

高效液相色谱法测定枸杞相关食品中枸杞酸和玉米黄质二棕榈酸酯的含量

周凌¹, 朱吟吟^{1*}, 郁静华¹, 廖勇诚², 石欢², 续斐², FRIES Lennart²

[1. 上海凡测质量检测有限公司, 上海 200335; 2. 雀巢研发(中国)有限公司, 北京 100015]

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法分析枸杞原料、提取物和相关配方产品中枸杞酸和玉米黄质二棕榈酸酯的含量。**方法** 采用 Poroshell 120 HILIC 柱, 以乙腈-0.1% (V/V)磷酸水(90:10, V/V)为流动相进行分离枸杞酸, 在紫外检测波长 235 nm 下进行检测, 外标法定量。用 Dionex Acclaim C₃₀ 柱, 以甲醇-甲基叔丁基醚为流动相进行梯度分离玉米黄质二棕榈酸酯, 在紫外检测波长 452 nm 下进行检测, 外标法定量。**结果** 枸杞酸的检出限为 10 mg/kg, 定量限为 30 mg/kg; 在 10~200 mg/L 的质量浓度范围内线性良好, 相关系数为 0.9999; 枸杞原料、提取物和相关配方产品中的加标回收率在 84.3%~98.1%之间, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 1.3%~4.7%; 精密密度 RSDs 为 0.65%~1.20%; 重复性 RSDs 为 1.3%~3.1%。玉米黄质二棕榈酸酯的检出限为 10 mg/kg, 定量限为 30 mg/kg; 在 0.5~10.0 mg/L 的浓度范围内线性良好, 相关系数为 0.999; 枸杞原料、提取物和相关配方产品中的加标回收率为 83.8%~98.6%, RSDs 为 1.5%~4.5%; 精密密度 RSDs 为 1.2%~2.1%; 重复性 RSD 为 2.0%~4.5%。**结论** 本方法操作简便, 快速, 分离度和准确度高, 可用于枸杞原料、提取物和相关配方产品的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 枸杞; 枸杞提取物; 枸杞酸; 玉米黄质二棕榈酸酯

Determination of ascorbic acid 2-glucoside and dipalmityl zeaxanthin in *Lycium barbarum* related foods by high performance liquid chromatography

ZHOU Ling¹, ZHU Yin-Yin^{1*}, YU Jing-Hua¹, LIAO Yong-Cheng², SHI Huan², XU Fei², FRIES Lennart²

[1. Shanghai Faith Testing Technology Co., Ltd., Shanghai 200335, China;
2. Nestle R & D (China) Co., Ltd., Beijing 100015, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of ascorbic acid 2-glucoside (AA-2βG) and zeaxanthin dipalmitate content in raw materials, extracts and related formula products of *Lycium barbarum* by high performance liquid chromatography. **Methods** AA-2βG was separated on a poroshell 120 HILIC column, eluted by acetonitrile-0.1% (V/V) phosphoric acid water solution (90:10, V/V), identified by ultraviolet (UV) detector at 235 nm and quantified by external standard method. Dipalmityl zeaxanthin was separated on a Dionex Acclaim C₃₀ column, eluted by methanol-methyl tert-butyl ether, identified by UV detector at 452 nm, and quantified by external standard method. **Results** For AA-2βG, the limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were 10 and 30 mg/kg respectively; the linearity was good in the mass concentration range of 10~200 mg/L, and the correlation coefficient

*通信作者: 朱吟吟, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: maple.zhu@healthy-star.cn

*Corresponding author: ZHU Yin-Yin, Engineer, Shanghai Faith Testing Technology Co., Ltd., Floor 1, Building 6, No.280, Linhong Road, Changning District, Shanghai 200335, China. E-mail: maple.zhu@healthy-star.cn

was 0.9999; the recoveries of AA-2 β G in *Lycium barbarum* fruit raw material, extract and the related formulated food varied from 84.3% to 98.1% and the relative standard deviations (RSDs) varied from 1.3% to 4.7%; the precision RSDs varied from 0.65% to 1.20%, and the repeatability RSDs varied from 1.3% to 3.1%. For dipalmityl zeaxanthin, the LOD and LOQ were 10 and 30 mg/kg respectively; the linearity was good in the concentration range of 0.5–10.0 mg/L, and the correlation coefficient was 0.999; the recoveries of dipalmityl zeaxanthin in *Lycium barbarum* fruit raw material, extract and the related formulated food varied from 83.8% to 98.6% and the RSDs varied from 1.5% to 4.5%. The precision RSDs varied from 1.2% to 2.1%, and the repeatability RSDs varied from 2.0% to 4.5%.

Conclusion The method is simple, rapid, and has high degree of separation and accuracy, which can be used for the quality control of *Lycium barbarum* fruit raw material, extract and the related formulated food.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; *Lycium barbarum* fruit; *Lycium barbarum* fruit extract; ascorbic acid 2-glucoside; dipalmityl zeaxanthin

0 引言

药食同源的枸杞(*Lycium barbarum*)被全球作为营养食品所广泛接受与食用,除了含有多种氨基酸、微量元素外,更重要是含有其他的次级代谢生物活性物质,如多糖及糖蛋白、类胡萝卜素、多酚(苯丙素、黄酮等)、甜菜碱及其他生物活性物质^[1-4],其提取物也被越来越多地应用到食品、饮料中去,所以确定枸杞中的特征性指标及检测方法,对其原料、提取物和相关产品的质量标准的建立尤为重要。

从国内现有相关的法规和标准来看,GB/T 18672—2014《枸杞》规定了枸杞中枸杞多糖作为含量测定的指标。枸杞多糖^[5]是枸杞内最主要的功效成分,具有增强免疫、眼睛保护、抗肿瘤、降血糖、抗氧化等广泛的生理活性。枸杞多糖是一系列结构复杂的混合物,在 2 个标准中均以分光光度法进行粗多糖的定量,但截至目前未有特征性结构成分被揭示,因此不宜作为功效特征指标。根据 2020 版中国药典规定,枸杞中的另一种有效成分——甜菜碱,作为一种饲料添加剂,在肉苁蓉^[6]、红枣^[7]等植物中也有较高含量,也不属于枸杞中特有的成分。

