

柴达木栽培和野生枸杞子中东莨菪内酯含量的测定

曹静亚^{1,2}, 谭亮^{1,2}, 迟晓峰^{1,2}, 胡凤祖^{1,2*}

¹中国科学院藏药研究重点实验室; ²中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

摘要: 建立测定枸杞子中东莨菪内酯的 HPLC 方法, 并进行方法学考察。利用所建立的方法对柴达木栽培和野生枸杞子的东莨菪内酯含量进行测定。以 Diamonsil C₁₈ 柱为分析柱, 甲醇-0.05% 磷酸溶液 (35:65) 为流动相, 流速: 1 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测波长: 344 nm; 研究发现, 枸杞子中东莨菪内酯在 0.026 ~ 1.040 μg ($R^2 = 0.9996$) 范围内成良好的线性关系; 平均加样回收率 ($n=6$) 为 96.1%, RSD = 2.0%。该方法准确、可靠、重现性好, 适用于枸杞子中东莨菪内酯的含量测定。测定结果表明, 柴达木栽培枸杞子具有很整齐的品质优良性, 而野生枸杞子品质差异很大, 适宜于选择性的开发。

关键词: 高效液相色谱; 东莨菪内酯; 柴达木; 枸杞子

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

Determination of Scopoletin in the Wild and Cultivated FructusLycii from Qaidam Basin

CAO Jing-ya^{1,2}, TAN Liang^{1,2}, CHI Xiao-feng^{1,2}, HU Feng-zu^{1,2*}

¹Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology;

²Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

Abstract: A high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated to determine the contents of scopoletin in the wild and cultivated FructusLycii from Qaidam Basin. The component was separated on aDiamonsil C₁₈ column using methanol-0.05% phosphoric acid buffer (35:65) as the mobile phases. The flow rate was 1 mL/min. The column temperature was set at 30 °C and the detection wavelength was set at 344 nm. It was found that the linearity range of scopoletin was from 0.026-1.040 μg ($R^2 = 0.9996$). The average recoveries ($n=6$) were 96.1%, RSD = 2.0%. The method was accurate, reliable and reproducible for the determination of scopoletin in FructusLycii. The result showed that the quality of cultivated FructusLycii from Qaidam Basin was neatly excellent. However, the wild samples had the significant different qualities, which was suitable for the selective exploitation.

Key words: HPLC; scopoletin; Qaidam Basin; FructusLycii

枸杞子 (*Fructus lycii*) 是茄科植物枸杞的成熟果实。枸杞子是名贵的药材和滋补品, 中医很早就有“枸杞养生”的说法, 在我国传统医学中具有重要的地位。《本草纲目》记载:“枸杞, 补肾生精, 养肝, 明目, 坚精骨, 去疲劳, 易颜色, 变白, 明目安神, 令人长寿”。枸杞子作为药食兼用的名贵资源, 已受到国内外学者的广泛关注。药典中在评价枸杞子的内在质量时, 选用了枸杞甜菜碱、多糖类成分为含量测定指标^[1], 东莨菪内酯具有抗炎、抗肿瘤、调节心血管^[2-4]等作用, 是枸杞子中的重要活性成分之一。而

根据已有文献报导, 对枸杞子中东莨菪内酯含量测定的报道较少, 对柴达木枸杞子中东莨菪内酯含量测定的相关报道并未见。

青海柴达木地区独特的高原大陆性气候造就了柴达木枸杞子的优良品质。据记载, 柴达木地区栽培枸杞子的年产量约为 10 ~ 20 吨, 野生枸杞子的年产量约为 2 ~ 10 吨, 是一笔宝贵的可利用资源。本文采用高效液相色谱法进行了枸杞子中东莨菪内酯的含量测定, 并对其测定方法进行考察, 旨在为青海柴达木枸杞子的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 原料、试剂及主要仪器

实验中所用的柴达木栽培和野生枸杞子样品均

收稿日期: 2013-05-22 接受日期: 2013-10-21

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.cac.cn

采自青海省海西州各地区,经中科院西北高原生物研究所胡祖研究员鉴定为枸杞子真品。

东莨菪内酯标准品(批号:110768-200504)购自中国药品生物制品检定所;甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司);超纯水(实验室自制,电阻率 ≥ 18.2 M Ω);其余试剂均为分析纯。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配备有 G1315 型 DAD 检测器,美国安捷伦公司);AG135 电子天平(德国 Mettler Toledo 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准储备溶液的制备

