

不同产地宁夏枸杞叶指纹图谱的建立及其生物碱成分的定量分析

刘霜¹, 卢顺¹, 马嘉怡¹, 汤丽华^{2,3}, 王琛^{2,3}, 范艳丽^{1*}, 刘源¹

1. 宁夏大学食品科学与工程学院, 宁夏 银川 750021

2. 宁夏回族自治区食品检测研究院, 宁夏 银川 750002

3. 国家市场监督管理总局重点实验室(枸杞及葡萄酒质量安全), 宁夏 银川 750002

摘要: 目的 通过 HPLC 指纹图谱结合化学计量学构建了宁夏 5 个主要种质基地 50 批宁夏枸杞 *L. barbarum* 叶 (S1~S50) 指纹图谱, 并对其中主要生物碱成分定量测定。方法 利用 HPLC 技术和中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.1 版) 绘制指纹图谱, 进行相似度评价和共有峰确认, 并结合化学计量学综合分析。同时采用 HPLC 法测定 7 种生物碱成分 (胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、枸杞素 A、枸杞素 B、*N*-反式阿魏酰酪胺、*N*-阿魏酰-3-甲氧基酪胺) 含量, 对宁夏不同产地宁夏枸杞叶予以评价。结果 所获指纹图谱共 18 个共有峰, 50 批宁夏枸杞叶生物碱指纹图谱与对照指纹图谱相似度为 0.692~0.981, 中宁、固原产地宁夏枸杞叶指纹图谱与对照指纹图谱共有模式相似度较高, 而银川产宁夏枸杞叶指纹图谱与对照指纹图谱共有模式相似度较低; 聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 将 50 批样品聚为 4 类; 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 筛选出 4 个主成分, 累积方差达 89.014%; 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 筛选出组间差异贡献率较大的成分, 按 VIP 大小顺序依次为 5 号峰>3 号峰>10 号峰>11 号峰>13 号峰>2 号峰>4 号峰>9 号峰; 含量测定结果表明固原产地的宁夏枸杞叶中 7 种生物碱含量最高。结论 构建了稳定性强的不同产地宁夏枸杞叶 HPLC 指纹图谱以及 7 种生物碱的测定方法, 结合化学计量学可用于宁夏枸杞叶产地差异分析与质量评价。

关键词: 宁夏枸杞; 枸杞菜 1 号; 胆碱; 甜菜碱; 葫芦巴碱; 枸杞素 A; 枸杞素 B; *N*-反式阿魏酰酪胺; *N*-阿魏酰-3-甲氧基酪胺; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R282.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)12-4845-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.026

Establishment of fingerprints and quantitative analysis of alkaloids in leaves of *Lycium barbarum* from different producing areas

LIU Shuang¹, LU Shun¹, MA Jiayi¹, TANG Lihua^{2,3}, WANG Chen^{2,3}, FAN Yanli¹, LIU Yuan¹

1. School of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

2. Ningxia Food Testing and Research Institute, Yinchuan 750002, China

3. Key Laboratory of the State Administration for Market Regulation (Quality and Safety of *Lycium barbarum* and Wine), Yinchuan 750002, China

Abstract: Objective To evaluate the quality of *Lycium barbarum* leaves from various production areas in Ningxia, an HPLC fingerprinting technique combined with chemometrics and quantitative determination of multiple alkaloids constituents with LC-MS/MS was used to construct the alkaloidal fingerprints of *L. barbarum* leaves (S1—S50) from five bases in three production areas in Ningxia. **Methods** The HPLC method and Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprinting in Chinese Medicine (version 2012) were used to generate fingerprints, and similarity evaluation and common peak confirmation were carried out. Meanwhile, LC-MS/MS was used to establish a method for the determination of the contents of seven alkaloids constituents (choline, betaine, trigonelline, lyciumin A, lyciumin B, *N*-trans-feruloyltyramine, *N*-feruloyl-3-methoxytyramine) to evaluate the leaves of *L. barbarum* from different origins in Ningxia. **Results** The obtained fingerprints had a total of 18 common peaks. The similarity between the alkaloid fingerprints of 50 batches of *L. barbarum* leaves. The control fingerprints ranged from 0.692 to 0.981. Zhongning and Guyuan origin *L. barbarum* leaves fingerprints have higher similarity to the control fingerprints, while Yinchuan origin *L. barbarum* leaves fingerprints have lower similarity to the control fingerprints. Hierarchical

收稿日期: 2025-12-02

基金项目: 宁夏重点研发项目 (2024BBF02009)

作者简介: 刘霜 (1999—), 女, 宁夏银川, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与质量控制。E-mail: 2508200048@qq.com

*通信作者: 范艳丽 (1980—), 女, 山东烟台, 教授, 工学博士, 研究方向为食品营养与特色农产品加工。E-mail: fanyanli_fyl@163.com

clustering analysis (HCA) clustered the 50 batches of samples into four categories; principal component analysis (PCA) screened out four principal components, with a cumulative variance of 89.014%; orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) screened out the components with larger contributions to inter-group variance, which were, in the order of the size of the VIP, peak 5 > peak 3 > peak 10 > peak 11 > peak 13 > peak 2 > peak 4 > peak 9; content determination showed that seven alkaloids from Guyuan origin had the highest content. The results of content determination showed that the seven alkaloids of Guyuan origin had the highest content. **Conclusion** A stable HPLC fingerprint of *L. barbarum* leaves of different origins and a quantitative LC-MS/MS method for the determination of seven alkaloids were constructed, which can be used for the analysis of the difference in the origins of *L. barbarum* leaves and quality evaluation by combining with chemometrics.

Key words: *Lycium barbarum* L.; Ningqicai No. 1; choline; betaine; trigonelline; lyciumin A; lyciumin B; *N-trans-feruloyl*tyramine; *N-feruloyl-3-methoxy*tyramine; fingerprint; HPLC

枸杞叶是茄科植物枸杞 *Lycium chinense* Mill. 或宁夏枸杞 *L. barbarum* L. 的嫩茎叶, 在我国、东南亚地区以及北美地区, 已有 1 千多年食用历史, 药用历史也达 2 千余年。是一种广泛被运用的功能性食物和中药材^[1-3], 已被证实具有降低血糖、调节血脂、抗氧化及抑菌的作用^[4]。近些年伴随着宁夏枸杞产业的迅猛发展, 宁夏地区培育出了以采摘叶片为主要利用目的的无果叶用宁夏枸杞叶, 并建成了产业化示范区。“宁杞菜 1 号”是宁夏地区种植叶用枸杞的主要品种^[5-7], 具有较强的适应性, 易于管理, 生长量大, 产菜量高, 营养丰富等特点^[8]。枸杞叶资源的开发与利用也逐渐受到重视, 但是对于枸杞叶生物活性的研究多集中在多糖、黄酮及酚酸类物质。有研究表明, 枸杞属中生物碱类物质是仅次于黄酮及酚酸类的第 2 大类物质, 在枸杞属小分子化学成分中占 30% 以上^[9-10], 具有抗阿尔茨海默病、抑菌、抑制肿瘤、调血脂等多种生物活性^[11-16]。因此研究枸杞叶中的生物碱, 有利于枸杞叶生物碱资源的开发与利用^[17-20]。

