

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)09-0080-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.09.018



鲜枸杞子浆质量标准研究*

田雨¹, 王庆^{2△}, 齐喜红², 韩莎²

(1. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏回族自治区药品检验研究院, 宁夏 银川 750001)

摘要:目的 建立鲜枸杞子浆的质量标准。方法 采用薄层色谱法对鲜枸杞子浆中的枸杞子进行定性鉴别;采用紫外-可见分光光度法测定枸杞多糖的含量,检测波长为490 nm;采用高效液相色谱法测定甜菜碱的含量,色谱柱为Merck Purospher®STAR NH₂柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水溶液(85:15, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为195 nm,柱温为25℃,进样量为10 μL。结果 薄层色谱图中,斑点清晰,分离度好。D-无水葡萄糖的质量浓度在2.506 0~18.794 8 μg/mL范围内与吸光度线性关系良好($r=0.999\ 8, n=6$);枸杞多糖的精密性、重复性、稳定性试验结果的RSD均低于2.0%;平均加样回收率为99.37%,RSD为0.54%($n=6$)。甜菜碱的质量浓度在17.54~350.77 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 6, n=5$);精密性、重复性、稳定性试验结果的RSD均低于2.0%;平均加样回收率为100.18%,RSD为0.53%($n=6$)。结论 该方法简便可行、重复性好,可用于鲜枸杞子浆的质量控制。

关键词:鲜枸杞子浆;枸杞子;枸杞多糖;甜菜碱;质量标准

Quality Standard of Fresh Lycii Fructus Syrup

TIAN Yu¹, WANG Qing², QI Xihong², HAN Sha²

(1. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia, China 750004; 2. Ningxia Hui Autonomous Region Institute of Drug Inspection, Yinchuan, Ningxia, China 750001)

Abstract: Objective To establish the quality standard of fresh Lycii Fructus syrup. **Methods** Lycii Fructus in fresh Lycii Fructus syrup was qualitatively identified by the thin-layer chromatography (TLC) method. The content of lycium barbarum polysaccharide was determined by the UV visible spectrophotometry with a detection wavelength of 490 nm. The content of betaine was determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, the chromatographic column was Merck Purospher®STAR NH₂ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-aqueous solution (85:15, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 195 nm, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** TLC spots were clear and well separated. The linear range of D-glucopyranose was 2.506 0-18.794 8 μg/mL ($r=0.999\ 8, n=6$). The RSDs of the precision, repeatability, and stability tests of lycium barbarum polysaccharide were lower than 2.0%. The average recovery of D-glucopyranose was 99.37% with an RSD of 0.54% ($n=6$). The linear range of betaine was 17.54-350.77 μg/mL ($r=0.999\ 6, n=5$), the RSDs of precision, repeatability, and stability tests of betaine were lower than 2.0%, and the average recovery of betaine was 100.18% with an RSD of 0.53% ($n=6$). **Conclusion** This method is simple and feasible with good repeatability, which can be used for the quality control of fresh Lycii Fructus syrup.

Key words: fresh Lycii Fructus syrup; Lycii Fructus; lycium barbarum polysaccharides; betaine; quality standard

*基金项目:宁夏回族自治区市场监管厅2022年度科技计划项目[2022SJKY0020]。

第一作者:田雨,男,硕士研究生在读,研究方向为药物质量控制与评价,(电子信箱)1643600313@qq.com。

△通信作者:王庆,女,硕士,主任药师,研究方向为中药质量控制,(电子信箱)2751576307@qq.com。

的江枳壳质量标志物预测分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(13):198-208.

[17] 王慧,钟国跃,张寿文,等. 枳壳化学成分、药理作用的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9):184-192.

[18] 徐坤勇,颜娟,韵国萍. 正交试验优选枳壳提取工艺[J]. 中国药业, 2021, 30(10):44-47.

[19] 魏晓锐,徐金玲,刘艳霞. 高效液相色谱法同时测定胆胃平颗粒中柚皮苷和新橙皮苷含量[J]. 中国药业, 2017, 26(11):28-30.

[20] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于发布《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》的公告(2021年第16号)[A/OL]. (2021-01-26)[2022-01-20]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20210210145453181.html>.

[21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:31.

[22] 何嘉莹,李定发,黄敏焯,等. 枳壳及麸炒枳壳对比研究[J]. 中药材, 2020(12):2914-2919.

[23] 何民友,李振雨,王利伟,等. 基于标准汤剂的罗布麻叶配方颗粒质量标准研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(8):100-106.

[24] 姜华,李军. 新橙皮苷对柚皮苷增溶作用及其机制的初步考察[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(6):484-488.

