

分类号_____

密级_____

UDC_____

编号_____

中国科学院研究生院

硕士学位论文

柴达木枸杞活性成分研究

李国梁

指导教师_____ 刘永军 研究员；索有瑞 研究员

_____ 中国科学院西北高原生物研究所

申请学位级别_____ 硕士 _____ 学科专业名称_____ 植物学

论文提交日期_____ 2010 年 5 月 _____ 论文答辩日期_____ 2010 年 5 月

培养单位_____ 中国科学院西北高原生物研究所

学位授予单位_____ 中国科学院研究生院

答辩委员会主席_____

Thesis of Master Degree

Graduate University of the Chinese Academy of Science

The study on the active ingredient in *Lycium barbarum* from
Qaidam Basin

by

Guoliang Li (Phytochemistry)

Directed by Professor Yongjun Liu; Yourui Suo

Northwest Institute of Plateau Biology, CAS

May, 2010, Xining, Qinghai, China

摘要

枸杞是茄科植物枸杞(*Lycium barbarum*)的成熟干燥果实。枸杞在祖国传统医学中具有重要的地位,其药用价值备受历代医家的推崇。《本草纲目》记载:“枸杞,补肾生精,养肝,明目,坚筋骨,去疲劳,易颜色,变白,明目安神,令人长寿。”对于枸杞上述功能起重要作用的因子,一般认为与其所含枸杞多糖、黄酮类物质和不饱和脂肪酸等活性成分有关。

本论文主要对柴达木枸杞中的主要活性成分进行了系统研究,主要内容如下:

1、通过紫外可见分光光度法测定了柴达木枸杞中多糖的含量,同时采用新合成的衍生试剂 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP)对糖类进行柱前衍生,在毛细管区带电泳模式下多糖中的单糖组成进行了研究;采用清除 DPPH 与 β -胡萝卜素-亚油酸体系对柴达木枸杞多糖的体外抗氧化活性研究进行了研究。

2、利用超临界 CO₂ 萃取技术萃取了枸杞籽油,同时采用响应面分析法对萃取条件包括萃取温度、萃取时间和夹带剂(乙醇)等进行了优化,得到了最佳萃取工艺;同时还考察了萃取条件间的相互作用对出油率的影响;采用清除 DPPH 与 β -胡萝卜素-亚油酸体系对枸杞籽油的体外抗氧化活性研究进行了研究,同时还利用正交分析法考察了不同萃取条件对籽油抗氧化活性的影响。

3、采用 2-(11H-苯[a]咪唑)乙基对甲苯磺酸酯(BCETS)作为柱前荧光标记试剂,通过响应面分析法,对衍生温度、衍生时间、衍生试剂量进行了优化,并建立了 30 种脂肪酸衍生物的同时分析测定方法(HPLC-FLD-MS)。利用该方法对不同萃取条件下籽油中的游离脂肪酸含量进行了分析;同时研究了不同萃取条件对游离脂肪酸的组成影响。

4、对柴达木枸杞中的总黄酮、氨基酸与主要微量元素进行了分析。

本文中利用响应面分析法对超临界萃取柴达木枸杞籽油的工艺进行了优化,同时建立了一种新型、快速、灵敏测定籽油中游离脂肪酸的柱前衍生分析方法,该分析方法可以应用于其他籽油或食用油、生物样品中的痕量游离脂肪酸测定。同时还对柴达木枸杞中其它活性成分进行了全面研究,这些基础研究为柴达木枸杞日后综合开发及应用等提供基础理论依据

关键词: 柴达木枸杞; 多糖; 超临界萃取; 响应面分析法; 籽油; 氨基酸; 黄酮; 微量元素

Abstract

Fruit from *Lycium barbarum* L. (*L. barbarum*) in the family Solanaceae is well known in traditional Chinese herbal medicine, which has an important role in traditional medicine. Compendium of Materia Medica records that the pharmacological activities associated with *L. barbarum* include hypoglycemic, immunomodulation, anti-hypertension, lipotropic, protecting hepatic function, anti-aging, anti-fatigue, antioxidant and so on. The main active ingredients in *L. barbarum* are polysaccharides, flavonoids, unsaturated fatty acids and so on.

In this study, *Lycium barbarum* from Qaidam Basin was used as experimental Material. The main main active ingredients in *L. barbarum* were studied.

1. The content of total flavonoids in *L. barbarum* was determined by UV-Vis spectrophotometry. 1-naphthyl-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) was used as derivatization reagent, derivatived carbohydrates from *L. barbarum* polysaccharides were separated by capillary zone electrophoresis. The antioxidant activity of *lyceum barbarum* polysaccharide was assessed by means of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging assay and β -carotene bleaching test.

2. The oil in *L. barbarum* seed was extracted by supercritical CO₂. To optimize the supercritical CO₂ oil extraction process, response surface methodology (RSM) was applied to optimize the extraction conditions including pressure, temperature and amount of modifier (ethanol). The interaction effect between the parameters was also studied. The effects of various extraction conditions on the antioxidant activity of extracted samples were investigated.

3. 2-(11*H*-benzo[*a*]carbazol-11-yl)-ethyl-4-methylbenzenesulfonate (BCETS) was used as pre-column derivatization reagent, response surface methodology was applied to optimize the derivatization conditions including reaction temperature, reaction time and amount of reagent. A facile and sensitive method for the simultaneous determination of 30 fatty acids was developed by HPLC with fluorescence detection and on-line MS identification; and this established method was used to analysis the free fatty acids in extracted samples. The effects of various supercritical extraction conditions on the free fatty acids composition were investigated by orthogonal analysis.

4. The content of total flavonoids, amino acids and trace elements in *Lycium barbarum* from Qaidam Basin were determined.

In this paper, the supercritical CO₂ oil extraction from *Lycium barbarum* seed was optimized by response surface methodology, and developed a new, rapid and sensitive method for free fatty acids by pre-column derivatization. This established method could be applied in the determination of free fatty acids in other seed oils, edible oils or biological samples. Main active ingredients in *Lycium barbarum* from Qaidam Basin were also investigated, which provide the theory basis for the application in the future.

Keyword: *Lycium barbarum* from Qaidam Basin; Polysaccharides; Supercritical CO₂ extraction; Response surface methodology; Seed oil; Amino acids; Flavonoids; Trace elements

目录

第一章 枸杞概述.....	1
1 枸杞研究进展.....	1
1.1 枸杞多糖的结构及其性质研究.....	1
1.2 枸杞活性研究进展.....	5
2 柴达木盆地产枸杞的生境、资源量及其分布规律.....	9
2.1 柴达木枸杞简介.....	9
2.2 柴达木枸杞生境基本特征.....	10
2.3 柴达木盆地产枸杞的种类及其分布规律.....	10
2.4 柴达木枸杞的研究目的与意义.....	11
第二章 柴达木枸杞多糖及抗氧化活性研究.....	12
1.1 引言.....	12
1.2 柴达木枸杞多糖含量的测定.....	13
1.2.1 枸杞多糖的制备.....	13
1.2.2 多糖含量的测定方法.....	13
1.2.3 多糖含量的测定.....	14
1.3 柴达木枸杞的单糖组成研究.....	14
1.3.1 材料与仪器.....	14
1.3.2 枸杞多糖的制备.....	14
1.3.3 柴达木枸杞多糖单糖组成分析.....	15
1.3.4 结果与讨论.....	16
1.4 柴达木枸杞多糖抗氧化活性研究.....	19
1.4.1 实验仪器与材料.....	19
1.4.2 试验方法.....	19
1.4.3 柴达木枸杞多糖的抗氧化活性.....	20
结论.....	21
第三章 超临界二氧化碳萃取柴达木枸杞籽油工艺研究.....	23
引言.....	23
2.1 实验部分.....	24
2.1.1 实验材料.....	24
2.1.2 实验试剂与仪器.....	24
2.1.3 试验设计.....	24
2.2 超临界提取工艺优化.....	25
2.2.1 粒径对萃取率的影响.....	25
2.2.2 Box-Behnken 的中心组合设计试验结果及分析.....	26
2.2.3 萃取工艺优化.....	28
结论.....	32
第四章 柴达木枸杞籽油中脂肪酸的柱前衍HPLC-FLD-APCI/MS 分析.....	33
引言.....	33
3.1 实验部分.....	34
3.1.1 仪器.....	34
3.1.2 试剂.....	34
3.1.3 HPLC标准液制备.....	35

3.1.4 油样HPLC供试液制备.....	35
3.1.5 衍生条件的优化.....	36
3.1.6 HPLC-MS 分析条件	41
3.2 结果与讨论.....	42
3.2.1 HPLC色谱分离与质谱鉴定.....	42
3.2.1 检测线, 线性回归方程与重现性.....	43
3.2.2 不同提取条件下枸杞籽油中的游离脂肪酸分析	43
3.2.3 萃取压力、温度、CO ₂ 流量及不同提取溶剂对枸杞籽油中游离脂肪酸组成的影响.....	46
结论.....	48
第五章 柴达木枸杞中黄酮, 氨基酸及微量元素的含量测定	49
引言.....	49
1.1 实验部分.....	50
1.1.1 实验材料.....	50
1.1.2 实验试剂与仪器.....	50
1.2 柴达木枸杞中总黄酮含量的测定	51
1.2.1 总黄酮的提取.....	51
1.2.2 芦丁标准曲线的制备 ^[87]	51
1.2.3 总黄酮含量的测定	52
1.3 RP-HPLC法测定柴达木枸杞中芦丁的含量.....	52
1.3.1 色谱条件.....	52
1.3.2 对照品溶液的制备.....	53
1.3.3 供试溶液的制备.....	53
1.3.4 标准曲线及线性范围.....	53
1.3.5 精密度实验、稳定性试验、重复性试验及加样回收率实验	54
1.3.6 柴达木枸杞样品中芦丁的含量测定	54
1.4 柴达木枸杞中氨基酸分析.....	54
1.4.1 全自动氨基酸分析仪分析氨基酸含量与组成	54
1.4.2 柴达木枸杞和多糖氨基酸测定结果.....	55
1.5 原子吸收分光光度仪测定元素含量.....	56
1.5.1 采用火焰法进行测试.....	56
1.5.2 枸杞中无机元素测定	57
结论.....	57
参考文献.....	59
攻读硕士期间发表的论文.....	66
致 谢.....	67

第一章 枸杞概述

枸杞是茄科植物枸杞 (*Lycium barbarum*) 的成熟干燥果实。1988 年我国卫生部正式公布枸杞既是食品又是药品。现宁夏、青海、山东、河南等地都有生产。枸杞在祖国传统医学中具有重要的地位，其药用价值备受历代医家的推崇。《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。”《神农本草经》中就指出：久服坚筋骨；名医别录谓枸杞擅长“补益精气”；《食疗本草》也记载枸杞“能益人，去虚劳”。现在医学研究表明，枸杞具有抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、免疫调节、降血糖、降血脂等作用^[1, 2]。对于枸杞上述功能起重要作用的因子，一般认为与其所含枸杞多糖、黄酮类物质和不饱和脂肪酸等活性成分有关，特别是与枸杞多糖密切相关重要，因此枸杞多糖的药理及临床应用研究受到格外关注^[3, 4]，又由于国际市场对我国中草药认可度的不断上升，欧美国家对中草药研究也在不断升温，这使得枸杞子作为药食兼用的名贵资源已为国内外学者所瞩目^[5]。据报道枸杞现在已经在美国、欧洲等诸多国热销，在美国作为癌症治疗的辅药广泛应用。

1 枸杞研究进展

1.1 枸杞多糖的结构及其性质研究

枸杞多糖的提取方法：传统的方法先将枸杞子烘干用氯仿-甲醇脱脂，用乙醇脱去小分子糖然后水提取浓缩，再用乙醇沉淀，有机溶剂脱水，真空干燥枸杞得到多糖粗品^[2]。张自萍等^[6]用超声提取枸杞多糖的含量为 6.26%(传统法 5.17%)。潘泰安、毛忠英等^[7]提出了超临界 CO₂ 萃取、水溶提取、电渗析、超滤、反渗透、冷冻升华干燥工艺生产枸杞多糖，产品纯度较高，可溶性好，利用生物活性膜分离技术的特点是高效节能，它可在常温下实现各组分分离、提纯、浓缩。随着膜材料、膜品种、

膜组件及膜装置的发展,应用领域更为广泛,方法手段先进,操作简便,具有重要的使用价值。纯化以较常用的层析法:(1)凝胶层析法。以蒸馏水溶解样品,上已平衡好的 SephadexG-300 层析柱,以 0.2 mol/L NaCl 了洗脱,收集,苯酚法显色。(2)离子交换柱层析。用 DEAE 纤维素柱(B-40 型),以 0.2 mol/L 硼砂同上进行洗脱,收集,显色。经层析,流出液均为单峰,可说明为单一组分^[8]。何进,张声华等^[9]对枸杞多糖的提取及理化特性进行了探讨,将多糖粗品装近 DEAE 纤维素柱(OH⁻)按下行法洗脱,得到的粗品溶于水,先以水洗脱然后用梯度浓度的 NaCl 洗脱,苯酚法显色,流出峰部分合并,浓缩,得到四级多糖的级分,将半成品溶于水中加样于 SephacrylS-300 上,以重蒸水洗脱,收集,苯酚法显色;浓缩冷冻干燥后合并得到对应的四个级分纯化的枸杞多糖。田庚元等^[10]用离子交换柱层析从 Lbp 中分离出的组份再用凝胶层析和离子交换层析等方法进行纯化,从 Lbp1-Lbp5 五个组份分别得到五种糖白。经高压液相(HPLC)、毛细管电泳(CE)检测均为单峰,证明这些糖蛋白是均一的过程如图 1

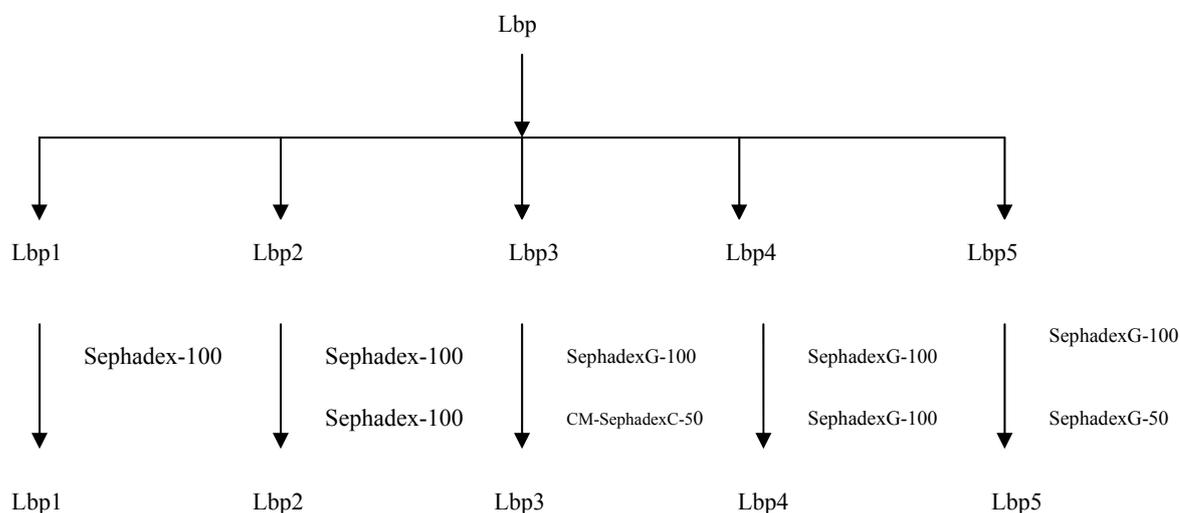


图 1 枸杞多糖纯化过程

Fig 1 The Purification process of LBP

赵春久等^[11]从枸杞总多糖中分离得到 4 个水溶性多糖均一体,以完全酸水解、过碘酸氧化、Smith 降解、酶解及光谱分析、氨基酸组成分析测定,对各均一体的结

构进行化学研究得出：除 LBP-4 分子量是 1.0×10^4 ，为 α -(1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)连接的葡聚糖肽外，LBP-3、LBP-1、LBP-2 分别为分子量 6.6×10^4 , 1.8×10^4 , 1.2×10^4 , 均为 β -(1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)连接的杂多糖肽。

枸杞多糖通常与蛋白质共价结合成为糖蛋白，笼统的称为枸杞多糖，通过测定了它们的分子量、C、H、N 元素分析、糖含量、蛋白含量、糖基组成、氨基酸组成及紫外(UV)、红外(IR)、核磁共振(NMR)等物理化学性质，结果证明它们都是一些糖与肽共价结合的糖缀合物^[10, 12]。其中以 LbGp4 含量最高。该糖蛋白含糖 70%，蛋白质 30%，检测出 16 种氨基酸，单糖组成为阿拉伯糖:半乳糖:葡萄糖 = 25:10:1.0 摩尔，为 Gly-O-Ser 连结的糖蛋白，其中多糖链达 40KD，此糖链主链是由 β - (1 \rightarrow 6) 半乳糖组成，平均每 8 个糖单元有 7 个分支，分支链含少量 β -(1 \rightarrow 3)半乳糖和大量阿拉伯糖，末端糖基均为 α - (1 \rightarrow 呋喃阿拉伯糖)。其化学物理性具体如表 1,2 所示。

表 1 枸杞多糖的组成
Table 1 The composition of LBP

Sample	M	Content of N(%)	Content of protein(%)	Composition of Glycosylation					
				Ara	Gal	Xyl	Rha	Glc	GalA
LbGp1	8.80	4.62	70.0	2.5	1.0			1.0	
LbGp2	6.80	1.48	82.7	3.0	4.0				
LbGp3	9.25	0.83	93.6	1.0	1.0				
LbGp4	21.48	1.72	85.6	1.5	2.5	0.23	0.43		
LbGp5	2.37	9.58	8.6	1.0	0.3		0.1	1.2	9.0

表 2 枸杞多糖的氨基酸含量 (g/kg)

Table 2 The content of amino acids in LBP (g/kg)

氨基酸	LbGp1	LbGp2	LbGp3	LbGp4	LbGp5
Asp	8.46	10.56	9.65	9.61	13.70
Thr	6.50	7.93	6.68	6.77	5.76
Ser	23.15	8.85	9.98	12.80	6.95
Glu	12.22	9.81	11.00	10.33	11.32
Pro	8.84	5.41	4.90	5.15	4.87
Gly	13.28	11.81	13.24	12.57	10.55
Ala	7.53	10.76	16.86	11.64	6.46
Cyc	0.41	1.53	0.67	1.52	1.91
Val	2.45	6.43	5.95	6.04	6.54
Met	0.24	2.10	1.12	1.03	.023
Ile	3.46	4.21	4.51	3.74	4.17
Leu	2.15	6.45	3.79	4.64	8.65
Tyr	3.68	3.27	2.33	3.06	3.65
Phe	1.74	2.93	2.91	3.00	3.97
Lys	0.93	4.19	2.82	3.94	5.91
His		0.81	0.73	1.25	1.19
Arg	4.98	3.49	2.85	2.92	4.18

姚瑞祺等^[13]用采用 5 个不同截流分子量的超滤膜,对 LBP 进行分级分离在 25℃、入口压力 70kPa、出口压力 30kPa 下,可得到分子量为 10~30 万的多糖样品液,按多糖分子量大小被分为 6 份,如表 3。

表 3 各分子量 LBP 所占比例及 FRAP 值

Table 3 The content of different LBP and the FRAP

M	Proportion (%)	FRAP	Proportion×FPAP
5000 以下	74.5	0.745	0.555
5000—1 万	11.0	0.597	0.066
1 万— 3 万	7.7	0.923	0.071
3 万—10 万	2.4	1.060	0.025
10 万—30 万	2.4	0.720	0.017
30 万以上	1.9	0.401	0.008

1.2 枸杞活性研究进展

1.2.1 抗癌活性研究

现代医学研究充分表明, LBP 具有较强抗肿瘤作用, 对人体大多数癌细胞的生长均有抑制作用, 对放、化疗后的不良反应有较好的预防作用。LBP 可显著提高荷瘤鼠胸腺指数、巨噬细胞吞噬功能、脾细胞抗体形成、淋巴细胞转化反应、细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤功能及降低脂质过氧化值, 具有明显的抗肿瘤活性^[14]。肖琳等^[15]研究还发现 LBP 有诱导细胞凋亡的作用。细胞凋亡的过程受到来自细胞内外多种信号的调控, 其中 Ca^{2+} 作为第二信使在细胞凋亡的过程中起着重要的作用, 这可能是其抗肿瘤作用的主要机制之一。何彦丽等^[16]用 H22 荷瘤小鼠, 以枸杞多糖连续灌胃两周后观察胸腺、肿瘤重量, 计算胸腺指数及肿瘤生长抑制率, 结果枸杞多糖可明显抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, 对小鼠的胸腺具有一定的保护作用, 可下调血清中 VEGF、TGF-B1 水平, 表明枸杞多糖的抗肿瘤作用与抑制肿瘤组织 VEGF、TGF-B1 因子的分泌, 干预机体的免疫逃逸状态有关。崔涛等^[17]研究枸杞多糖对人类慢性髓系白血病 K562 细胞株作用。LBP 作用 48 h 后可明显抑制 K562 细胞的生长, 琼脂糖凝胶电泳 DNA 梯带跟流式细胞仪可见白血病 K562 细胞株明显的凋亡, 提示 LBP 能诱导 K562 细胞的凋亡, 并出现一定时间与浓度的依赖关系。LBP 在体内、体外对 LAK 细胞抗肿瘤活性具有一定调节作用, LBP 注射老龄小鼠可显著促进脾细胞增殖, LAK 活性可提高 120%~200%, 体外 IL22 用量可降低大于 75%。LBP 在体内不但可以提高常规 LAK 活性, 也可快速提高 LAK 活性。用 LBP 联合 LAK/IL22 疗法临床试验治疗恶性黑色素瘤、肾癌、直肠癌、肺癌、恶性胸腔积液和鼻咽癌, 75 例可评估资料分析表明, LBP 联合 LAK/IL22 疗法的总缓解率和缓解时间均优于单用 LAKP/IL22 疗法, 联合疗法治疗前后外周血淋巴细胞(PBL)的 NK、LAK 活性增高程度均显著大于单用疗法, 说明了 LBP 能够提高 LAK/IL22 疗法对晚期肿瘤的治疗效果^[18]。黄文书, 杨海燕等^[19]