精密称取东莨菪内酯标准品 3.25 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度为 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品储备溶液。

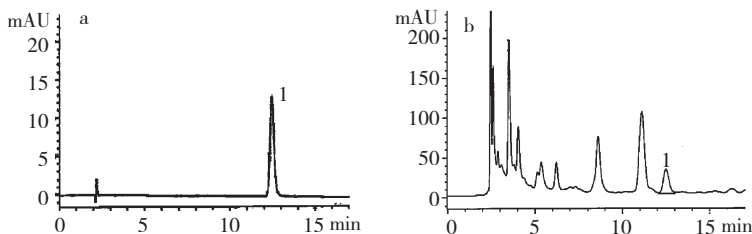


图 1 对照品(a)及样品(b)的 HPLC 图(1:东莨菪内酯)

Fig. 1 HPLC chromatogram of standard (a) and sample (b) (1:scopoletin)

1.2.4 标准曲线的绘制

精密量取东莨菪内酯标准储备液 0.2、1、2、4、6、8 mL 于 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得浓度分别为 2.6、13、26、52、78、104 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的东莨菪内酯对照品溶液。按上述色谱条件各进样 10 μL ,拟合峰面积(y)和进样量(x , μg)作回归曲线。

2 结果与分析

2.1 供试品溶液的制备方法优化

2.1.1 提取溶剂的选择

根据已有文献报导,对枸杞子样品中东莨菪内酯测定试验中,多采用的是酸溶液回流水解,然后用氯仿多次提取的方法^[5]。虽然该方法提取效率高,但考虑到氯仿的毒性大,成本高,操作繁琐,本实验对该传统提取方法进行了改进。分别试用了(1:4)盐酸/甲醇溶液、(1:6)盐酸/甲醇溶液和甲醇为提取溶剂,对同一批枸杞子样品进行提取,结果(1:4)盐酸/甲醇溶液的提取率最高,并与酸水解氯仿多次提取的传统方法进行比较,提取效率一致。因此,选

置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放,备用。

1.2.2 样品的处理

取本品粉末(粗粉)过 4 号筛,精密称定 0.5 g,置于 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸溶液(4:1, v/v) 50 mL,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中回流提取 1 h,取出,放冷。将提取液过滤到圆底烧瓶中,减压旋转近干,残渣用甲醇溶解并定容至 25 mL 容量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 滤膜过滤,进液相进行分析。

1.2.3 HPLC 分析

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.05% 磷酸溶液(35:65),流速:1 mL/min,柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:344 nm;进样量:10 μL 。HPLC 色谱图见图 1。

用(1:4)盐酸/甲醇溶液为提取溶剂,制备供试品溶液。

2.1.2 提取方式和时间的选择

试验中,分别比较了超声处理、浸泡和加热回流三种常用提取方式,并比较了不同的提取时间对东莨菪内酯提取率的影响,结果加热回流处理 1 h 的方法提取率最高,且方法简单易行,因此,选择该方法制备供试品溶液。

2.1.3 料液比的选择

取同一样品 0.5 g(3 份),分别精密加入(1:4)盐酸/甲醇溶液 10、50、100、150 mL,加热回流处理 1 h,测定东莨菪内酯含量,结果各处理测定含量基本一致,无显著性差异,为保证有效成分的充分提取,选择提取溶剂用量为 50 mL。

2.2 色谱条件的优选

2.2.1 流动相的选择

易智彪等^[5]在对枸杞子中东莨菪内酯含量测定中,选用了甲醇-0.5% 冰醋酸溶液为流动相,试验中,分别比较了甲醇-0.5% 冰醋酸溶液和甲醇-0.5% 磷酸溶液,结果甲醇-0.5% 磷酸溶液效果较

好。考虑到高浓度酸溶液对柱子的损耗大,实验中比较了甲醇-0.5%磷酸溶液和甲醇-0.05%磷酸溶液,结果,在甲醇-0.05%磷酸溶液流动相条件下,样品中的东莨菪内酯峰形对称,保留时间适宜,与杂质峰可达到基线分离。因此,选择甲醇-0.05%磷酸溶液的流动相条件。

2.2.2 检测波长的选择

分别吸取东莨菪内酯对照品溶液和供试品溶液,注入液相色谱仪,在200~400 nm进行光谱扫描,东莨菪内酯对照品溶液及供试品溶液主峰的光谱一致,均在344 nm处有强紫外吸收,因此选定344 nm为测定波长。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系