(收稿日期:2022-06-15;修回日期:2022-12-07)

枸杞子为药食同源的常用滋补类中药^[1],始载于《神农本草经》^[2],现收载于2020年版《中国药典(一部)》,具有滋补肝肾、益精明目功效^[3]。枸杞子含有丰富的化学成分,主要有枸杞多糖、生物碱、氨基酸、黄酮类、维生素、微量元素^[4-6]等。鲜枸杞子浆是结合现代科技,将枸杞子鲜果经破碎、制浆及灭菌工艺灌装生产而成,最大限度地保留了枸杞子鲜果的药效成分,同时便于运输、储存和使用。近年来,鲜枸杞子浆作为食品已有应用,其标准为食品行业团体标准^[7-9]。为传承、创新枸杞子中药饮片传统炮制加工方法,提升其生物利用度,拓宽鲜枸杞子浆在中药领域的应用,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对鲜枸杞子浆进行定性鉴别,分别采用紫外-可见分光光度法和高效液相色谱法测定枸杞多糖及甜菜碱的含量,为建立鲜枸杞子浆的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

XS205型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为十万分之一);2550型紫外分光光度计(日本岛津公司);安捷伦1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

1.2 试药

枸杞子浆(宁夏早康生物科技有限公司,批号分别为20191001,20191002,20191003,20191004,20191005,20200701,20200702,20200703,20200704,20200705);枸杞子对照药材(批号为121072-201611),*D*-无水葡萄糖对照品(批号为110833-201908,纯度为99.8%),甜菜碱对照品(批号为110894-201604,纯度为99.2%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

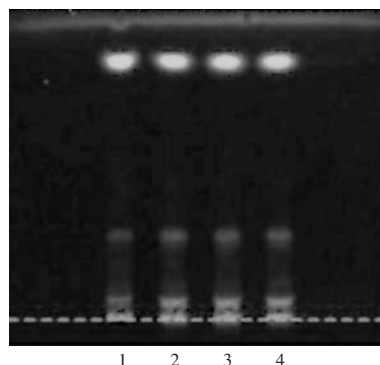
2.1 TLC鉴别

取样品2.0 g,加水35 mL,加热煮沸15 min,放冷,滤过,滤液用乙酸乙酯15 mL振摇提取,分取乙酸乙酯液,浓缩至1 mL,作为供试品溶液。取枸杞子对照药材0.5 g,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。吸取供试品溶液和对照药材溶液各5 μ L,用自动点样仪分别点在同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-三氯甲烷-甲酸(3:2:1, *V/V/V*)为展开剂,上行展开,展距8.0 cm,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相同位置显相同颜色的荧光斑点。色谱图见图1。

2.2 枸杞多糖含量测定

2.2.1 溶液制备

取*D*-无水葡萄糖对照品25.11 mg,精密称定,置250 mL容量瓶中,加水定容,即得对照品溶液。取样品



1. 对照药材溶液 2-4. 供试品溶液

图1 薄层色谱图(365 nm)

1. Reference medicinal materials solution 2-4. Test solution

Fig. 1 TLC chromatogram (365 nm)

2.0 g,精密称定,加乙醚100 mL,加热回流1 h,弃去乙醚液,残渣加100 mL 80%乙醇,加热回流提取1 h,滤过,用30 mL 80%乙醇分次洗涤,将滤渣和滤纸置装有150 mL水的烧瓶中,继续加热回流提取2 h,趁热滤过,用少量热水冲洗滤器,收集滤液和洗液,放冷,转移至250 mL容量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.2 标准曲线制备^[10-12]

精密量取2.2.1项下对照品溶液0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.5 mL,分别置具塞试管中,加水至2.0 mL,各精密加入5%苯酚溶液1 mL,摇匀,迅速精密加入硫酸5 mL,摇匀,放置10 min,40 $^{\circ}$ C水浴放置15 min,取出,迅速冷却至室温,以溶剂为空白对照,于490 nm波长处测定吸光度,以吸光度(*Y*)为纵坐标、质量浓度(*X*, μ g/mL)为横坐标绘制标准曲线,得线性方程 $Y = 0.072 X - 0.026 4$ ($r = 0.999 8, n = 6$)。结果表明,*D*-无水葡萄糖质量浓度在2.506 0~18.794 8 μ g/mL范围内与吸光度线性关系良好。

2.2.3 样品含量测定方法

精密量取供试品溶液1.0 mL,置具塞试管中,精密加水1.0 mL,按2.2.2项下自“各精密加入5%苯酚溶液1 mL”起,依法测定吸光度,按标准曲线计算供试品溶液中*D*-无水葡萄糖的浓度和含量。