研究发现枸杞粗多糖具有针对肿瘤细胞的体外细胞毒作用，其机制可能是枸杞粗多糖直接破坏癌细胞的结构，使 DNA 分子损伤，DNA 复制和转录功能受抑，进而阻碍了细胞的蛋白质合成，最终导致细胞死亡，也可能是枸杞多糖结合到肿瘤细胞膜上，抑制胞外葡萄糖进入肿瘤细胞内，使之缺乏能量而致死。

1.2.2 抗衰老作用

人体衰老主要是细胞氧化所致,体内自由基脂质过氧化是导致衰老的主要原因。LBP 在体外可直接清除羟自由基,并能抑制自发或由羟自由基引发的脂质过氧化反应。灌服 LBP 能提高半乳糖致衰老小鼠体内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,从而可以清除过量的自由基,降低 MDA 和脂褐素含量,起到延缓衰老的作用^[2],所以 LBP 在动物体内的抗氧化途径可能有两种:一是 LBP 直接清除体内过多的自由基;二是通过提高动物抗氧化酶活力的间接作用来清除过多自由基。陈智松等^[24]报道,枸杞多糖能使年老小鼠骨髓 c-myc 基因表达水平明显下降,说明枸杞多糖的作用机理之一可能是通过抑制原癌基因 c-myc 的表达,从而抑制细胞凋亡,最终达到延缓衰老,提高机体生命力的目的。朱彩平等^[20]研究表明, LBP 可显著降低肝组织的脂质过氧化程度,显著提高肝组织中 SOD 的活性,维持机体氧化及抗氧化系统的动态平衡,从而使组织细胞免受自由基的侵害。余江等^[21]对醋酸铅染青的小鼠血浆中的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性与 MDA 含量研究表明,阳性对照组血浆中 SOD 水平明显低于阴性对照组和观察组(* $P<0.05$),而且观察组中用药剂量越大,血浆中 SOD 活性越高。阳性对照组血浆中 GSH-Px 水平明显低于阴性对照组和观察组($P<0.05$),阳性对照组血浆中 MDA (丙二醛)水平明显高于阴性对照组和观察组(* $P<0.05$)。说明复合枸杞多糖具有拮抗铅致的脂质过氧化作用。

1.2.3 护肝作用

大量的研究表明,LBP 对实验性肝损伤有保护作用。LBP 对四氯化碳引起肝损伤有修复作用,其机制可能是通过阻止内质网的损伤,促进蛋白质合成及解毒作用,恢复肝细胞功能,并促进肝细胞再生^[22]。贺捷^[23]等研究发现 LBP 可使四氯化碳所致的丙氨酸氨基转移酶(ALT)升高值明显降低,使老龄小鼠的肝细胞脂质过氧化作用降低,还揭示了 LBP 可以使长期受电击加低剂量 γ 射线照射的 5 个月龄小鼠脾和脑匀浆总脂水平与空白对照组接近,同时使脾匀浆脂质过氧化物(MAD)含量显著降低。田丽梅等^[24]通过测定家兔血清 ALT 活性的大小表明,枸杞子具有明显抑制乙醇所致 ALT 升高的作用,对大剂量饮酒造成的肝损伤具有保护作用。王建华等^[25]研究发现 LBP-1 可以清除 $\cdot\text{OH}$,减少 $\cdot\text{OH}$ 所致丙二醛的产生,抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致膜流动性下降和减轻 $\cdot\text{OH}$ 所致肝线粒体膨胀程度,并呈量效关系,表明 LBP-1 具有清除 $\cdot\text{OH}$ 和抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致小鼠肝线粒体氧化损伤的作用。迟国兴等^[26]研究结果表明,枸杞粗多糖可降低肝组织丙二醛含量,可使四氯化碳肝损伤小鼠肝糖元含量显著升高,提高肌体的能量储备。宋育林^[27]等采用乙醇饮料(乙醇浓度 5%~40%,终浓度 40%,共 29 周)复制酒精性肝病模型,25 周时剩余的大鼠随机分为模型组,两个剂量的 LBP 治疗(250、1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),以光镜和电镜下观察形态学改变,与模型组相比,LBP 组肝形态学明显改善,大剂量(1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 效果更优,表明 LBP 对大鼠酒精性肝病模型能改善线粒体的形态、减轻肝细胞的脂肪变性和炎症坏死程度。朱彩平等^[20]研究表明, LBP 可显著降低肝组织的脂质过氧化程度,显著提高肝组织中 SOD 的活性维持机体氧化及抗氧化系统的动态平衡,从而使组织的细胞免受自由基的侵害。

1.2.4 降血糖

临床研究发现,LBP 对 II 型糖尿病有明显的免疫调节效应,对 II 型糖尿病患者的 T8 和 IL-6 有明显的下调作用,并能明显增高 IL-2 的水平,LBP 还能明显降低链脲佐菌

素(STZ)引起高血糖小鼠的血糖,并对 STZ 诱导的胰岛 β 细胞(NIT- β 细胞)损伤具有保护作用,其降血糖作用主要不是通过促进 NIT- β 细胞释放胰岛素所产生^[28]。王玲等^[29]发现,枸杞多糖灌胃给药可使小鼠血糖从对照组的 21.3mmol/L 降至注射四氧嘧啶后 72h 的 10.16 mmol/L, 四氧嘧啶糖尿病小鼠枸杞多糖与正常小鼠血糖明显降低。徐曼艳等^[30]从细胞水平研究了枸杞多糖对糖尿病的保护作用。结果:枸杞多糖明显增强受损胰岛细胞内 SOD 的活性,提高了胰岛细胞的抗氧化能力,减轻了过氧化物对细胞的损伤,降低丙二醛生成量,表明枸杞多糖对四氧嘧啶损伤的离体大鼠胰岛细胞有一定的保护作用。孙桂菊等^[31]试验表明,LBP 和茶叶多糖混合物具有增强 II 型糖尿病模型动物胰岛素的敏感性,增加肝糖原的储备,降低血糖水平,也可能通过抑制 α -糖苷酶,降低餐后血糖的升高,提高糖耐量水平。LBP 和 TPS(茶多糖)混合物还可抑制肾脏 AR(醛糖还原酶)活性,降低血清 AGE-P 水平,提高血清 SOD 水平,在预防糖尿病并发症发生中起重要作用。

1.2.5 抗疲劳作用及其他活性

研究表明 LBP 具有提高小鼠运动耐力及增强机体抗氧化酶活性的作用^[32]。罗琼^[8]将 LBP 粗品与纯品分 5、10、20、50、100 mg/(kg · d⁻¹)5 个不同剂量的实验组,灌喂小鼠,比较其对小鼠抗疲劳的效果,结果以纯品 LBP 10 mg/(kg · d⁻¹)剂量组效果最佳。李晓莉^[33]通过实验研究发现, LBP 提高小鼠机体组织对 O₂ 的利用。同时通过耐缺氧效应研究认为 LBP50~900 mg.kg⁻¹ · d⁻¹, 可显著延长小鼠的存活时间,其中以 700 mg/ (kg · d⁻¹)剂量效果最佳,存活时间比对照组延长 52.11%。彭晓东^[34]采用脉冲式电流直接刺激蟾蜍离体腓肠肌作为疲劳模型,研究 LBP 对离体肌肉的收缩能力,耗竭肌肉组织内脂质过氧化物以及乳酸产生的影响。发现 LBP 对离体蟾蜍腓肠在电刺激条件下引发的收缩疲劳有促进作用。抗应激作用, 曲红^[35]等研究发现, 经电击加低剂量 γ 射线照射后, 大鼠的脾重指数明显降低, 大脑皮层指数明显提高, 应激刺激还使脾和大脑皮层总脂含量明显降低, 脂质过氧化物丙二醛(MDA)明显增加。腹腔

注射 LBP 剂量 5、10 mg/kg, 5 次/2 周, 共给药 15 次。结果可见, 给药组脾和脑匀浆总脂水平与对照组接近, 脾匀浆 MDA 含量显著降低, 这表明 LBP 具有抗应激作用。保护生殖系统, 黄晓兰等^[36]通过研究发现枸杞多糖可使睾丸损伤大鼠血清性激素水平升高; 增加睾丸、附睾的脏器系数, 提高大鼠睾丸组织 SOD 活性, 降低丙二醛含量, 使受损的睾丸组织恢复到接近正常。黄晓兰^[37]等研究发现枸杞多糖各剂量均能使过氧化氢染毒细胞的拖尾细胞百分率和尾长显著降低, 二者呈剂量-反应关系, 提示枸杞多糖能抑制过氧化氢诱导的睾丸细胞损伤, 对生殖细胞具有明显的保护作用。

2 柴达木盆地产枸杞的生境、资源量及其分布规律

2.1 柴达木枸杞简介

柴达木枸杞又名柴杞, 是青海三大浆果之一, 与白刺、沙棘齐名。主要出产于柴达木盆地, 鲜果玲珑剔透, 红艳欲滴, 状似红宝石, 色红粒大, 果实卵圆形, 籽少、肉厚, 大小均匀, 无碎果, 无霉变, 无杂质, 品质优良, 这主要得益于青海柴达木盆地独具特色的高原大陆性气候。现在柴达木盆地内的德令哈市、格尔木市、诺木洪、巴隆、香日德等地, 均种植了枸杞, 枸杞作为柴达木地区特色产业, 发展日趋壮大^[38-40]。

柴达木盆地已营造枸杞经济林近 6 万亩, 其中 5 万多亩已有产出。目前, 枸杞干果加工和依托枸杞经济林发展起来的公司, 年产值已达 6200 多万元, 以枸杞种植为主的产业在当地农牧民收入中的比重达 34.3%。

柴达木枸杞在发挥巨大的经济效益的同时, 还给柴达木盆地脆弱的生态环境建立起了绿色屏障。青海省开始在柴达木盆地沙区数十个绿洲及周边地区, 因地制宜、集中连片地在沙化土地上人工营造、发展枸杞经济林, 达到生态防护和经济效益兼用的目的。

2.2 柴达木枸杞生境基本特征

柴达木盆地位于青藏高原东北部, 介于东经 $90^{\circ} 16'$ - $99^{\circ} 16'$ 、北纬 $35^{\circ} 00'$ - $39^{\circ} 20'$ 之间。盆地海拔 2680 - 3300 m, 周围山地海拔 3300 (3500) - 5500 m, 其东北以祁连山脉为界, 南界为昆仑山脉, 西北界为阿尔金山脉, 盆地面积 12 km²。盆地略呈三角形, 北西西—南东东方向延伸, 东西长约 850 km, 南北宽约 250 km, 是高原型封闭式的内陆盆地, 属西北干旱区四大盆地之一。自然地理条件独特, 具有高寒和干旱特征, 物理风化过程强烈, 化学积盐过程旺盛, 而生物的储存转化过程微弱。内部的自然地理环境仍然具有很大差异, 主要表现为盆地东南部半干旱荒漠草原和西半部干旱荒漠两个自然地带。其界线大致以香日德的脱土山经都兰县西面的阿勒格尔尕山—牦牛山西麓—德令哈—中吾农山南麓的怀头他拉连线为界。界线以东为荒漠草原棕钙土(亚) 地带, 界西为干旱荒漠灰棕漠土地带。盆地具有独立的内流水系, 相对独立的堆积基准面, 形成其完整的物质迁移运动系列—湖盆堆积、盆缘侵蚀堆积、山地侵蚀的系列。使盆地从中心至周围山地的自然环境依次呈现: 湖泊、湖盆盐滩、盐泽、沼泽盐土、草甸盐土、盐化草甸、荒漠化草甸、沙漠(沙丘)、戈壁、荒漠低山丘陵至草原、草甸草原山地、高寒草甸高山、冰雪及高山至草原、草甸草原山地、高寒草甸高山、冰雪及高山的排列, 构成环带状的环境结构特征。大部分地区太阳辐射强度大, 日照时间长, 辐射量大, 全年日照时数在 2250 - 3603h 之间, 自东南向西北递增, 居全国第二位。气温日差较大, 白天气温高, 光照充足, 光合作用时间长, 制造有机物质多; 夜间气温低, 呼吸作用弱, 植物消耗的营养物质少。雨热同季, 降水集中在 7、8 月份, 自然隔离条件好^[38]。

2.3 柴达木盆地产枸杞的种类及其分布规律

《中国中药药典》药材品种中记载, 柴达木盆地共有药用植物 657 种, 其中主要药用植物有 69 种, 占全国重点品种 363 种的 19100%。全国重点植物药材品种资

源蕴藏量约为 76305133 吨, (其中野生植物药 76259104 吨,人工栽培药 46129 吨)。枸杞是其中主要的药用植物之一。野生枸杞子的产量约为 2 -10 吨;栽培枸杞子的产量约为 10 - 20 吨。柴达木产枸杞的地带性分布规律:枸杞的种类和覆盖度呈现出由东向西递减的规律。这是由于柴达木盆地的地形是西北高而东南低,降水量和湿度受海洋湿润气候的微弱影响,呈现出由东南向西北递减的规律,与之相对应的是越向西北方向荒漠化程度越高^[38]。

2.4 柴达木枸杞的研究目的与意义

由于柴达木盆地独具特色的高原大陆性气候使得柴达木枸杞中的有机物质积累与其他产地有所差异,目前对枸杞研究主要集中在宁夏枸杞,而相对与柴达木枸杞的化学成分及其活性研究处于空白阶段,枸杞作为柴达木地区特色产业,发展日趋壮大,因此对柴达木枸杞的基础研究显得越来越重要。

本文研究重点是柴达木枸杞中主要活性成分提取及分析,主要从以下方面进行:

- ① 多糖提取、含量测定、单糖组成及多糖抗氧化活性研究;
- ② 柴达木枸杞籽油的超临界萃取工艺研究、柱前衍生化分析脂肪酸的方法建立、不同提取条件下籽油组成分析、不同提取条件下籽油抗氧化活性分析。
- ③ 黄酮、氨基酸、微量元素进行定量分析;

通过以上研究以期日后柴达木枸杞综合开发及应用、出口等提供基础理论依据。

第二章 柴达木枸杞多糖及抗氧化活性研究

1.1 引言

糖是自然界和生物体中广泛存在的物质。长期以来人们认为糖的主要功能是提供能量,而新兴的糖生物化学研究发现糖类物质除了提供能量外还有其它多方面的生物活性与功能,诸如抗癌、抗衰老、抗病毒、控制细胞分裂,调节细胞生长和人体免疫功能等作用,多糖及其衍生物还被用作分离对映异构体的手性选择剂^[41-43],所以糖类的研究受到人们越来越多的关注。

但多糖的结构复杂,具有很高的微观不均一性,因此对其分离分析相当困难。毛细管电泳是 20 世纪 80 年代发展起来的一种分离分析技术,它以快速、高效和灵敏度高、所需样品少等优点被广泛应用于各个领域。用毛细管电泳分析糖类物质在 20 世纪 90 年代发展迅速,目前毛细管电泳对糖的分析主要集中在单糖和寡糖的分离检测方面,对多糖的分离分析还不多见。Suzuki^[44]等提出了一种不同于还原氨化类型的新的衍生方法,方法以 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP) 作衍生试剂,利用活泼碳(C-4) 和还原糖的还原端之间的一种新的缩合反应。在温和条件下缩合反应快速定量进行,不需要酸催化剂。

氧化是任何生物体代谢过程中都会发生的非常重要的化学反应过程,也是自由基电子转移发生反应的过程。氧化过程同时也是一个产生自由基和自由基参与的链式反应,每一步反应都有活性氧自由基中间物的产生和参与^[45]。氧化过度,产生过多的自由基,就会对机体产生严重伤害,从而导致膜脂过氧化和细胞损伤,引起人体衰老和心脏病、动脉粥样硬化、癌症、炎症、糖尿病等严重疾病。抗氧化作用指能够使自由基氧化减缓或停止自由基氧化的各种过程^[46]。

本文主要工作: 1, 测定柴达木枸杞其中多糖含量,同时采用新合成的衍生试剂 1-萘基-3-甲基-5-吡啶啉酮(NMP)对糖类进行柱前衍生,在毛细管区带电泳模式下对

柴达木枸杞多糖中的单糖组成进行研究；2，采用清除 DPPH 与 β -胡萝卜素-亚油酸体系对柴达木枸杞多糖的体外抗氧化活性研究进行了研究。

1.2 柴达木枸杞多糖含量的测定

1.2.1 枸杞多糖的制备

取经干燥处理后的枸杞子10 g，用氯仿：甲醇(2:1) 60 °C下回流脱脂2次，滤出溶剂，残渣挥干溶剂后置锥形瓶中加入10 倍体积85%乙醇超声提取2次，每次30min，过滤，待残渣中的乙醇挥干后，加水适量超声提取2次，过滤，滤液浓缩至原体积的1/3，最后用四倍体积的95%乙醇沉淀，放置24 h，抽滤，所得固形物先后以95%乙醇、无水乙醇、丙酮依次洗涤、真空干燥(50 °C)，即得枸杞多糖粗粉^[3]。

1.2.2 多糖含量的测定方法

蒽酮-硫酸试剂的配制^[47]：准确称取200.0 mg 蒽酮，溶于浓硫酸中，再定容于100mL 棕色容量瓶中，配成2.0000 g/L 的试剂，当日配制当日使用。

标准曲线的绘制：精确称取100.00mg 葡萄糖(于105°C烘干至恒重)。用蒸馏水溶解后定容于100mL 容量瓶中，准确从中分别吸取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL 置于6 个100mL 容量瓶中蒸馏水定容，然后各吸取2.0mL 分别加入到6支20mL带塞试管中，以蒸馏水做空白对照，各试管中再分别加入8.0 mL 蒽酮-硫酸试剂，加完后立刻置冰水中冷却5min，再将7支试管同时浸入沸水浴中，加热10min 后取出，于水中冷却至室温，620nm 波长处测定其吸光度。测定结果用最小二乘法作线性回归，得方程为： $A = 0.0771 C + 0.1625$ ， $r = 0.9993$ A（吸光度）；C（葡萄糖浓度）。

多糖含量的换算因子的计算：精确称取制备的枸杞多糖粉末4 mg，干燥至恒重。按照上述2.1.2的方法测定吸光度（A）和葡萄糖浓度（C），按下式计算得换算因子 $f=4.84$ 。 $f=W/(C \times D)$ 式中，W为精制多糖质量(mg)；C为多糖稀释液中葡萄糖浓度

(mg/mL); D为多糖的稀释因素。

1.2.3 多糖含量的测定

多糖含量的计算公式如下： $E(\text{mg/g})=C \times D \times f/W$ 式中，C 为多糖稀释液中葡萄糖浓度(mg/mL)，D 为多糖的稀释因素，F 为换算因子，W 为实验样品的质量(g)。由以上公式计算得出枸杞多糖含量。经三次重复实验所测得多糖含量，计算平均值，得出枸杞多糖的含量为8.33%(见表 1)。

表1 重复性实验
Table 1 Repeat experiments

Repeatability	1	2	3	Mean value
Content of Polysaccharid (%)	8.36	8.29	8.34	8.33

1.3 柴达木枸杞的单糖组成研究

1.3.1 材料与仪器

柴达木枸杞于 2008 年 8 月采自柴达木盆地腹地的诺木洪农场,干燥处理后备用。1 HP-3D 毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司),毛细管总长 58.5 cm,有效柱长为 50 cm,内径为 50 μm (河北省永年锐沣色谱器件有限公司), PHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。单糖 (美国 sigma 公司), 硼砂 (分析纯, 徐州试剂二厂), 水为 Milli-Q 超纯水。其它试剂皆为分析纯。

1.3.2 枸杞多糖的制备

取经干燥处理后的枸杞子 10g, 用氯仿: 甲醇(2:1) 60 $^{\circ}\text{C}$ 下回流脱脂2次, 滤出溶剂, 残渣挥干溶剂后置锥形瓶中加入10倍体积85%乙醇超声提取2次, 每次 30 min, 过滤, 待残渣中的乙醇挥干后, 加水适量超声提取 2 次, 过滤, 滤液浓缩至原体积

