

双波长薄层扫描法测定不同来源枸杞子中甜菜碱的含量

谭亮冀 恬,曹静亚 胡风祖*

中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

摘要:通过对枸杞子样品提取、脱色时间等前处理条件的优化,建立不同来源枸杞子中甜菜碱含量测定的双波长薄层扫描法(TLCS法)。使用快速溶剂萃取仪(ASE 350)用80%甲醇提取出枸杞子中的甜菜碱,经活性炭脱色、雷氏盐沉淀、丙酮溶解沉淀,采用改进的薄层扫描法在检测波长为530 nm,参比波长为625 nm条件下对枸杞子中的甜菜碱进行含量测定。得到清晰的薄层色谱斑点,无干扰;甜菜碱点样量在3.84 ~ 38.40 μg 范围内线性关系良好 $r = 0.9995$;平均加样回收率为98.30% $RSD = 2.55\%$ ($n = 9$)。该方法简便、准确、重现性好,适用于测定枸杞子中甜菜碱的含量测定,可为枸杞的质量控制提供依据。

关键词:双波长薄层扫描法;枸杞子;甜菜碱;不同来源;含量测定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Determination of Betaine Contents in *Fructus Lycii* from Different Origins by Dual Wavelength TLC Scanning

TAN Liang, JI Tian, CAO Jing-ya, HU Feng-zu*

Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

Abstract: In this study, a thin layer chromatography scanning (TLCS) method was developed for the determination of betaine contents in *Fructus Lycii* from different origins. Betaine was extracted using accelerated solvent extractor (ASE 350) with 80% aqueous methanol. The detection and reference wavelengths of the developed TLCS method were 530 nm and 625 nm after activated charcoal decolorize, redwood salt deposit and acetone dissolve. TLC spots were clear and no interference was appeared. The linear response ranges of betaine was 3.84 - 38.40 μg ($r = 0.9995$); The average recoveries ($n = 9$) were 98.30% $RSD = 2.55\%$. The assay demonstrated that the developed method was accurate. It was suitable for the determination of betaine in *F. Lycii*. In addition, it can be used to assist the quality evaluation of *Lycium barbarum* L.

Key words: TLCS; *Fructus Lycii*; betaine; different origins; assay

枸杞子 (*Fructus Lycii*) 为茄科植物宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 的干燥成熟果实。夏、秋二季果实呈红色时采收,热风烘干,除去果梗。或晾至皮皱后,晒干,除去果梗^[1]。现代药理学研究表明,枸杞子有抗衰老、降血糖、降血脂、内分泌激素调节等多方面药理作用^[2-4]。近年来,有关枸杞子中多糖、甜菜碱、总黄酮、原花青素、 β -胡萝卜素、东莨菪内酯等成分的含量测定屡有文献报道^[5-8]。其中,甜菜碱是枸杞果、叶、柄中主要生物碱之一,在体内起甲基供体作用,是枸杞中对脂质代谢或抗脂肪肝作用的主要活性物质^[9]。目前甜菜碱的检测方法主要有

薄层扫描法^[1]、高效液相色谱法^[10]、比色法^[11]等。《中国药典》2010年版一部中,规定枸杞子中甜菜碱的含量测定采用薄层扫描法。但按药典方法操作并不能得到满意的结果,于是我们以药典方法为基础,对其中部分操作做出了改进,建立了TLCS法测定枸杞子中甜菜碱的含量,并对枸杞子主产地以及周边省20批枸杞子进行测定。结果表明该方法简单、准确、重现性好,可为枸杞子质量控制提供了一定参考,为枸杞资源的研究与开发利用提供了科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

枸杞子:自不同产地收集20批枸杞子,经中国科学院西北高原生物研究所分析测试中心胡风祖教

收稿日期: 2012-12-06

接受日期: 2013-03-08

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-EW-J-26)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6132750; E-mail: hufz@nwipb.cas.cn

授鉴定确认为正品。样品预处理: 将收集的枸杞子阴干, 装入密封袋中密封, 置干燥器中保存。

甜菜碱对照品(批号: 894-200202, 中国药品生物制品检定所); 甲醇、丙酮、无水乙醇、甲酸(天津市百世化工有限公司); 盐酸(甘肃白银瑞斯物资贸易有限公司); 雷氏盐、碘化铋钾(天津市光复精细化工研究所); 活性炭(常州碧海环保技术有限公司), 以上化学试剂均为分析纯。水为一级超纯水。

