

固相萃取 - 高效液相色谱法测定枸杞中甜菜碱

王晓菁, 吴燕, 王黎明

(农业部枸杞产品质量监督检验测试中心, 宁夏 银川 750002)

摘要: 建立固相萃取液相色谱法净化和测定枸杞中甜菜碱的分析方法。方法采用混合型阳离子交换小柱(Waters Oasis MCX)净化枸杞样品提取液, 使用 Atlantis HILIC 色谱柱, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 在 195nm 波长处检测。结果表明, 线性范围为 0.2 ~ 5.0mg/mL, 方法检出限为 0.0066mg/mL, 平均回收率为 88.3% ~ 104%。本方法能简便、快速、准确地检测枸杞中甜菜碱。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱法; 枸杞; 甜菜碱

Determination of Betaine in Fruits of *Lycium barbarum* L. by Solid Phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography

WANG Xiao-jing, WU Yan, WANG Li-ming

(Supervision and Testing Center for Lycium Quality, Ministry of Agriculture, Yinchuan 750002, China)

Abstract: A solid phase extraction and high-performance liquid chromatographic (SPE-HPLC) method was developed for the determination of betaine in the fruits of *Lycium barbarum* L.. The cleanup of sample extracts was achieved on Waters Oasis MCX cartridge. A mixture of acetonitrile and water was used as the mobile phase for the chromatographic separation on Atlantis HILIC column in the gradient elution mode. The detection wavelength was set at 195 nm. The method exhibited a limit of detection of 0.0066 mg/mL and a linear range of 0.2 - 5.0 mg/mL. Average recoveries of three replicates for betaine in a real sample spiked at the levels of 0.05, 0.1 mg/mL and 0.2 mg/mL ranged between 88.3% and 104%. A simple, rapid and accurate determination of betaine in the fruits of *Lycium barbarum* L. was successfully achieved using the method.

Key words: solid phase extraction; high-performance liquid chromatography; *Lycium barbarum* L.; betaine

中图分类号: R151.3; S663

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)08-0199-03

枸杞(*Lycium barbarum* L.)为茄科、枸杞属多年生落叶灌木的干燥果实, 是药食同源的产品, 具有滋补肝肾、明目的功效^[1]。现代药理学研究一般认为枸杞的活性成分、微量元素等有药理效果。枸杞的活性成分主要有 3 类, 甜菜碱为其中之一。甜菜碱是一类季胺盐化合物, 是枸杞果、叶、柄中主要的生物碱之一, 它在植物体内起甲基供应体的作用。目前对甜菜碱含量测定方法的研究日益增多, 主要有滴定法^[2]、比色法^[3-5]、高效液相色谱法^[6-11]等。这些方法各有其特点, 滴定法成本低, 但受样品中色素成分的干扰, 测定终点不易判断; 比色法测定过程复杂, 且洗脱溶剂用乙醚, 不利于日常检测工作的需要。高效液相色谱法测定甜菜碱, 或采用离子对试剂, 或采用专用柱: 采用离子对试剂, 缓冲盐容易析出造成液相系统堵塞, 缩短色谱柱使用寿命; 采用专用柱(阳离子交换柱 SCX 或氨基

柱 NH₂)分析, 前处理操作较繁琐。本方法利用高效液相色谱仪对枸杞中甜菜碱的测定方法的色谱条件、准确度、精密度以及样品处理进行实验研究, 以期建立快速、灵敏、准确的检测方法, 为质量检测部门等建立枸杞中甜菜碱的检测标准提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯) 美国 Fisher 公司; 氨水(优级纯)、盐酸(优级纯); 超纯水; 固相萃取柱: MCX 小柱(6mL/150mg) 美国 Waters 公司; WCX 小柱(3mL/50mg) 美国 Supelco 公司; 甜菜碱标准物质(98%) 美国 Sigma 公司。

0.1mol/L 盐酸、氨化甲醇(5mL 浓氨水+95mL 甲醇)、甲醇溶液(85mL 甲醇 + 15mL 水)、乙腈溶液(75mL 乙腈 +

收稿日期: 2009-05-31

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金项目(NZ0748)

作者简介: 王晓菁(1972—), 女, 高级实验师, 本科, 主要从事农产品营养与安全检测研究。E-mail: wangxiaoj74@163.com

25mL水)和MCX固相萃取柱的预淋洗使用溶液(上样前依次用5mL 甲醇、5mL 0.1mol/L 盐酸进行活化平衡。

甜菜碱标准溶液:准确称取甜菜碱标准物质 100mg 于 10mL 刻度试管中,加乙腈溶液溶解并定容,配制成 10mg/mL 标准储备液。

1.2 仪器与设备

Waters 2695 液相色谱仪(配 2487 紫外检测器, Empower 数据处理系统) 美国 Waters 公司;U-3900 紫外-可见分光光度计 日本日立公司;超声波清洗器 上海生析公司;涡旋混合器 广州 IKA 公司;TDL-40B 离心机 上海 Anke 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