在我国, 中药指纹图谱技术广泛应用于中药材的真实性验证及其来源地的区分^[21-22], 是中医药领域中一种重要的质量评估工具。该技术通过对中药材化学成分进行全面剖析, 描绘出特定化学标记物的峰度分布情况, 进而精确反映药材的质量稳定性和一致性, 实现对其品质等的定性和定量评价^[23-25], 能够提供科学依据来区分药材类型及加工工艺的优化。然而, 关于枸杞叶的指纹图谱分析却少有文献报道^[26-27]。在此背景下, 本研究构建了 50 批宁夏枸杞叶中生物碱成分的 HPLC 指纹图谱, 并鉴定了其中 18 个共有峰。基于课题组先前的代谢组学分析结果, 筛选出了 7 种具有较高平均相对含量的生物碱成分(胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、枸杞素 A、枸杞素 B、*N*-反式阿魏酰酪胺、*N*-阿魏酰-3-甲氧基酪胺)。采用

HPLC 法对这些生物碱进行了含量测定, 并建立了一种快速检测方法。该方法不仅有助于宁夏枸杞叶中生物碱的鉴定, 还为其生物碱资源的开发利用以及宁夏枸杞叶的原产地识别和质量监控提供了有力的数据支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); KQ-250DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TG16M 型高速台式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); DC-MIX-MV 型多管涡旋混匀器(点成生物科技有限公司); WT-CH 型玻璃罩精密天平(常州万泰天平仪器有限公司); WK-600A 型高速中药粉碎机(上海新诺仪器设备厂); 6470LC/TQ 三重四级杆液质联用仪(美国安捷伦公司)。

1.2 材料

“宁杞菜 1 号”枸杞叶样品采集于 2022 年 7 月, 来源于宁夏回族自治区的银川、中宁和固原 3 个产地。采用 5 点取样法随机取样, 采集 2~3 年树龄树苗顶端 10 cm 范围内的叶片。所有采集样品经宁夏大学范艳丽教授鉴定为宁夏枸杞 *L. barbarum* L. 的叶, 样品采集信息如表 1 所示。采集的鲜宁夏枸杞叶样品经 105 °C 杀青 1 min, 并在 70 °C 条件下烘干至恒定质量后过 60 目筛, 装袋、密封、室温下干燥保存。

甲醇、乙腈、乙酸铵(色谱纯)购于美国默克公司; 甲酸(色谱纯)购于阿拉丁试剂有限公司; 对照品甜菜碱(批号 B21244)、胆碱(批号 T25208)、葫芦巴碱(批号 B20521)、*N*-反式阿魏酰酪胺(批号 B30645)购于绿源生物科技有限公司; 枸杞素 A(批号 PS012737)、枸杞素 B(批号 PS012738)、*N*-阿魏酰-3-甲氧基酪胺(批号 PS013053)购于普思生物科技有限公司。

表 1 宁夏枸杞叶样品

Table 1 Samples of *L. barbarum* leaves

样品编号	产地	基地	经纬度	海拔/m
S1~S10	中卫市中宁县舟塔乡康滩村	中宁基地1	E105°40'34"; N37°31'13"	1 124.65
S11~S20	中卫市中宁县新堡镇吴桥村	中宁基地2	E105°44'46"; N37°27'57"	1 152.78
S21~S30	固原市原州区三营镇甘沟村	固原基地	E106°6'19"; N36°18'10"	1 518.34
S31~S40	银川市西夏区G110(京青线)	银川基地1	E106°4'59"; N38°39'33"	1 097.19
S41~S50	银川市贺兰县洪广镇广荣村社区	银川基地2	E106°4'59"; N38°44'7"	1 061.73

2 方法与结果

2.1 宁夏枸杞叶指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 使用 ZORBAX Eclipse PLUS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 287 nm, 柱温 30 °C, 进样量为 10 μL, 体积流量为 1.0 mL/min。流动相以乙腈作为 A 相, 0.1%甲酸-水溶液为 B 相。梯度洗脱: 0~8 min, 5%~30% B; 8~10 min, 30%~40% B; 10~15 min, 40%~55% B; 15~16 min, 55%~90% B; 16~17 min, 90%~5% B。

2.1.2 供试品溶液的制备 精确称量 1.0 g 研磨后的宁夏枸杞叶粉, 将其转移至 25 mL 的离心管中, 添加 20 mL 50%甲醇溶液后放置在多通道涡旋仪中涡旋 3 min, 完成后超声 20 min, 设置离心机转速为 9 000 r/min, 离心 5 min, 取上清液, 经 0.22 μm 滤膜滤过后上样分析。

2.1.3 精密度试验 根据“2.1.2”项制备宁夏枸杞叶 (S21) 样品, 按照“2.1.1”项色谱条件连续进样 6 次。以 6 号峰为参照峰 (S), 计算得到 18 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.056%, 相对峰面积的 RSD 为 0.021%~0.043%。

2.1.4 重复性试验 根据“2.1.2”项的方法制备宁夏枸杞叶 (S21) 样品 6 份, 并记录“2.1.1”项色谱条件下的色谱图。以 6 号峰为参照峰 (S), 计算得到 18 个共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.320%~0.560%、相对峰面积的 RSD 为 0.856%~2.087%。

2.1.5 稳定性试验 根据“2.1.2”项制备宁夏枸杞叶 (S21) 供试品溶液, 并在室温条件下分别于 0、4、8、12、18、24 h 于“2.1.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 记录相应的指纹图谱。以 6 号峰为参照峰 (S), 计算得到 18 个共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.56%, 而相对峰面积的 RSD 为 0.078%~0.543%。表明在 24 h 内样品稳定性良好。

2.1.6 指纹图谱建立及相似度评价 按照“2.1.2”项所述方法准备 50 批宁夏枸杞叶粉末的试验溶液, 依据“2.1.1”项中的色谱程序进行处理。对获得的 HPLC 图谱进行分析, 并利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.1 版)》生成对照图谱 (R)。整合了 50 批样品的指纹图谱, 形成了样品叠加指纹图谱 (图 1)。50 批宁夏枸杞叶样品中共标定出了 18 个共有峰, 峰面积占比为各批