2004 年 YOSHIKO 等^[8]首次从枸杞中分离纯化到枸杞酸(ascorbic acid 2-glucoside, AA-2 β G),这是一种稳定、纯天然的维生素 C 衍生物,具有抑制黑色素^[9]、抗氧化^[10]、清除自由基^[11]等作用。类胡萝卜素及其酯为枸杞子内另一种重要的成分。1999 年新加坡学者 ZHOU 等首次鉴定出枸杞中的主要类胡萝卜素为玉米黄素二棕榈酸酯^[12],该物质在体内代谢会转化成能够预防黄斑病变的玉米黄素^[13-14],对肝脏也有较好的保护作用^[15-16]。迄今为止,枸杞被认为最好的玉米黄质和枸杞酸的天然来源,故本研究选取这 2 个物质作为枸杞原料、提取物和最终产品的质控指标。

有关枸杞酸,目前未有权威机构发布其检测方法及相关标准。国内外已经发表的文献中,已经有不少相关的分析方法^[17-20],但还没有一个方法是同时适用于枸杞原料、提取物和相关配方产品的。2020 年 12 月 12 日,宁夏食品安

全协会发布了团体标准 TNXFSA 004S—2020《枸杞红素的测定高效液相色谱法》描述了枸杞干果及其制品中玉米黄素二棕榈酸酯的测定方法;国内外已经发表的文献中,也有不少相关的分析方法^[20-23],和枸杞酸一样,这些方法中没有同时适用于枸杞原料、提取物和相关配方产品的。

本研究对国内外文献中报道的枸杞酸和玉米黄质二棕榈酸酯的方法进行了考察和验证,综合各自的优缺点,最终开发出了枸杞原料、提取物和相关配方产品中 2 个成分的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的检测方法,以期对枸杞原料和相关产品的质量的控制提供强有力的检测依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枸杞原料(宁夏瀚瀚生物科技产业有限公司);枸杞提取物(黄山华绿园生物科技有限公司);燕麦片为天猫购买的桂格即食原味燕麦片;奶粉为天猫购买的雀巢 nido 荷兰进口全脂高钙成人奶粉;咖啡粉为天猫购买的雀巢 1+2 微研磨速溶原味咖啡。

奶粉相关配方食品为自行制备,具体方法为:取 4 g 枸杞提取物,加 96 g 燕麦片充分粉碎、混合,得到燕麦基质低水平添加配方食品;取 20 g 枸杞提取物,加 80 g 燕麦片充分粉碎、混合,得到燕麦基质高水平添加配方食品;取 6 g 枸杞提取物,加 94 g 奶粉充分混合,得到奶粉基质低水平添加配方食品;取 20 g 枸杞提取物,加 80 g 奶粉充分混合,得到奶粉基质高水平添加配方食品;取 10 g 枸杞提取物,加 90 g 速溶二合一咖啡粉充分混合,得到咖啡基质低水平添加配方食品;取 20 g 枸杞提取物,加 80 g 咖啡粉充分混合,得到咖啡基质高水平添加配方食品。

对照品枸杞酸(CAS: 562043-82-7,含量 98%,美国 MCE 公司);对照品玉米黄素二棕榈酸酯(CAS: 144-67-2,含量 95%,法国 Extrasynthese 公司);甲醇(色谱纯,美国默

克公司); 磷酸、甲基叔丁基醚(色谱纯, 美国天地公司); 2,6-二叔丁基对甲酚、三氯乙酸、抗坏血酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

1200 系列高效液相色谱仪、1290 系列高效液相色谱仪、Poroshell 120 HILIC 色谱柱(美国安捷伦公司); Acclaim C₃₀ 色谱柱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DV215CD 天平(美国奥豪斯仪器有限公司); AL204 天平、ME3002E 天平(瑞士梅特勒托利多仪器有限公司); Lambda 35 紫外可见分光光度计(美国珀金埃尔默仪器有限公司); RUC-5200 超声波清洗机器(上海睿祺电子设备有限公司); 5804R 离心机(德国艾本德科技有限公司); MR1029 摩飞破壁机(广东新宝电器股份有限公司); SJ-J05S 匀浆机(东莞市瑟诺电器有限公司); Genius 3 涡旋混合器(广州艾卡仪器设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

(1)枸杞酸色谱柱: Poroshell 120 HILIC 柱(150 mm×2.7 μm, 4.6 mm); 柱温: 30 °C; 流动相: 0.1%磷酸水溶液-乙腈(10:90, V/V); 流速: 1 mL/min; 紫外检测器波长: 235 nm; 进样量: 1 μL。

(2)玉米黄质二棕榈酸酯色谱柱: Acclaim C₃₀ 柱(250 mm×5 μm, 4.6 mm); 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇(A), 甲基叔丁基醚(B), 梯度洗脱(1~4 min, 20.7% B; 4~21 min, 20.7% B→57.4% B; 21~22 min, 57.4% B; 22~33 min, 57.4% B→88% B; 33~37 min, 88% B; 37~39 min, 88% B→15.3% B; 39~49 min, 15.3% B); 流速: 1 mL/min; 紫外检测器波长: 452 nm; 样品进样量: 10 μL; 标准品的进样量为: 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μL, 分别代表 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L。

1.3.2 标准溶液的配制

(1)枸杞酸标准溶液的配制

准确称取枸杞酸对照品适量(精确至 0.01 mg), 置棕色小瓶中, 用水充分溶解, 配制成质量浓度为 1000 mg/L 的对照品储备液, 分装在若干个液相小瓶中, 避光-18 °C 保存。每次取用时, 拿出一个液相小瓶, 准确移取适量的对照品储备液, 用水定容, 配制成系列浓度的标准工作溶液, 浓度分别为 10、20、50、100、200 mg/L, 该工作溶液在室温下一周内保持稳定。