依据“1.2.4”项下标准曲线绘制方法,得东莨菪内酯回归方程 $y = 0.863x + 2.897$, $R^2 = 0.9996$,在0.026~1.040 μg 范围内成良好的线性关系。

2.3.2 重复性

取同一枸杞子样品粉末6份,精密称定,按“1.2.2”项下方法处理,测定峰面积并计算RSD,结果RSD为2.4%。表明该方法重复性良好。

2.3.3 精密度

精密吸取同一供试品溶液10 μL ,重复进样6次,测定峰面积并计算RSD,结果RSD为1.9%。表

表1 柴达木栽培枸杞子中东莨菪内酯含量($n = 3$)

Table 1 Contents of scopoletin in the cultivated Fructus Lycii from Qaidam Basin ($n = 3$)

采样地 Sampling site	经纬度 Longitude and latitude	东莨菪内酯含量 Contents of scopoletin ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)
怀头塔拉1	N 36°23'05.9" E 94°59'00.3"	201.63	1.5
怀头塔拉2	N 37°18'57.0" E 96°43'35.2"	251.34	1.8
德令哈杂海	N 37°14'52.9" E 97°27'33.2"	229.44	1.5
德令哈农场	N 37°16'59.8" E 96°51'34.7"	226.08	1.7
乌兰	N 36°56'12.6" E 98°26'50.5"	183.67	1.6
格尔木农场	N 36°23'31.2" E 94°36'02.6"	161.30	1.4
都兰县夏日哈	N 36°25'00.2" E 95°29'45.1"	191.20	1.4
诺木洪	N 36°26'16.8" E 96°25'03.6"	177.52	1.3
格尔木河西农场	N 36°23'31.8" E 94°35'04.5"	161.42	1.3
大格勒	N 36°45'87.6" E 95°69'74.3"	150.64	1.6
格尔木大格勒菊花村	N 36°23'05.9" E 94°59'00.3"	131.17	1.4
平均值 Average (%)	-	187.76	-

栽培枸杞子中,怀头塔拉2号样地枸杞子中东莨菪内酯含量最高(251.34 $\mu\text{g/g}$),格尔木大格勒菊花村样地枸杞子中东莨菪内酯含量最低(131.17

明该方法精密度较好。

2.3.4 稳定性

取枸杞子供试品溶液一份,室温放置,分别在0、2、4、8、12和24 h时进样10 μL ,测定峰面积并计算RSD,结果RSD为2.8%。结果表明东莨菪内酯在24 h内稳定。

2.3.5 加样回收率

取已知含量的枸杞样品(东莨菪内酯的含量为212.72 $\mu\text{g/g}$)6份,每份0.25 g。精密加入东莨菪内酯对照品的甲醇溶液(130 $\mu\text{g/mL}$)0.4 mL,以下按“1.2.2”项下平行操作,制得加样供试品溶液6份。吸取加样供试品溶液10 μL ,注入液相色谱仪,按“1.2.3”项下色谱条件测定东莨菪内酯的含量,计算加样回收率,结果回收率($n = 6$)为96.1%,RSD = 2.0%。

2.4 样品的测定及数据分析

22个柴达木栽培和野生枸杞子样品均按“1.2.2”项下方法处理,按“1.2.3”项下色谱条件测定峰面积,结果见表1和表2。

由以上两表看出,柴达木地区栽培枸杞子中东莨菪内酯平均含量(187.76 $\mu\text{g/g}$)低于野生枸杞子中(251.93 $\mu\text{g/g}$)。栽培枸杞子中东莨菪内酯含量的波动远小于野生枸杞子,其原因可能是由于野生枸杞子本身的品种差异及生长环境的差异所造成。

$\mu\text{g/g}$);野生枸杞子中,杂海镇陶哈村1号样地枸杞子中东莨菪内酯含量最高(776.48 $\mu\text{g/g}$),柯鲁克湖南样地枸杞子中东莨菪内酯含量最低(53.42 $\mu\text{g/g}$)

表2 柴达木野生枸杞子中东莨菪内酯含量($n = 3$)Table 2 Contents of scopoletin in the wild Fructus Lycii from Qaidam Basin ($n = 3$)