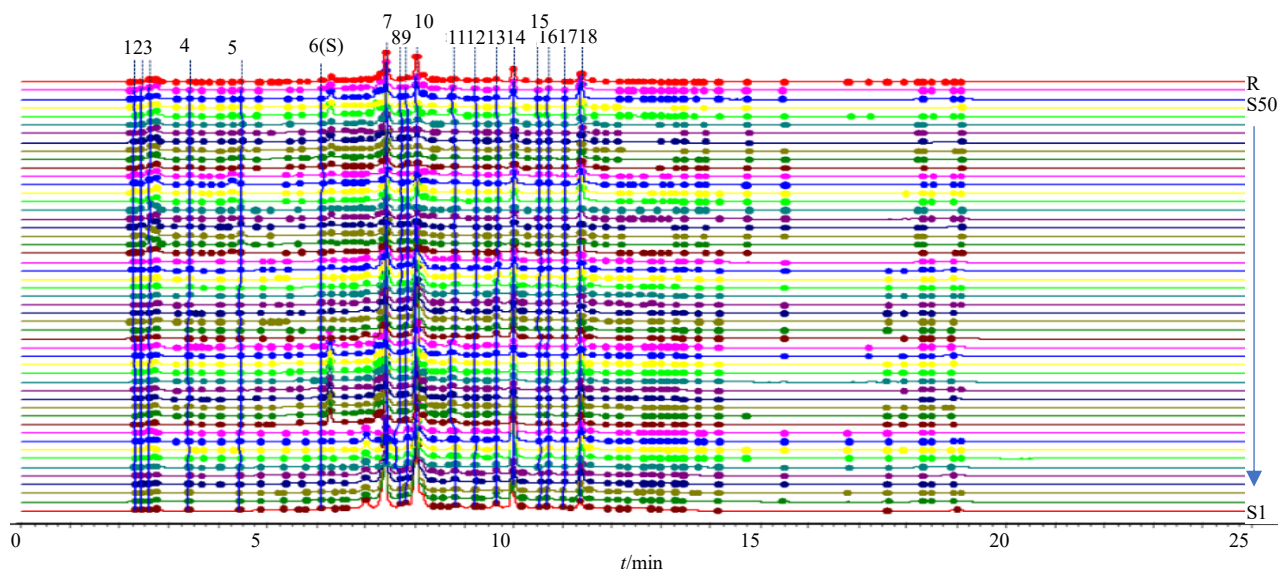


图 1 50 批宁夏枸杞叶样品的 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprints and control fingerprints of 50 batches of *L. barbarum* leaf samples (R)

次样品总峰面积的 78%。各样品图谱与对照指纹图谱之间的相似度在 0.780~0.993 (表 2)。根据相似度越高, 宁夏枸杞叶样品图谱与标准指纹图谱越接近的原则, 可以看出中宁、固原产地的宁夏枸杞叶指纹图谱与宁夏枸杞叶指纹图谱共有模式有较高的相似度, 银川产地宁夏枸杞叶与指纹图谱共有模式相似度较低。

表 2 50 批宁夏枸杞叶样品 HPLC 指纹图谱相似度评价结果

Table 2 Results of similarity evaluation of HPLC fingerprints of 50 batches of <i>L. barbarum</i> leaves samples					
编号	相似度	编码	相似度	编号	相似度
S1	0.967	S18	0.956	S35	0.894
S2	0.966	S19	0.966	S36	0.780
S3	0.977	S20	0.954	S37	0.906
S4	0.970	S21	0.979	S38	0.917
S5	0.970	S22	0.981	S39	0.817
S6	0.940	S23	0.966	S40	0.870
S7	0.992	S24	0.977	S41	0.877
S8	0.912	S25	0.976	S42	0.872
S9	0.908	S26	0.977	S43	0.853
S10	0.993	S27	0.981	S44	0.956
S11	0.956	S28	0.978	S45	0.835
S12	0.961	S29	0.978	S46	0.897
S13	0.968	S30	0.973	S47	0.829
S14	0.954	S31	0.850	S48	0.892
S15	0.955	S32	0.813	S49	0.894
S16	0.957	S33	0.782	S50	0.891
S17	0.955	S34	0.786		

2.2 化学计量学分析

2.2.1 HCA 通过系统聚类分析, 能依据数据集中对象的相似状况, 把整体区分为不同的群组或类型, 以达成对数据进行分类的目的^[28]。使用 Origin 22.0 软件, 针对 50 批样品中 18 个共有峰的标准化合峰面积展开聚类分析。由图 2 可知, 样品划分为 4 大类, 第 1 类为 S1~S5; 第 2 类为 S6~S10; 第 3 类为 S31~S50; 其余为 S11~S30, 这表明 50 批宁夏枸杞叶存在产地差异。然而, 部分宁夏枸杞叶有一定的相似性, 例如, 中宁和固原 2 地的宁夏枸杞叶样品在聚类结果上存在交叉现象, 这很可能与其相似的地理位置有关。

2.2.2 PCA 通过 PCA 较小的数据集更易于探索和可视化^[29-30]。因此, 将 PCA 引入到对宁夏枸杞叶生物碱指纹图谱数据分析中。使用 SPSS 22.0 软件

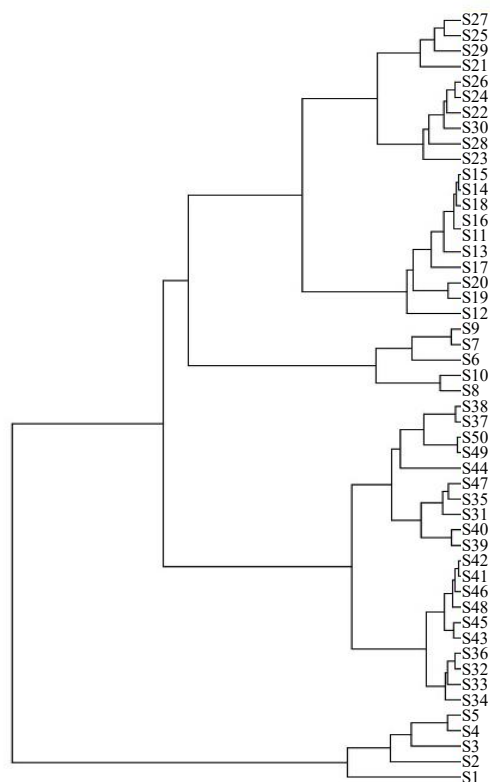


图 2 50 批宁夏枸杞叶生物碱指纹图谱共有峰聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of shared peak clustering analysis of alkaloid fingerprints of 50 batches of *L. barbarum* leaves