CS-9000 薄层扫描仪(日本岛津公司); ASE 350 快速溶剂萃取仪(赛默飞世尔科技戴安公司); PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); AG 135 电子天平(METTLER TOLEDO); RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); G₁ 号垂熔砂芯漏斗(上海闵达玻璃仪器有限公司); 薄层层析硅胶 G 板(青岛海洋化工厂分厂); CN61M/290181 毛细管(北京中西远大科技有限公司第一分公司); 101-3 型烘箱(北京科伟仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备

取甜菜碱对照品适量, 精密称定, 加盐酸甲醇溶液(0.5→100)制成每 1 mL 含 4 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备

使用美国戴安公司 ASE 350 快速溶剂萃取仪来提取枸杞子中的甜菜碱。取本品剪碎, 取约 2 g, 精密称定, 与硅藻土拌匀后填入仪器配备的 34 mL 不锈钢萃取池中。在 80 °C 条件下用 80% 甲醇水溶液静置提取 15 min, 循环提取 1 次。将提取液浓缩至 10 mL, 用盐酸调节 pH 值至 1, 加入活性炭 1 g, 加热煮沸, 放冷, 滤过, 用水 15 mL 分次洗涤, 合并洗液与滤液, 加入新配制的 2.5% 雷氏盐溶液 20 mL, 搅匀, 10 °C 以下放置 3 h。用 G₁ 垂熔漏斗滤过, 沉淀用少量冰水洗涤, 抽干, 残渣加丙酮溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加丙酮稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

1.2.3 薄层层析与扫描条件

照薄层色谱法(附录 VI B)试验, 精密吸取供试品溶液和对照品溶液 5 μL, 分别交叉点于同一硅胶 G 薄层板上, 以丙酮-无水乙醇-甲酸(10:6:3)为展开剂, 预饱和 30 min, 展开, 取出, 挥干溶剂, 立即喷以新配制的改良碘化铋钾试液, 置 105 °C 烘箱中加热 20 min 至斑点清晰。照薄层色谱法(附录 VI B)进行扫描, 在 350 nm ~ 700 nm 范围内作全波长扫

描, 确定检测波长 $\lambda_S = 530 \text{ nm}$, 参比波长 $\lambda_R = 625 \text{ nm}$, 测量供试品与对照品的吸光度积分值进行计算。按上述条件所得结果见图 1。

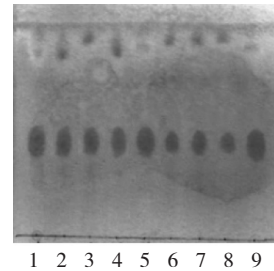


图 1 枸杞子的薄层色谱图

Fig. 1 Thin-layer chromatogram of *F. Lycii*

1, 5, 9: 甜菜碱对照品; 2~4, 6~8: 枸杞子药材

1, 5, 9: Betaine reference substance; 2~4, 6~8: Medicinal material of *F. Lycii*

1.2.4 线性关系的考察

精密吸取对照品溶液(3.84 mg/mL) 1、2、4、6、8、10 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 展开, 显色, 测定其峰面积值, 结果依次为 1196.15、2389.30、4864.59、7084.89、9479.18、12215.48。以峰面积为纵坐标, 点样量为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 314.76 X - 49.90$ ($r = 0.9995$)。结果表明甜菜碱点样量在 3.84 ~ 38.40 μg 范围内线性关系良好。

1.2.5 重复性试验

取同一枸杞子药材(红果枸杞, 青海德令哈) 6 份, 精密称定, 分别按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液。点样 5 μL, 展开, 显色至斑点清晰, 测定其峰面积值。结果甜菜碱平均含量为 0.48%, RSD 为 2.64%。结果表明该测定方法重复性良好。

1.2.6 精密度试验

1.2.6.1 同板精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(红果枸杞, 青海德令哈) 5 μL, 在同一硅胶 G 薄层板上分别点样 6 次, 展开, 显色至斑点清晰, 测定其峰面积值。测得峰面积值的平均值为 3009.75, RSD 为 1.89%。结果表明该测定方法同板精密度良好。

1.2.6.2 异板精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(红果枸杞, 青海德令哈) 5 μL, 在不同的 6 块硅胶 G 薄层板上分别点样, 展开, 显色至斑点清晰, 测定其峰面积值。测得样品中甜菜碱平均含量为 0.50%, RSD 为 3.55%。结果表明该测定方法异板精密度良好。

