

## 柴达木枸杞叶提取物中甜菜碱的鉴定及含量测定

张莉<sup>1</sup>, 党军<sup>1</sup>, 王启兰<sup>1</sup>, 陶燕铎<sup>1</sup>, 刘雪娟<sup>2</sup>, 梅丽娟<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室 青海省藏药研究重点实验室, 西宁 810008; 内蒙古自治区阿拉善盟林业治沙研究所, 阿拉善左旗 750300

**摘要:** 对柴达木枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 叶提取物中甜菜碱进行鉴定及含量测定, 着重建立柴达木枸杞叶提取物中甜菜碱的含量测定方法。采用 HPLC 法建立枸杞叶提取物中甜菜碱的含量测定方法。HPLC 色谱分析条件: 色谱柱: Hypersil NH<sub>2</sub> 柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸-乙腈: 0.1% 甲酸-水 (85: 15); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 195 nm。HPLC 法测定结果表明: 甜菜碱在 0.5 ~ 4.5 μg 范围内线性关系良好, 平均回收率为 101.14%, RSD 为 0.30%。柴达木枸杞叶提取物中甜菜碱的含量不得低于 10%。该方法可以准确地进行定性、定量检测, 操作简便快速、结果可靠、重现性好, 可完善在柴达木枸杞叶化学成分方面的研究, 并有效控制其质量。

**关键词:** 枸杞叶; 高效液相色谱; 甜菜碱; 含量测定

中图分类号: Q946.88

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.018

## Identification and Determination of Betaine in Extract of *Lycium barbarum* L. Leaf from Qaidam Basin

ZHANG Li<sup>1</sup>, DANG Jun<sup>1</sup>, WANG Qi-lan<sup>1</sup>, TAO Yan-duo<sup>1</sup>, LIU Xue-juan<sup>2</sup>, MEI Li-juan<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences / Key Laboratory of Tibetan

Medicine Research, Chinese Academy of Sciences / Qinghai Key Laboratory of Tibetan Medicine Research,

Qinghai Xining 810008, China; <sup>2</sup> Alxa Forestry and Desert Control Research Institute, Inner Mongolia Alxa Left Banner 750300, China

**Abstract:** In this study, betaine in the extract of *Lycium barbarum* L. leaf from Qaidam Basin was identified and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The chromatographic analysis conditions were as follows: using Hypersil NH<sub>2</sub> (250 × 4.6 mm, 5 μm) column with 0.1% formic acid in acetonitrile (85%) and 0.1% formic acid in water (15%) as mobile phases. The flow rate was set at 0.9 mL/min, and column temperature was maintained at 30 °C, UV detection wavelength was 195 nm. Betaine showed good linearity within the range of 0.5-4.5 μg. The average recovery was 101.14% and the relative standard deviation (RSD) was 0.30%. The content of betaine in the extract of *L. barbarum* leaf from Qaidam Basin was no less than 10%. The developed HPLC method was simple, rapid, reliable as well as reproducible. It can be used for the qualitative and quantitative determination of betaine in *L. barbarum* leaf from the Qaidam Basin and hence to control its quality effectively.

**Key words:** *Lycium barbarum* L. leaf; high performance-liquid chromatography; betaine; content determination

柴达木枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 简称柴杞, 又名青海枸杞, 其叶为茄科 (Solanaceae) 植物枸杞的叶, 其嫩芽俗称天精草, 是一味重要的中药材<sup>[1]</sup>。青海柴达木盆地以其独特的自然地理条件优势, 所产枸杞叶品质较好, 是柴达木枸杞的主产地。柴达木枸杞叶中含人体需要的多种氨基酸和微量元素,

同时富含甜菜碱这一季胺型生物碱<sup>[2-5]</sup>。现代体内药理学研究表明, 甜菜碱可促进脂肪分解代谢, 具有抗脂肪肝的作用, 以及提高机体免疫力、降血脂、抗氧化、抗肿瘤等药理作用<sup>[6-11]</sup>, 为此本研究在前人研究报道基础上, 采用反相高效液相色谱法结合氨基酸谱柱建立了柴达木枸杞叶提取物中甜菜碱的含量测定方法, 同时规定了其含量限度, 为进一步完善其相关质量标准以及进一步开发利用柴达木枸杞叶这一丰富资源提供了科学依据。

收稿日期: 2015-08-10 接受日期: 2015-12-17

基金项目: 青海省科技厅项目 (2012-G-Q08A-6); 青海省重大科技专项 (2014-GX-A3A-01)