分析原始峰峰面积数据, 从 50 批样品中筛选出与群体差异较大的样品, 并进一步考察相关性矩阵。表 3 为 18 个共有峰的特征值及其累积贡献率。选择了特征值大于 1 的 4 个主成分, 其特征值分别为 7.306、3.879、3.001 和 1.836, 对应的方差贡献率依次为 40.588%、21.522%、16.674%及 10.200%, 累积贡献率为 89.014%。

后续分析中, 运用最大方差法得到了公共因子载荷矩阵, 见表 4。从表中可以看出, 第 1 主成分与 12、16 和 17 号色谱峰面积的增大呈正相关; 第 2 主成分与 1、2 和 15 号色谱峰面积的增大呈正相关; 第 3 主成分与 7、8 和 10 号色谱峰面积的增大呈正相关; 而第 4 主成分与 3、5 和 6 号色谱峰面积的增大呈正相关。

2.2.3 OPLS-DA 基于 PCA 分析法, OPLS-DA 可对 50 个不同产地宁夏枸杞叶样品进行组间差异强化^[31]。使用 SIMCA-P14.0 进行数据分析, 将不同产地宁夏枸杞叶样品标准化处理后的数据设定为观测值, 以共有峰的峰面积为变量, 按照不同产地

表3 18个成分的特征值与贡献率

Table 3 Eigenvalues and contributions of 18 components

成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	7.306	40.588	40.588
2	3.879	21.552	62.141
3	3.001	16.674	78.815
4	1.836	10.200	89.014
5	0.568	3.154	92.168
6	0.320	1.775	93.943
7	0.243	1.349	95.293
8	0.213	1.182	96.475
9	0.171	0.948	97.422
10	0.146	0.809	98.231
11	0.118	0.658	98.890
12	0.064	0.357	99.247
13	0.048	0.268	99.515
14	0.043	0.239	99.754
15	0.018	0.100	99.854
16	0.015	0.083	99.937
17	0.007	0.038	99.974
18	0.005	0.026	100.000

表4 旋转后的公共因子载荷矩阵

Table 4 Matrix of rotated common factor loadings

峰号	载荷			
	1	2	3	4
1	-0.013	0.929	-0.058	-0.080
2	-0.354	0.761	-0.310	0.283
3	-0.263	0.310	-0.337	0.816
4	-0.560	0.498	-0.324	0.404
5	-0.225	0.026	-0.247	0.893
6	-0.077	-0.269	0.487	0.733
7	-0.026	0.064	0.897	-0.363
8	-0.419	-0.088	0.879	0.046
9	0.498	-0.554	0.547	-0.049
10	0.565	-0.216	0.657	-0.425
11	0.018	-0.008	0.232	-0.842
12	0.909	-0.155	0.153	-0.119
13	0.419	-0.176	0.743	-0.267
14	0.886	-0.240	-0.326	-0.113
15	-0.056	0.906	0.169	0.150
16	0.978	-0.024	0.028	-0.038
17	0.814	0.333	0.005	-0.236
18	0.271	0.744	-0.298	-0.428

对样本进行分组，然后进行 OPLS-DA，建立模型，得出模型累计解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.651 和 0.270，预测能力参数 $Q^2=0.635$ ，显示出所确立的分析模型有着不错的稳定性，能够很好地区分不同产地来源的宁夏枸杞叶。

OPLS-DA 得分图 (图 3) 中，中宁基地 1、中宁基地 2、固原基地与银川基地 1、银川基地 2 存在明显区分，且各自呈聚集状态。其中中宁与固原产地组间差异不大，中宁基地 1 与固原基地组间差异最小，分析结果与相似度评价、HCA 一致。另外，银川产地的 2 基地间也有交叉的部分，原因可能是同产地内的海拔、经纬度、气温、降水等较为一致而致使其含量相近，而海拔可能是造成银川产地与中宁、固原产地差异的主要原因。此外，通过 VIP 值可筛选差异化合物，因此选取 VIP 值 > 1 的差异性标志成分^[68]，共得到 8 个主成分。如图 4 所示，VIP 值的大小依次为 5 号峰 > 3 号峰 > 10 号峰 > 11 号峰 > 13 号峰 > 2 号峰 > 4 号峰 > 9 号峰，这 8 个主成分可能是造成不同产地样品间产生差异的关键因素。综合分析结果表明，HPLC 生物碱指纹图谱能够有效分析来自不同产地宁夏枸杞叶的质量差异。

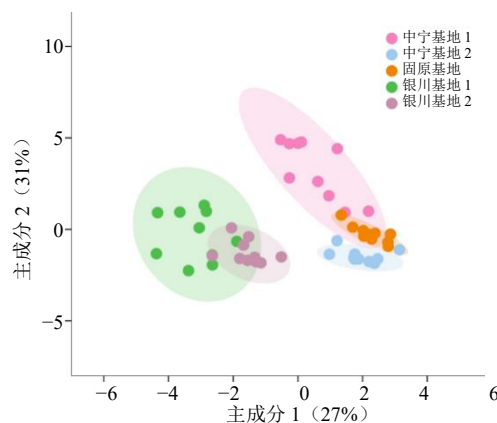


图3 50批宁夏枸杞叶 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 Plot of OPLS-DA scores for 50 batches of *L. barbarum* leaves

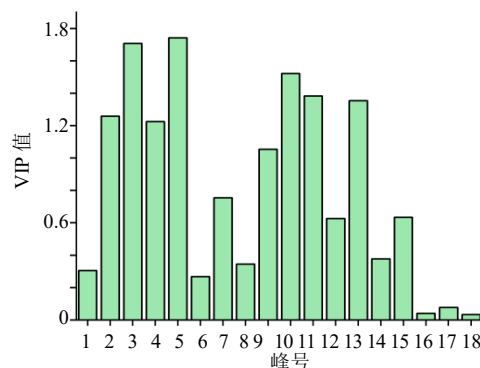


图4 50批宁夏枸杞叶中 18 个共有峰 VIP 值

Fig. 4 VIP values of 18 shared peaks in 50 batches of *L. barbarum* leaves

2.3 生物碱成分的含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸+5 mmol/L 乙酸铵, B 为乙腈; 梯度洗脱: 0~3 min, 1%~60% B; 3~4 min, 60%~70% B, 4~5 min, 70%~90% B; 5~8 min, 90%~1% B。柱温 30 °C、体积流量 0.1 mL/min、进样量 5 μL。

2.3.2 供试品溶液的制备 同“2.1.2”项。测样前需稀释 10 倍, 并用流动相定容。

2.3.3 对照品溶液的制备 分别称取对照品 5 mg, 并用流动相定容, 溶解到 5 mL 量瓶中, 得到的各对照品溶液质量浓度均为 1.0 mg/mL 的混合对照品溶液。分别放置于 4 °C 冰箱中备用。