1.2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(红果枸杞,青海德令哈) 5 μ L,点样,展开,显色至斑点清晰,每隔 30 min 测定其峰面积值 1 次,共测定 7 次。测得峰面积值的平均值为 3027.34, RSD 为 2.78%。结果表明供试品溶液在 3 h 内稳定性良好。

1.2.8 加样回收率试验

采用加样回收法,取已知含量的枸杞子样品(红果枸杞,青海德令哈,含量为 0.48%) 粉末 6 份,每份 1.0 g 精密称定,按低、中、高浓度分别精密加入甜菜碱对照品溶液。按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液。按含量测定方法计算甜菜碱的回收率。测定平均回收率为 98.3%, RSD 为 2.55% ($n = 9$)。

1.2.9 样品的含量测定

分别称取所收集的不同来源的枸杞子适量,精密称定,按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液,照薄层色谱法(附录 VI B)进行试验。结果见表 1~3。

表 1 不同产地红果枸杞子样品中甜菜碱的含量测定结果($n = 3$)Table 1 Determination results of betaine contents in *F. Lycii* samples from different origins ($n = 3$)

产地 Origin	含量 Content (%)
青海共和县塔拉镇 Tala ,Gonghe ,Qinghai	0.62
青海德令哈尔海镇 Gahai ,Delingha ,Qinghai	0.48
甘肃 Gansu	0.51
宁夏中宁 Zhongning ,Ningxia	0.64
青海海西州塔湾克里 Tawankeli ,Haixi ,Qinghai	0.54
青海都兰县诺木洪 Nuomuhong ,Dulan ,Qinghai	0.58
新疆 Xinjiang	0.36
青海格尔木大格勒 Dagele ,Geermu ,Qinghai	0.50
内蒙古 Inner Mongolia	0.40
宁夏固原 Guyuan ,Ningxia	0.61

表 2 同产地枸杞子不同种样品中甜菜碱的含量测定结果($n = 3$)Table 2 Determination results of betaine contents of different species from the same origin ($n = 3$)

产地 Origin	种 Species	含量 Content (%)
青海德令哈尔海镇 (Gahai ,Delingha ,Qinghai)	红果(野生) <i>Lycium barbarum</i> L. (wild)	0.48
	黄果(野生) <i>Lycium barbarum</i> L. var. auranticarpum K. F. Ching var. nov. (wild)	0.39
	黑果(野生) <i>Lycium ruthenicum</i> murr. (wild)	0.43
青海共和县塔拉 (Tala ,Gonghe ,Qinghai)	红果(种植) <i>Lycium barbarum</i> L. (cultivation)	0.62
	黄果(种植) <i>Lycium barbarum</i> L. var. auranticarpum K. F. Ching var. nov. (cultivation)	0.51
	黑果(种植) <i>Lycium ruthenicum</i> murr. (cultivation)	0.52

表 3 同产地枸杞子不同野生和栽培样品中甜菜碱的含量测定结果($n = 3$)Table 3 Determination results of betaine contents of different wild and cultivation samples from the same origin ($n = 3$)

产地 Origin	野生/栽培 Wild/Cultivation	含量 Content (%)
青海德令哈尔海镇 Gahai ,Delingha ,Qinghai	红果(野生) <i>Lycium barbarum</i> L. (wild)	0.48
	黄果(野生) <i>Lycium barbarum</i> L. var. auranticarpum K. F. Ching var. nov. (wild)	0.39
	黑果(野生) <i>Lycium ruthenicum</i> murr. (wild)	0.43
	柴杞 1 号(栽培) Chaiqi ,No. 1 (cultivation)	0.34
	柴杞 2 号(栽培) Chaiqi ,No. 2 (cultivation)	0.42
青海都兰县诺木洪 Nuomuhong ,Dulan ,Qinghai	柴杞 3 号(栽培) Chaiqi ,No. 3 (cultivation)	0.36
	诺木洪路北村 2(野生) Lubei village 2 ,Nuomuhong (wild)	0.58
	诺木洪路北村 3(野生) Lubei village 3 ,Nuomuhong (wild)	0.59
	宁杞 1 号(栽培) Ningqi ,No. 1 (cultivation)	0.47
	宁杞 2 号(栽培) Ningqi ,No. 2 (cultivation)	0.41