\* 通讯作者 Tel: 86-971-6143610; E-mail: meilijuan111@163.com

## 1 仪器与材料

SK03GT 科导超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);UPT-I-5 优普超纯水机(成都超纯水科技有限公司);RE-52 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);HH-6 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);Agilent 1200LC 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),配有:G1379A 在线脱气机、G1311A 四元泵、G1313A 标准型自动进样器、G1316A 柱温箱以及 Agilent 1200 色谱工作站;AG204 电子分析天平(梅特勒公司);硅胶 HSGF254 薄层板(青岛海洋化工厂);甜菜碱对照品购自北京恒元启天化工技术研究院(批号:A0135,纯度 > 98%);色谱纯乙腈(山东禹王试剂公司);色谱纯甲酸(百灵威科技有限公司),其余试剂均为分析纯。

枸杞叶原料:共 10 批,分别于 2010 年 6 月采自青海省海西蒙古族藏族自治州,柴达木盆地境内:大风山,茶冷口,锡铁山,德令哈市,察尔汗,乌兰柯柯镇,格尔木市,诺木洪农场,都兰巴隆乡,都兰察汗乌苏镇,由中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟副研究员鉴定为柴达木枸杞的叶。

## 2 实验方法

### 2.1 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱: Hypersil NH<sub>2</sub> 柱(250 × 4.6 mm, 5 μm); 流动相:0.1% 甲酸-乙腈溶液(85%):0.1% 甲酸-水溶液(15%);流速:0.9 mL/min;柱温:30 °C;检测波长:195 nm;进样量:5 μL;理论塔板数按

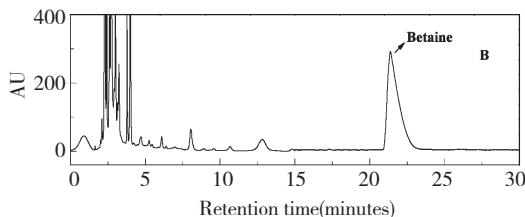
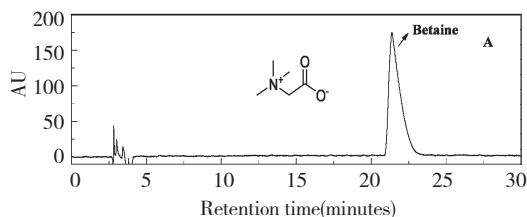


图 1 甜菜碱对照品溶液(A)以及枸杞叶提取物样品溶液(B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of betaine standard (A) and sample solution of *L. barbarum* leaves (B)

### 3.2 线性关系考察

分别将“2.2”项下不同浓度的对照品溶液按“2.1”项下色谱条件依次连续进样,以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为: $Y = 90.37X + 6.11$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明甜菜碱在 0.5 ~ 2.5 μg 范围内成良好的线性关系。

甜菜碱峰计算应不低于 6000。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取甜菜碱对照品 2.5 mg,加适量色谱纯水溶解,转移并定容于 5 mL 容量瓶中,得浓度为 0.5 mg/mL 的甜菜碱对照品母液,精密吸取上述对照品母液适量,逐级稀释得浓度为 0.25、0.12、0.06、0.03、0.015 mg/mL 的甜菜碱对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

将阴干的枸杞叶粉末称取 10 g,加入 100 mL 的蒸馏水,回流提取 2 h,提取三次,过滤并合并滤液,将滤液在烘箱中烘干,干浸膏用色谱纯水超声溶解,转移到 100 mL 容量瓶中,用色谱纯水定容,0.45 μm 微孔滤膜过滤,作为供试液。

## 3 结果与讨论

### 3.1 甜菜碱含量测定方法的建立

实验中,选择流动相:85% (0.1% 甲酸-乙腈)与 15% (0.1% 甲酸-水)等度洗脱条件在 Hypersil NH<sub>2</sub> 色谱柱(250 × 4.6 mm, 5 μm)对照品及供试品溶液中甜菜碱进行高效液相色谱法分析,甜菜碱对照品溶液与枸杞叶提取物供试品溶液液相检测结果见图 1(甜菜碱对照品溶液见图 1 A,枸杞叶提取物供试品溶液见图 1 B)。从图中可以看出:在 Hypersil NH<sub>2</sub> 色谱柱上 30 min 之内枸杞叶中甜菜碱提取样品与甜菜碱对照品可以实现基线分离,甜菜碱对照品溶液以及枸杞叶提取物供试品溶液中甜菜碱在色谱柱上保留时间约为 21.4 min。