(2)玉米黄质二棕榈酸酯标准溶液的配制

准确称取玉米黄质二棕榈酸酯对照品适量(精确至 0.1 mg), 置棕色小瓶中, 用质量浓度为 1 mg/L 的 2,6-二叔丁基对甲酚的石油醚溶液充分溶解, 配制成质量浓度为 40 mg/L 的对照品储备液, 避光 4 °C 保存。准确移取适量的对照品储备液, 用 1 mg/L 2,6-二叔丁基对甲酚的甲醇-四氢呋喃(1:1, V/V)溶液定容, 配制成质量浓度为 10 mg/L 的标准工作溶液, 需用现配, 且每次配制后需使用分光光度计进

行浓度校准, 具体方法为: 在 460 nm 处, 使用 1 cm 比色皿读取吸光度, 标准品的实际浓度(mg/L)=读取的吸光度×1000/标准品证书中 460 nm 的吸光值。

1.3.3 样品处理

(1)枸杞酸样品处理

称取粉碎后枸杞样品或者枸杞提取物样品 0.5 g, 加水 100 mL, 超声 30 min, 冷却试液到室温, 经 0.45 μm 的滤膜过滤后待测。称取添加枸杞提取物的配方食品 1.0 g, 加水 10 mL, 超声 30 min, 取上清液 1 mL, 加入 1 mL 5% 三氯乙酸水溶液, 充分摇匀后在 5000 r/min 下离心, 上清液经 0.45 μm 的滤膜过滤后待测。

(2)玉米黄质二棕榈酸酯样品处理

称取枸杞原料样品 30 g, 加抗坏血酸钠 0.6 g、水 120 mL, 避光浸泡 30 min 后用破壁机匀浆, 将样液倒出备用, 再用 120 mL 水分多次冲洗破壁机刀头, 清洗的水一并加入匀浆样液中, 通过称重定容到 300.00 g。称取 2 g 匀浆样品(精确至 0.01 g)或 0.25 g 枸杞提取物(精确至 0.01 g)或 0.5 g (精确至 0.01 g)添加枸杞提取物的配方食品于 50 mL 离心管中, 加入 2 mL 1 mg/L 2,6-二叔丁基对甲酚的乙醇溶液, 涡旋混匀 30 s, 加入 15 mL 1 mg/L 2,6-二叔丁基对甲酚的乙醇-二氯甲烷(2:8, V/V)溶液, 涡旋混匀后超声 30 min(超声仪中加冰块使温度保持在 30 °C 以下), 取出, 在 4 °C、8000 r/min 的条件下离心 8 min。将下层有机相转移至另一 50 mL 离心管中, 40 °C 水浴下氮气吹干, 用 20 mL 1 mg/L 2,6-二叔丁基对甲酚的乙醇-四氢呋喃(1:1, V/V)溶液涡旋溶解, 并转移至 50 mL 容量瓶中; 离心管中剩余物用 15 mL 质量浓度为 1 mg/L 的 2,6-二叔丁基对甲酚的乙醇-四氢呋喃(1:1, V/V)溶液涡旋萃取, 并转移至同一 50 mL 容量瓶中, 并定容至刻度, 过 0.22 μm 滤膜后用于 HPLC 分析。

2 结果与分析

2.1 标准品配制的改进

枸杞酸标准品价格较为昂贵, 之前的文献^[17-19]中多为实验室自行提取, 这样做虽然降低了成本, 但是不够严谨, 因此本研究还是采用了商品化的枸杞酸标准品。为了尽量减少重新配制, 对其标准品溶液的稳定性进行了考察, 具体方法为: 在同一台高效液相色谱仪上进样, 比较色谱峰面积, 结果显示, 1000 mg/L 的枸杞酸储备液在-18 °C 下稳定保持 6 个月; 在 10~200 mg/L 范围内, 枸杞酸标准溶液在室温下 17 天内保持稳定, 反复冻融会大大降低枸杞酸标准溶液的稳定性, 应予以避免, 具体变化情况见图 1。可以发现在反复冻融后, 高浓度下的枸杞酸标准品衰减得尤为严重, 这种现象比较罕见, 因为一般情况下, 低浓度的标准品稳定性会远低于高浓度标准品, 猜测可能是反复冻融的过程破坏了枸杞酸的结构, 且在一定浓度下才会发生。

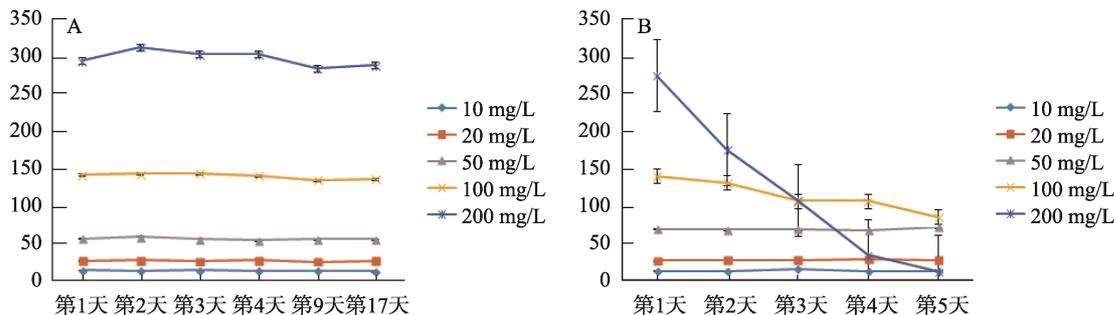


图1 不同浓度的枸杞酸标准品溶液在室温储存(A)、反复冻融(B)过程中峰面积的变化

Fig.1 Peak area variation of different AA-2βG standards under room temperature storage (A) and repeated freezing (B)

玉米黄素二棕榈酸酯作为一种类胡萝卜素, 结构中存在共轭双键, 使其极不稳定性^[23], 所以每次使用标准溶液之前, 都需要使用分光光度计进行校准。这主要是依据所购标准品附送的检测证明中会标注有 1%质量浓度下该物质的出厂吸光值, 在使用前将标准品配制至合适浓度, 在同样的波长下测定吸光度, 根据配制比例计算出该溶液的真实浓度。配制玉米黄素二棕榈酸酯的溶剂沸点低, 在吸取过程中极易挥发造成浓度不准, 所以在制作标准曲线时, 采用调整进样量的方式减少误差, 效果良好。