2 结果与分析

2.1 样品的前处理和提取

2.1.1 在线净化过程

ASE 是多组分高效萃取技术,在萃取过程中一些干扰物质有时会被一起萃取出来,这些共萃取物可能会干扰样品的分析。在供试品制备中若直接加 80% 甲醇水溶液提取,经点样、展开、显色后发现:斑点很多,尤其是有些斑点与甜菜碱斑点出现在同一位置,无法分离,势必对分析造成一定的干扰。故在用 80% 甲醇水溶液提取前先加二氯甲烷,以除去大部分的脂溶性成分,减免干扰斑点的出现,使甜菜碱与杂质斑点分离。

2.1.2 ASE 提取条件的选择

(1) 提取溶剂: 考察了乙醇、70%、80%、90% 甲醇水溶液; (2) 提取温度: 考察了 60、70、80、90 °C; (3) 提取静置时间: 考察了 10、15、20、30 min; (4) 提取循环次数: 考察了 1、2、3、4 次。结果表明在 80 °C 下用 80% 甲醇水溶液静置提取 15 min,循环提取 1 次时提取效率最高。

2.2 薄层层析与扫描条件的改进

在实际操作过程中发现完全按药典方法操作测定甜菜碱并不能得到满意的结果,于是以药典方法为基础,对其中部分操作做出了改进: (1) 药典法采用加热回流 1 h,中间有多次的转移、洗涤等操作,势必造成提取成分的损失,回收率不高。本研究使用美国戴安公司 ASE 350 快速溶剂萃取仪来提取枸杞子中的甜菜碱,减少了提取过程中的损失,而且该技术是在高压(1000 psi)条件下进行,大大提高了提取效率; (2) 药典中所用展开剂为丙酮-无水乙醇-盐酸(10:6:1),但在展开过程中发现展开效果并不佳,前沿不平,呈锯齿状分裂。本研究采用展开剂丙酮-无水乙醇-甲酸(10:6:3),结果展开效果明显有所改善,且 $R_f = 0.47$; (3) 药典中显色后需放置 1~3 h 至斑点清晰,而在实际操作中发现无论放置多长时间,显色斑点都不是很清晰,并且本人认为显色时间过长。本研究在显色后置 105 °C 烘箱中加热 20 min 至斑点清晰,极大地缩短了显色时间且显色效果不错; (4) 药典中薄层扫描条件是检测波长 $\lambda_s = 515 \text{ nm}$,参比波长 $\lambda_R = 590 \text{ nm}$ 。实际操作中在 350 nm ~ 700 nm 范围内作全波长扫描发现最佳检测波长 $\lambda_s = 530 \text{ nm}$,参比波长 $\lambda_R = 625 \text{ nm}$,故选用后者作为薄层扫描条件。

2.3 实验测定结果分析

(1) 不同产地红果枸杞子中甜菜碱含量依次为宁夏 > 青海 > 甘肃 > 内蒙古 > 新疆,但也有部分青海样品中甜菜碱含量低于甘肃样品; (2) 同产地枸杞子不同种之间甜菜碱含量依次为红果枸杞 > 黑果枸杞 > 黄果枸杞; (3) 同产地枸杞子不同野生和栽培样品中甜菜碱含量野生 > 栽培。

3 结论

本研究对枸杞子样品提取、脱色时间等前处理条件进行了优化,并以药典方法为基础,对其中部分操作做出了改进,建立了枸杞子主产地以及周边省 20 批不同来源枸杞子中甜菜碱含量的双波长薄层扫描法。结果使用二氯甲烷除去脂溶性成分,使用 ASE 350 在 80 °C 下用 80% 甲醇水溶液静置提取 15 min,循环提取 1 次提取出甜菜碱。以丙酮-无水乙醇-甲酸(10:6:3)为展开剂,显色后置 105 °C 烘箱中加热 20 min 至斑点清晰,在检测波长 $\lambda_s = 530 \text{ nm}$,参比波长 $\lambda_R = 625 \text{ nm}$ 条件下进行薄层扫描。该方法简便、准确,重现性好,适用于测定枸杞子中甜菜碱的含量测定。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I 232-233.
- 2 Wang DS(王德山), Xiao YF(肖玉芳), Dong CH(董朝晖) et al. Study on the toxic of *Fructus Lycii* on dose-effect relationship of anti-experimental hyperlipemia and hepatic lipid. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 1997, 24: 567-568.
- 3 Yang XB(杨新波), Huang ZM(黄正明), Cao WB(曹文斌) et al. Effect of *Fructus Lycii* polysaccharides on blood sugar of normal mice and hyperglycemia mice caused by alloxan. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 1998, 14: 11.
- 4 Yan XY(闫秀英), Xu ZH(许志华), Han LS(韩丽莎) et al. The inhibitory effect of *Fructus Lycii* on carbon tetrachloride-caused peroxidation action of lipid in rats. *J Baotou Med Coll* (包头医学院学报), 1998, 14: 7-9.
- 5 Liu WC(刘万仓), Sun L(孙磊), Qiao SY(乔善义) et al. Content determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* L. from different areas. *Intel J Pharm Res* (国际药学研究杂志) 2011, 38: 229-231.