的 1/3, 然后用Sevag试剂 (正丁醇:氯仿= 1:4) 除蛋白, 1%的粉状活性炭脱色,加3倍体积的无水乙醇使之沉淀,将沉淀先后用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤两次,真空干燥,得浅灰色多糖粉末。

1.3.3 柴达木枸杞多糖单糖组成分析

多糖水解 称取枸杞多糖样品 12.0mg, 加 2mol/L 三氟乙酸 (TFA) 1mL, 封口后于 110℃水解 6h, 放冷后氮气吹干, 加 2000μL 水溶解备用糖的衍生化。

糖的衍生化 向 2mL 安瓿瓶中依次加入 200μL 0.05mol/L 的 NMP 乙腈溶液配、50μL 多糖水解液、40μL 17%氨水, 封口后于 70℃水浴中反应 35min, 取出放冷后用氮气吹干, 加 500μL 乙腈水溶液 (体积比为 4:1) 超声溶解供毛细管电泳分析。衍生化过程如图 1

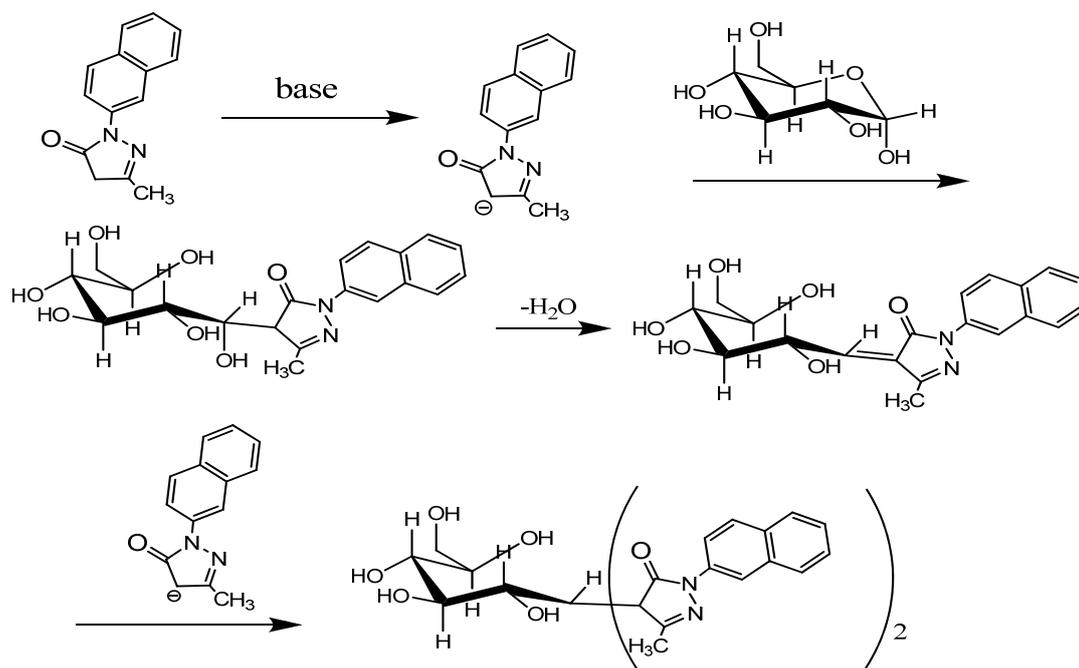


图1 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮(NMP)与还原性单糖衍生反应示意图

Fig. 1 Derivatization scheme of NMP with reductive saccharides

电泳条件 硼酸盐浓度 55mmol/L, pH =9.46, 柱温 20℃, 分离电压 22 kV, 50 mbar 压力进样, 进样 8s, 254nm 检测。实验前对缓冲溶液进行超声脱气 5min, 每次进样

之前, 分别用 0.1mol/L NaOH 溶液、超纯水、硼砂缓冲液冲洗毛细管柱 5min。

1.3.4 结果与讨论

1.3.4.1 线性回归方程、重现性和回收率

单糖衍生物进样量在 1000pmol~ 31.125pmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,各单糖衍生物的回归方程、相关系数和检测限见表2 与 表3。

枸杞多糖水解液中分别加入10 μ L 浓度为1.1 mol /L 的单糖标准溶液,按照上述方法进行衍生,重复3次所得的各单糖的回收率在95.17%~103.17%。

表2 单糖衍生物的线性回归方程、相关系数、检测限

Table 2 The linear regression equation, correlation coefficient, detection limit of the monosaccharide derivatives

Carbohydrates	Regression equation	R	Detection limit/pmole
木糖(Xyl)	$Y=1.90591X-0.25684$	0.9996	0.886
阿拉伯糖(Ara)	$Y=2.0458X+0.42542$	0.9997	0.850
葡萄糖(Glc)	$Y=1.41938X+0.78782$	0.9991	1.263
鼠李糖(Rha)	$Y=1.54032X-1.63403$	0.9980	1.488
甘露糖(Man)	$Y=1.73246X-1.76493$	0.9989	1.344
岩藻糖(Fuc)	$Y=1.87222X-0.30456$	0.9995	1.602
半乳糖(Gal)	$Y=2.23051X-0.30982$	0.9998	1.016
葡萄糖醛酸(GlcUA)	$Y=1.27261X-1.89004$	0.9998	2.193
半乳糖醛酸(GalUA)	$Y=2.15725X-3.32697$	0.9997	1.437

X:浓度(μ mol/L); Y:峰面积

表3 单糖衍生物的分离参数

Table 3 The separation parameters of monosaccharide derivatives

carbohydrates	Migration time	Theory plates	Resolution	Selectivity
木糖(Xyl)	12.801	324220	3.02	1.05
阿拉伯糖(Ara)	13.201	283732	4.22	1.03
葡萄糖(Glc)	13.333	302240	1.34	1.01
鼠李糖(Rha)	13.645	232085	2.96	1.02
甘露糖(Man)	14.478	274863	7.44	1.06
岩藻糖(Fuc)	14.706	169120	1.79	1.02
半乳糖(Gal)	15.242	275614	4.13	1.04
葡萄糖醛酸 (GlcUA)	16.799	271871	12.7	1.1
半乳糖醛酸 (GalUA)	17.942	256813	8.94	1.07

分析条件: 55 mmol/L 硼酸盐, pH=9.46, 温度 20 °C, 电压 22 kV, 10 s 进样, 毛细管长 58.5 cm, 内径 50 μ m, 有效长度 50 cm, 检测波长 254 nm.

1.3.4.2 NMP衍生单糖迁移时间和峰面积的重现性

在最优化条件下, 连续进样六次, 得 NMP 衍生单糖迁移时间和峰面积的重现性, 如表 4 所示:

表4 NMP 衍生单糖迁移时间和峰面积的重现性

Table 4 The migration time and peak area reproducibility of the monosaccharide derivatives

RSD (%)	Xyl	Ara	Glc	Rha	Man	Fuc	Gal	GlcUA	GalUA
Migration time	0.48	0.48	0.46	0.44	0.44	0.46	0.47	0.48	0.45
Peak area	4.8	4.6	3.4	3.5	3.8	4.3	3.2	4.2	3.3

1.3.4.3 样品测定

按照 2.3 中的电泳条件对 9 种糖的衍生化合物和柴达木枸杞多糖样品进行了分离, 标准品与样品的衍生物分离色谱图见图2, 图3, 结果表明在以上电泳条件下可以实现9种糖的快速基线分离, 柴达木枸杞多糖组成见图4, 其中阿拉伯多糖含量最高, 其次为半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖、木糖、葡萄糖醛酸、甘露糖、葡萄糖。

图2 9种糖类衍生物毛细管区带电泳分离图

Fig.2 Chromatogram of standard derivatives by Capillary Electrophoresis

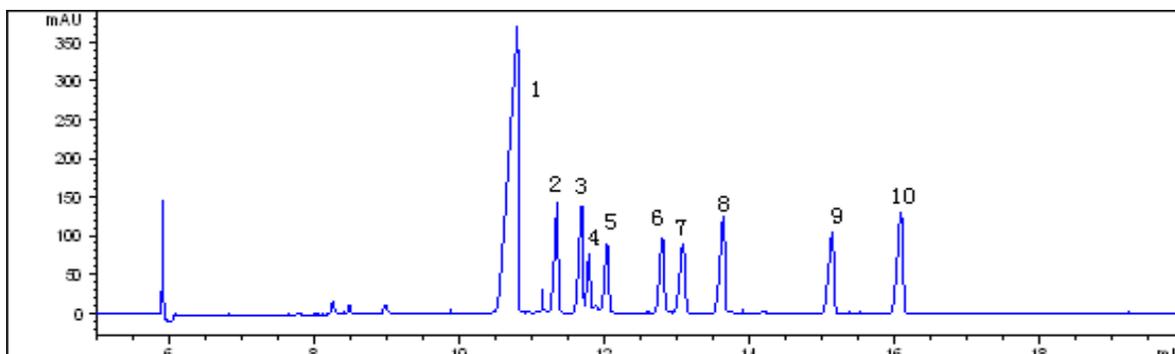
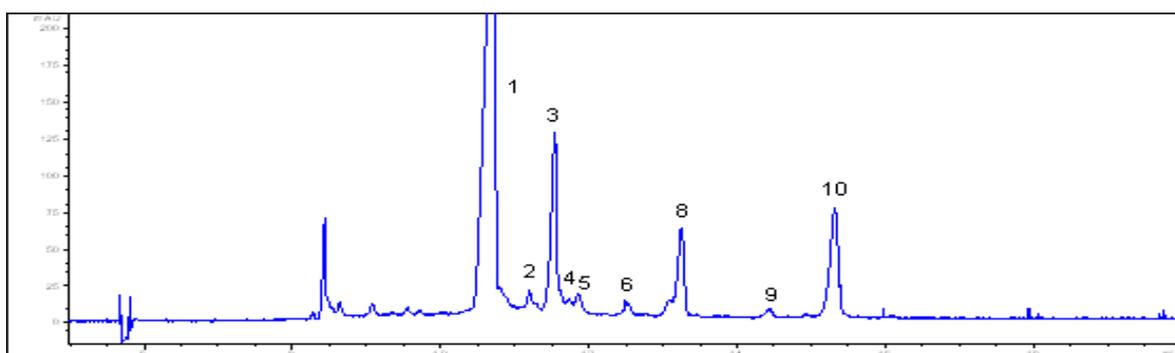


图3 实际样品的毛细管区带电泳分离图

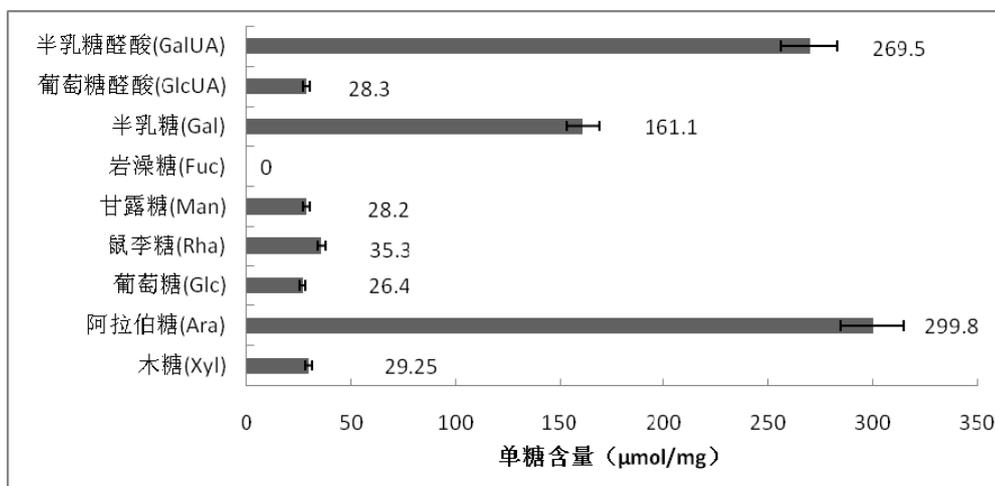
Fig.3 The chromatogram of the sample by Capillary Electrophoresis



1. NMP; 2.木糖(Xyl); 3.阿拉伯糖(Ara); 4.葡萄糖(Glc); 5.鼠李糖(Rha); 6.甘露糖(Man) ; 7. 岩藻糖(Fuc) ; 8.半乳糖(Gal); 9; 葡萄糖醛酸(GlcUA) ; 10; 半乳糖醛酸(GalUA)

图4 柴达木枸杞多糖中单糖的组成

Fig 4 The composition of monosaccharide in LBP



1.4 柴达木枸杞多糖抗氧化活性研究

1.4.1 实验仪器与材料

紫外扫描分光光度仪（美国 Varian 公司），柴达木枸杞多糖，二苯代苦味酰基自由基 DPPH·、β-胡萝卜素、亚油酸、抗坏血酸、单糖、2, 6-二叔丁基对甲酚 BHT（均从美国 sigma 公司购买），水为 Milli-Q 超纯水。其它试剂皆为分析纯。

1.4.2 试验方法

(1) DPPH·法^[48] 取100μL多糖溶液与1.4mL乙醇混合，然后再加入1mL 0.004% DPPH·乙醇溶液混合均匀，避光室温放置70min，以原溶剂乙醇调零，测定在517 nm处吸光度(重复3次)。用同浓度 Vc 作对比实验。按下式计算DPPH·清除率(IP):

$$IP(\%) = \left(\frac{(DPPH)_{t=70}}{(DPPH)_{t=0}} \right) \times 100\%$$

其中，(DPPH·)_{t=0}表示0时刻体系的吸光度值，(DPPH·)_{t=70}表示70min时刻体系的吸光度值。

(2) β -胡萝卜素-亚油酸体系^[49] 精确称取 10mg β -胡萝卜素溶于10mL 氯仿中, 取 0.2mL β -胡萝卜素-氯仿溶液, 20mg亚油酸, 200mg 吐温 80 混合与圆底烧瓶中, 40℃ 旋转蒸干氯仿至残渣, 加入 50mL 蒸馏水震荡混匀得到乳化液, 取 5mL 乳化液加到含有0.2mL 多糖的试管中混匀迅速在470nm 处测定在“0”时刻的吸光度值, 然后将所有试管逐一置于50℃ 恒温水浴中, 反应一小时后测定吸光度值, 对照样品组用 0.2mL 蒸馏水代替多糖溶液。用不同浓度的 BHT 作对比实验。每组实验均平行三次, 计算公式如下

$$AA(\%) = \left(\frac{DRC - DRS}{DRC} \right) \times 100\%$$

AA (%) 为抑制率, $DRC(\text{对照组}) = [\ln(a/b)/60]$, $DRS(\text{样品组}) = [\ln(a/b)/60]$, a 为 0 时刻的吸光度, b 为 60min 时刻的吸光度。

1.4.3 柴达木枸杞多糖的抗氧化活性

本研究选用DPPH·和 β -胡萝卜素-亚油酸体系对柴达木枸杞多糖的抗氧化活性进行了研究。如结果所示, 在选定的实验条件范围内柴达木枸杞多糖具有一定的抗氧化活性, 其抗氧化活性能力与浓度呈量效关系。二苯代苦味酰基(DPPH·)是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 若受试物能将其清除, 则表示受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧化氢自由基的有效浓度和打断脂质过氧化链反应的作用, 如图5 所示, 对DPPH·的清除率可达到65%, 在 β -胡萝卜素-亚油酸体系反应中抑制率可达到70%, 在两个反应中均表现出良好的抗氧化活性, 以上结果也说明枸杞多糖的抗氧化活性与枸杞延缓衰老功效是一致的。

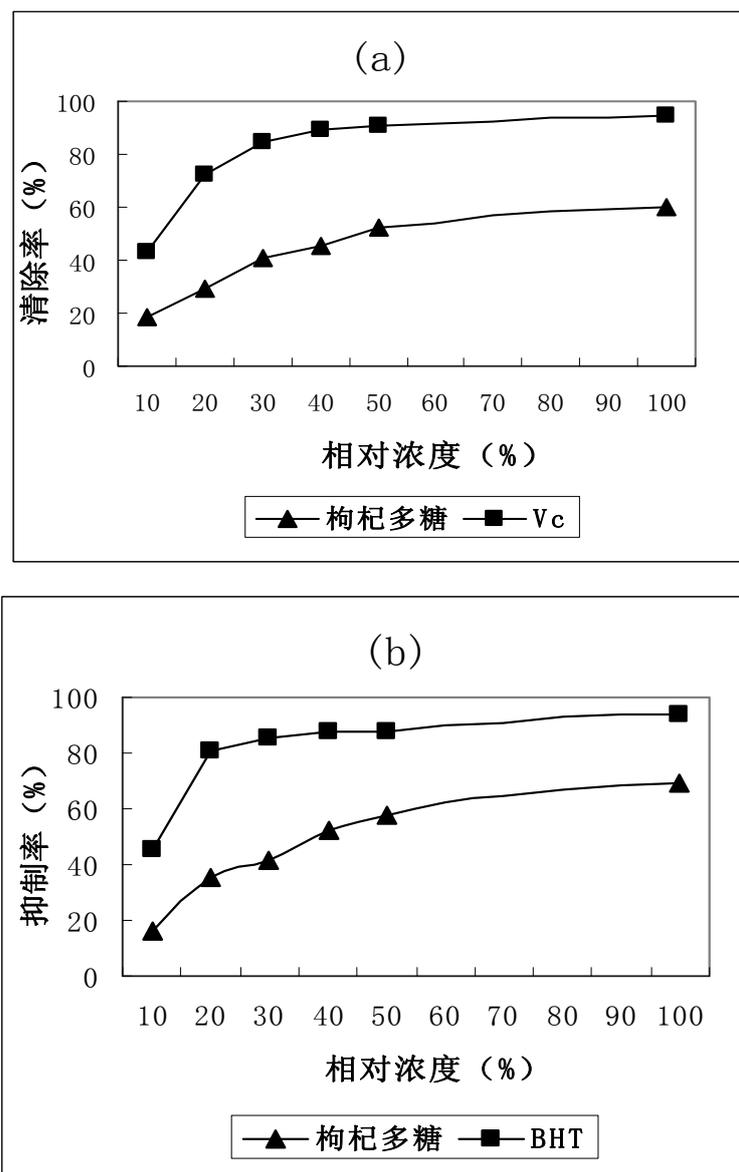


图5 通过清除 DPPH· (a), β -胡萝卜素油脂体系 (b) 对柴达木枸杞多糖抗氧化活性研究
 Fig.5 Antioxidant activity of LBP in DPPH radical-scavenging assay(a) and β -carotene bleaching test(b)

结论

枸杞多糖是枸杞中最主要的活性成分, 本实验利用微波协助提取法提取枸杞多糖, 取得很好的效果, 经三次重复实验测得柴达木枸杞枸杞中多糖含量为8.33%。

为实现对柴达木枸杞多糖中各单糖的有效分离, 对枸杞多糖中可能含有的9种单糖的NMP衍生化合物电泳条件进行了优化, 最终选用硼酸盐浓度55mmol/L, pH=9.46, 柱

温 20℃，分离电压 22kV，50mbar 压力进样，进样 8s，254nm 检测作为电泳条件，实现 9 种单糖的快速基线分离。

随着植物抗氧化研究的不断深入，越来越多与植物体内抗氧化活性成分相关的食品、保健品、化妆品和药品等表现出日益广阔的开发前景。本研究通过清除自由基 DPPH·和β-胡萝卜素-亚油酸体系对枸杞多糖的抗氧化活性进行研究，结果表明枸杞多糖有一定的抗氧化活性，并呈现出量效关系，其中在油脂过氧化体系中其表现的抗氧化能力较强，可为日后柴达木枸杞多糖在食品和药品等领域的开发提供一定依据。

第三章 超临界二氧化碳萃取柴达木枸杞籽油工艺研究

引言

枸杞籽为枸杞加工中的副产品,占整粒的3%,加工1t鲜果可得枸杞籽30kg。枸杞籽油系枸杞籽经压榨或萃取等方法精制而成,油中含有大量的不饱和脂肪酸、VE及磷脂。枸杞油除了有食用价值外,还有医疗保健作用,可以用于对高血压、高血脂、动脉粥样硬化等心脑血管疾病的辅助治疗^[50]。

超临界CO₂ 流体萃取(SFE-CO₂)技术广泛应用于医药、食品、化工等领域。该工艺具有操作方便,且CO₂ 无毒、无味、价廉易得、不易燃,既可以保证提取的天然产物中无溶剂残留又可充分保持其活性^[51]。超临界萃取籽油的报道已经很多,但对枸杞籽油的提取研究报道很少,主要集中在理论数值模拟^[52,53]与简单的单因素实验研究^[54]。采用固定其他因素,改变一个因素的单因素考察法确定工艺条件,不能考察因素之间的相互作用,同时也很难考察多个相应值与因素之间的交互作用关系。响应面法(response surface methodology, RSM)可以采用二次回归方程拟合多个因素与多个响应值之间的函数关系,通过回归方程分析寻求最佳工艺参数^[55-58]。