2.2 前处理方法的改进

枸杞酸的水溶性很好, 在样品没有干扰的情况下只需要用纯水超声就可以很好地提取出来。室温下枸杞酸有一定的稳定性, 前处理过程中对温度的控制无需使用液氮、冰水^[17,20], 故简化了操作步骤, 降低了检测时间和成本。配方食品的基质比较复杂, 水提后直接进样会出现很多干扰峰影响定量, 所以本研究加入了沉淀蛋白的步骤。分别尝试了加入 80%乙醇、3%三氯乙酸、5%三氯乙酸、10%三氯乙酸来沉淀蛋白, 最终发现加入 5%三氯乙酸就可以很好地达到去除杂质干扰的效果, 也不会影响枸杞酸的回收率。

玉米黄素二棕榈酸酯的极性较弱, 前后采用乙醇、二氯甲烷和四氢呋喃多次提取至无色时将其提取完全。又考虑到其不稳定性, 所以在整个提取过程中都添加了 2,6-二叔丁基对甲酚作为稳定剂, 且保持提取温度不能过高, 如粉碎过程用水作为散热介质、超声装置中加入冰块、采用氮气吹干进行浓缩等一系列简便、经济且有效的措施, 避免使用文献中昂贵的液氮^[20,22]、减压浓缩^[21]、冷冻干燥^[23]等试剂或装置, 也没有采用团体标准中少量试剂研钵提取等不易操控的步骤。

2.3 仪器方法的改进

对于极性化合物枸杞酸来说, 普通的 C₁₈ 色谱柱很难有保留, 通常用到的分析方法是采用 HILIC 原理的色谱柱^[17-18,20]或者在流动相中添加离子对试剂^[19], 考虑到离子对试剂对液相系统的污染性, 本研究最终选择了 Agilent 的 HILIC 色谱柱, 一开始尝试的流动相为水-乙腈(15:85,

V:V)^[17-18,20], 在做到奶粉基质样品时发现目标化合物附近有干扰峰无法彻底分开, 所以将有机相比比例调高至 90%, 最终得到了理想的分离效果, 见图 2。

分析玉米黄质二棕榈酸酯时, 和分析类胡萝卜素类化合物一样, 采用 C₃₀ 色谱柱是比较常见的做法, 比如团体标准和某些文献^[23], 但还是有很多使用普通 C₁₈ 的案例^[20-22], 比较尝试之后发现, 使用 C₃₀ 色谱柱时, 在目标化合物后面有一个很明显的干扰峰(图 3), 这在使用 C₁₈ 色谱柱时是观察不到的。由于 C₃₀ 色谱柱对非极性化合物有更强的分离效果, 可以判断使用 C₁₈ 色谱柱时发现的玉米黄素二棕榈酸酯的色谱峰中实则包含了该干扰峰, 这就使得定量准确性有所下降, 所以方法最终还是采用 C₃₀ 色谱柱。另外, 为了节省时间和溶剂, 对流动相梯度做了调整, 使得出峰时间从文献^[20]中的 40 min、文献^[23]和团体标准中的 30 min, 提前至 20 min 左右, 大大提高了检测效率。