2.3.4 线性关系考察 将对照品溶液以 10 倍的比例进行稀释, 制备出具有线性梯度的对照品, 并按照“2.3.1”项中的条件进行测定与分析。制作横坐标 (X) 为对照品溶液浓度、纵坐标 (Y) 为响应值的标准曲线 (表 5)。各对照品在 4.30~590.00 μg/g 线性良好, 线性关系良好。

表 5 线性关系考察

Table 5 Linear relationship examination table

分析物	回归方程	R ²
胆碱	$Y=1120.88X+8709.69$	0.995 6
甜菜碱	$Y=169.73X+1343.6$	0.998 1
葫芦巴碱	$Y=119.04X+1866.28$	0.990 3
枸杞素 A	$Y=4.40X+22.81$	0.998 8
枸杞素 B	$Y=3.93X+44.69$	0.999 8
N-反式阿魏酰酪胺	$Y=654.66X-1713.01$	0.999 8
N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺	$Y=2602.44X-20277.45$	0.999 2

2.3.5 精密度试验 取对照品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件连续进样 6 次。得到对照品 (胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、枸杞素 A、枸杞素 B、N-反式阿魏酰酪胺、N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺) 峰面积的 RSD 分别为 0.006%、0.028%、0.023%、0.101%、0.109%、0.007%、0.008%。

2.3.6 重复性试验 同批次样品 (S1) 按“2.3.2”项制备 6 份供试品溶液, 进样检测。计算所得供试品溶液中胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、枸杞素 A、枸杞素 B、N-反式阿魏酰酪胺、N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺质量分数的 RSD 分别为 0.013%、0.020%、0.024%、0.090%、0.094%、0.011% 和 0.013%。

2.3.7 稳定性试验 同批次样品 (S1) 根据“2.3.2”项方法制备供试品溶液, 在 0、4、8、12、18、24 h

测定。样品中胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、枸杞素 A、枸杞素 B、N-反式阿魏酰酪胺、N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺的峰面积的 RSD, 结果分别为 0.013%、0.020%、0.030%、0.091%、0.096%、0.052%、0.011%。

2.3.8 加样回收率试验 取已测定的宁夏枸杞叶样品粉末 6 份各 0.5 g, 精密称定, 分别加入等量的胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、枸杞素 A、枸杞素 B、N-反式阿魏酰酪胺、N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺对照品溶液, 按“2.1.2”项制备供试品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件进样测定, 计算加样回收率和 RSD 值。胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、枸杞素 A、枸杞素 B、N-反式阿魏酰酪胺、N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺的平均加样回收率分别为 104.8%、101.7%、102.5%、98.8%、96.4%、100.2%、106.7%, RSD 值分别为 0.50%、1.08%、0.12%、0.75%、1.49%、1.13%、1.34%。

2.3.9 宁夏枸杞叶生物碱含量测定 在“2.3.1”项的色谱条件下对“2.3.2”项下方法制备的 50 批供试品溶液进行测定, 计算 7 种生物碱成分的质量分数。结果见表 6。可以看出, 不同产地的宁夏枸杞叶片中生物碱成分有明显的差异。胆碱在中宁基地 2 中含量最高, 为 76.84 μg/g, 在银川基地 2 中含量最低; 甜菜碱在中宁基地 1 中含量最高, 为 549.14 μg/g, 在中宁基地 2 中含量最低; 葫芦巴碱在中宁基地 1 中含量最高, 为 46.55 μg/g, 在银川基地 2 中含量最低; 枸杞素 A 在中宁基地 2 中含量最高, 为 85.44 μg/g, 在银川基地 2 中含量最低; 枸杞素 B 在中宁基地 2 中最高为 107.58 μg/g, 在中宁基地 1 中含量最低; N-反式阿魏酰酪胺在银川基地 2 含量最高, 为 25.57 μg/g, 在中宁基地 2 基地含量最低; N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺在中宁基地 1 基地含量最高, 为 7.36 μg/g, 在中宁基地 2 含量最低。

另外, 通过含量测定结果箱线图分析 (图 5), 能够推测出不同产地宁夏枸杞叶中的代表性生物碱成分。甜菜碱和葫芦巴碱以及 N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺可作为区分中宁基地 1 与其他基地宁夏枸杞叶的差异性成分; N-反式阿魏酰酪胺可作为区分银川基地 2 与其他基地宁夏枸杞叶的差异性成分; 胆碱、枸杞素 A 和枸杞素 B 可作为区分中宁基地 2 与其他基地宁夏枸杞叶的差异性成分。其中中宁基地 1 与中宁基地 2、银川基地 1 和银川基地 2, 虽然都同属于一片产地, 但 2 个基地在生物碱含量上仍然存在差异, 生物碱活性成分也不尽相同, 推测造成含量差异的原因可能是与 2 个基地作物的栽培方

表 6 宁夏枸杞叶中生物碱成分含量的测定 (n = 3)

Table 6 Determination of content of alkaloidal components in leaves of *L. barbarum* (n = 3)