超临界萃(SC)取技术是利用天然产物在SC 状态下的高溶解能力,而在非SC 状态下的低溶解能力这一特性提取和分离目标成分的。但是SC- CO₂ 是一种非极性溶剂,在提取天然产物中的某些成分时,CO₂ 的萃取效率会因其极性、分子量大、被有关物质结合等因素而大大降低,此时可以考虑添加适当的夹带剂以增强其溶解力和选择性,使极性、分子量大的物质被萃取出来^[59-62]。

本实验对影响枸杞籽油的超临界萃取的主要因素(萃取温度,萃取压力,萃取时间,CO₂ 流量,粒径, 夹带剂)进行研究并通过响应面法对萃取工艺进行了优化,得到超临界萃取柴达木枸杞籽油的最佳工艺。

2.1 实验部分

2.1.1 实验材料

枸杞籽：柴达木枸杞榨汁后分离出来，晾干，粉碎后过筛。

2.1.2 实验试剂与仪器

试剂：CO₂纯度为 99.99%；水为 Milli-Q Gradient 去离子水

仪器：超临界萃取装置(型号：HA221-50-06，江苏南通华安超临界萃取有限公司生产)；粉碎机(9FZ-19 型齿爪式粉碎机，四川省井研县永兴机械厂)；土壤分析筛(南京土壤仪器厂)

2.1.3 试验设计

响应面法以最经济的方式，较少的试验次数和较短的时间对所选的试验参数进行全面研究。根据Box-Behnken 的中心组合试验设计原理，选择影响出油率(Y)的3个主要影响因素：萃取压力 (MPa)，萃取温度 (°C)，夹带剂 (vol.%) 进行组合。以-1、0、1 代表自变量水平，按方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码。其中， x_i 为自变量的编码值； X_i 为自变量的真实值； X_0 为试验中心点处自变量的真实值； ΔX 为自变量的变化步长。试验因素及水平编码见表1。

采用SAS 软件对实验数据进行回归分析，拟合二次多项式方程可以表达为：

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

式中： Y 为预测响应值(枸杞籽油出油率)； x_i 和 x_j 为自变量编码水平； β_0 为常数项； β_i 为线性回归系数； β_{ii} 为二次项回归系数； β_{ij} 为交互项回归系数。多项式模型方程拟合可靠性由 R^2 表达，其统计学上的显著性由 F 值检验。影响因素的线性效应、平方 效应及其交互效应的显著性由模型系数的 P 值检验。

Table 1. 枸杞籽油提取响应面分析因素水平及编码

Table 1 Codes and levels of independent variables of extraction conditions in RSM design

Symbols	Independent variable	Coded levels		
		-1	0	+1
X ₁	P (MPa)	15	22.5	30
X ₂	T(°C)	30	40	50
X ₃	M (vol.%)	0	7.5	15

2.2 超临界提取工艺优化

2.2.1 粒径对萃取率的影响

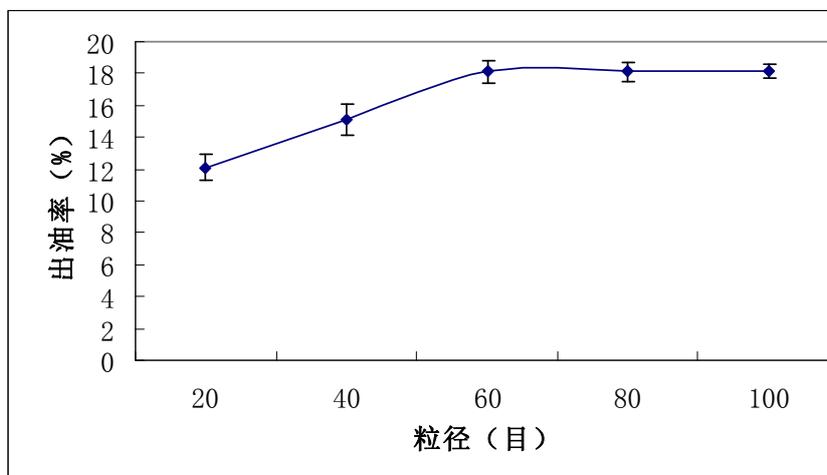


图 1 粒径对萃取率的影响

Fig.1 Effect of the powder size on the oil yielded

物料粒径对超临界流体萃取的影响主要体现在以下三个方面：有效传质面积、颗粒床层的空隙率和超临界流体的渗透力。减小颗粒粒度将会增大颗粒群的比表面积，且超临界流体容易渗透到颗粒内部，有利于提高萃取率。但粒度太小，颗粒间的接触面积将大大增加，致使有效传质面积降低，萃取率降低；同时由于颗粒床层

空隙率降低，将产生严重的“沟流”现象，对萃取操作极为不利。不同粒径得到的萃取率见图2。可以看出粒径从20~60目萃取率逐渐增加，但从60目~100目萃取率变化很小，而且当粒径小于60目时筛选比较困难，因此，我们选择粉碎粒径为60目进行以后的实验。

2.2.2 Box-Behnken 的中心组合设计试验结果及分析

枸杞籽油出油率见表2，采用SAS 程序对所得数据进行回归分析，试验数据的模型拟合结果见表3。由表3 可见得到的模型的 R^2 值为0.9895，说明通过二次回归得到的枸杞籽出油率的模型与实验拟合较好，可靠性高。从表3 可知,模型整体为极显著水平,表明回归模型与试验结果数据吻合良好；同时失拟检验中 $P > 0.05$,表明回归模型无失拟因素存在,该模型可用于此试验结果的预测和分析。对试验数据进行回归拟合,得多元二次回归模型:

$$Y = 19.11 + 4.83X_1 + 1.33X_2 + 2.46X_3 + 1.44X_1^2 - 1.40X_2^2 + 1.21X_3^2 - 2.26X_1X_2 - 3.41X_1X_3 - 2.03X_2X_3$$

表 2 Box-Behnken 的中心组合设计试验结果及分析(n=3)

Table 2 Experimental data for the peak area obtained from Box–Behnken design (n=3)

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Oil yield
1	22.50	40.00	7.50	19.19
2	15.00	30.00	7.50	9.37
3	22.50	40.00	7.50	19.61
4	30.00	40.00	0.00	19.41
5	22.50	30.00	0.00	10.72
6	22.50	40.00	7.50	19.30
7	15.00	50.00	7.50	8.93
8	22.50	40.00	7.50	18.38
9	15.00	40.00	15.00	13.02
10	30.00	40.00	15.00	21.00
11	22.50	40.00	7.50	19.06
12	30.00	50.00	7.50	20.37
13	15.00	40.00	0.00	5.85
14	22.50	50.00	0.00	11.17
15	22.5	30	15	13.74
16	22.50	50.00	15.00	19.04
17	30.00	30.00	7.50	15.06

表 3 回归模型中回归系数及显著性分析

Table 3 Regression coefficients and significance analysis

	系数	标准误差	DF	F 值	显著性
常变量	19.11	0.33	1	73.10	< 0.0001
B_1	4.83	0.26	1	333.55	< 0.0001
B_2	1.33	0.26	1	25.16	0.0015
B_3	2.46	0.26	1	86.13	< 0.0001
β_{11}	1.44	0.37	1	14.75	0.0064
β_{22}	-1.40	0.37	1	13.89	0.0074
β_{33}	1.21	0.37	1	10.49	0.0143
β_{12}	-2.26	0.36	1	38.43	0.0004
β_{13}	-3.41	0.36	1	87.57	< 0.0001
β_{23}	-2.03	0.36	1	30.86	0.0009
Lack of fit				4.98	0.078
R^2	0.9895		Adjusted R^2	0.9759	

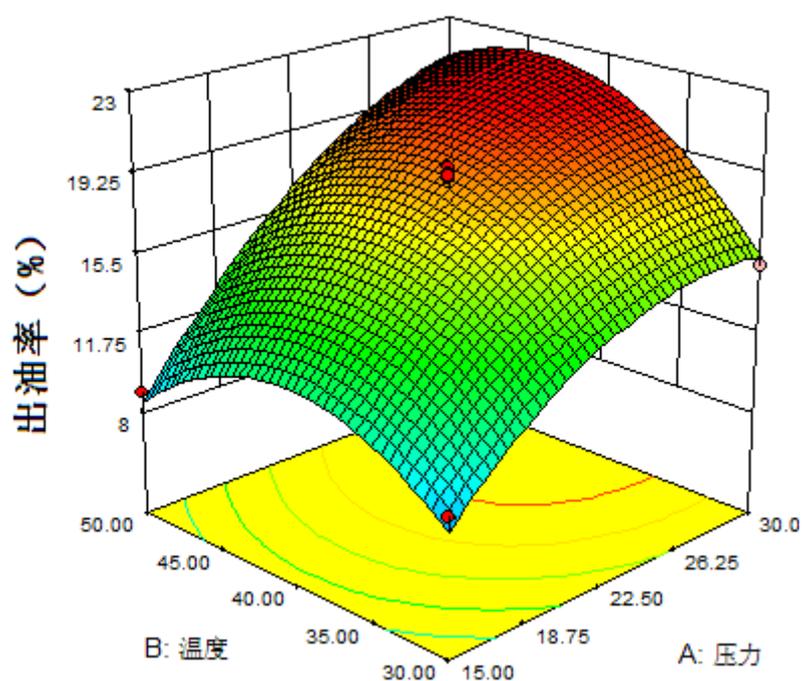
2.2.3 萃取工艺优化

表 3 为模型中各项系数估计值以及各项对试验结果的影响显著性分析,可见在 3 个因素中,影响最显著的因素是萃取压力,影响作用从大到小依次为:萃取压力>萃取温度>夹带剂。

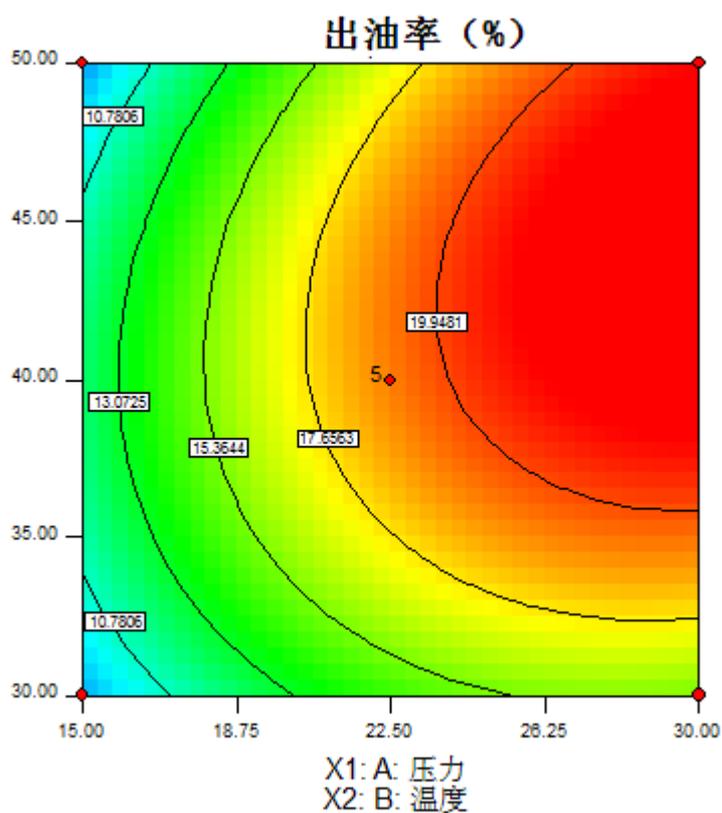
通过响应面三维及等高线图,可直观地反映各因素的交互作用对响应值的影响,从而确定最佳工艺参数范围。由于响应面图为三维图,只能表达含两个影响因素的函数,故应固定其中一个影响因素。图2中,夹带剂的量(X_3),固定为编码0,即夹带剂为7.5 vol.%,绘制萃取压力与萃取温度对出油率的影响的三维及等高线。比较响应面三维图可知,萃取压力与萃取温度之间交互作用显著($P < 0.05$),并且在所选范围内存在响应面最高点,随着萃取压力的升高,出油率不断增加。随着温度由30 °C 升高到45 °C,出油率一直升高,但当温度超过45 °C时,随着温度的升高出油率不断下降。

图3中,萃取温度(X_2)固定为编码0,即夹带剂为 40 °C,绘制萃取压力与夹带剂对出油率影响的三维及等高线。比较响应面三维图可知,萃取压力与夹带剂间交互作用显著($P < 0.05$),随着夹带剂的用量的增加至9.0 vol.% 附近,出油率一直升高,当夹带剂的量达到一定值以后,随着夹带剂的用量增加,出油率无明显变化。

图4,萃取压力(X_1)固定为编码0,即夹带剂为 22.5 MPa,绘制萃取温度与夹带剂对出油率影响的三维及等高线,比较响应面三维图可知,夹带剂与萃取温度之间交互作用显著($P < 0.05$)。通过回归拟合方程我们得出最佳提取工艺: $X_1 = 0.805$; $X_2 = 0.002$; $X_3 = -0.083$ 即 萃取压力为28.54 MPa; 萃取温度为40.2 °C; 夹带量为 6.88 vol.%。在此条件下实际出油率为21.02% 与预测值相差 0.39%,与模型比较吻合。



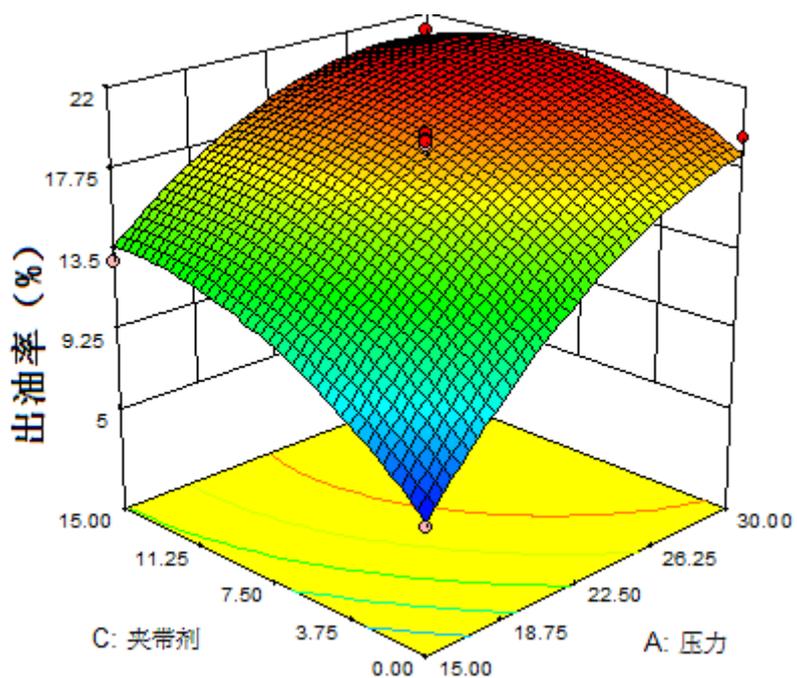
萃取压力与萃取温度对出油率影响的响应面图



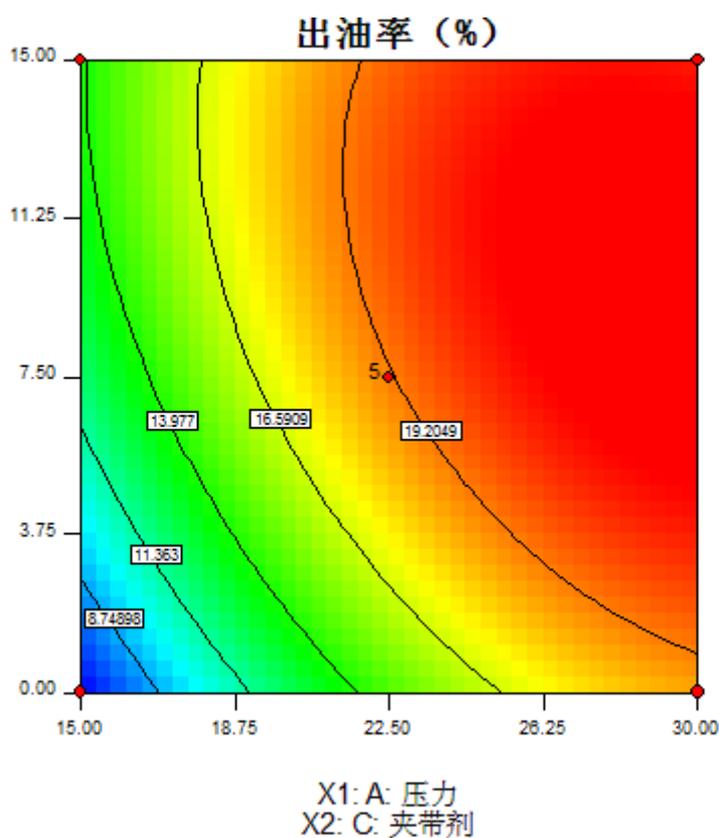
萃取压力与萃取温度对出油率影响的等高曲线图

图 2 萃取压力与萃取温度对出油率影响

Fig 2 Effect of extraction pressure and temperature on the oil yields



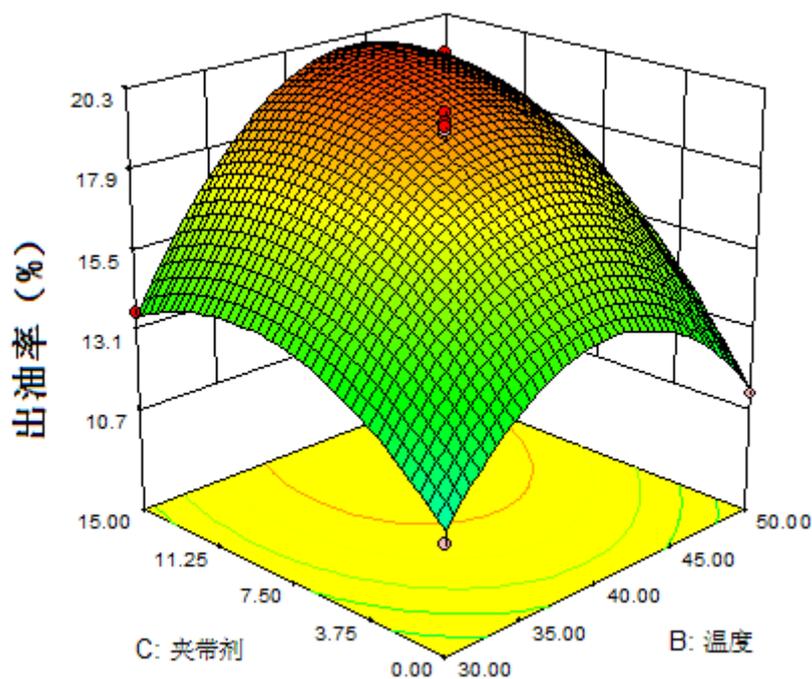
萃取压力与夹带剂对出油率影响的响应面图



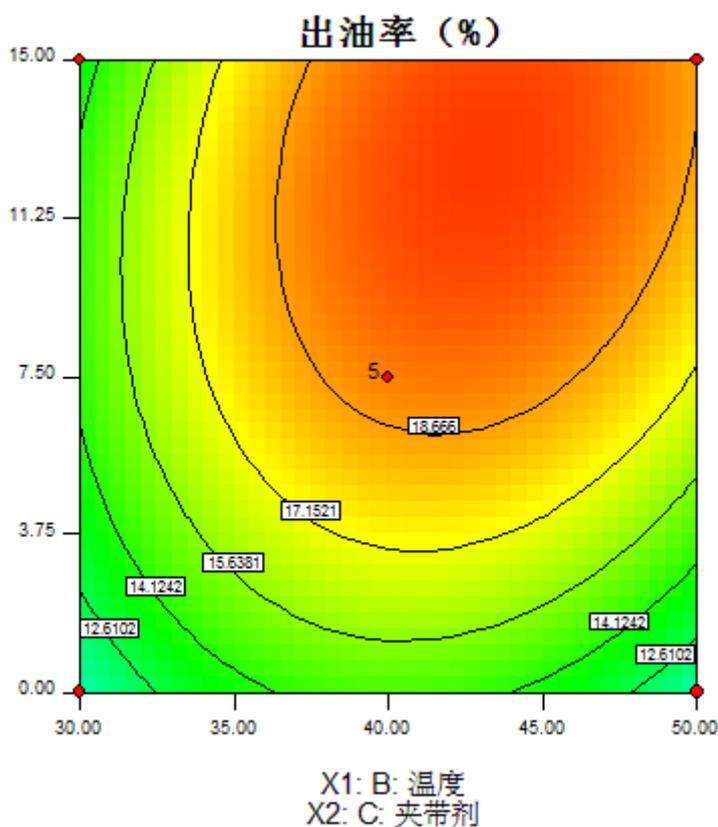
萃取压力与夹带剂对出油率影响的等高曲线图

图3 萃取压力与夹带剂的量对出油率的影响

Fig 3 Effect of extraction pressure and amount of modifier on the oil yields



萃取温度与夹带剂对出油率影响的响应面图



萃取温度与夹带剂对出油率影响的等高曲线图

图 4 萃取温度与夹带剂的量对出油率的影响

Fig 4 Effect of extraction temperature and amount of modifier on the oil yields

结论

通过响应面优化，我们最终得出提取柴达木枸杞籽油的最佳提取工艺： $X_1 = 0.805$ ； $X_2 = 0.002$ ； $X_3 = -0.083$ 即 萃取压力为28.54MPa；萃取温度为40.2 °C；夹带量为 6.88 vol.%。在此条件下实际出油率为21.02% 与预测值相差 0.39%，与模型比较吻合。