### 3.3 精密度试验

分别设置上述对照品溶液进样量 5.0 μL,按上述色谱条件日内、日间连续进样 5 次,并测定 5 天,记录甜菜碱的峰面积。计算甜菜碱的日内、日间分别为 0.30% 和 0.44%,表明仪器精密度良好。

### 3.4 重复性试验

按样品溶液制备方法处理同一样品 5 份,各进样 5.0  $\mu\text{L}$ ,按上述色谱条件测定,记录甜菜碱的峰面积。计算 RSD 为 0.28%,表明实验方法的重复性良好。

### 3.5 稳定性试验

取同一供试品溶液分别在 0、2、6、8、12、16、24 h 按上述色谱条件测定,记录甜菜碱的峰面积,计算甜菜碱峰的保留时间和相对峰面积。结果表明,甜菜碱峰相对保留时间和相对峰面积稳定,计算 RSD 分别为 0.30% 和 1.26%,表明样品溶液至少在 24 h 内稳定。

表 1 柴达木盆地不同海拔地点的枸杞叶提取物样品中甜菜碱含量测定结果

Table 1 Determination results of betaine in *L. barbarum* leaves from Qaidam Basin of different altitudes

样品批次 Lot No.	采集地点 Collection place	海拔 Altitude (m)	甜菜碱含量 Content (%)
1	大风山	3010	10.13
2	茶冷口	2760	10.19
3	锡铁山	3796	10.76
4	德令哈市	3425	10.01
5	察尔汗	2717	10.30
6	乌兰柯柯镇	2961	10.41
7	格尔木市	2928	10.27
8	诺木洪农场	2793	12.32
9	都兰巴隆乡	3293	11.82
10	都兰察汗乌苏镇	3500	11.65

### 3.8 提取方法的选择

青海地处青藏高原,有其独特的地理优势,所产枸杞叶质量较好,所以我们选择了青海省柴达木盆地不同海拔地点的 10 批次枸杞叶提取物作为样品,进行了相关质量标准研究,综合考虑,规定枸杞叶提取物中甜菜碱的含量不得低于 10%。

比较了 3 种提取法:回流提取法、微波回流提取法(带磁力搅拌)和超声提取法。结果表明:10 批次药材回流提取率均稍大于超声提取法和微波回流法,与其他提取方法相比,回流提取法工艺耗时,效率低下,而微波提取法省时,只是大规模生产上不易实现,超声提取法浸泡时间较长,效率更低,而且浸膏中目标产物含量不如回流提取高,综合各方面条件,选择回流提取法。实验过程中比较了提取时间(1、2、3 h)、料液比(1:6、1:8、1:10 g/mL)和提取次数(1 次、2 次、3 次)对枸杞叶甜菜碱提取率的影响,

### 3.6 加样回收率试验

采用加样回收法。称取已知含量 10.19% 的枸杞叶提取物粉适量,分别精密加入一定量的甜菜碱对照品,按供试品制备与测定方法,在上述色谱条件下,平行做 5 组,结果测得其平均回收率为 101.14%,RSD 为 1.19%。

### 3.7 样品测定结果

依上述提取与含量测定方法,对柴达木盆地 10 批不同海拔地点的枸杞叶提取物中甜菜碱的含量依据以下公式进行计算:,其中  $A_2$  和  $A_1$  分别为不同采集地样品溶液的峰面积和 0.5 mg/mL 的对照品溶液的峰面积,结果见表 1。

结果表明料液比 1:10 g/mL、回流提取时间 2 h,回流提取 3 次为实验最佳提取工艺。因此,采用回流提取法,料液比为 1:10 g/mL、提取 2 h、提取 3 次对样品进行提取制样。

### 3.9 色谱条件的优化

由于甜菜碱属季铵型生物碱,同时化合物结构中无共轭体系,具有紫外末端吸收特性,只能选择低波长(195 nm)对其进行检测。条件摸索中采用两相都加 0.1% 甲酸在酸性条件下(抑制硅醇基电离)摸索甜菜碱的色谱分离条件,有研究报道,乙腈与水两相按一定比例混合作为流动相在氨基柱上对甜菜碱进行分离<sup>[6]</sup>,研究中并未实现甜菜碱在色谱图上基线分离,导致测量结果有偏差。本研究以 0.1% 甲酸-乙腈溶液:0.1% 甲酸-水溶液(85:15)为流动相,流速 0.9 mL/min,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$  的色谱条件下样品中甜菜碱峰与其他共存化合物色谱峰能达到良好的