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	胆碱	甜菜碱	葫芦巴碱	枸杞素 A	枸杞素 B	N-反式阿魏酰酪胺	N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺
S1	37.65±1.19	552.96±18.27	44.27±14.10	73.52±11.03	49.54±9.33	19.80±7.28	6.77±2.06
S2	37.78±1.35	574.62±19.82	37.00±6.30	74.83±6.05	67.15±14.29	24.29±5.13	10.04±2.47
S3	40.08±2.92	546.32±12.27	39.38±9.25	72.71±9.38	41.65±29.96	26.03±5.28	9.42±3.72
S4	41.43±5.36	549.46±34.60	50.51±13.34	88.92±24.30	41.91±27.70	31.23±6.88	6.14±1.47
S5	37.19±1.18	581.41±25.15	35.14±5.74	71.57±14.37	56.99±30.16	25.30±9.44	9.99±1.68
S6	38.68±5.43	560.83±1.29	43.18±7.73	54.55±9.77	43.36±21.65	28.44±4.35	6.62±2.91
S7	41.73±4.58	538.96±13.67	53.34±4.09	73.79±26.36	40.58±5.07	22.29±6.77	5.92±0.99
S8	36.84±1.74	532.82±13.25	51.70±17.96	93.91±26.06	42.87±7.61	22.30±7.43	7.28±1.32
S9	40.39±3.79	521.16±17.35	57.58±5.66	85.91±14.79	43.28±10.33	23.13±6.42	5.91±0.46
S10	38.15±1.42	532.83±33.85	53.39±15.73	72.71±12.67	47.32±8.96	18.33±5.34	5.66±0.06
S11	84.73±5.59	406.74±19.09	29.22±6.37	83.82±1.27	112.90±8.41	9.75±3.20	4.55±0.64
S12	67.27±24.22	456.61±9.33	39.75±8.71	75.73±21.27	82.31±50.22	14.70±6.05	5.50±0.78
S13	63.58±24.46	458.05±5.33	41.79±13.24	59.00±43.96	86.76±45.29	13.37±3.93	5.85±0.45
S14	70.62±24.04	453.16±3.57	38.19±13.35	76.10±11.90	101.92±7.46	15.47±7.67	5.19±0.53
S15	76.78±5.98	415.82±9.49	32.61±2.55	91.82±6.84	113.31±12.63	9.10±1.44	5.12±0.49
S16	83.73±7.26	398.03±6.55	31.17±5.02	86.49±2.46	119.53±10.17	10.21±0.29	4.66±0.57
S17	78.93±2.75	415.00±6.18	32.34±4.13	104.58±11.46	124.50±9.77	10.25±0.94	5.12±0.75
S18	80.08±6.25	402.71±17.24	32.58±3.96	93.56±5.51	107.34±25.99	9.10±0.90	4.89±0.75
S19	78.99±4.57	417.96±6.06	33.75±3.41	101.39±16.81	111.36±16.20	10.47±2.66	5.56±1.33
S20	83.67±0.73	395.35±11.54	32.60±2.36	81.93±14.90	115.87±8.52	11.00±1.85	5.43±0.94
S21	39.66±4.01	530.73±11.64	47.88±3.80	70.03±13.34	71.01±14.39	13.51±3.56	6.14±1.85
S22	38.69±2.78	513.43±21.66	48.38±3.94	69.03±9.45	71.91±15.47	11.62±3.03	6.81±2.52
S23	45.33±2.33	517.86±31.72	45.51±8.18	91.77±37.65	83.02±13.87	12.15±4.99	6.02±2.20
S24	38.99±1.95	551.68±13.56	44.53±2.00	65.15±9.99	88.50±39.98	15.99±3.37	6.86±2.52
S25	38.96±3.96	550.91±9.51	46.45±5.71	69.78±13.04	90.93±39.50	13.23±4.29	7.30±2.89
S26	40.03±3.23	562.61±7.37	46.31±3.48	70.41±10.55	76.35±4.96	13.79±4.14	6.35±1.66
S27	36.99±2.74	555.94±15.84	46.62±5.32	83.76±10.03	90.51±33.29	12.65±2.51	7.92±2.27
S28	41.33±4.43	535.22±30.33	37.15±15.96	66.09±18.76	91.15±3.73	20.17±6.01	6.10±1.41
S29	41.56±1.88	548.90±13.68	45.46±7.12	73.00±18.30	71.38±8.01	16.61±8.77	6.71±0.92
S30	42.53±3.95	533.19±15.84	48.29±5.29	68.87±4.63	72.53±8.98	12.04±4.78	5.31±1.38
S31	41.58±4.65	496.37±11.98	33.35±4.23	71.14±35.00	92.37±5.61	13.71±3.20	6.34±3.64
S32	45.92±9.18	485.85±30.17	36.49±0.37	65.42±39.09	96.76±15.96	12.81±3.31	6.99±3.63
S33	63.46±15.80	449.43±32.31	33.85±4.83	98.90±1.20	83.49±1.27	9.83±2.71	4.86±4.43
S34	55.81±18.22	471.54±33.92	32.46±6.15	59.00±43.96	96.87±9.89	13.22±4.86	5.52±3.43
S35	38.21±3.70	550.75±4.13	36.53±4.34	105.91±18.16	102.30±12.21	18.00±14.46	10.07±0.76
S36	50.69±7.14	469.91±17.42	36.97±2.08	60.08±2.89	66.10±13.78	16.51±1.85	5.50±2.34
S37	42.40±1.54	526.42±10.69	38.37±4.09	95.10±4.93	105.96±20.29	12.77±1.04	10.36±1.26
S38	47.66±8.35	477.25±29.29	33.90±8.57	52.76±3.30	91.18±28.11	13.37±0.98	5.65±3.65
S39	41.36±5.70	492.09±6.81	38.77±3.47	75.52±9.60	83.76±11.11	14.23±6.07	7.89±0.97
S40	42.25±4.50	506.44±10.67	35.71±5.82	74.21±7.21	80.65±15.95	15.00±5.65	7.20±0.68
S41	36.49±1.28	513.38±17.36	25.95±5.59	68.97±27.19	96.77±15.18	25.04±4.25	6.97±3.24
S42	38.20±1.14	488.85±2.75	23.26±1.01	47.69±8.59	103.84±16.35	23.56±8.24	4.68±0.97
S43	36.42±3.48	505.78±31.99	25.19±2.27	69.28±38.57	98.29±9.55	19.82±4.85	5.84±2.44
S44	36.35±0.40	491.40±14.56	23.20±2.15	35.70±3.34	77.82±2.22	21.74±10.98	4.28±1.18
S45	37.69±1.92	490.86±5.76	22.99±3.68	37.08±3.35	91.89±11.96	20.43±7.72	4.15±0.59
S46	37.06±0.37	491.49±5.75	22.93±2.77	54.12±10.83	108.40±18.15	27.21±4.70	5.00±0.61
S47	42.84±5.38	561.75±5.98	30.83±7.81	84.91±11.15	123.68±13.20	32.11±11.76	10.33±2.56
S48	40.29±3.45	513.03±11.72	24.11±0.68	64.34±12.42	114.42±17.65	30.31±5.33	6.92±3.29
S49	38.02±5.92	552.36±14.88	29.74±4.94	97.05±8.65	106.30±9.31	25.81±8.32	10.74±0.91
S50	39.26±4.42	524.45±34.42	26.14±7.66	81.27±27.20	94.78±28.56	29.68±5.29	9.82±4.51