第四章 柴达木枸杞籽油中脂肪酸的柱前衍

HPLC-FLD-APCI/MS 分析

引言

分子中含有羧基的化合物称为羧酸。根据与羧基相连的烃基的不同, 可将羧酸分为脂肪酸和芳香酸, 前者又可分为饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。根据分子中所含羧基数目的不同, 可将羧酸分为一元酸、二元酸、多元酸。自然界存在的脂肪中, 含有大量的高级的一元饱和羧酸, 因此一元饱和羧酸亦称为脂肪酸。脂肪是动植物体内脂肪贮藏细胞的主要成分, 也是有机体的重要储备物质之一, 我们可以将这些动植物脂肪——固态的常称为脂(fat), 液态的常称为油(oil)——萃取出来, 从而获得了诸如牛脂、羊脂、玉米油、花生油等。从化学角度讲, 脂肪是甘油与各种羧酸形成的甘油酯。

脂肪酸在紫外-可见光区吸收较弱, 光度法难以准确测定^[63]。脂肪酸分析方法已有大量报导, 最常见的是 GC-MS 法。GC-MS 法常采用酸催化法^[64]与碱催化法^[65]制备脂肪酸甲酯化产物, 普通实验室即可实现, 成本低, 速度快。已报导的波棱瓜子油中脂肪酸的分析方法都是采用 GC 或 GC-MS 法^[66-68], 但该法的缺点是灵敏度欠佳, 稳定性差, 衍生重现性不够理想等。高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FLD)分析脂肪酸国外报导较多, 它具有较高的灵敏度, 已报导的用于羧酸类化合物的标记试剂主要有: 溴代香豆素类、重氮甲烷类、联氨类、胺类、醇类及磺酸酯类化合物。溴代香豆素类标记试剂主要有: 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素(Br-MMC)^[69]、4-溴甲基-6,7-二甲氧基香豆素(Br-DMC)^[70]、4-溴甲基-6,7-二氧亚甲基香豆素(Br-MDC)^[71]、4-溴甲基-7-乙酰氧基香豆素(Br-MAC)^[72]等, 但与羧酸的衍生化一般要有 K_2CO_3 催化剂及 18-冠-6 相转移试剂的存在。重氮甲烷类化合物主要有: 9-蒎基重氮甲烷(ADAM)^[73]、1-苾基重氮甲烷(PDAM)^[74]、4-重氮甲基-7-甲氧基香豆素(DAM-MC)^[75]等, 但此类试剂

对潮气及水的稳定性较差。磺酸酯类试剂主要有：2-(2,3-蒎二羧基酰亚胺基)-乙基三氟甲基磺酸酯(AE-OTf)^[76]、2-(2,3-萘二羧基酰亚胺基)-乙基三氟甲基磺酸酯(NE-OTf)^[77]、2-(2-萘氧基)乙基-2-(哌啶子基)乙基磺酸酯(NOEPES)^[78]等，磺酸酯对脂肪酸类化合物的衍生化有理想的衍生化产率，但需在较高温度下，碳酸钾催化剂和冠醚相转移试剂的参与下于苯或甲苯溶剂完成，分离前需预处理，既费时又费力。2002年，Toshimasa Toyo'oka 对这些已报道羧酸衍生试剂进行了评价与展望^[79]。

本文采用本课题组新合成的 2-(11H-苯[a]吡唑)乙基对甲苯磺酸酯 (BCETS) 作为柱前荧光标记试剂，通过响应面分析法，对衍生温度，衍生时间，衍生试剂量进行了优化，并建立了 30 种脂肪酸衍生物的同时分析测定方法，并应用到枸杞籽油中脂肪酸的分析，结果满意。

3.1 实验部分

3.1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱-质谱联用仪 (HPLC-MS, Agilent 公司) 配备四元梯度泵，在线真空脱气机，荧光检测器，100 位自动进样器，大气压化学电离源(APCI)，Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6×150 mm, 5 μm, Agilent 公司)。KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。XH-100A 型微波催化合成/萃取仪(带冷凝回流和磁力搅拌，北京祥鹤科技发展有限公司)。

3.1.2 试剂

BCETS(自制)，30 种脂肪酸标准标品(上海试剂厂)，9 种不饱和脂肪酸标品(Sigma 公司)，枸杞籽油(超临界 CO₂ 萃取)，光谱纯乙腈(ACN, 德国 Merck 公司)，氢氧化钾、盐酸、硫酸(分析纯，西安化学试剂厂)，甲醇(色谱纯，山东禹城化学试剂厂)，其他试剂皆为分析纯，纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。N,N-二甲基甲酰胺

胺(DMF)经减压蒸馏后使用。

3.1.3 HPLC标准液制备

准确取定量脂肪酸标品,用光谱纯乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L 的溶液 (长链脂肪酸需加入少量 DMF 作为助溶剂)。称取 8.32 mg BCETS 用 DMF 定容至 10 mL, 浓度为 0.01 mol/L。低浓度的脂肪酸标准液(1.0×10^{-4} mol/L)用光谱纯乙腈稀释而成。

3.1.4 油样HPLC供试液制备

超临界提取枸杞籽油的条件按照正交试验设计 (表 1) 进行, 提取后的油样进行标号。 籽油前处理过程: 称取 0.1 g 油(精确到 0.0001), 置于 3 mL 的安培瓶中, 加入 2.0 mL DMF 后摇匀待衍生, 9 个正交实验的油样都如此操作。衍生方法: 向盛有 10 mg 无水 K_2CO_3 的 2 mL 安培瓶中依次加入 100 μ L DMF, 100 μ L 上述油样的 DMF 溶液, 200 μ L 衍生试剂溶液(0.01 mol/L), 封口后于 90 $^{\circ}$ C 恒温水浴下振荡反应 30 min, 取 100 μ L 衍生液加入 300 μ L 稀释液后摇匀进样分。

表 1 枸杞籽油提取条件
Table 1 The seed oil extraction conditions

Run	Pressure(MPa)	Time(min)	Temperature($^{\circ}$ C)
1	20	20	40
2	25	40	40
3	30	60	40
4	25	60	45
5	30	20	45
6	20	40	45
7	30	40	50
8	20	60	50
9	25	20	50

3.1.5 衍生条件的优化

BCETS 与脂肪酸的衍生反应随溶剂不同产率有显著差异, 本文分别选取乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF, 干燥后减压蒸馏处理)、四氢呋喃、二甲亚砜(DMSO, 干燥后减压蒸馏处理)作为衍生溶剂体系, 对衍生产率进行了考察。结果表明在其它条件相同的情况下, DMF 和 DMSO 具有最大衍生化产率, 但 DMSO 衍生物洗脱时前面增加两个未知峰(副反应产物), 因而本实验选取 DMF 作衍生化溶剂。实验中选取 K_2CO_3 、 $K_2C_2O_4$ 、酒石酸钾、柠檬酸钾和 NaAc 作碱性催化剂, 对衍生化产率的考察表明: K_2CO_3 具有最高衍生产率。故实验选取 K_2CO_3 作为碱性催化剂。

根据Box -Benhnken 的中心组合试验设计原理, 选择影响衍生效率(Y, 峰面积)的3个主要影响因素: 衍生时间, 衍生温度, BCETS试剂量进行组合。以 -1、0、1 代表自变量水平, 按方程 $x_i = (X_i - X_0) / \Delta X$ 对自变量进行编码。其中, x_i 为自变量的编码值; X_i 为自变量的真实值; X_0 为试验中心点处自变量的真实值; ΔX 为自变量的变化步长。试验因素及水平编码见表2。采用SAS 软件对实验数据进行回归分析, 拟合得到二次多项式方程:

$$Y=1102.39+53.75X_1+202.50X_2-20.08X_3-181X_1^2-368.50X_2^2-76.00X_3^2-7.50X_1X_2+37.50X_2X_3$$

表2 Box-Behnken 试验设计与实验室结果(n=3)

Table 2 Experimental data for the peak area obtained from Box-Behnken design (n=3)

Run	Independent variable			Y (Peak area)
	X ₁ (Amount of BCETS)	X ₂ (Temperature, °C)	X ₃ (Time,min)	
1	4(-1)	80(0)	40(+1)	850
2	12(+1)	80(0)	10(-1)	800
3	4(-1)	80(0)	10(-1)	650
4	4(-1)	100(+1)	25(0)	700
5	12(+1)	100(+1)	25(0)	750
6	12(+1)	60(-1)	25(0)	380
7	8(0)	80(0)	25(0)	1100
8	8(0)	80(0)	25(0)	1050
9	8(0)	60(-1)	10(-1)	450
10	8(0)	100(+1)	40(+1)	900
11	8(0)	60(-1)	40(+1)	500
12	8(0)	80(0)	25(0)	1080
13	8(0)	80(0)	25(0)	1060
14	8(0)	100(+1)	10(-1)	700
15	8(0)	80(0)	25(0)	1120
16	12(+1)	80(0)	40(+1)	1000
17	4(-1)	60(-1)	25(0)	300

通过响应面三维及等高线图,可直观地反映各因素的交互作用对响应值的影响,从而确定最佳衍生条件。由于响应面图为三维图,只能表达含两个影响因素的函数,故应固定其中一个影响因素。图1中,衍生时间(X₃),固定为编码0,即夹带剂为25 min,绘制衍生温度与衍生试剂量对响应值影响的三维及等高线。如图所示随着衍生试剂量得增加衍生效率也随着增加,当衍生试剂量达到一定值时,随着衍生试剂量的增加衍生效率增加不显著。衍生温度从60 °C升到100 °C过程中,随着衍生温度的升高,衍生效率先升高后降低。图2为衍生时间与衍生试剂量对衍生效率的影响。

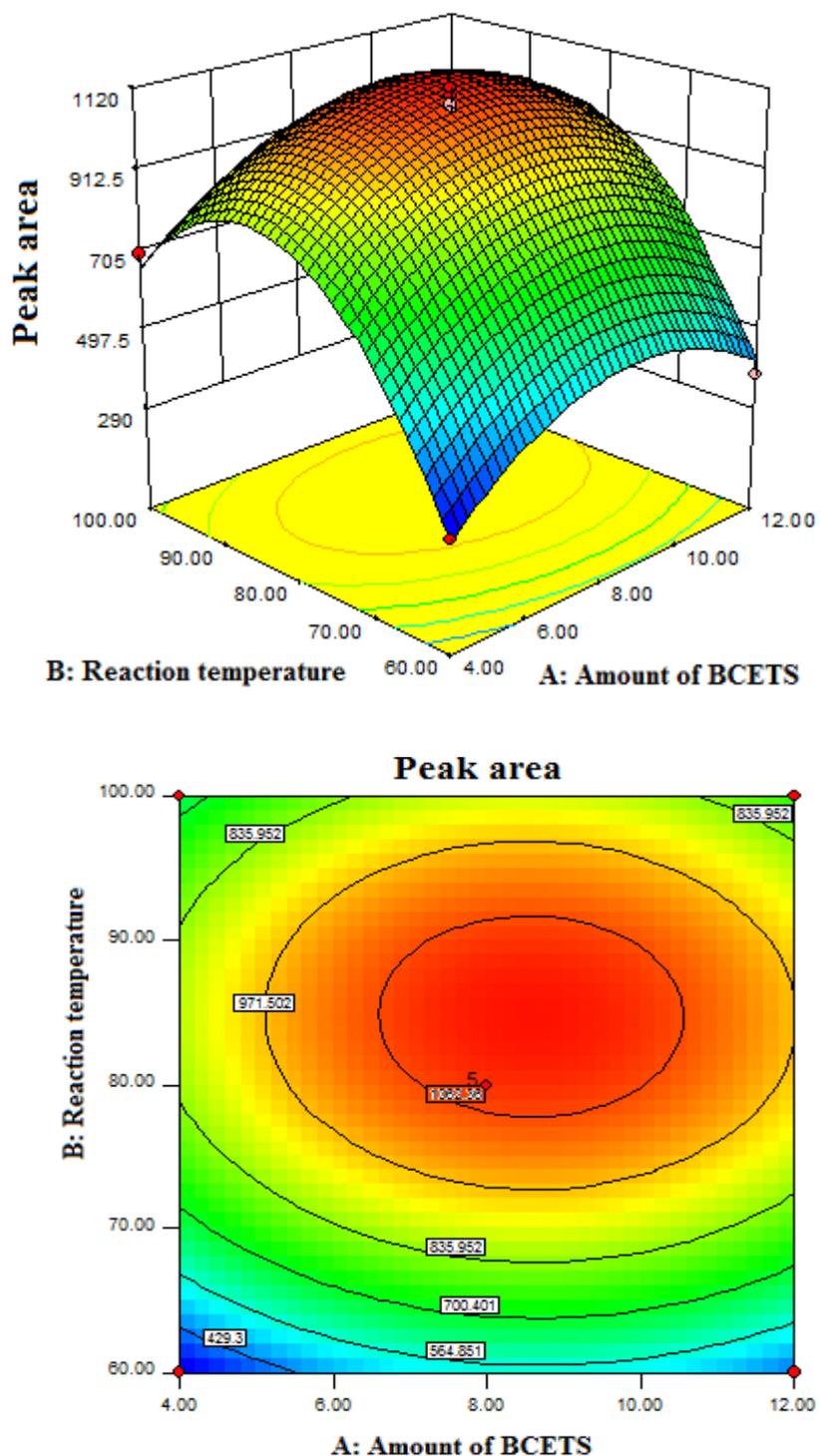


图 1 衍生试剂量与衍生温度对衍生效率的影响

Fig.1 The 3D response surface and 2D contour plots of detection responses (peak area) affected by the amount of BCETS (mol (BCETS)/mol (total fatty acids)) and reaction temperature

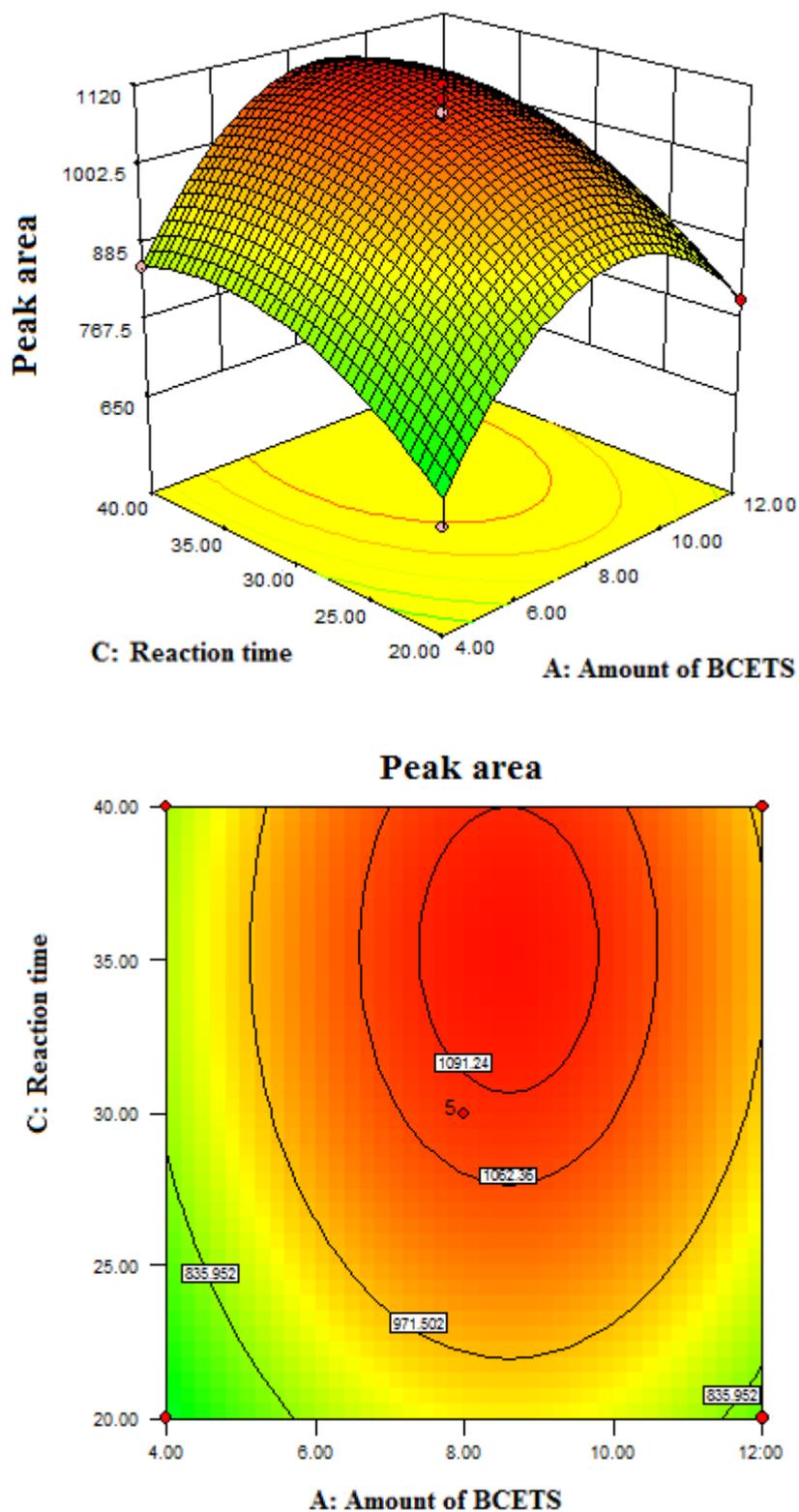


图 2 衍生试剂量与衍生时间对衍生效率的影响

Fig.2 The 3D response surface and 2D contour plots of detection responses (peak area) affected by the amount of BCETS (mol (BCETS)/mol (total fatty acids)) and reaction time

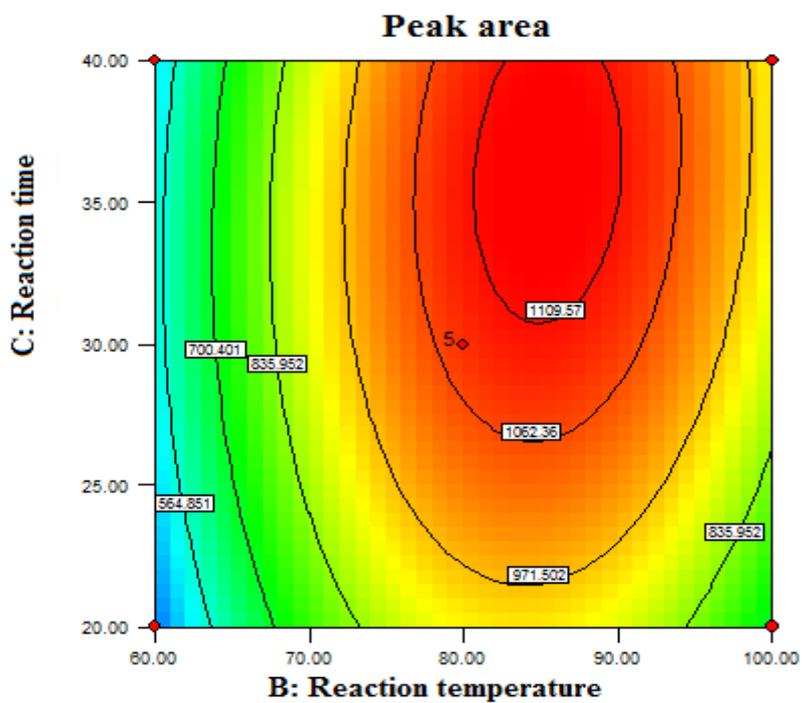
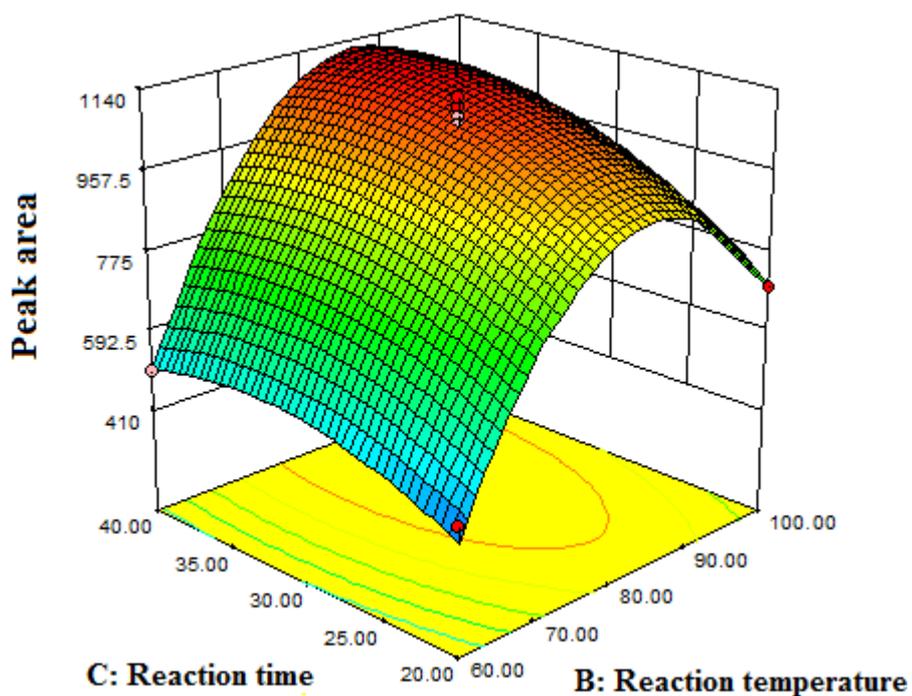