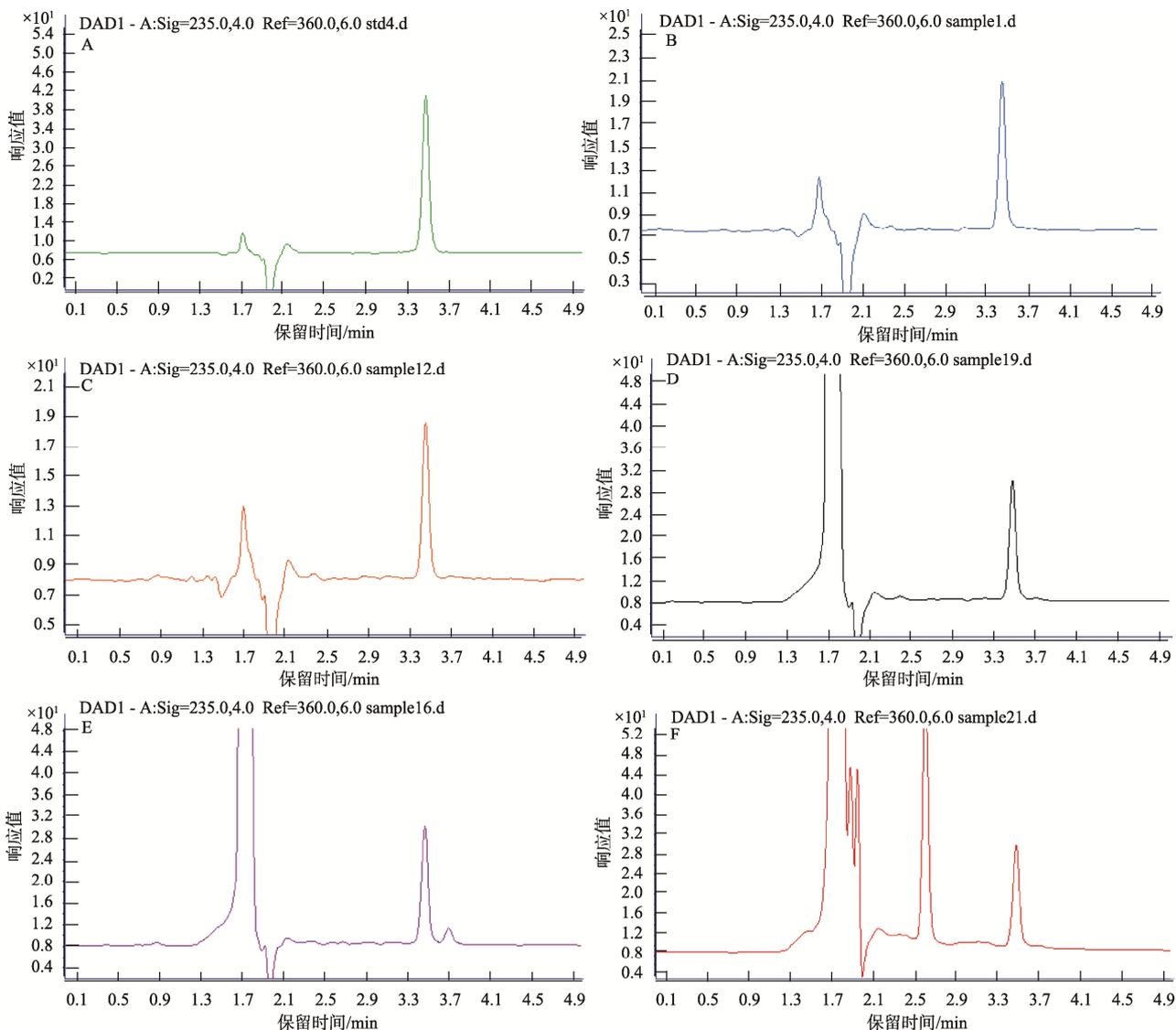
2.4 线性范围与检出限

在 10~200 mg/L 浓度范围内, 枸杞酸的线性关系良好, 线性方程为 $Y=0.9365X-0.4752$, 线性相关系数为 0.9999。当取样量为 3.33 g, 定容体积为 10 mL 时, 枸杞酸的检出限(limit of detection, LOD)为 10 mg/kg、定量限(limit of quantitation, LOQ)为 30 mg/kg, 方法灵敏度高, 可以满足枸杞酸的检测。

在 0.5~10.0 mg/L 浓度范围内, 玉米黄素二棕榈酸酯的线性关系良好, 线性方程为: $Y=91.15X-1.665$, 线性相关系数为 0.999。当取样量为 0.83 g, 最终定容体积为 50 mL 时, 玉米黄素二棕榈酸酯的 LOD 为 10 mg/kg、LOQ 为 30 mg/kg, 方法灵敏度高, 可以满足玉米黄质二棕榈酸酯的检测。

2.5 精密度和重复性

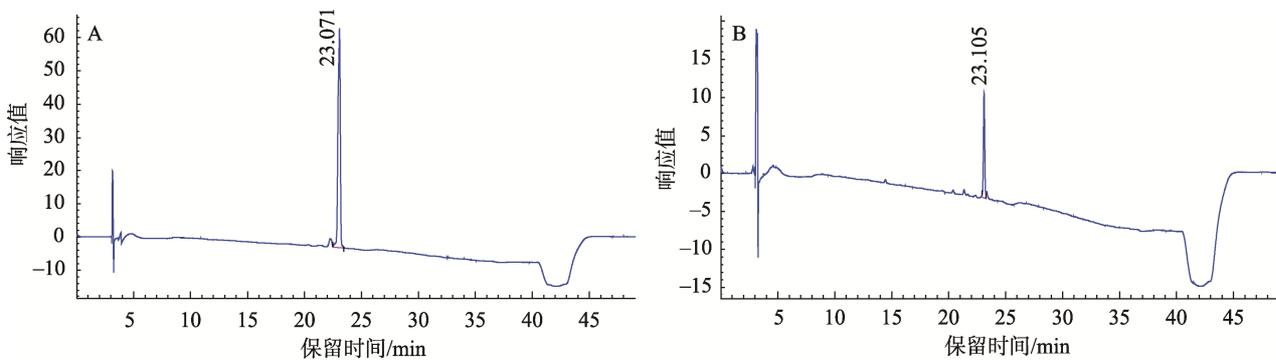
对处理好后的样品溶液连续进样 6 针, 枸杞原料、枸杞提取物及相应配方食品中枸杞酸和玉米黄质二棕榈酸酯的含量相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)结果如表 1 所示。枸杞酸精密度 RSDs 为 0.65%~1.20%; 重复性 RSDs 为 1.3%~3.1%。玉米黄质二棕榈酸酯的精密度 RSDs 为 1.2%~2.1%; 重复性 RSD 为 2.0%~4.5%。数据显示该方法的精密度和重复性均良好。