式、土壤的不同有关。

图 6 展示了宁夏 3 个产地 7 种生物碱活性成分的
总体平均含量, 3 个产地中总生物碱含量以固原产地

最高, 其中的甜菜碱含量明显高于其他组分。

3 讨论

枸杞产业是宁夏 6 大特色产业之一, 得益于宁

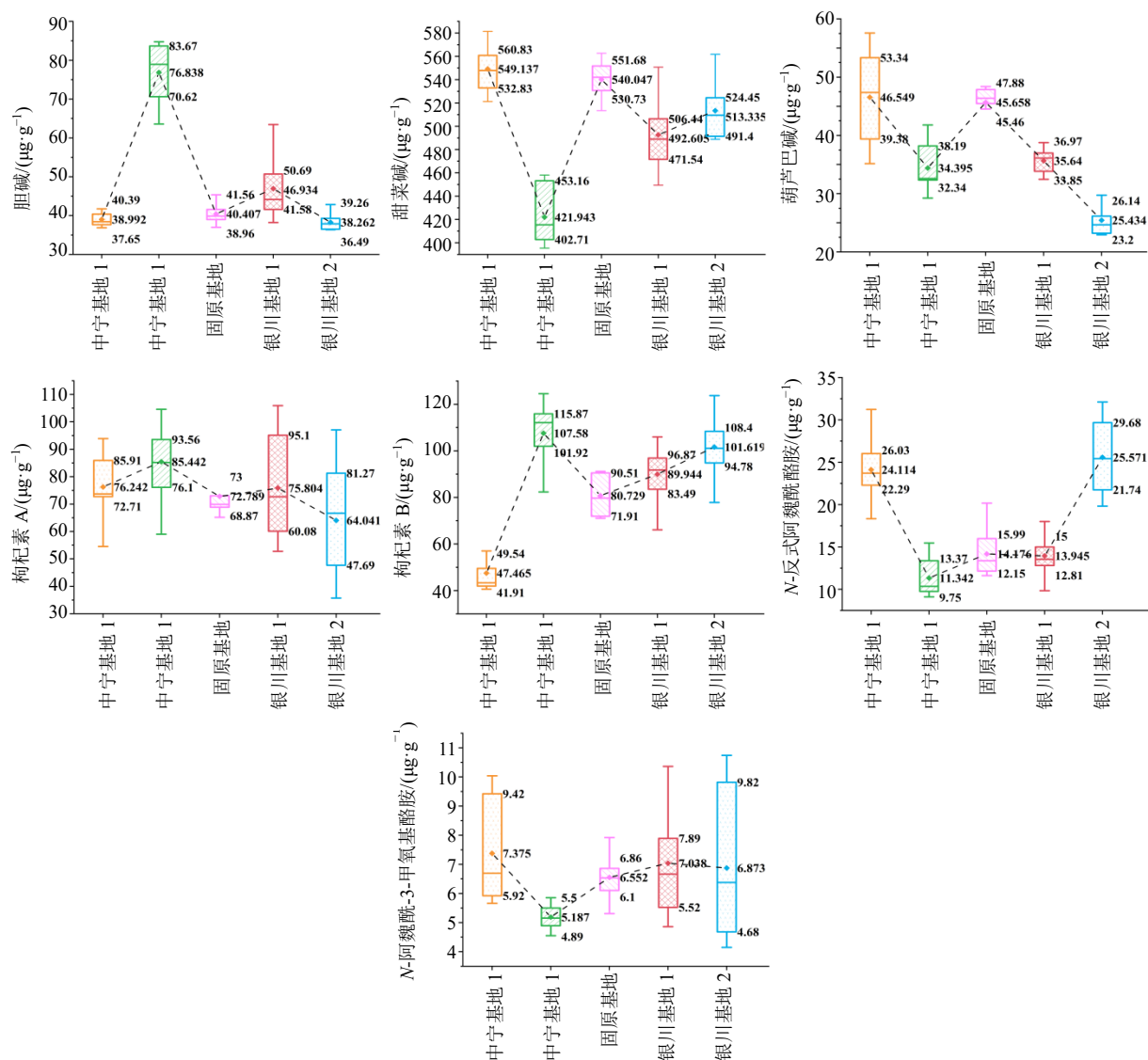


图 5 不同基地宁夏枸杞叶 7 种枸杞叶生物碱含量箱线图

Fig. 5 Box line diagram of alkaloid content of seven kinds of wolfberry leaves in different bases of *L. barbarum* leaves

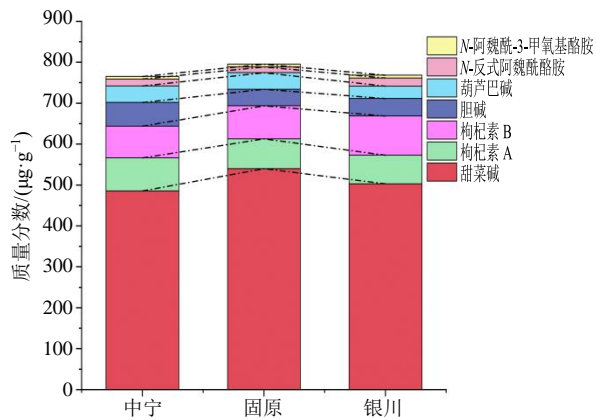


图 6 3 个产地宁夏枸杞叶 7 种生物碱平均含量堆积图

Fig. 6 Mean content of seven alkaloid fractions of *L. barbarum* leaves of three origins stacking diagram

宁夏回族自治区的大力扶持，枸杞产业得到了飞速发展，同时宁夏枸杞叶的加工和利用也日益受到更多的关注。更有研究表明，宁夏枸杞叶中的生物活性物质远高于枸杞子，使其成为是一种极具利用价值的药食资源，值得深入探寻其价值所在^[32]。

在本次研究中，使用了 50 批来自宁夏不同产地的宁夏枸杞叶构建 HPLC 生物碱指纹图谱，确定出 18 个共有峰，并运用相似度分析评价、HCA、PCA、OPLS-DA 的方法共同探讨不同产地之间的差异。同时，利用 LC-MS/MS 建立了一种快速测定宁夏枸杞叶中 7 种生物碱（胆碱、甜菜碱、葫芦巴碱、枸杞素 A、枸杞素 B、N-反式阿魏酰酪胺、N-阿魏酰-3-甲氧基酪胺）的方法，这一方法准确度良好，

能够在复杂的宁夏枸杞叶提取物中精准地识别和定量这7种生物碱,可为后续研究提供准确的数据基础,进而为深入探究其生物活性与药用价值奠定坚实的量化依据。通过直观的数据分析和多元统计分析结果表明,中宁基地1与中宁基地2、银川基地1和银川基地2,尽管位于同一地理区域内,但2个基地在生物碱含量上仍然存在差异,生物碱活性成分也不尽相同。这种在同一地理区域出现差异的现象可能暗示着微观环境因素的重要性。就栽培方式而言,灌溉方式和施肥方法的差异可能是关键因素之一^[33]。例如,采用滴灌的方式能够更精准地控制水分供给,而采用漫灌的方式可能导致土壤水分分布不均,进而影响宁夏枸杞叶对养分的吸收与生物碱的合成。同样,不同的肥料种类、施肥时间和施肥量会改变土壤中的营养元素比例,亦可能影响到生物碱的产生。