2.2.4 方法学考察

精密度试验:精密量取*D*-无水葡萄糖对照品溶液0.4 mL,置具塞试管中,加水至2.0 mL,按2.2.3项下方法测定吸光度6次。结果的*RSD*为0.11% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20191001)样品6份,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.3项下方法测定吸光度,并计算含量。结果平均含量为0.81%,*RSD*为1.28% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为20191001),按2.2.1项下方法制备供试品溶液,分别于配制后0,2,4,6,8 h时按2.2.3项下方法测定吸光度。结果供试品溶液在室温下放置6 h的吸光度无明显变化, RSD 为0.63%($n=4$),表明供试品溶液在6 h内稳定性良好;放置8 h后吸光度下降, RSD 为2.83%($n=5$)。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20191001)0.25 g,精密称定,共6份,分别精密加入D-无水葡萄糖对照品2 mg,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.3项下方法进样测定,并计算加样回收率。结果见表1。

表1 枸杞多糖加样回收试验结果($n=6$)
Tab.1 Results of the recovery test of lycium burbarum polysaccharide ($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
0.2517	2.0388	2.0030	4.0440	100.11	99.37	0.54
0.2512	2.0347	2.0030	4.0304	99.64		
0.2518	2.0315	2.0030	4.0266	99.61		
0.2497	2.0226	2.0030	3.9984	98.64		
0.2571	2.0663	2.0030	4.0560	99.34		
0.2528	2.0477	2.0030	4.0288	98.91		

2.2.5 样品含量测定

取10批样品,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.3项下方法进样测定,并计算含量。结果见表2。

表2 样品中枸杞多糖含量测定结果(%)

Tab.2 Results of the content determination of lycium burbarum polysaccharide in samples (%)

批号	含量	批号	含量	批号	含量
20191001	0.79	20191005	0.81	20200704	0.80
20191002	0.80	20200701	0.80	20200705	0.79
20191003	0.80	20200702	0.79		
20191004	0.78	20200703	0.80		

2.3 甜菜碱含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Merck Purospher®STAR NH₂柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水溶液(85:15, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:195 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μL。

2.3.2 溶液制备

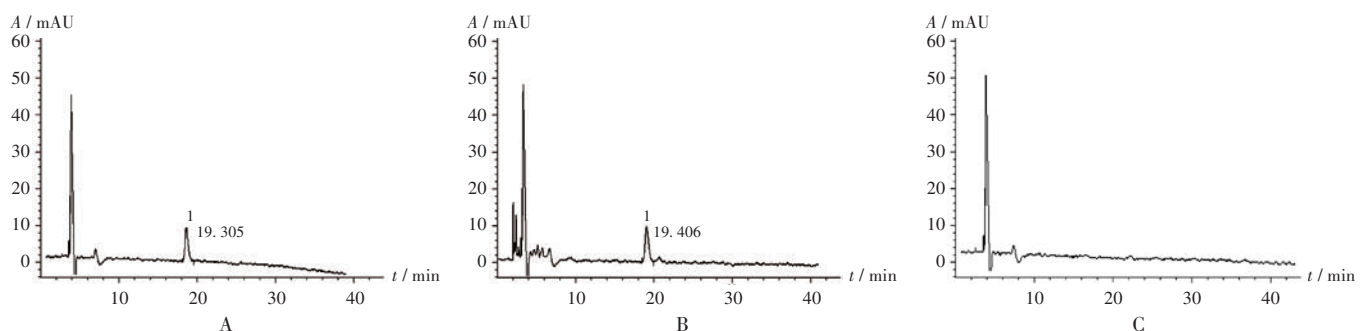
取甜菜碱对照品17.68 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,作为对照品溶液。取样品4 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,加热回流1 h,冷却,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液2 mL,置碱性氧化铝固相萃取柱(2 g)上,加乙醇30 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加水适量,溶解,转移至2 mL容量瓶中并定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液^[13-14]。同法制备阴性对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

专属性试验:取2.3.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱同一保留时间处有相应色谱峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图2。

线性关系考察:分别精密量取对照品溶液0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL,置10 mL容量瓶中,加水定容,摇匀,按2.3.1项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X , μg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.9527X - 9.2190$ ($r = 0.9996$, $n = 5$)。结果表明,甜菜碱质量浓度在17.54 ~ 350.77 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.3.2项下对照品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果的



1. 甜菜碱

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

1. Betaine

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig.2 HPLC chromatograms

RSD为1.50%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20191001)样品6份,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果的RSD为1.10%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.3.2项下对照品溶液,分别于0,2,4,6,8,12,24 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为1.94%($n=7$),表明甜菜碱在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20191001)2 g,精密称定,共6份,分别精密加入质量浓度为3.761 7 mg/mL的甜菜碱对照品溶液1 mL,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果见表3。

表3 甜菜碱加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 3 Results of the recovery test of betaine ($n=6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
2.005 5	4 171.44	3 761.66	7 972.28	101.04	100.18	0.53
2.003 8	4 167.90	3 761.66	7 942.05	100.33		
2.004 0	4 168.32	3 761.66	7 940.77	100.29		
2.002 5	4 165.20	3 761.66	7 934.37	100.20		
2.002 5	4 165.20	3 761.66	7 911.33	99.59		
2.003 0	4 166.24	3 761.66	7 915.17	99.66		