注: 枸杞酸标准品(A)、枸杞原料(B)、枸杞提取物(C)、谷物配方(D)、奶粉配方(E)、咖啡配方(F)。

图 2 枸杞酸色谱图

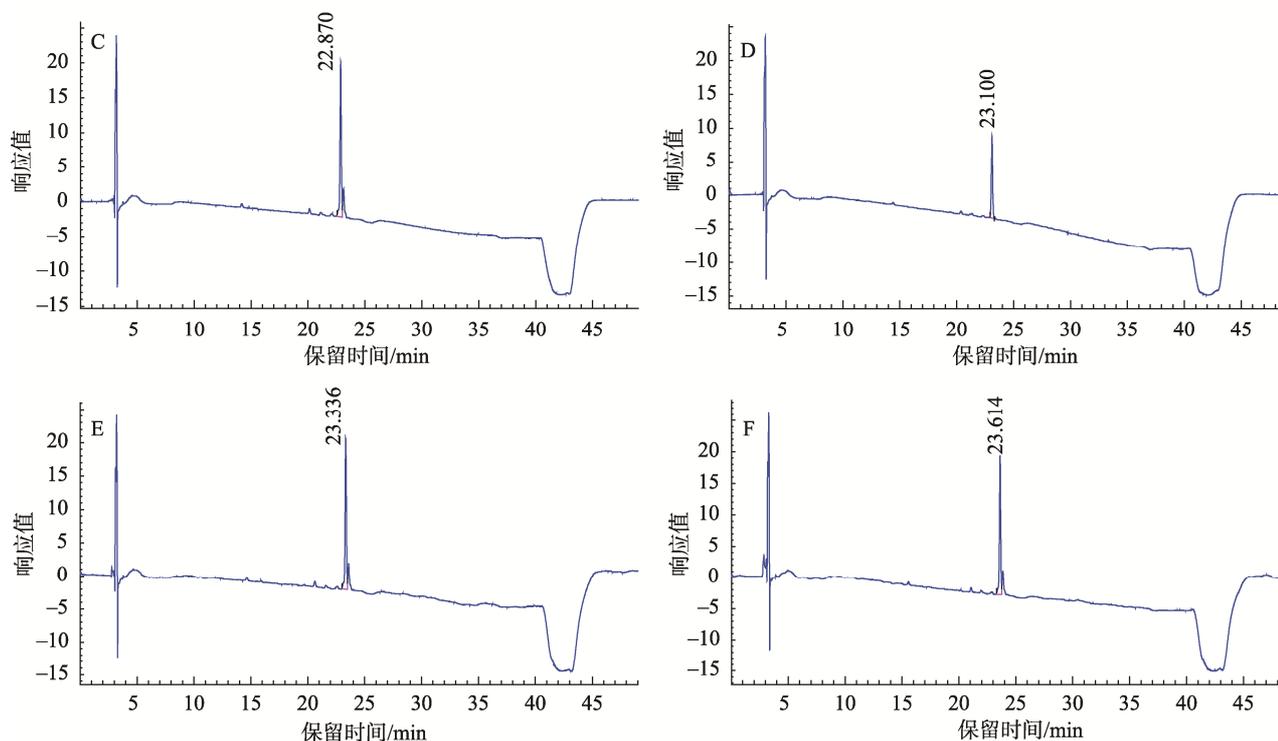
Fig.2 Chromatograms of AA-2βG



注: 玉米黄质二棕榈酸酯标准品(A)、枸杞原料(B)。

图 3 玉米黄质二棕榈酸酯色谱图

Fig.3 Chromatograms of dipalmityl zeaxanthin



注: 枸杞提取物(C)、谷物配方(D)、奶粉配方(E)、咖啡配方(F)。

图 3(续) 玉米黄质二棕榈酸酯色谱图

Fig.3 Chromatograms of dipalmityl zeaxanthin

表 1 枸杞酸和玉米黄质二棕榈酸酯的精密度和重复性($n=6$)

Table 1 Precision and repeatability of AA-2 β G and dipalmityl zeaxanthin ($n=6$)

样品名称	枸杞酸精密度 RSD/s/%	枸杞酸重复性 RSDs/%	玉米黄质二棕榈酸酯精密度 RSDs/%	玉米黄质二棕榈酸酯重复性 RSDs/%
枸杞原料	0.85	2.3	1.9	3.9
枸杞提取物	0.74	1.8	1.2	3.3
燕麦基质低水平添加配方食品	0.97	2.7	1.3	2.0
燕麦基质高水平添加配方食品	0.75	3.1	1.3	2.7
奶粉基质低水平添加配方食品	0.97	1.4	1.8	3.4
奶粉基质高水平添加配方食品	0.65	1.3	2.1	4.5
咖啡基质低水平添加配方食品	1.20	2.5	2.0	3.3
咖啡基质高水平添加配方食品	1.10	2.7	1.9	2.1

2.6 加标回收率

取枸杞原料 0.5 g、枸杞提取物 0.5 g、相关配方食品样品 1 g 各 6 份, 制备供试品溶液, 准确吸取该试液和质量浓度为 1000 mg/L 的枸杞酸储备液: 980 和 20 μ L、960 和 40 μ L、900 和 100 μ L, 充分混合后得到加标回收率实验样品, 按照 1.3.1 (1) 色谱条件, 进行加标回收实验, 结果见表 2。加标回收率在 84.3%~98.1% 之间, RSDs 在 1.3%~4.7% 之间, 此方法的回收率好, 准确度高。

取枸杞原料原浆液 2 g、枸杞提取物 0.25 g、相关配方食品样品 0.5 g 各 6 份, 制备供试品溶液, 在 1.3.3 (2)“加入 2 mL 质量浓度为 1 mg/L 的 2,6-二叔丁基对甲酚的乙醇溶液”之前, 分别向枸杞原料中加入 5.0 mL 的 20、40 和 100 mg/L 的玉米黄质二棕榈酸酯储备液; 向枸杞提取物中加入 2.5 mL 的 20、40 和 100 mg/L 的玉米黄质二棕榈酸酯储备液; 向相关配方食品样品加入 0.5 mL 质量浓度为 20、40 和 100 mg/L 的玉米黄质二棕榈酸酯储备液, 得到加标回收率实验样品, 按照

1.3.3 (2) 色谱条件, 进行加标回收实验, 结果见表 3。加标回收率在 83.8%~98.6% 之间, RSD 在 1.5%~4.5% 之间, 此方法的回收率好, 准确度高。

2.7 实际样品测定

采用此方法对宁夏瀚瀚生物科技产业有限公司提供的不同产地和品种的枸杞原料、黄山华绿园生物科技有限公司提供的不同工艺和批次的枸杞提取物以及自行制备的不同基质和添加量的相关配方食品进行了枸杞酸、玉米黄素二棕榈酸酯的含量测定。枸杞酸的对照品和样品的色谱图见图 2, 玉米黄素二棕榈酸酯的对照品和样品的色谱图见图 3, 枸杞原料的具体含量结果见表 4, 提取物的具体含量结果见表 5, 配方产品的具体结果见表 6。从表 4 可以看出, 宁杞 1 号的枸杞酸含量普遍高于宁杞 7

号, 宁夏产地的枸杞酸含量普遍高于青海产地的。玉米黄素二棕榈酸酯的含量则差异不大和品种、产地没有太大关系 ($P>0.05$)。从表 5 可以看出, 不同工艺得到的枸杞提取物, 其枸杞酸含量差异不大 ($P>0.05$); 普通水提工艺无法提取出玉米黄质二棕榈酸酯, 特定提取工艺可以显著提高提取效率 ($P<0.05$), 喷干粉由于添加糊精类物质帮助成粉所以含量低于同批次的冻干粉。随着工厂对于工艺的精益求精, 含量也逐渐提高, 确保添加枸杞提取物的最终产品仍然具有枸杞保肝、护眼的作用。从表 6 可以看出, 实际检测的枸杞酸、玉米黄质二棕榈酸酯含量和理论添加值十分接近, 确保该检测方法可以对最终产品起到很好的质控作用, 对起草企业标准、建立行业壁垒有着很重要的作用。