基线分离;故本试验最终确定此色谱条件。

### 3.10 柴达木枸杞叶提取物质量标准的建立

提取物的质量标准在药典中记载较少,一般以胶囊剂、颗粒剂或糖浆等形式出现,是特定单一药材的提取物或某几种提取物制成的各不相同的剂型,针对特定指标性成分制定其检测限<sup>[1]</sup>。本研究以甜菜碱为指标性成分,建立了柴达木枸杞叶提取物中甜菜碱的含量测定方法,并对产自柴达木盆地不同地点的10批枸杞叶提取物指标性成分进行了HPLC测定,针对测定结果,制定了柴达木枸杞叶提取物甜菜碱的检测限,为后续开发利用枸杞叶提取物制定其质量标准提供借鉴。

## 4 结论

本实验建立了柴达木枸杞叶提取物中甜菜碱的HPLC鉴定及含量测定方法,该方法操作简便、结果可靠、重现性好,可完善在柴达木枸杞叶化学成分方面的研究,并有效控制其质量。

### 参考文献

- 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, 2005. 174.
- Xie C (谢忱), Xu LZ (徐丽珍), Li XM (李宪铭), et al. Studies on chemical constituents in fruit of *Lycium barbarum* L. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26: 323-324.
- Xu XZ (徐秀珍), Qi XH (齐喜红). Determination of betaine contents in *Fructus Lycii* by TLC scanning. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2005, 27: 941-943.
- Li H (李炜), Zhang DS (张丹参). Advancement on extraction and isolation as well as quantitative determination of betaine. *Med Recapitulate* (医学综述), 2006, 12: 506-508.
- Tan L (谭亮), Ji T (冀恬), Cao JY (曹静亚), et al. Determination of betaine contents in *Fructus Lycii* from different origins by dual wavelength TLC scanning. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 388-391.
- Wang X (王迅). Natural betaine-a superior functional ingredient. *China Food Addit* (中国食品添加剂), 2008, S1: 98-100.
- Li BL (李炳龙), Qi YX (齐永秀), Liu CL (刘常丽), et al. Current studies on pharmacodynamics of betaine and the mechanisms. *Chin New Drug J* (中国新药杂志), 2008, 17: 1571-1574.
- Liu H, Wang K, Zhao J L, et al. Secondary metabolites from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Rec Nat Prod*, 2012, 6: 58-62.
- Michaela M, Karin T, Johann J, et al. Betaines and free proline within the *Achillea millefolium* group. *Phytochemistry*, 1997, 44: 1067-1069.
- Young GS, Kyung HC, Jong MK, et al. Determination of betaine in *Lycium chinense* fruits by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1999, 857: 331-335.
- Fu DH (傅冬和). Identification and qualification of glycine betaine proline and trigonelline in grape leaves by HPLC. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 313-315.
- (上接第55页)
- Wei XY (魏希颖), Zhang YN (张延妮), Bai LL (白玲玲), et al. Analysis of oil in the *Flospaulowniae* by GC-MS and study on antibacterial function. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 87-90.
- Wang DM (王冬梅), Huang LF (黄林芳). Analysis of volatile oil from the leaves of *Uncaria macrophylla* Wall. by GC-MS. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2013, 33: 234-240.
- Fu T (付涛), Wang ZL (王志龙), Lin L (林立), et al. Comparison of volatile oils in different parts of *Dendrobium officinale* tube seedlings by GC-MS. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2015, 37: 2233-2238.
- Li WG (李卫国), Zhang LW (张乐伟), Wang C (王超), et al. Analysis of mulberry leaf volatile components by static headspace-gas chromatography-mass spectrometry. *Sci Sericulture* (蚕业科学), 2009, 35: 355-361.
- Wu SM (吴时敏). Functional Oil (功能性油脂). Beijing: China Light Industry Press, 2004. 93-100.
- Sun YP, Rajasekar S, Min JK, et al. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19: 253-261.
- Policegoudraa RS, Chattopadhyaya P, Aradhyab SM. Inhibitory effect of *Tridaxprocumbens* against human skin pathogens. *J Herbal Med*, 2014, 4: 83-88.
- Noha MS, Ebtehal ED, Hanaa MA, et al. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264: 84-93.