样品 Samples	采样地 Sampling site	经纬度 Longitude and latitude	东莨菪内酯含量 Contents of scopoletin ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)
野生黑果	格尔木市园艺场	N 36°24'27.3" E 94°55'52.7"	58.98	1.1
野生黑果	柯鲁克湖南	N 37°13'23.4" E 96°46'39.0"	53.42	0.9
野生黑果	柯鲁克湖西	N 37°19'02.8" E 96°51'3.8"	60.65	0.9
野生红果	尕海镇陶哈村1	N 37°12'24.7" E 97°28'36.8"	776.48	1.9
野生红果	尕海镇陶哈村2	N 37°12'10.4" E 97°28'35.2"	227.23	1.6
野生红果	乌兰县某田边	N 36°56'12.6" E 98°26'50.5"	179.96	1.4
野生红果	乌兰县兽疫站	N 36°55'54.7" E 98°28'56.6"	421.44	1.9
野生红果	格尔木市中山路	N 36°23'31.2" E 94°36'02.6"	188.53	1.2
野生红果	都兰英德羊场	N 36°12'58.8" E 95°52'20.3"	376.94	1.6
野生红果	柯鲁克湖南	N 37°13'23.4" E 96°46'39.0"	363.39	1.7
野生黄果	诺木洪宗加镇	N36°24.5'31.0"E96°28'20.1"	64.20	0.9
平均值 Average (%)	-	-	251.93	-

g);从枸杞子果实颜色上看,野生黑果和黄果枸杞子中东莨菪内酯含量均较低,红果枸杞子中含量普遍较高。

另外,根据已有文献报道,柴达木栽培和野生红果枸杞子中东莨菪内酯的平均含量,除了较宁夏中宁(编号为20050331-6)的低外,较其他地区(包括河北、新疆、内蒙古、甘肃)枸杞子中东莨菪内酯的含量高。

综上,柴达木栽培枸杞子具有很整齐的品质优良性,而野生枸杞子因其生长地区和自身品种不同,品质差异很大,适宜于选择性的开发。单从东莨菪内酯含量考虑的话,柴达木栽培和野生红果枸杞子适宜于作为原料药材。

3 结论

依据已有文献报道,本研究对枸杞子中东莨菪内酯提取方法进行优化,采用甲醇-盐酸溶液(4:1, v/v),水浴回流提取1 h,在保证提取效率的前提下,避免了使用高毒、高成本的三氯甲烷溶剂,简化了提取工艺,降低了提取成本。同时,本研究对东莨菪内酯的测定方法进行优化,采用甲醇-0.05%磷酸溶液(35:65)为流动相,流速:1 mL/min,柱温:30 °C,检测波长:344 nm。在该条件下,样品中的东莨菪内酯峰形对称,保留时间适宜,与杂质峰可达到基线分离。对优化的方法进行了线性范围、重复性、精密密度、稳定性、准确度等相关方法学考察,结果表明,本文所建立的枸杞子中东莨菪内酯含量测定方法准确可靠,方法学考察结果符合有关规定,适用于枸杞

子中东莨菪内酯的含量测定。

通过对青海柴达木栽培和野生枸杞子中东莨菪内酯含量的比较,发现栽培枸杞子中东莨菪内酯含量整齐度远优于野生枸杞子,红果枸杞子中莨菪内酯含量远远高于黑果和黄果枸杞子;而不同地区、不同品种野生枸杞子中东莨菪内酯含量差异很大。另外,单从东莨菪内酯含量考虑的话,柴达木栽培和野生红果枸杞子适宜于作为原料药材。这一研究对于柴达木地区野生枸杞子的选择性开发利用提供了一定的理论依据。

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.
- 2 Han F(韩枫). Pharmacological activity and pharmacokinetic study progress of scopoletin. *Chin Pharm* (中国药房), 2011, 22:2971-2972.
- 3 Pan R, Dai Y, Yang J, et al. Anti-angiogenic potential of scopoletin is associated with the inhibition of ERK1/2 activation. *Drug Dev Res*, 2009, 70:214-219.
- 4 Pan R, Gao XH, Xia YF, et al. Anti-arthritis effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium. *Fundam Clin Pharmacol*, 2010, 24:477-490.
- 5 Yi ZB(易智彪), Zeng B(曾宝), Lai XP(赖小平). Determination of scopoletin in *Lycium barbarum* L. by HPLC. *Asia-Pac Tradit Med* (亚太传统医药), 2010, 6(4):13-15.