准确称取粉碎枸杞样品 0.2g 于 50mL 离心管中,加入 25mL 超纯水,涡旋混匀,振荡提取 30min 后,以 4000r/min 离心 4min,过滤。吸取滤液 5mL 加入已活化的 MCX 小柱中,控制自然流速,待样液进入萃取小柱的吸附层后,依次用 5mL 甲醇溶液、5mL 甲醇进行淋洗。最后用 5mL 氨化甲醇进行洗脱,并重复洗脱一次。将收集的洗脱液氮吹浓缩近干,用 2mL 乙腈溶液溶解定容,经 0.45 μ m 滤膜过滤,待测定。

1.3.2 样品测定

色谱柱:Atlantis HILIC(150mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水;流速:1.0mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:195nm;进样体积:20 μ L。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱流动相比

Table 1 Mobile phase composition for gradient elution of betaine

时间/min	0	2	3	4	9	10	15
水:乙腈(V/V)	5:95	10:90	30:70	50:50	50:50	5:95	5:95

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

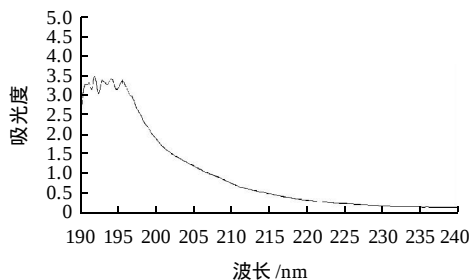


图 1 甜菜碱吸收光谱图

Fig.1 Absorption spectrum of betaine

如图 1 所示,在所设定的扫描区间内,甜菜碱的最大吸收波长为 192nm,为排除末端吸收干扰,本研究确定甜菜碱的检测波长为 195nm。

2.2 色谱柱及流动相的选择

甜菜碱又名甘氨酸甜菜碱,是一类季胺盐化合物。因此,研究分别采用 NH₂ 色谱柱、强阳离子 SCX 色谱柱、Sunfire C₁₈ 色谱柱、XTerra RP C₁₈ 色谱柱、Atlantis HILIC Silica 色谱柱,以不同的流动相体系及不同体积对比对甜菜碱标准品液相色谱检测条件进行确定。结果表明:甜菜碱组分在 NH₂ 色谱柱、强阳离子 SCX 色谱柱、Sunfire C₁₈ 色谱柱、XTerra RP C₁₈ 色谱柱中不易保留,相对保留时间在 4min 以内,很难与样品中的干扰组分分离;而 Atlantis HILIC Silica 色谱柱对甜菜碱与干扰成分能有效分离,并对甜菜碱能有效保留。甜菜碱的相对保留时间是 7.405min。

2.3 固相萃取小柱的选择

甜菜碱具有季胺碱性基团和羧酸酸性基团,是极性较大的两性物质。依据此特性,研究中采用 WCX 萃取小柱和 MCX 萃取小柱,以不同的淋洗剂及洗脱液对样品提取液进行净化、洗脱。结果表明:应用 MCX 萃取小柱能有效地保留甜菜碱组分,从而达到净化、洗脱的目的。

2.4 淋洗剂的选择

MCX 萃取小柱是阳离子交换小柱,活化平衡时采用 0.1mol/L 盐酸能使甜菜碱很好保留在小柱上,然后再采用体积比分别为 30:70、50:50、70:30 的甲醇溶液进行淋洗。结果表明:淋洗剂中随着甲醇体积比的增加,淋洗液中甜菜碱的流出减少,说明甜菜碱在 MCX 小柱的保留增强。通过进一步优化淋洗液,最终确定以甲醇-水体积比为 85:15 进行淋洗时,MCX 小柱能有效保留甜菜碱组分,最终洗脱液中的甜菜碱回收率令人满意。结果见表 2。

表 2 不同体积比甲醇-水淋洗的甜菜碱回收率

Table 2 Effect of mobile phase composition on betaine recovery in SPE

甲醇:水(V/V)	30:70	50:50	70:30	75:25	85:15	90:10
淋洗液中甜菜碱回收率/%	67.1	39.6	13.5	-	-	-
洗脱液中甜菜碱回收率/%	-	-	-	76.6	92.1	92.0

注:“-”为未测定。

2.5 标准工作曲线与最小检出量

配制 0、0.2、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0mg/mL 标准工作液,经 0.45 μ m 滤膜过滤,取 20 μ L 进行测定,外标法定量。以甜菜碱质量浓度 X(mg/mL)为横坐标、以相应的峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归,在 0.2~5.0mg/mL 范围内,质量浓度与响应值呈良好的

线性关系, 回归方程为 $y = 2 \times 10^6 x - 93885$, 相关系数 $R^2 = 0.9996$ 。以 3 倍信噪比计算甜菜碱的最低检出质量浓度为 0.0066 mg/mL。标准曲线见图 2, 甜菜碱标准色谱图(0.5 mg/mL)见图 3。