表 2 枸杞酸的回收率 ($n=6$)
Table 2 Recoveries of AA-2βG ($n=6$)

样品名称	20 μg		40 μg		100 μg	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
枸杞原料	89.2	2.1	93.5	3.6	91.3	2.5
枸杞提取物	90.7	3.4	94.9	2.8	95.7	3.8
燕麦基质低水平添加配方食品	85.6	4.6	93.2	1.9	93.7	3.6
燕麦基质高水平添加配方食品	88.9	2.8	95.4	2.5	95.6	2.5
奶粉基质低水平添加配方食品	89.3	4.3	97.1	3.4	92.6	3.4
奶粉基质高水平添加配方食品	91.5	1.9	93.4	1.3	97.9	1.6
咖啡基质低水平添加配方食品	84.3	4.7	91.9	4.2	91.4	2.5
咖啡基质高水平添加配方食品	89.0	3.0	98.1	2.6	92.8	1.6

表 3 玉米黄素二棕榈酸酯的回收率 ($n=6$)
Table 3 Recoveries of dipalmityl zeaxanthin ($n=6$)

样品名称	加标量/μg					
	100 (枸杞原料)		200 (枸杞原料)		500 (枸杞原料)	
	50 (枸杞提取物)		100 (枸杞提取物)		250 (枸杞提取物)	
	10 (配方食品)		20 (配方食品)		50 (配方食品)	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
枸杞原料	87.0	4.3	94.9	2.6	90.5	2.7
枸杞提取物	84.6	3.9	98.0	1.7	97.6	3.4
燕麦基质低水平添加配方食品	83.8	4.0	92.0	3.6	93.8	4.1
燕麦基质高水平添加配方食品	88.6	3.1	98.6	1.5	91.9	2.7
奶粉基质低水平添加配方食品	86.0	4.5	95.3	4.1	95.5	3.1
奶粉基质高水平添加配方食品	83.9	4.0	94.6	2.3	92.8	1.9
咖啡基质低水平添加配方食品	89.3	3.8	93.7	3.6	94.6	4.1
咖啡基质高水平添加配方食品	90.1	3.1	98.3	1.8	96.7	2.2

表4 不同枸杞原料中枸杞酸和玉米黄质二棕榈酸酯的含量($n=3$)
Table 4 AA-2 β G and dipalmityl zeaxanthin content in different *Lycium barbarum* raw materials ($n=3$)

品种	产地	品牌	枸杞酸含量/(g/100 g)	玉米黄质二棕榈酸酯含量/(mg/kg)
宁杞1号	宁夏	A	1.170	3300
宁杞1号	宁夏	B	1.160	3164
宁杞1号	青海	-	0.796	3115
宁杞7号	宁夏	A	1.070	3005
宁杞7号	宁夏	B	0.900	3423
宁杞7号	宁夏	C	0.810	3191
宁杞7号	青海	-	0.843	3365

3 结论

本研究根据枸杞成分和功效的相关信息,确定了枸杞的功效指标枸杞酸和玉米黄素二棕榈酸酯,通过实验优化了前处理和仪器参数等各项条件,确定了在枸杞原料、提取物和相关配方产品中2种成分的检测方法。该方法准确性高、重复性好、成本可控、操作性强,对枸杞原料的采收加工,提取物的工艺开发和最终产品的质量控制在起到非常重要的作用,可以作为产品企业标准的建立依据,

为枸杞更全方位地应用到产品中提供强有力的技术支持。

表5 不同枸杞提取物中枸杞酸和玉米黄质二棕榈酸酯的含量($n=3$)
Table 5 AA-2 β G and dipalmityl zeaxanthin content in different *Lycium barbarum* extracts ($n=3$)

枸杞提取物名称	批次	枸杞酸含量/(g/100 g)	玉米黄质二棕榈酸酯含量/(mg/kg)
喷干粉	A	0.559	<10
喷干粉	B	0.753	<10
喷干粉	C	0.569	<10
喷干粉	D	0.509	<10
冻干粉	E	1.250	<10
喷干粉	1	0.564	274
喷干粉	2	0.561	693
喷干粉	3	0.579	1197
喷干粉	4	0.470	1385
喷干粉	5	0.556	1540
冻干粉	6	0.490	823
冻干粉	7*	0.671	1181
冻干粉	8	0.657	1781
冻干粉	9	0.614	2110
冻干粉	10	0.624	2181

注: *该批次冻干粉用于“1.1”项下配方样品的制备。

表6 不同配方食品中枸杞酸和玉米黄质二棕榈酸酯的含量($n=3$)
Table 6 AA-2 β G and dipalmityl zeaxanthin content in different formula foods ($n=3$)

配方基质	添加水平	枸杞酸含量(g/100 g)			玉米黄质二棕榈酸酯含量/(mg/kg)		
		检测值	理论值**	回收率%	检测值	理论值**	回收率%
燕麦	低	0.0230	0.0268	85.8	43.5	47.2	92.2
燕麦	高	0.1270	0.1340	94.8	240.0	236.0	102.0
奶粉	低	0.0361	0.0403	89.6	72.0	70.9	102.0
奶粉	高	0.1280	0.1340	95.5	236.0	236.0	100.0
咖啡	低	0.0572	0.0671	85.2	116.0	118.0	98.3
咖啡	高	0.1190	0.1340	88.8	236.0	236.0	100.0

注: **理论值含量=表5中用于配方样品制备的冻干粉的检测值 \times 冻干粉在该基质中的添加百分比。

参考文献

- [1] QIAN D, ZHAO YX, YANG G, et al. Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae) [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 911.
- [2] LU YY, GUO S, ZHANG F, et al. Comparison of functional components and antioxidant activity of *Lycium barbarum* L. fruits from different regions in China [J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2228.
- [3] KULCZYŃSKI B, GRAMZA-MICHALOWSKA A. Goji berry (*Lycium barbarum*): Composition and health effects-A review [J]. *Pol J Food Nutr Sci*, 2016, 66(6): 67-75.
- [4] KOCYIGIT E, SANLIER N. A review of composition and health effects of *Lycium barbarum* [J]. *Int J Chin Med*, 2017; 1(1): 1-9.
- [5] CHENG J, ZHOU ZW, SHENG HP, et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 9: 33-78.
- [6] 赵志红, 邢桢荣, 王志强, 等. 不同产地肉苁蓉品质特征研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(12): 65-69.