图3 衍生时间与衍生温度对衍生效率的影响

Fig. 3 The 3D response surface and 2D contour plots of detection responses (peak area) affected by reaction time and reaction temperature

通过回归拟合方程我们得出最佳衍生条件：衍生温度 84°C；衍生时间 28min；衍生试剂量/脂肪酸的量=8.8。最佳衍生条件下，得到的实际峰面积为 1174，与预测值相差 21，与模型比较吻合。脂肪酸与 BCETS 衍生示意图见图 4A。质谱裂解模式见图 4B。

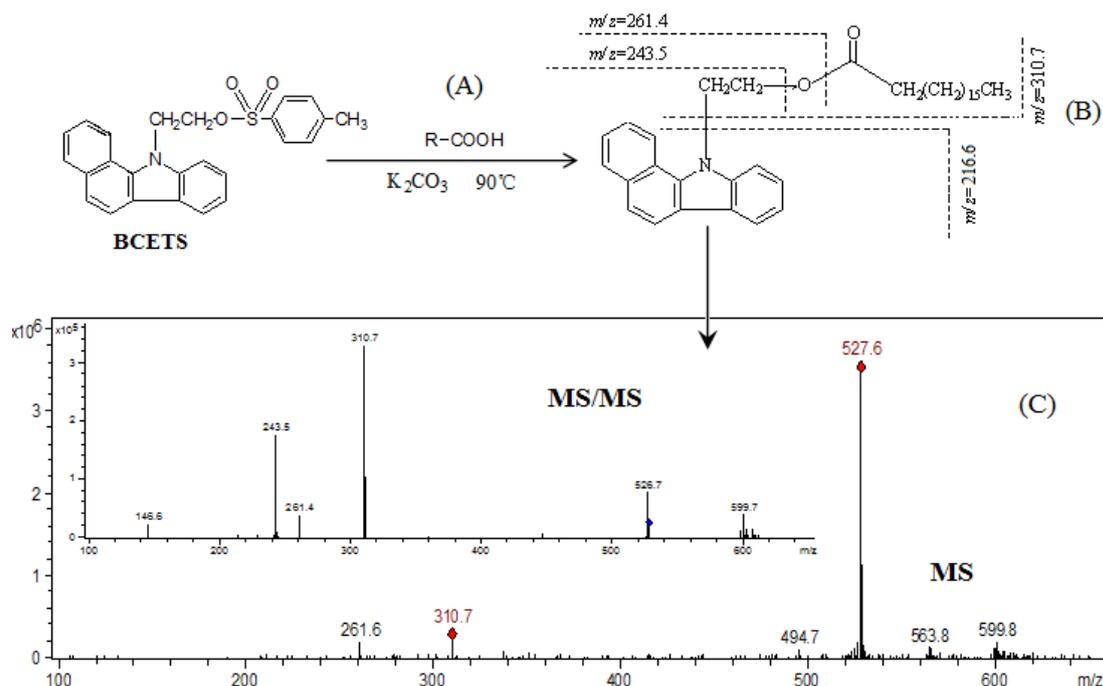


图 4 C₁₈ 酸与 BCETS 衍生过程 (A)，裂解示意图 (B) 与质谱数据 (C)

Fig.4 Derivatization and identification of fatty acids: (A) derivatization scheme of fatty acids with BCETS; (B) the MS/MS cleavage mode of BCETS- C_{18:1}fatty acid derivative; (C) the profile of the molecular ion chromatogram and scanning of the isolated representative derivative of C₁₈ fatty acid with BCETS as labeling agent(MS and MS/MS)

3.1.6 HPLC-MS 分析条件

液相色谱：色谱柱为 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6×150 mm, 5 μm)。流动相 A: 100% 水溶液，B: 乙腈/ N,N-二甲基甲酰胺 (ACN/DMF=1/1, v/v)，C: 100% 乙腈水溶液。流速为 1.0 mL/min，进样量为 10 μL，柱温 30°C。荧光激发和发射波长分别为： $\lambda_{ex} = 279$ nm, $\lambda_{em} = 380$ nm。洗脱梯度如下: 45-10% (A), 50-80% (B) from 0 to 30 min;

10-3% (A), 80-87% (B) from 30 to 40 min; 3-2% (A), 87-88% (B) from 40 to 50 min;
2-0% (A), 88-85%(B) from 50 to 70 min.

3.2 结果与讨论

3.2.1 HPLC色谱分离与质谱鉴定

在流动相 B 中添加溶解能力极强的 DMF，可以使难以洗脱的高碳长链脂肪酸实现快速洗脱，避免过长的分离时间。按前述实验条件，30 种标准脂肪酸衍生物获得完全分离，代表图谱见图 5A。各组分经液相色谱分离荧光检测后，直接进入柱后串联质谱进行定性鉴定，各组分质谱数据见表 3

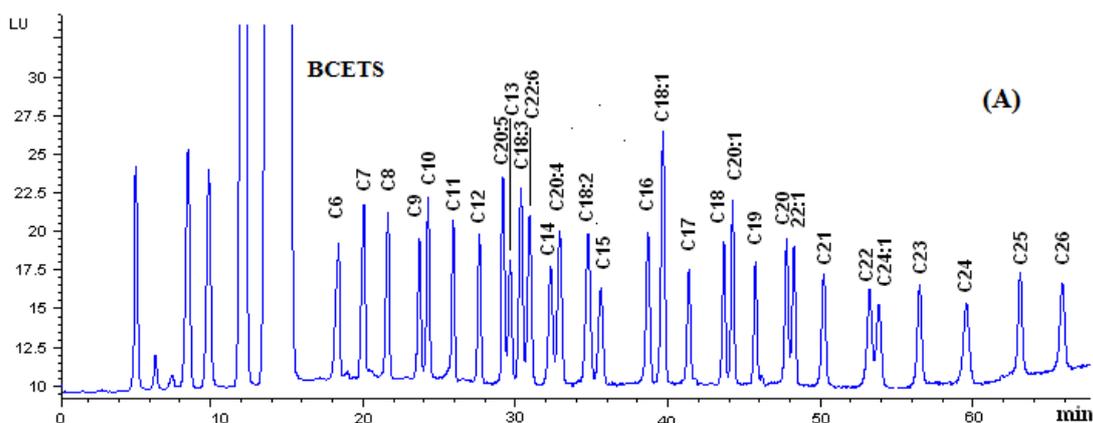


图 5A 标准脂肪酸衍生物的色谱分离图
Fig.5A Chromatogram of standard fatty acid derivatives

峰标注(peak labels): C6 (己酸, hexanoic acid); C7 (庚酸, heptanoic acid); C8 (辛酸, octoic acid); C9 (壬酸 pelargonic acid); C10 (癸酸, decaoic acid); C11 (十一酸, undecanoic acid); C12 (十二酸, dodecanoic acid); C20:5 (5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid, 5,8,11,14,17-二十碳五烯酸); C13 (十三酸, tridecanoic acid); C18:3 (8,11,14-octadecatrienoic acid, 8,11,14-十八碳三烯酸); C22:6 (2,5,8,11,14,17-docosahexenoic acid, 2,5,8,11,14,17-二十碳六烯酸); C14 (十四酸, tetradecanoic acid); C20:4 (6,9,12,15-arachidonic acid, 6,9,12,15-二十碳四烯酸); C18:2 (9,12-octadecadienoic acid, 9,12-十八碳二烯酸); C15 (十五酸, pentadecanoic acid); C16 (十六酸, hexadecanoic acid); C18:1 (12-octadecenoic acid, 12-十八碳烯酸); C17 (十七酸, heptadecanoic acid); C18 (十八酸, octadecanoic acid); C20:1 (11-eicosenoic acid, 11-二十碳烯酸); C19 (十九酸, nonadecanoic acid); C20 (二十酸, eicosoic acid); C22:1 (12-docosenoic acid, 12-二十二碳烯酸); C21 (二十一酸, heneicosoic acid); C22 (二十二酸, docosanoic acid); C24:1 (20-tetracosenoic acid, 20-二十四碳烯酸); C23 (二十三酸, tricosanoic acid); C24 (二十四酸, tetracosanoic acid); C25 (二十五酸, pentacosanoic acid); C26 (二十六酸, hexacosanoic acid)

3.2.1 检测线，线性回归方程与重现性

在相同实验条件下，对同一份脂肪酸标品进行六次平行衍生，相同稀释后进样计算保留时间和峰面积重现性(表 3)，保留时间 RSD 小于 0.24%，峰面积 RSD 小于 2.96%。各种脂肪酸的检测线为 10.79 ~ 34.19 fmol (表 3)。各脂肪酸的线性回归系数大于 0.9994 (表 3)。

3.2.2 不同提取条件下枸杞籽油中的游离脂肪酸分析

按前述实验条件，对实际样品衍生后进行色谱分离及质谱鉴定，色谱分离见图 5B。不同提取条件下籽油中的游离脂肪酸组成见表 4 与表 5。柴达木枸杞籽油中不饱和脂肪酸占总游离脂肪酸 81.3%。含量由高到低分别是：C18:2, C18:1, C22:6, C18:3, C20:1 and C20:5。饱和脂肪酸主要是 C16, C18 and C20。

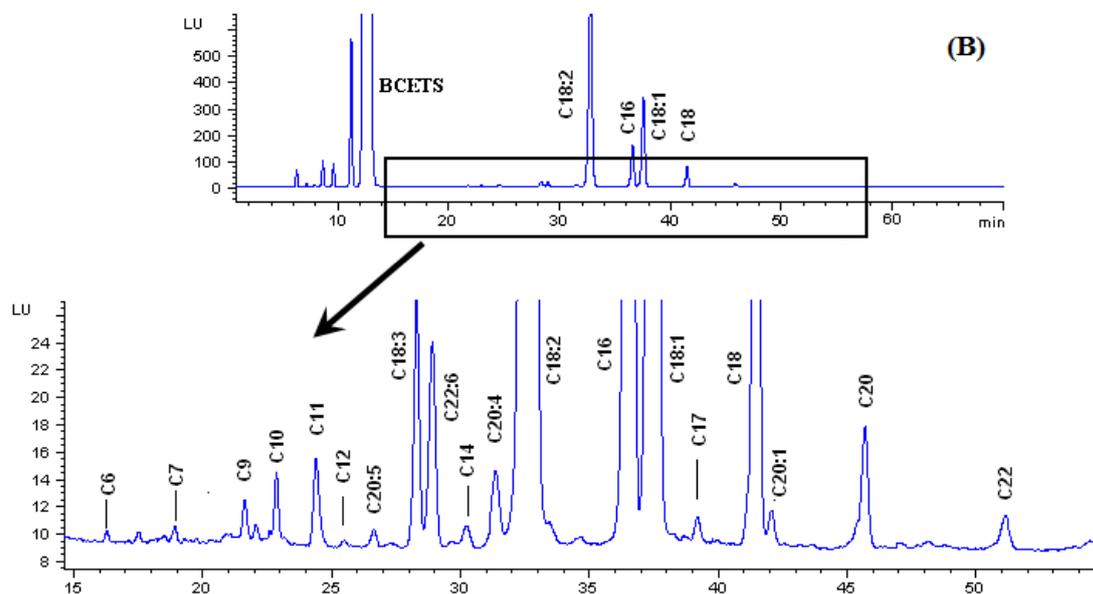


图 5B 超临界萃取油中脂肪酸衍生物的 HPLC 色谱图
Fig. 5B HPLC chromatogram of fatty acid derivatives from extracted oil

表3 脂肪酸衍生物裂解质谱数据, 相对保留时间与相对峰面积, 线性系数

Table 3 MS data of BCETS fatty acid derivatives, correlation coefficients, detection limits, and repeatability of peak area and retention time

Fatty acids	Molecular weight	[M+H] ⁺	Specific MS/MS data	Correlation coefficient	Detection limit/fmol	time RSD(%)	Peak area RSD(%)
C5	345	346.2	216.6, 129.2	0.9998	20.79	0.21	0.47
C6	359	360.2	216.6, 133.2	0.9997	23.67	0.18	0.70
C7	373	374.1	216.8, 157.6	0.9994	17.07	0.13	0.59
C8	387	388.3	216.6, 171.3	0.9999	32.06	0.10	0.58
C9	401	402.3	216.6, 185.4	0.9997	20.25	0.09	0.49
C10	415	416.3	216.8, 199.5	0.9995	19.76	0.073	0.40
C11	429	430.1	216.7, 213.4	0.9994	20.25	0.084	0.50
C12	443	444.3	216.8, 227.3	0.9998	18.92	0.062	0.47
C20:5	545	546.1	216.6, 328.6, 528.2	0.9996	16.32	0.061	0.38
C13	457	458.3	216.6, 231.2	0.9994	34.19	0.056	0.22
C18:3	521	521.9	215.6, 304.9, 503.9	0.9996	15.65	0.059	0.25
C22:6	571	572.1	215.4, 354.9, 553.8	0.9998	16.19	0.059	0.30
C14	471	472.3	216.4, 255.6	0.9994	20.79	0.044	0.27
C20:4	547	547.9	217.0, 330.9, 529.9	0.9999	15.18	0.072	0.33
C18:2	523	523.9	216.6, 306.7, 516.0	0.9996	14.26	0.037	0.27
C15	485	486.3	216.8, 269.6	0.9994	12.06	0.041	0.19
C16	499	500.2	216.7, 283.5	0.9994	10.79	0.035	0.11
C18:1	525	525.8	216.7, 309.0, 507.7	0.9994	12.32	0.029	0.14
C17	513	514.4	216.7, 297.1	0.9998	12.06	0.027	0.19
C18	527	528.3	216.5, 311.3	0.9999	12.06	0.019	0.18
C20:1	553	553.9	216.5, 337.4, 536.0	0.9995	15.34	0.037	0.20
C19	541	542.4	216.6, 325.1	0.9996	10.79	0.021	0.19
C20	555	556.3	216.5, 339.4	0.9997	14.65	0.045	0.40
C22:1	581	582.6	216.8, 365.6, 564.3	0.9998	18.74	0.088	0.52
C21	569	570.3	216.8, 353.2	0.9999	15.78	0.072	0.88
C22	583	584.1	216.6, 367.5	0.9997	16.34	0.095	1.25
C24:1	609	610.5	216.6, 393.3, 592.1	0.9996	20.48	0.18	1.14
C23	597	598.4	216.7, 371.2	0.9994	28.05	0.12	1.38
C24	611	612.3	216.6, 395.4	0.9999	24.75	0.19	1.92
C25	625	626.5	216.8, 409.1	0.9996	25.62	0.24	2.30
C26	639	640.3	216.6, 423.0	0.9997	26.79	0.23	2.96

表 4 不同提取条件下枸杞籽油游离脂肪酸的组成 (n=3)

Table 4 Content of FFAs from *L. barbarum* seed oil with different extraction methods (n=3)

FFA	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7	Run 8	Run 9
C6	5.1	3.5	3.22	3.3	2.8	2.7	2.3	3.3	2.4
C7	1.8	0.0	1.2	1.1	0.7	0.6	0.4	1.1	0.4
C8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C9	20.5	17.3	15.8	15.3	14.9	15.2	12.6	24.9	16.3
C10	68.1	29.8	25.8	41.2	7.1	7.2	8.4	16.5	10.1
C11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:5	1.1	3.6	0.0	12.6	5.8	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:3	417.8	258.0	222.5	308.7	286.5	285.5	285.2	350.3	335.0
C22:6	446.9	265.2	233.6	332.0	298.5	299.3	301.5	378.1	399.7
C14	52.1	24.9	17.4	26.5	27.7	25.8	0.0	30.6	28.0
C20:4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2	11430.0	12332.7	10844.9	15558.0	14458.3	14394.0	14610.8	17918.9	17336.6
C15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C16	3330.0	2150.4	1938.4	2499.6	2528.2	2431.2	2400.0	3031.2	2684.2
C18:1	5333.4	3357.6	2980.2	4114.7	3853.7	3853.8	3849.0	4801.5	4539.4
C17	50.2	36.9	28.7	35.3	34.3	35.2	36.4	42.9	38.7
C18	2067.9	1347.6	1210.9	1623.7	1617.3	1623.6	1589.2	2034.6	1797.9
C20:1	46.9	30.9	26.3	36.7	28.3	30.7	31.3	38.4	35.0
C19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20	417.4	289.2	254.2	324.7	340.3	212.1	195.5	428.7	211.7
C22:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22	170.3	111.2	134.1	115.3	146.6	128.3	99.7	137.1	138.1
SFFA	6183.3	4010.9	3629.7	4685.9	4719.8	4481.8	4344.5	5750.8	4927.6
UFFA	17676.1	16248.0	14307.6	20362.7	18931.2	18863.3	5928.9	23487.1	22645.7
TFFA	23859.3	20258.8	17937.2	25048.6	23651.1	23345.1	23422.3	29238.0	27573.3

表 5 不同提取溶剂对枸杞籽油中游离脂肪酸的组成影响
 Table 5 Content of FFAs from *L. barbarum* seed oil with different extraction methods

FFA	CO ₂ +ethanol	Mineral ether	n-hexane
C6	7.0	3.8	4.4
C7	0.0	0.4	0.0
C8	0.0	0.0	0.0
C9	38.0	18.8	16.5
C10	11.3	9.0	0.0
C11	0.0	0.0	0.0
C12	0.0	0.0	0.0
C20:5	12.6	6.6	0.2
C18:3	518.9	259.5	272.2
C22:6	445.0	207.4	205.3
C14	46.5	23.6	25.1
C20:4	0.0	0.0	0.0
C18:2	24558.8	12439.2	12580.5
C15	0.0	0.0	0.0
C16	4120.0	2027.3	2273.1
C18:1	6571.0	3158.9	3347.4
C17	58.2	35.0	36.8
C18	2582.0	1159.9	1354.1
C20:1	48.6	43.3	28.3
C19	0.0	0.0	0.0
C20	322.5	242.4	291.5
C22:1	0.0	0.0	0.0
C21	0.0	0.0	0.0
C22	214.9	114.1	151.3
SFFA	7400.4	3634.4	4152.7
UFFA	32154.7	16115.0	16434.0
TFFA	39555.2	19749.4	20586.7

3.2.3 萃取压力、温度、CO₂ 流量及不同提取溶剂对枸杞籽油中游离脂肪酸组成的影响

对表 4 中的结果进行正交分析得到图 6。如图可知当压力从 20MPa 变化到 30MPa 时，随着压力升高总游离脂肪酸的含量也一直升高。不饱和游离脂肪酸的含量变化与总游离脂肪酸含量变化是一致的，而饱和游离脂肪酸的含量随着压力的升

高含量却降低。如图 6 所示 CO_2 游离脂肪酸的含量是现增加后降低，这可能是因 CO_2 流速过高会导致超临界 CO_2 与被萃取物之间接触时间过短，从而造成萃取不充分。当温度从 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 升高到 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 时，总游离脂肪酸的含量下降，不饱和游离脂肪酸含量先减小后增大，而不饱和游离脂肪酸则是先生高后降低，说明高温不利于游离脂肪酸的萃取。