2.3.4 样品含量测定

取10批样品,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表4。

表4 样品中甜菜碱含量测定结果(%)

Tab. 4 Results of the content determination of betaine in samples (%)

批号	含量	批号	含量	批号	含量
20191001	0.17	20191005	0.20	20200704	0.19
20191002	0.19	20200701	0.19	20200705	0.18
20191003	0.17	20200702	0.17		
20191004	0.19	20200703	0.18		

3 讨论

本研究中鲜枸杞子浆的TLC鉴别主要参考2020年版《中国药典(一部)》枸杞子TLC鉴别项下的方法^[3],同时考察了不同薄层板、不同温湿度对试验结果的影响,结果重复性良好,操作简便,斑点清晰,分离效果好。故确定为2.1项下鲜枸杞子浆TLC鉴别方法。

在190~680 nm波长范围内扫描,结果于490 nm波长处葡萄糖吸收峰最大,故选用490 nm为枸杞多糖的测定波长。考察了样品在不同提取时间(2,3,4 h)所测得的枸杞多糖含量,结果分别为0.82%,0.83%,0.84%。综合考虑,确定样品提取时间为2 h。考察了比

色皿、波长和苯酚试剂的耐用性,结果均无明显影响。

从鲜果炮制成鲜枸杞子浆的收率为80%~90%,从鲜果炮制成枸杞子的收率为20%~25%,即鲜枸杞子浆与枸杞子干品比率为4:1。参照2020年版《中国药典(一部)》枸杞子含量测定项下枸杞多糖的限度为不得少于1.8%,结合10批样品的含量测定结果,暂将鲜枸杞子浆中枸杞多糖的限度订为不得少于0.5%。

考察了流动相乙腈-水溶液的3种比例(87:13,85:15,83:17,V/V),结果均符合要求。考察了不同品牌色谱柱(Merck Purospher®STAR NH₂柱、Agilent NH₂柱、Waters NH₂柱,规格均为250 mm×4.6 mm,5 μm)对甜菜碱含量测定结果的影响,结果对甜菜碱含量测定结果影响较小,故最终确定为2.3.1项下色谱条件。结合10批样品的甜菜碱含量测定结果,暂将鲜枸杞子浆中甜菜碱的限度订为不得少于0.10%。

综上所述,本研究中建立的方法简便、可行、重复性好,可用于鲜枸杞子浆的质量控制。

参考文献

- [1] 黄燕明,陈桂生,李雪银,等. 枸杞子标准汤剂制备及质量标准研究[J]. 亚太传统医药,2022,18(5):69-74.
 - [2] 邢世瑞. 宁夏中药志(第二版,下卷)[M]. 银川:宁夏人民出版社,2006:322-329.
 - [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:国家医药科技出版社,2020:260.
 - [4] 刘倩,余意,梁琰,等. 枸杞子活性成分及分析方法研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(11):56-59.
 - [5] 逯海龙,刘仕丽,苏亚伦,等. 宁夏枸杞子化学成分的研究[J]. 解放军药学报,2012,28(6):475-476.
 - [6] 滕俊,袁佳,叶莎莎. 枸杞子化学成分及药理作用相关性概述[J]. 海峡药学,2014,26(6):36-37.
 - [7] 李启佳,陆华. 应用红外热成像技术评价采杞枸杞原浆的靶向药效[J]. 现代医学与健康研究电子杂志,2019,3(8):119-120.
 - [8] 沈焱焱. 维生素C及柠檬酸对于鲜枸杞原浆的抗氧化研究[J]. 食品安全导刊,2020(36):132.
 - [9] T/NXSPATXH 002S—2020,枸杞原浆[S].
 - [10] 牛延菲,王鹏,张晓南,等. 不同产地及炮制方法雪上一枝蒿多糖含量分析[J]. 云南中医中药杂志,2021,42(5):64-69.
 - [11] 万晓莹,刘振丽,宋志前,等. 中药多糖含量测定方法研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2021,27(7):1175-1178.
 - [12] 李良,金文娟. 枸杞多糖含量测定方法的比较分析[J]. 食品研究与开发,2016,37(11):143-146.
 - [13] 卢艳婷. 枸杞中甜菜碱的含量测定[J]. 食品安全导刊,2018(18):49-50.
 - [14] 陈晶,王京辉,傅欣彤,等. 枸杞子中甜菜碱HPLC-UV含量测定方法的优化[J]. 中国药品标准,2018,19(3):222-225.
- (收稿日期:2022-09-06;修回日期:2022-12-21)