ZHAO ZH, XING ANR, WANG ZQ, et al. Study on quality characteristics of *Cistanche deserticola* from different origins [J]. *J*

- Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019, 21(12): 65–69.
- [7] 张金磊, 邢丽杰, 王远, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定红枣中甜菜碱[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(17): 213–215, 258.
ZHANG JL, XING LJ, WANG Y, *et al.* Rapid determination of betaine in red date by UPLC-MS/MS [J]. J Anhui Agric Sci, 2020, 48(17): 213–215, 258.
- [8] TOYODA OY, MAEDA M, NAKAO M, *et al.* 2-O-(β -D-glucopyranosyl) ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from *Lycium* fruit [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(7): 2092–2096.
- [9] 张自萍, 李弘武, 廖国玲, 等. 枸杞子中 2-O- β -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸抑制黑素合成的研究[J]. 中国新药杂志, 2007, (9): 689–692.
ZHANG ZP, LI HW, LIAO GL, *et al.* Inhibition of melanin synthesis by 2-O- β -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid from *Fruetus lycii* [J]. Chin J New Drug, 2007, (9): 689–692.
- [10] 张自萍, 张立平, 郝艳芳. 枸杞子中 AA-2 β G 体外抗氧化作用研究[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(01): 11–13.
ZHANG ZP, ZHANG LP, HAO YF. *In vitro* antioxidant effects of AA-2 β G extracted from *Fruetus lycii* [J]. J Pract Med, 2011, 27(1): 11–13.
- [11] 张自萍, 刘晓明, 郝艳芳, 等. AA-2 β G 与 Vc 对 DPPH 自由基清除作用的比较[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 2010, 31(4): 377–380.
ZHANG ZP, LIU XM, HAO YF, *et al.* Comparative evaluation of radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl of vitamin C and natural vitamin C anal 2-O- β -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid isolated from *Fruetus lycii* [J]. J Ningxia Univ (Nat Sci Ed), 2010, 31(4): 377–380.
- [12] AMAGASE H, FARNSWORTH N. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (goji) [J]. Food Res Int, 2011, 44(7): 1702–1717.
- [13] ZHOU L, LEUNG I, TSO MO, *et al.* The identification of dipalmityl zeaxanthin as the major carotenoid in gouqizi by high pressure liquid chromatography and mass spectrometry [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 1999, 15(6): 557–565.
- [14] CHENG CY, CHUNG WY, SZETO YT, *et al.* Fasting plasma zeaxanthin response to *Fruetus barbarum* L. (wolfberry; Kei Tze) in a food-based human supplementation trial [J]. Brit J Nutr, 2005, 93(1): 123–130.
- [15] 枸杞红素对改善酒精性肝损伤的作用机制研究[Z]. 百瑞源枸杞股份有限公司, 2019.
Study on the therapeutic mechanism of zeaxanthin dipalmitate on alcoholic liver disease [Z]. Berylgogi Stock Corporation, 2019.
- [16] BAHAJI ANL, SUN MY. Zeaxanthin dipalmitate in the treatment of liver disease [J]. J Evid-Based Complement Altern Med, 2019, (2019): 1475163.
- [17] TAI A, GOHDA E. Determination of ascorbic acid and its related compounds in foods and beverages by hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2007, 853(1): 214–220.
- [18] 杨延超, 董慧燕, 殷梦龙. HPLC 测定枸杞提取物中枸杞酸的含量[J]. 食品工业, 2014, 35(10): 255–257.
YANG YC, DONG HY, YIN ML. Determination of 2-O-(β -D-glucopyranosyl) ascorbic acid in *Lycium barbarum* L. extracts by HPLC [J]. Food Ind, 2014, 35(10): 255–257.
- [19] 郭荣. 枸杞果实发育过程 AA-2 β G、甜菜碱及黄酮含量变化研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2008.
GUO R. Changes of AA-2 β G, betaine and flavonoids in *Lycium barbarum* fruits during development [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2008.
- [20] 周慧吉, 彭博, 李廷钊, 等. 枸杞子中玉米黄素双棕榈酸酯及枸杞酸的测定[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 294–299.
ZHOU HJ, PENG B, LI TZ, *et al.* Determination of zeaxanthin dipalmitate and 2-O-(β -D-glucopyranosyl) ascorbic acid in fruit of *Lycium barbarum* L. [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(12): 294–299.
- [21] YONG P, CHEN M, YAWEI L, *et al.* Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in *Lycium* fruits (*Fruetus lycii*) [J]. Plant Foods Human Nutr, 2005, 60(4): 161–164.
- [22] KARIOTI A, BERGONZI MC, VINCIERI FF, *et al.* Validated method for the analysis of goji berry, a rich source of zeaxanthin dipalmitate [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(52): 12529–12535.
- [23] 庄晶玲, 于洋, 杨丽丽, 等. 高效液相色谱法研究枸杞子中枸杞红素含量[J]. 食品工业, 2020, 41(10): 306–310.
ZHUANG JL, YU Y, YANG LL, *et al.* Identification of zeaxanthin dipalmitate by high performance liquid chromatography [J]. Food Ind, 2010, 41(10): 306–310.

(责任编辑: 李磅礴 郑丽)

作者简介



周 凌, 工程师, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: laurel.zhou@healthy-star.cn



朱吟吟, 工程师, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: maple.zhu@healthy-star.cn