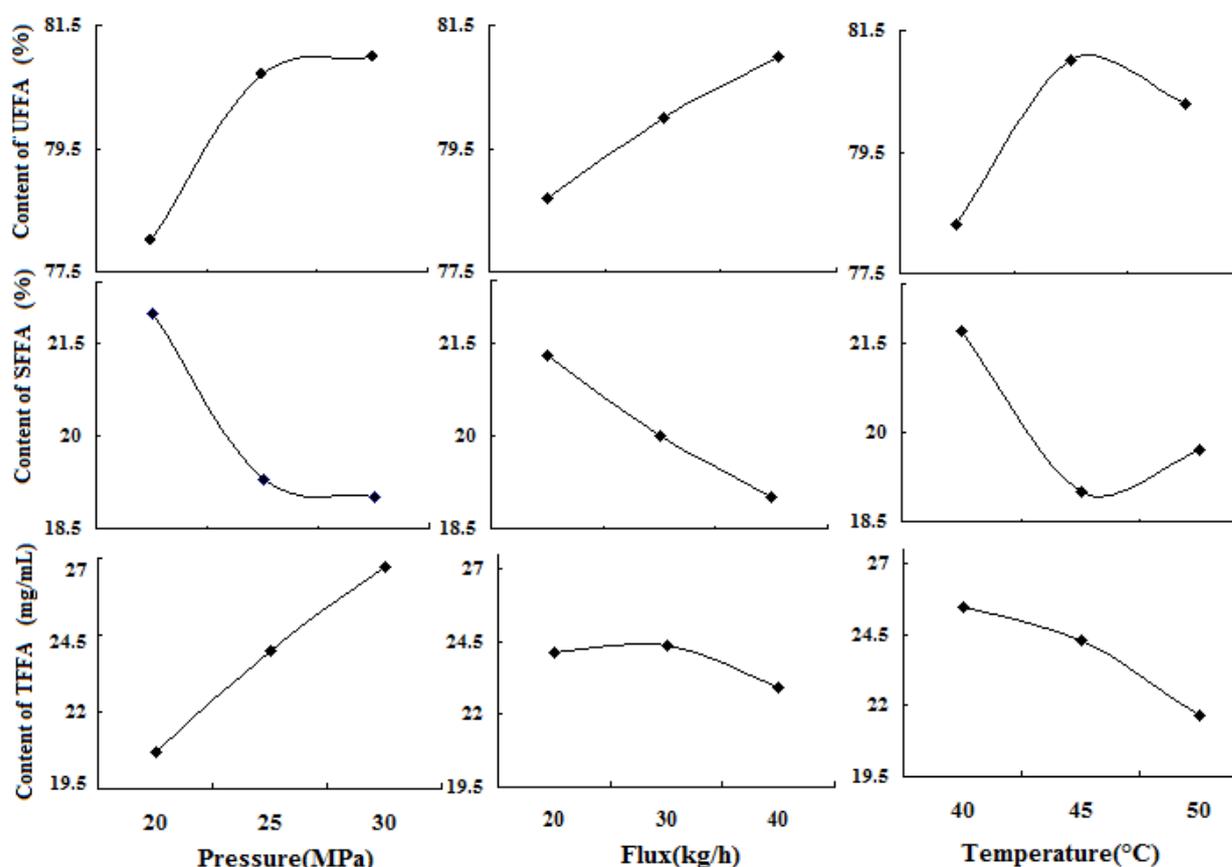


图 6 萃取压力、温度、 CO_2 流量对枸杞籽油中游离脂肪酸组成的影响

Fig 6 Effect of pressure, CO_2 flux and temperature on the FFA composition of LBSO

表 5 为不同提取溶剂得到的枸杞籽油中的游离脂肪酸组成。图 7 反映了不同提取溶剂所得到的柴达木枸杞籽油中总脂肪酸、不饱和游离脂肪酸和饱和脂肪酸的组成情况。从图中可以看出 超临界 CO_2 + 乙醇 提取得到的籽油中游离脂肪酸含量最高 (39555.2 mg/mL), 其次是超临界 CO_2 (29238.0 mg/mL), 正己烷 (20586.7 mg/mL) 与石油醚 (19749.4 mg/mL)。

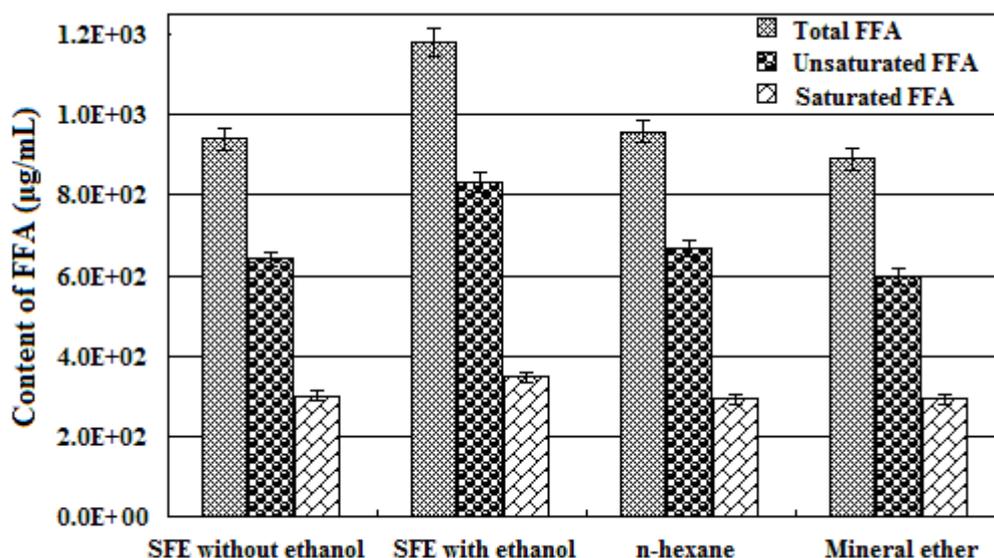


图 7 不同提取溶剂对枸杞籽油的组成影响

Fig 7 FFA content in samples extracted by different methods

结论

本试验采用新型荧光标记试剂 BCETS 作为脂肪酸柱前衍生试剂,通过响应面分析法对衍生条件进行了优化,得到最佳衍生条件:衍生温度 84°C ;衍生时间 28min;衍生试剂量/脂肪酸的量=8.8。在最佳衍生条件下,保留时间 RSD 小于 0.24%,峰面积 RSD 小于 2.96%。各种脂肪酸的检测线为 10.79 ~ 34.19 fmol。各脂肪酸的线性回归系数大于 0.9994。

通过建立的分析方法对不同方法提取的枸杞籽油进行分析,结果表明枸杞籽油中不饱和游离脂肪酸含量占总游离脂肪酸的 81.3%,含量从高到低依次为 C18:2, C18:1, C22:6, C18:3, C20:1 和 C20:5。饱和脂肪酸主要是 C16, C18 和 C20。

在超临界萃取中不同萃取温度,萃取压力,超临界流体的流速对籽油的游离脂肪酸组成都有影响。不同提取方法得到的籽油(①正己烷,②石油醚,③超临界 CO_2 萃取,④超临界 CO_2 +乙醇),进行了对比分析,其中④方法提取的籽油中游离脂肪酸含量最高,其次为③,①,②。

第五章 柴达木枸杞中黄酮, 氨基酸及微量元素的含量测定

引言

黄酮类化合物(flavonoids)广泛存在于自然界中, 属于植物在长期自然选择过程中产生的一些次级代谢产物。黄酮类化合物的结构特点是具有 C₆-C₃-C₆ 的基本骨架, 根据中间三碳链的氧化程度、B 环(苯基)连接位置(2-或 3-位)以及三碳链是否呈环状等特点, 分为黄酮、黄烷醇、异黄酮、双氢黄酮、双氢黄酮醇、噢弄、黄烷酮、花色色素、查耳酮、色原酮等 10 多个类别^[80]。现已发现约有 4000 余种黄酮类化合物, 主要存在于植物的叶、果实、根、皮中。黄酮类化合物具有广谱的药理活性和较低毒性^[81], 已成为国内外天然药物开发利用研究的热点。现代研究证明黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗衰老、抗自由基、抗病毒、降低脂质过氧化反应、预防心血管疾病等作用^[82]。

黄酮化合物的分离测定研究也是一个热点, 已报导的主要方法有分光光度法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、薄层色谱法等。分光光度法选择性较差, 一般只用来测定黄酮类化合物的总量, 张兰杰等^[83]采用双波长分光光度法, 测定了黑玉米花粉中的总黄酮含量。高效液相色谱法可以直接分析黄酮苷的含量, 也可以通过水解后分析黄酮苷元含量, 再通过转化系数求得黄酮总含量。但存在检测时间相对较长, 设备运行费用高的特点。Fang 等^[84]用该方法研究了红葡萄酒中十多种黄酮类化合物随时间的变化情况。高效毛细管电泳法因其高效快速、分辨率高、检测方便、进样量少、分离模式多的特点而得到广泛应用, Shufang Wang^[84]等用毛细管胶束电动色谱测定短角淫羊藿中的黄酮类物。薄层色谱法是在 20 世纪 50 年代以后, 在纸色谱和柱色谱的基础上发展起来的一种色谱分析方法。其特点为应用广泛, 测试速度快, 所需溶剂量少等, 但在分辨率及重现性等方面不如高效液相色谱法和气相色

谱法，一般用作定性和半定量的手段。李钧敏^[85]等利用聚酰胺薄层色谱法对云锦杜鹃不同营养器官中黄酮类化合物的成分进行分析。

蛋白质是生命的物质基础，与生命活动相关的主要蛋白质大约是由20种氨基酸相互间用氨基和羧基通过失水形成酰胺键构成的。羧酸分子中羟基上的一个或几个氢原子被氨基取代后产生的化合物称为氨基酸。氨基酸主要有两种存在形式，一种是以游离态存在于生理体液(血浆、尿)、食品(酒、饮料)中，另一种是以结合态存在于肽和蛋白质中。氨基酸是生命有机体的重要组成部分，其中，有八种氨基酸叫做必需氨基酸(essential amino acid)，他们是生命的必需物质，但人体本身不能合成，必须从食物中得到。而且氨基酸与人类健康有着紧密的关系，如天门冬氨酸对肝和肌肉有保护作用,可治疗心绞痛,对心肌梗塞等有防治效果。异亮氨酸能维持机体平衡,治疗精神障碍,促进食欲的增加和抗贫血的作用等^[86]。

Cu、Zn、Fe、Mn 元素是人体必需的微量元素，参与多种酶的合成，对促进机体的新陈代谢、增强免疫功能和防治疾病等能发挥重要作用。如 Fe 可治疗贫血, Cu 可治疗骨折等。而且最近研究发现在药物有效成分的提取过程中，有效成分越纯，药理活性反而下降，可能与提纯过程中无机元素特别是微量元素丢失有关。

本部分主要对柴达木枸杞中总黄酮，芦丁，氨基酸与主要微量元素进行了定量分析。

1.1 实验部分

1.1.1 实验材料

柴达木枸杞2008年8月采自柴达木盆地，干燥处理后备用。

1.1.2 实验试剂与仪器

甲醇分为分析甲醇和色谱甲醇；娃哈哈纯净水；氢氧化钠，亚硝酸，硝酸铝，

蒽酮, 浓硫酸, 乙醇, 磷酸均为分析纯。葡萄糖对照品, 芦丁对照品(100080-200707) 购自中国药品生物制品检定所, 纯度大于98%。

CRAY300Bio紫外可见分光光度计(美国Varian公司); KQ 3200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Waters2996 DAD检测器(美国Waters公司); Waters 515 高效液相色谱输液泵(美国Waters公司); Waters Empower色谱工作站(美国Waters公司); Waters 色谱柱恒温箱(美国Waters公司); 电子分析天平(上海天平仪器厂); R2002K升型旋转蒸发器(无锡星海王生化设备有限公司)。L-8900 全自动氨基酸分析仪(日本HITACHI公司); KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); CP225D 电子分析天平(德国Sartorius公司); 2XZ-1型旋片真空泵; DHG-9077A型电热恒温干燥箱。岛津AA - 6300 原子吸收分光光度仪。

1.2 柴达木枸杞中总黄酮含量的测定

1.2.1 总黄酮的提取

精密称研磨的枸杞子粗粉各2.000 g于500 mL圆底烧瓶中, 分别用95%乙醇200mL浸泡过夜。加热回流3次, 每次2h, 抽滤合并滤液, 并用少量95%乙醇洗涤容器, 洗液并入滤液。在水浴上减压蒸馏滤液, 以除去醇液。提取液用石油醚200 mL脱脂3次, 每次1h, 水液浓缩至浆状, 用80%乙醇溶解, 过滤至100mL容量瓶, 洗涤容器合并滤液与洗液, 用80%乙醇定容, 摇匀待用。

1.2.2 芦丁标准曲线的制备^[87]

以芦丁为标准品, 用分光光度计测定黄酮类化合物的含量, 精密称取于120℃干燥至恒重的芦丁对照品5.000 mg, 加入80%的乙醇溶解, 定容至25mL容量瓶中, 摇匀, 制成0.2mg / mL的对照品溶液, 分别取该溶液0.0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0mL于10mL容量瓶中, 加入5%的亚硝酸钠0.4mL, 放置6min, 再加10%的硝酸铝0.4 mL,

放置6 min, 最后加4%的氢氧化钠4mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置15 min, 经扫描显示510nm为最大吸收, 在510 nm处测定其吸光度值. 计算得标准回归方程

$C=1.287A-0.046$, $r=0.9991$. A (吸光度); C (芦丁浓度)

1.2.3 总黄酮含量的测定

精确吸取2.0mL枸杞黄酮的供试品溶液按照2.2.2的方法测定吸光度值. 三次重复实验, 按照所得的标准品的回归方程算得柴达木枸杞中总黄酮含量, 并计算平均值, 得出总黄酮的含量为 1.05%。

1.3 RP-HPLC法测定柴达木枸杞中芦丁的含量

1.3.1 色谱条件

C_{18} 色谱柱 (4.6mm×250mm, 5 μ m), 以V (甲醇):V (0.4% H_3PO_4) =50:50为流动相, 流速: 1.0mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}C$, 检测波长; 360nm, 采集时间20分钟. 标准品及样品色谱图如下

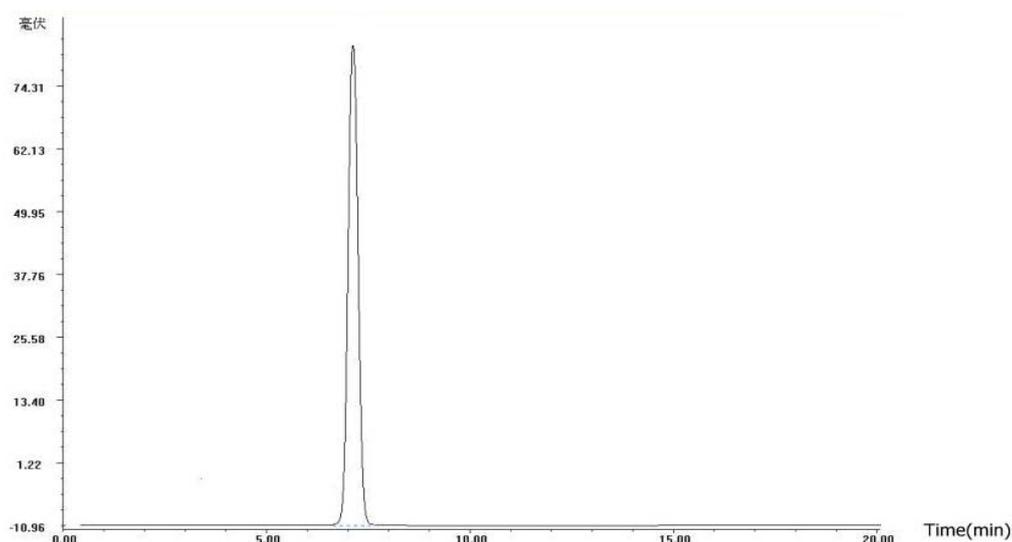


图1 芦丁标准品HPLC色谱图

Fig.1 PLC chromatogram of Rutin

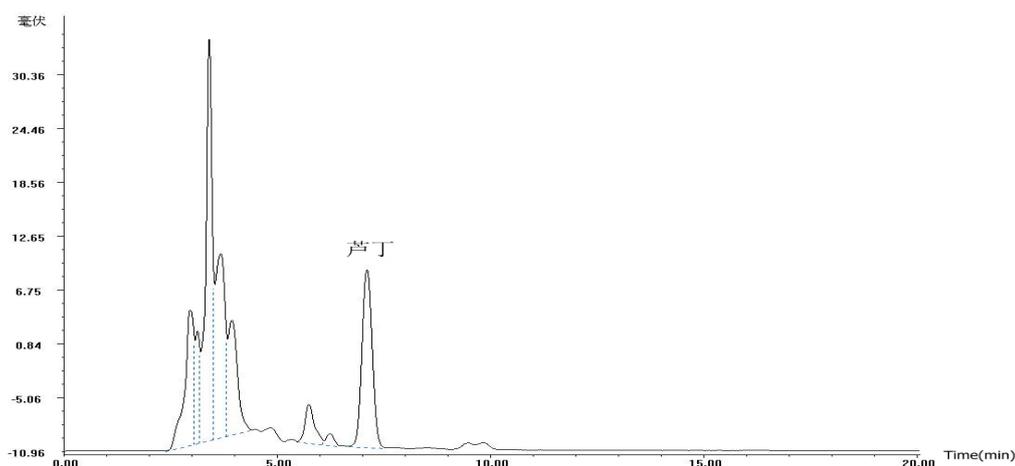


图2 供试液HPLC色谱图, 1-芦丁

Fig.2 HPLC chromatogram ,1-Rutin

1.3.2 对照品溶液的制备

精密称取经在烘箱中105℃烘干的芦丁对照品1.200 mg, 加入10 mL到加甲醇定容, 制成0.12 mg/mL溶液, 摇匀, 用0.45 μm的微孔滤膜过滤后作为对照品溶液。

1.3.3 供试溶液的制备

柴达木枸杞样品1.000克, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇25mL, 超声处理40min分钟, 放置1h小时后, 过滤, 将滤液转移至25mL容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 经0.45μm微孔滤膜过滤备用。

1.3.4 标准曲线及线性范围

精密吸取对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10μL, 在上述色谱条件下依次进样, 以进样量 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程:

$Y=5629782.083X+35549.3$, $r=0.9993$, 芦丁在 0.24μg -1.2μg 范围内成良好的线性关系。

1.3.5 精密度实验、稳定性试验、重复性试验及加样回收率实验

精密吸取对照样品溶液10 μ L, 按上述色谱条件测定5次, 结果芦丁峰面积的RSD值为1.56%, 表明仪器精密度良好。

精密称出干燥处理后柴达木枸杞1.000 g, 按上述方法制备供试溶液, 分别在0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0小时在上述色谱条件下进样10 μ L, 结果芦丁峰面积的RSD值为1.03%。表明样品在8.0 h内稳定。

精密称干燥处理后柴达木枸杞1.000 g, 按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,重复测定5份, 结果芦丁峰面积的RSD值为1.54%, 表明重复性良好。

称取已知芦丁含量的柴达木枸杞5份, 每份1.000 g, 加入对照品储备液1.0mL, 制备样品溶液。精密吸取10 μ L进样分析, 计算平均回收率, 平均回收率为98.23%。

1.3.6 柴达木枸杞样品中芦丁的含量测定

取供试溶液, 分别进样10 μ L, 测定芦丁含量 (n=3), 取三次测定的平均值, 柴达木枸杞中芦丁的含量为 0.077%。

1.4 柴达木枸杞中氨基酸分析

1.4.1 全自动氨基酸分析仪分析氨基酸含量与组成

分析条件条件: 分析时间: 30 min; 离子交换柱: .6 mm \times 60mm \times 3 μ m 磺酸型阳离子树脂; 柱温: 57 $^{\circ}$ C; 反应温度: 135 $^{\circ}$ C; 分离缓冲液流速: 0.40 mL \cdot min $^{-1}$; 茚三酮反应液流速: 0.35 mL/min; 检测波长: 570 nm、440 nm。

氨基酸的上样品制备: 准确称取 20 mg 样品 (精确到 0.00001g) 样品置于水解管中, 在水解管内加 6.0 mol/L 盐酸 5.00mL, 充高纯氮气, 封口后置于 110 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 的恒温干燥箱内水解 22 h, 水解结束后将水解液过滤, 吸取滤液 0.50 mL 于 15mL 烧杯内, 抽真空蒸干, 再用 1~2 mL 水溶解后再蒸干, 重复 2 次, 最后残留物用 0.02

mol/L 盐酸 5.00mL 溶解, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后上机测定。按照上述仪器条件, 以保留时间定性、外标法定量, 测定样品中的氨基酸含量。

1.4.2 柴达木枸杞和多糖氨基酸测定结果

柴达木枸杞中含有人体所需的17种氨基酸(表 1), 其中人体必需氨基酸和半必需氨基酸(组氨酸)含量较高, 占氨基酸总量的24.48%。作为枸杞中最主要的活性成分枸杞多糖中人体必需氨基酸和半必需氨基酸(组氨酸)占氨基酸总量的42.76% (E/T, 必需氨基酸/总氨基酸), 超过了FAO的模式标准(40%), 可见枸杞是一种营养价值极高且富含多种必需氨基酸的天然药才, 既可作为保健品也可作为药用。在必需氨基酸中亮氨酸含量最为丰富, 其次为苯丙氨酸和缬氨酸, 在非必需氨基酸中脯氨酸含量最高, 其次为谷氨酸和天门冬氨酸。

表 1 柴达木枸杞和枸杞多糖中的氨基酸含量/g.Kg-1
Table 1 The content of amino acid in Lyceum Barbarum and Polysaccharides

必需氨基酸	枸杞多糖	枸杞	非必须氨基酸	枸杞多糖	枸杞
苏氨酸(Thr)*	1.5	2.6	天门冬氨酸(Asp)	2.9	11.2
缬氨酸(Val)*	2.2	3.6	丝氨酸(Ser)	3.2	3.9
蛋氨酸(Met)*	0.4	1.5	谷氨酸(Glu)	0.7	12.3
异亮氨酸(Ile)*	1.1	1.2	脯氨酸(Pro)	1.8	13.4
亮氨酸(Leu)*	2.4	1.9	甘氨酸(Gly)	3.5	2.2
苯丙氨酸 (Phe)*	2.3	1.7	丙氨酸(Ala)	3.2	5.0
赖氨酸(Lys)*	1.9	0.8	胱氨酸(Cys)	2.0	1.3
色氨酸(Trp)*	/	1.9	酪氨酸(Tyr)	/	3.2
组氨酸(His)**	0.6	1.4	精氨酸(Arg)	1.4	5.2
总含量	11.8	18.7		17.2	57.7
百分含量 (%)	42.76	24.48		57.24	75.52