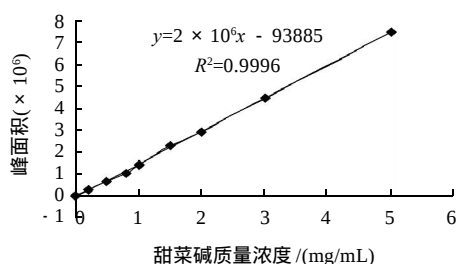


图2 甜菜碱工作曲线

Fig.2 Standard curve of betaine

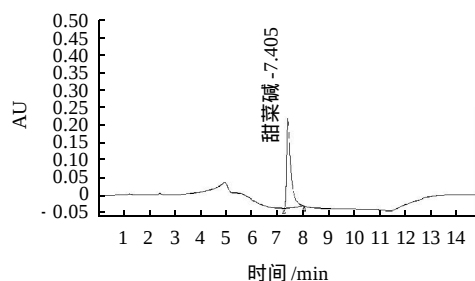


图3 甜菜碱的标准色谱图(0.5 mg/mL)

Fig.3 Chromatogram of betaine standard (0.5 mg/mL)

2.6 回收率及方法精密度

准确称取枸杞样品, 分别添加不同质量浓度的甜菜碱标准储备液, 以 1.3.1 节方法进行处理后测定回收率, 结果见表 3。

表3 甜菜碱添加回收率和精密度实验

Table 3 Average recoveries of three replicates for betaine in a real sample spiked at three levels

添加质量浓度/(mg/mL)	本底值/(mg/mL)	加标后样品质量浓度/(mg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
0.05	0.233	0.280	94	104	9.6
		0.290	114		
		0.285	104		
0.10	0.233	0.327	94	88.3	8.3
		0.324	91		
		0.313	80		
0.20	0.233	0.430	98.5	89.0	9.7
		0.407	87		
		0.396	81.5		

从表 3 可以看出, 0.05、0.1、0.2 mg/mL 3 个添加水平平均回收率为 88.3% ~ 104%, 相对标准偏差为

8.3% ~ 9.7%, 方法的准确性较好。

2.7 样品分析测定

表4 实验样品检测结果

Table 4 Betain contents in fruits of *Lycium barbarum* L. from four different geographic sources determined by the method

样品	1	2	3	4
甜菜碱含量/(g/100g)	0.80	1.22	0.83	0.96

市场上购得不同产地的枸杞样品, 用确定的方法进行分析检测, 测定结果(表 4)显示不同产地枸杞中甜菜碱含量存在差异。

3 结 论

本研究建立的固相萃取-液相色谱法测定枸杞中甜菜碱含量, 直接用蒸馏水提取甜菜碱组分, 操作方便; 净化样品提取液时, 采用固相萃取小柱技术以 85:15(V/V)的甲醇溶液进行淋洗、5:95(V/V)氯化甲醇进行洗脱, 有效去除了共提物的干扰, 为准确定量枸杞中甜菜碱组分提供了保障; 应用高效液相色谱仪, 采用 Atlantis HILIC Silica 色谱柱, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 甜菜碱的相对保留时间为 7.405 min, 重现性好。通过添加不同水平甜菜碱, 其回收率为 88.3% ~ 104%, 相对标准偏差为 8.3% ~ 9.7%, 方法的精密度、准确度高, 可以满足枸杞中甜菜碱检测的要求。

参考文献:

- [1] 白寿宁. 宁夏枸杞研究: 上册[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1998: 552-559.
- [2] 张立木, 张颖, 牛瑞仙, 等. 非水滴定法测枸杞子中甜菜碱的含量[J]. 泰山医学院学报, 2005, 26(2): 149-149.
- [3] 孙杰, 韩丽君, 张立新, 等. 比色法测定海藻植物促生长剂中甜菜碱的含量[J]. 海洋科学, 2007, 31(11): 5-8.
- [4] 朱桂花, 杨高文, 陈晓光. 枸杞半成品饮料中甜菜碱含量的测定[J]. 化学研究与应用, 1998, 10(4): 433-435.
- [5] 胡彩虹, 夏枚生. 比色法测定甜菜碱和甜菜碱预混剂中甜菜碱的含量[J]. 饲料工业, 2001, 22(3): 24-25.
- [6] 陈少良, 毕望富, 李金克, 等. 反相 HPLC 离子对色谱法测定植物组织中的甜菜碱[J]. 植物学报, 2000, 42(10): 1014-1018.
- [7] 王俊华, 曾幼玲, 杨洁, 等. RP-HPLC 法测定长期盐胁迫下盐爪爪和盐穗木中的甜菜碱[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 0515-0520.
- [8] 甄录旭, 方宗华, 吴海林, 等. HPLC 法测定枸杞子中甜菜碱的含量[J]. 安徽医学, 2007, 11(8): 703-704.
- [9] 廖国玲, 杨文, 张自萍, 等. RP-HPLC 法测定不同产地宁夏枸杞甜菜碱含量[J]. 宁夏医学杂志, 2007, 29(6): 492-493.
- [10] 廖国玲, 张自萍, 郭荣. 宁夏枸杞甜菜碱提取物高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 分析科学学报, 2007, 23(6): 642-646.
- [11] SHIN Y G, CHO K H, KIM Y M, et al. Determination of betaine in *Lycium chinense* fruits by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 857(1/2): 331-335.