等),是现有枸杞子质量评价的有力补充。初级代谢产物的差异反映了枸杞子在不同生长环境下植物生理状态的差异,这些差异不仅与枸杞子的口感品质相关,而且可能会对枸杞子的功效产生一定影响,这类成分对于枸杞子的功效贡献尚需深入研究。此外,在代谢组学研究中,多种技术手段联合应用有助于全面阐释样本的化学信息。枸杞子化学成分复杂,但本研究所揭示的枸杞子代谢物种类和数量有限,<sup>1</sup>H-NMR图谱中未能反映的物质是否存在差异,还有待通过其他手段进一步分析。后期本课题组还将采用液质联用等其他技术对枸杞子进行深入研究,以期全面揭示不同产地枸杞子中次级代谢物的化学差异,为枸杞子的质量控制及其种植产区的选址提供依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:249.  
 [2] 付文昊,于梅. 枸杞子的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(98):104.  
 [3] 徐常青,刘赛,徐荣,等. 我国枸杞主产区生产现状调研及建议[J]. 中国中药杂志,2014,39(11):1979-1984.  
 [4] 张启立,崔治家,杨毛毛,等. 基于HPLC指纹图谱的不同产地枸杞子的差异性评价[J]. 国际药学研究杂志,2019,46(3):232-237.  
 [5] 白光灿,李娅琦,张泽坤,等. 枸杞HPLC指纹图谱的建立及3种成分测定[J]. 中成药,2019,41(7):1721-1724.  
 [6] 范玛莉,邢婕,李震宇,等. 基于NMR代谢组学技术

- 的白芍与赤芍化学成分比较研究[J]. 中草药, 2014, 45(22):3230-3237.
- [7] 张丽, 尤慧芳, 黄金龙, 等. 新疆乌苏和宁夏银川枸杞子的质量对比分析[J]. 中医药导报, 2019, 25(14): 62-65.
- [8] LI A P, LI Z Y, QU T L, et al. Nuclear magnetic resonance based metabolomic differentiation of different Astragali Radix[J]. Chin J Nat Med, 2017, 15(5):363-374.
- [9] 张争争, 支海娟, 秦雪梅, 等. 基于NMR代谢组学技术的不同来源款冬花的化学比较[J]. 药学学报, 2015, 50(5):599-604.
- [10] LEE E J, SHAYKHUTDINOV R, WELJIE A M, et al. Quality assessment of ginseng by <sup>1</sup>H-NMR metabolite fingerprinting and profiling analysis [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(16):7513-7522.
- [11] 曲婷丽, 魏玉海, 李爱平, 等. 黄芪注射液<sup>1</sup>H-NMR指纹图谱研究[J]. 药学学报, 2016, 51(5):780-785.
- [12] 朱田田, 王引权, 郭俊霞. 基于变异系数权重的中药质量综合评价模糊物元模型[J]. 中药材, 2008, 31(1):139-142.
- [13] 张争争, 田栋, 邢婕, 等. 基于UPLC多指标测定比较不同来源款冬花药材的质量[J]. 中草药, 2015, 46(15):2296-2302.
- [14] WANG Q, ZENG S, WU X, et al. Interspecies developmental differences in metabonomic phenotypes of *Lycium ruthenicum* and *L. barbarum* fruits [J]. J Proteome Res, 2018, 17(9):3223-3236.
- [15] 刘强, 王占武, 周晓梅. NaHCO<sub>3</sub>胁迫下新疆枸杞和枸杞的渗透调节作用[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(2):34-38.
- [16] 李越颀, 米佳, 闫亚美, 等. 不同产地宁夏枸杞主要化学成分分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(21): 286-288.
- [17] 刘增根, 陶燕, 邵赟, 等. 柴达木枸杞和黑果枸杞中甜菜碱的测定[J]. 光谱实验室, 2012, 29(2):694-697.
- [18] 谭亮, 董琦, 肖远灿, 等. RP-HPLC法同时测定枸杞子中5个酚酸类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3):376-381, 394.

[责任编辑 刘德文]