注：* 为必需氨基酸，** 对婴幼儿也为必需氨基

1.5 原子吸收分光光度仪测定元素含量

1.5.1 采用火焰法进行测试

称取1.000g样品置于消化管内, 加入4:1的 $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ 混酸15mL左右,用远红外消化器加热至沸腾,有大量棕色气体产生,再继续加热,温度控制在200℃左右,直至冒白烟近干为止,取下冷却。加适量去离子水润洗并转移至50.00mL 容量瓶中后定容。测试条件见表 3。

表2 火焰原子吸收光谱法测定仪工作条件

Table 2 The working conditions for Flame atomic absorption spectrometry detector

元素	波长 (nm)	狭缝 (nm)	燃烧器高度 (mm)	乙炔流量 (mL/min)
Cu	324.8	1.3	7.5	2.0
Fe	248.3	0.2	7.5	1.8
Mn	279.5	0.4	7.5	2.0
Zn	213.9	1.3	7.5	1.8

1.5.2 枸杞中无机元素测定

Cu、Fe、Mn、Zn 等 3 种标准溶液浓度范围、标准曲线、回归方程分别见表 3。分析结果如表 4, 在测定的元素中铜含量最高为 $0.0711 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 其次为为铁、锰、锌, 含量分别为、 $0.2263 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.0146 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.2115 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

表3 Cu、Fe、Mn、Zn线性测定结果

Table 3 The linear measurement result of Cu、Fe、Mn、Zn

元素	线性范围 (mg/L)	回归方程	相关系数 r
Cu	0.1 ~ 1.0	$y = 2.585 \times 10^{-2}x + 2.829 \times 10^{-5}$	1.0000
Fe	0.5 ~ 4.0	$y = 3.553 \times 10^{-2}x + 1.495 \times 10^{-3}$	1.0000
Mn	0.5 ~ 4.0	$y = -7.317 \times 10^{-4}x^2 + 6.861 \times 10^{-2}x + 1.183 \times 10^{-4}$	1.0000
Zn	0.1 ~ 1.0	$y = -1.883 \times 10^{-2}x^2 + 2.707 \times 10^{-1}x - 6.910 \times 10^{-4}$	1.0000

表4 无机元素含量(mg/g)

Table 4 Contents of mineral elements(mg/g)

元素	质量分数
Cu	0.0711
Fe	0.2263
Mn	0.0146
Zn	0.2115

结论

枸杞中黄酮类物质是枸杞中重要活性成分之一, 是枸杞发挥药效不可缺少的一部分, 经三次重复性实验测得柴达木枸杞中总黄酮含量为 1.05 %。

本实验利用反相高效逆流色谱法以 V（甲醇）:V（0.4% H_3PO_4 ）=50:50 为流动相，实现很好的分离，经重复实验测得柴达木枸杞中芦丁的含量为 0.077%。

柴达木枸杞中氨基酸总含量为 $74.6\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ 其中人体必需氨基酸占 24.48%。枸杞多糖中氨基酸总含量为 $29\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ，其中人体必需氨基酸含量占 42.76%。Cu、Fe、Mn、Zn 含量分别为 $0.0711\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.2263\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.0146\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $0.2115\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

参考文献

- [1] 方建国; 丁水平; 田庚元. 枸杞多糖药理作用与临床应用[J]. 医药导报, 2004, 23(007):484-485.
- [2] 王建华; 王汉中; 张民等. 枸杞多糖延缓衰老的作用[J]. 营养学报, 2002, 24(002):189-191.
- [3] Qian, J.; Liu, D.; Huang, A. The efficiency of flavonoids in polar extracts of Lycium chnense Mill fruits as free radical scavenger[J]. Food Chemistry, 2004, 87(2):283-288.
- [4] Chang-shan, G.; Shan-tian, X.; Jin-huang, Z., et al. Enhancing effect of Lycium barbarum polysaccharides on the interleukin-2 activity in mice[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 1989.
- [5] 霍超; 徐桂花. 枸杞生理功效和活性成分的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2007, (011):50-53.
- [6] 张自萍; 黄文波. 枸杞总黄酮和多糖的超声提取及含量测定[J]. 农业科学研究, 2006, 27(001):22-24.
- [7] 潘泰安; 刘敦华. 枸杞多糖生产工艺及产品的开发研究[J]. 中国食品添加剂, 2002, (004):21-24.
- [8] 罗琼; 阎俊. 枸杞多糖粗品与纯品抗疲劳作用的比较[J]. 营养学报, 1999, 21(003):310-317.
- [9] 何进; 张声华. 枸杞及枸杞多糖研究 (I) [J]. 食品科学, 1995, 16(002):14-21.
- [10] 田庚元. 枸杞子糖缀合物的结构与生物活性研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2003, 5(004):22-30.
- [11] 赵春久; 李荣芷. 枸杞多糖的化学研究[J]. 北京医科大学学报, 1997, 29(003):231-232.
- [12] 田庚元; 王晨. 枸杞子糖蛋白的分离纯化, 物化性质及糖肽键特征[J]. 生物化学与生物物理学报: 英文版, 1995, 27(002):200-206.
- [13] 姚瑞祺; 刘海英; 牛鹏飞等. 不同分子量枸杞多糖的超滤法分离及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2008, (005):89-91.
- [14] 甘璐; 张声华. 枸杞多糖的抗肿瘤活性和对免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2003, 25(002):200-202.
- [15] 肖琳; 白秀珍; 杨学东. 枸杞多糖对人肺癌 A549 细胞影响的研究[J]. 数理医药学杂

- 志, 2006, 19(002):130-132.
- [16] 何彦丽; 应逸; 王斌等. 枸杞多糖对荷瘤小鼠免疫抑制因子 VEGF, TGF- β 1 水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(005):28-29.
- [17] 崔涛; 李梅君; 赵艳春. 枸杞多糖对 K562 白血病细胞抑制作用及凋亡的研究[J]. 锦州医学院学报, 2006, 27(001):30-34.
- [18] 曹广文; 杜平. 黄芪多糖, 刺五加多糖和枸杞多糖在体内对 LAK 细胞抗肿瘤活性[J]. 第二军医大学学报, 1993, 14(001):10-13.
- [19] 黄文书; 杨海燕; 武运等. 枸杞多糖的提取及其体外抗肿瘤作用研究[J]. 中国食物与营养, 2008, (005):38-40.
- [20] 朱彩平; 张声华. 枸杞多糖对高脂血症小鼠血脂及脂质过氧化的影响[J]. 营养学报, 2005, 27(001):79-80.
- [21] 余江; 李伯灵. 复合枸杞多糖抗突变作用和抗脂质过氧化作用研究[J]. 广东药学院学报, 2002, 20(2).
- [22] 张敏; 赵太济; 张新华等. 枸杞子抗衰老保肝等实验研究综述[J]. 辽宁中医杂志, 1998, 25(4):185.
- [23] 贺捷; 潘力; 郭富祥. 枸杞多糖对实验性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1993, 7(4):293-293.
- [24] 田丽梅; 张利群; 申梅素等. 枸杞子对大剂量饮酒造成肝损伤保护作用的研究[J]. 牡丹江医学院学报, 1998, 19(003):6-7.
- [25] 王建华; 张民; 甘璐等. 枸杞多糖 21 对羟自由基所致小鼠肝线粒体损伤的作用[J]. 研究 [J], 1999, 22(2):59.
- [26] 迟国兴; 田刚; 吴晓岚. 吉林枸杞粗多糖保肝作用的研究 [J][J]. 吉林中医学, 1996, 1(2):35-35.
- [27] 宋育林; 曾民德; 陆伦根等. 枸杞多糖防治大鼠酒精性肝病的形态学观察[J]. 医学研究生学报, 2002, 15(001):13-16.
- [28] 黄正明; 杨新波; 王建华等. 枸杞多糖对小鼠链脲佐菌素性胰岛损伤及血糖的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(012):1419-1421.
- [29] 王玲; 蒋绿芝. 枸杞多糖—D 对四氧嘧啶糖尿病小鼠高血糖的防治作用[J]. 河北中医, 2000, 22(002):159-160.
- [30] 徐曼艳; 王煜飞. 枸杞多糖对四氧嘧啶损伤的离体大鼠胰岛细胞的作用[J]. 河北中医,

- 2002, 24(008):636-638.
- [31] 孙桂菊; 张林. 枸杞多糖, 茶叶多糖混合物对 II 型糖尿病大鼠降血糖作用及对糖尿病并发症相关指标的影响[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(002):75-78.
- [32] 李国莉; 任彬彬. 枸杞多糖对小鼠耐力及体内抗氧化酶活性的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2002, 29(010):634-634.
- [33] 李晓莉; 王斌. 枸杞多糖对小鼠耐常压缺氧能力的影响[J]. 营养学报, 2000, 22(004):337-340.
- [34] 彭晓东; 沈泳. 枸杞多糖对电刺激离体蟾蜍腓肠肌疲劳的影响[J]. 中草药, 2000, 31(005):356-358.
- [35] 曲红; 王德山. 枸杞多糖的药理及临床研究概况[J]. 山东医药工业, 2002, 21(004):36-37.
- [36] 黄晓兰; 杨明亮; 吴晓旻等. 枸杞多糖对雄性大鼠睾丸组织损伤的保护作用[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(009):1052-1054.
- [37] 黄晓兰; 闫俊; 吴晓旻等. 枸杞多糖对 H₂O₂ 诱导的小鼠生殖细胞损伤的影响[J]. 食品科学, 2003, 24(012):116-118.
- [38] 郭辉; 沈宁东. 柴达木盆地枸杞的资源状况及其栽培繁育研究进展[J]. 青海师范大学学报: 自然科学版, 2009, (001).
- [39] 吴广生; 唐慧锋; 李瑞鹏. 宁夏枸杞在青海的发展现状[J]. 宁夏农林科技, 2008, (002):62-62.
- [40] 马顺虎; 周舰; 何玉贤. 柴达木地区宁夏枸杞栽培技术[J]. 青海农林科技, 2008, (002):79-80.
- [41] 丁侃; 方积年. 多糖类药物的毛细管电泳分析方法及其应用[J]. 色谱, 1999, 17(004):346-350.
- [42] Nishi, H.; Kuwahara, Y. Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing carboxymethyl derivatives of polysaccharides as chiral selectors[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2002, 27(3-4):577-585.
- [43] Chankvetadze, B.; Burjanadze, N.; Blaschke, G. Enantioseparation of chiral vasodilator drug isoxsuprine in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2002, 27(1-2):153-159.
- [44] Suzuki, S.; Tanaka, R.; Takada, K., et al. Analysis of sialo-N-glycans in glycoproteins as

- 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 910(2):319-329.
- [45] Rai, S.; Wahile, A.; Mukherjee, K., et al. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds[J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2006, 104(3):322-327.
- [46] Lu, Y.; Foo, Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. *Food Chemistry*, 2000, 68(1):81-85.
- [47] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 浙江大学出版社: 1999.
- [48] Chan, K.; Ismail, M. Supercritical carbon dioxide fluid extraction of *Hibiscus cannabinus* L. seed oil: A potential solvent-free and high antioxidative edible oil[J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(3):970-975.
- [49] Liu, W.; Fu, Y.; Zu, Y., et al. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(1):334-339.
- [50] 苏宇静; 王辉. 枸杞籽油开发应用[J]. *中国油脂*, 2004, 29(008):56-58.
- [51] Stahl, E.; Quirin, K.; Gerard, D. Dense gases for extraction and refining. MRF Ashworth, New York, NY: 1988.
- [52] 陈淑花; 刘学武; 李志义等. 超临界二氧化碳萃取枸杞籽油的实验研究与数值模拟[J]. *化学工业与工程技术*, 2004, 25(005):11-13.
- [53] 潘太安; 刘敦华. 超临界 CO₂ 萃取枸杞籽油的研究[J]. *宁夏大学学报: 自然科学版*, 2000, 21(002):156-158.
- [54] 白寿宁. 超临界 CO₂ 萃取枸杞油及枸杞色素研究[J]. *粮食与油脂*, 1999, (004):12-16.
- [55] Liyana-Pathirana, C.; Shahidi, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology[J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(1):47-56.
- [56] Wu, Y.; Cui, S.; Tang, J., et al. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited *sterculia* seeds by response surface methodology[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(4):1599-1605.
- [57] Liu, F.; Ang, C.; Springer, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using response surface methodology[J]. *J. Agric. Food Chem*, 2000, 48(8):3364-3371.
- [58] RUSTOM, I.; ÓPEZ-LEIVA, M.; NAIR, B. Optimization of extraction of peanut proteins with water by response surface methodology[J]. *Journal of Food Science*, 2006,

- 56(6):1660-1663.
- [59] Teberikler, L.; Koseoglu, S.; Akgerman, A. Selective extraction of phosphatidylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001, 78(2):115-120.
- [60] Ke, J.; Mao, C.; Zhong, M., et al. Solubilities of salicylic acid in supercritical carbon dioxide with ethanol cosolvent[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 1996, 9(2):82-87.
- [61] Cocero, M.; Calvo, L. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996, 73(11):1573-1578.
- [62] Goto, M.; Sato, M.; Hirose, T. Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide[J]. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 1993, 26(4):401-407.
- [63] Lozanov, V.; Petrov, S.; Mitev, V. Simultaneous analysis of amino acid and biogenic polyamines by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1025(2):201-208.
- [64] Weng, Q.; Jin, W. Determination of free intracellular amino acids in single mouse peritoneal macrophages after naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde derivatization by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(13):2797-2803.
- [65] Latorre, R.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S. Sensitivity enhancement by on-line preconcentration and in-capillary derivatization for the electrophoretic determination of amino acids[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(20):4355-4361.
- [66] Coble, P.; Timperman, A. Fluorescence detection of proteins and amino acids in capillary electrophoresis using a post-column sheath flow reactor[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 829(1-2):309-315.
- [67] Roth, M. Fluorescence reaction for amino acids[J]. *Analytical Chemistry*, 1971, 43(7):880-882.
- [68] García Alvarez-Coque, M.; Medina Hernández, M.; Villanueva Camas, R., et al. Formation and instability of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids[J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 178(1):1-7.
- [69] Dorresteyn, R.; Berwald, L.; Zomer, G., et al. Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization effect of reaction conditions[J]. *Journal of*

- Chromatography A, 1996, 724(1-2):159-167.
- [70] Tsikas, D.; Sandmann, J.; Holzberg, D., et al. Determination of S-Nitrosoglutathione in Human and Rat Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence and Ultraviolet Absorbance Detection after Precolumn Derivatization with o-Phthalaldehyde[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 273(1):32-40.
- [71] Sanz, M.; del Castillo, M.; Corzo, N., et al. 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality[J]. J. Agric. Food Chem, 2003, 51(15):4278-4283.
- [72] Beketov, V.; Voronina, R.; Filatova, D., et al. Spectrophotometric and fluorimetric determination of amino acids by their reaction with o-phthalic aldehyde in the presence of sulfite and cyanide ions[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2000, 55(12):1148-1151.
- [73] Bauza, T.; Blaise, A.; Dumas, F., et al. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection[J]. Journal of Chromatography A, 1995, 707(2):373-379.
- [74] Chan, K.; Janini, G.; Muschik, G., et al. Laser-induced fluorescence detection of 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatized amino acids in capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 1993, 653(1):93-97.
- [75] Fürst, P.; Pollack, L.; Graser, T., et al. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials[J]. Journal of Chromatography A, 1990, 499:557-569.
- [76] Komarova, N.; Kamentsev, J.; Solomonova, A., et al. Determination of amino acids in fodders and raw materials using capillary zone electrophoresis[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 800(1-2):135-143.
- [77] Cheng, Y.; Dovichi, N. Subattomole amino acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence[J]. Science, 1988, 242(4878):562.
- [78] Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Sanz, A., et al. Analysis of glutamate in beverages and foodstuffs by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. Chromatographia, 2000, 52(9):599-602.
- [79] Nouadje, G.; Nertz, M.; Courderc, F. Study of the racemization of serine by

- cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 1995, 716(1-2):331-334.
- [80] Hollman, P.; Katan, M. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1999, 37(9-10):937-942.
- [81] Yao, L.; Jiang, Y.; Shi, J., et al. Flavonoids in food and their health benefits[J]. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 2004, 59(3):113-122.
- [82] 钱俊臻. 黄酮类化合物提取方法的研究进展[J]. *化工文摘*, 2008, (006):35-37.
- [83] 张兰杰; 辛广; 张维华. 双波长分光光度法测定黑玉米花粉中总黄酮的含量[J]. *食品科学*, 2006, 27(002):230-232.
- [84] Fang, F.; Li, J.; Pan, Q., et al. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(1):428-433.
- [85] 李钧敏; 金则新; 杨蓓芬. 云锦杜鹃总黄酮含量及成分分析[J]. *西北林学院学报*, 2004, 19(001):110-112.
- [86] 李国梁; 刘永军; 王洪伦; 索有瑞. 柴达木枸杞主要营养成分分析[J]. *分析测试技术与仪器*, 2009, 15(2).
- [87] 张颖; 张立睦; 周红英等. 不同产地枸杞子中黄酮含量的测定[J]. *中国中医药科技*, 2004, 11(002):102-103.

攻读硕士期间发表的论文

李国梁; 索有瑞; 史俊友; 刘永军。 柴达木枸杞多糖单糖组成的柱前衍生方法及其抗氧化活性[J]。 食品与发酵工业, 2009, (012):39-42。

李国梁; 史俊友; 孙志伟; 王洪论; 索有瑞; 刘永军; 超临界 CO₂ 萃取柴达木枸杞籽油工艺与籽油成分研究[J]。 食品工业科技 (录用)。

李国梁; 索有瑞; 刘永军。 枸杞多糖研究进展[J]。 天然产物研究与开发 (录用)。

李国梁; 刘永军; 史俊友; 索有瑞。 柴达木枸杞几种活性成分分析[J]。 分析实验室, 2009, 28(B05):286-288。

李国梁; 刘永军; 王洪伦; 索有瑞。 柴达木枸杞主要营养成分分析[J]。 分析测试技术与仪器, 2009, 15(2)。

李国梁; 刘永军; 索有瑞。 沙棘中原花青素提取工艺研究[J]。 天然产物研究与开发 (录用)。

史俊友; 索有瑞; **李国梁**; 刘永军。 大叶白麻叶多糖提取及组分分析[J]。 中成药, 2010 (001):102-106。

Guoliang Li, Zhiwei Sun, Junyou Shi, Yourui Suo, Jinmao You, Yongjun Liu, Supercritical CO₂ oil extraction from Chinese star anise seed and simultaneous compositional analysis by HPLC/APCI/MS with fluorescence detection [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture (accepted)

Guoliang Li, Zhiwei Sun, Junyou Shi, Yourui Suo, Jinmao You, Yongjun Liu, Supercritical CO₂ cell breaking extraction of Lycium barbarum seed oil and determination of its chemical composition by HPLC/APCI/MS and antioxidant activity, LWT- Food Science and Technology (under review).

Guoliang Li, Junyou Shi, Zhiwei Sun, Lian Xia, Jinmao You, Yourui Suo, Yongjun Liu, Oil extraction from Lycium barbarum seed by supercritical fluid and effect of various extraction conditions on its free fatty acids composition and antioxidant activity (Submitted)

Lian Xia, Zhi Wei Sun, **Guo Liang Li**, You Rui Suo and Jin Mao You A sensitive analytical method for the component monosaccharides of the polysaccharides from a Tibetan herb Potentilla anserine L. by capillary zone electrophoresis with UV detector European Food Research and Technology, 2010 (5) 715-722.

致 谢

值此论文完成之际，谨将最诚挚的谢意献给三位恩师刘永军研究员，索有瑞研究员和尤进茂研究员！

本论文是在刘永军，索有瑞和尤进茂三位老师的悉心指导下完成的。在整个论文工作中，三位导师倾注了大量的心血，他们严谨的治学态度、敏锐的学术思维、创新的学术精神和忘我的工作热情将使我终生受益；他们豁达的心胸、平易近人的优秀品质更是深深教育着我，也将是我努力追求的人生境界。

同时，感谢周昌范高工、李玉林博士、王洪伦博士、丁晨旭博士等诸位老师的支持和帮助。

感谢史俊友、赵先恩、孙志伟、夏莲、王小艳、张蕊、王志国、杨芳、李春婷、王凌云、张凤枰、曹越、利毛才让、滕旭、郑杰、张兴旺、张小龙、赵德勇、常小峰、陈千权、付艳艳等各位师兄师姐及同学的支持、帮助和有益探讨。

感谢研究生处的王萍处长和车国冬老师给予的支持与帮助。

感谢我的父母，我的女朋友及其家人多年来对我学业的支持、鼓励和无私付出！

最后，感谢所有支持和帮助过我的老师、同学和朋友。

李国梁

2010年5月 青海 西宁