(下转第 397 页)

were isolated from *C. spicatus*^[7, 8] which were tested to have strong antioxidant activities. More than 30 phenol and polyphenol acid were isolated which were tested to be the active ingredient of anti-inflammatory, antibiosis and diuresis^[9]. Based on the results obtained in the present study, it was concluded that the *C. spicatus* had significant antioxidant activities and the extracts of *C. spicatus* can be used as an antioxidant for adjuvant therapy on renal diseases.

References

- 1 CAS Editorial Committee of Flora. Flora Republicae Popularis Sinicae, Volume 66. Beijing: Science Press, 1999. 574-577.
- 2 Cai HF, Shou Y, Wang JJ, *et al.* Preliminary study on the pharmacological action spicatus. *J Chin Med Mater*, 1997, 20: 38-40.
- 3 Tan JJ, Tan CH, Chen YL, *et al.* Chemical constituents of *Clerodendranthus spicatus*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2009 21: 608-611.
- 4 Xu FC, Loubu ZD, Yang DJ. Study on antibacterial effects of the aqueous extract from *Clerodendranthus spicatus*(Thunb.) C. Y. Wu. *J Tibet Univ Nat Ed* 2010 25(2) : 82-85.
- 5 Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, *et al.* Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food Chem Toxicol* 2013 55: 290-296.
- 6 Zhang QA, Fan XH, Zhang ZQ, *et al.* Antioxidant for phenolic extracts from Semen Astragalii Complanati. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2012 24: 955-958.
- 7 Chen YL, Tan CH, Tan JJ, *et al.* Progress of chemical and pharmacological studies on *Clerodendranthus spicatus*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2009 21: 885-891.
- 8 Chen YL, Tan CH, Lu LL, *et al.* Water-soluble constituents of *Clerodendranthus spicatus*. *Chin Tradit Herb Drugs* 2009 40: 689-693.
- 9 Li YT, Huang RG, Zheng XZ. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2002 22: 470-472.
- 6 Zhang ZP(张自萍), Guo R(郭荣), Liao GL(廖国玲), *et al.* Comparative study on methods for determination of betaine from *Lycium barbarum* L.. *Acta Agric Boreali-Occident Sin* (西北农业学报) 2007 16: 292-295.
- 7 Chen C(陈晨), Wen HX(文怀秀), Zhao XH(赵晓辉), *et al.* Determination of oligomeric proantho cyanidins in *Lycium Ruthenicum* Murr. Pigment. *Chin J Spectrosc Lab* (光谱实验室) 2011 28: 1767-1769.
- 8 Bao HM(鲍会梅). *Lycium* beta-carotene content analysis. *Food Ferment Tech* (食品与发酵科技) 2008 44(2) : 63-66.
- 9 Zhang YJ(张宇金), Gao SY(高世勇), He LW(何立巍). Study on bioactivities of betaine. *J Harbin Univ Com Nat Sci Ed* (哈尔滨商业大学学报, 自科版) 2006 22: 13-16.
- 10 Wang XJ(王晓菁), Wu Y(吴燕), Wang LM(王黎明). Determination of betaine in fruits of *Lycium barbarum* L. by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Food Sci* (食品科学) 2010 31: 199-201.
- 11 Zhu GH(朱桂花), Yang GW(杨高文), Chen XG(陈晓光). Spectrophotometry for determination of betaine in *Fruitus Lycii* semi finished drinkables. *Chem Res App* (化学研究与应用) 1998 10: 433-435.

(上接第 391 页)