另外,在对分析结果进行研究时还观察到,宁夏枸杞叶中甜菜碱的含量明显高于其他6种生物碱成分,并且与传统用药部位枸杞子相比,宁夏枸杞叶中的甜菜碱含量更是远高于枸杞子的甜菜碱含量^[34],这一发现为枸杞叶的开发利用提供了新视角。由于甜菜碱具有降血压、改善心脏功能、预防血栓、改善血液循环等作用^[35],使得枸杞叶在心血管疾病的预防与辅助治疗方面具有潜在的应用前景。基于此,可以充分利用甜菜碱的这些功效特性,将宁夏枸杞叶提取物加工制作成诸如胶囊、片剂或者口服液等特定的保健品剂型,以此来满足特定人群对于心血管健康维护方面的需求。在工业生产领域,甜菜碱还可被用作食品添加剂、营养强化剂以及稳定剂等。此外,与化学合成药物相比,天然存在的生物碱具有更高的安全性,更容易获得广大消费者的认可。在以往的枸杞种植过程中,人们往往将主要精力集中在枸杞子的收获与利用方面而忽略叶的利用。通过对宁夏枸杞叶生物碱成分进行深度开发,能够构建起枸杞全株综合利用的全新模式,有力地推动枸杞产业朝着绿色、可持续的方向大步迈进,最终达成经济效益与生态效益双赢的良好局面。

此外,鉴于枸杞叶在其生长发育的不同阶段内,生物碱积累程度展现出显著的差异性,这一变化直接关系到对枸杞叶生物碱品质的综合评估。鉴于此,本课题组未来将继续展开更为详尽的研究,旨在探究不同地域来源及采摘时间点的枸杞叶中,

生物碱的具体特征及其代谢产物的动态演变规律,从而为科学评估枸杞叶品质特性及潜在应用价值提供坚实的理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宁夏食品药品监督管理局. 宁夏中药材标准 [M]. 银川: 阳光出版社, 2018: 69-71.
- [2] 中国药典 [S]. 四部. 2025: 59-60.
- [3] Wen Lee H, Bi X Y, Jeyakumar Henry C. Carotenoids, tocopherols and phyloquinone content of 26 green leafy vegetables commonly consumed in Southeast Asia [J]. *Food Chem*, 2022, 385: 132729.
- [4] 宿树兰, 郭盛, 朱悦, 等. 枸杞叶现代研究进展与资源化利用展望 [J]. *中国现代中药*, 2022, 24(1): 10-19.
- [5] 孙红亮. 枸杞叶的研究及利用 [J]. *山西农业科学*, 2017, 45(6): 1037-1039.
- [6] 李润淮, 石志刚, 安巍, 等. 菜用枸杞新品种宁杞菜1号 [J]. *中国蔬菜*, 2002(5): 48.
- [7] 李永华, 杨柳, 南雄雄, 等. 不同叶用枸杞新品种营养成分及产量的对比 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(13): 113-116.
- [8] 吕慕洁. 枸杞叶主要酚类成分和生物活性的综合评价及其高效提取富集工艺 [D]. 北京: 北京林业大学, 2021: 1-2.
- [9] Zhao J H, Xu Y H, Li H X, *et al.* Metabolite-based genome-wide association studies enable the dissection of the genetic bases of flavonoids, betaine and spermidine in wolfberry (*Lycium*) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2024, 22(6): 1435-1452.
- [10] Yu Z L, Xia M Q, Lan J P, *et al.* A comprehensive review on the ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and quality control of the genus *Lycium* in China [J]. *Food Funct*, 2023, 14(7): 2998-3025.
- [11] 陈栋杰, 郭盛, 伊艳玲, 等. 枸杞属植物酰胺类成分及其生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(1): 317-333.
- [12] Ma R H, Zhang X X, Thakur K, *et al.* Research progress of *Lycium barbarum* L. as functional food: Phytochemical composition and health benefits [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2022, 47: 100871.
- [13] Chen H, Kong J B, Zhang L, *et al.* Lycibarbarines A-C, three tetrahydroquinoline alkaloids possessing a spiro-heterocycle moiety from the fruits of *Lycium barbarum* [J]. *Org Lett*, 2021, 23(3): 858-862.
- [14] Teixeira F, Silva A M, Delerue-Matos C, *et al.* *Lycium barbarum* berries (Solanaceae) as source of bioactive compounds for healthy purposes: A review [J]. *Int J Mol*

- Sci*, 2023, 24(5): 4777.
- [15] Li Y T, Wang X Y, Sa Y P, *et al.* A comparative UHPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach reveals the metabolite profiling of wolfberry sourced from different geographical origins [J]. *Food Chem X*, 2024, 21: 101221.
- [16] Wang S L, Zhang R, Song X Y, *et al.* Mechanochemical-assisted extraction of active alkaloids from plant with solid acids [J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2019, 7(1): 197-207.
- [17] Bendjedou H, Barboni L, Maggi F, *et al.* Alkaloids and sesquiterpenes from roots and leaves of *Lycium europaeum* L. (Solanaceae) with antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(16): 2784-2788.
- [18] Lei Z L, Chen X Q, Cao F L, *et al.* Phytochemicals and bioactivities of Goji (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) leaves and their potential applications in the food industry: A review [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2022, 57(3): 1451-1461.
- [19] Yan Y M, Li X, Zhang C H, *et al.* Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids: A review [J]. *Antibiotics*, 2021, 10(3): 318.
- [20] Gracheva I A, Shchegravina E S, Schmalz H G, *et al.* Colchicine alkaloids and synthetic analogues: Current progress and perspectives [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(19): 10618-10651.
- [21] 张欣蕊, 蒋孝峰, 张逸婷, 等. HPLC 指纹图谱、多成分定量、UFLC-Q-TOF MS/MS 表征技术相结合的黄芩药材质量评价研究 [J]. *中药材*, 2024, 47(5): 1181-1189.
- [22] 吴瑞, 程庆兵, 金凤华, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别评价不同品种梅花的质量及抗氧化活性 [J]. *中草药*, 2026, 57(2): 652-664.
- [23] Luo Y D, Yang H B, Tao G C. Systematic review on fingerprinting development to determine adulteration of Chinese herbal medicines [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155667.
- [24] Liu X Y, Jiang W W, Su M, *et al.* Quality evaluation of traditional Chinese medicines based on fingerprinting [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(1): 6-17.
- [25] Noviana E, Indrayanto G, Rohman A. Advances in fingerprint analysis for standardization and quality control of herbal medicines [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 853023.
- [26] 赵雪琴. 宁夏枸杞叶及花的资源化学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [27] dos Santos G S, de Almeida Veiga A, Carlotto J, *et al.* Identification and fingerprint analysis of novel multi-isomeric Lycibarbarspermidines and Lycibarbarspermines from *Lycium barbarum* L. by liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Orbitrap) [J]. *J Food Compos Anal*, 2022, 105: 104194.
- [28] Jaeger A, Banks D. Cluster analysis: A modern statistical review [J]. *Wires Comput Stat*, 2023, 15(3): e1597.
- [29] Greenacre M, Groenen P J F, Hastie T, *et al.* Principal component analysis [J]. *Nat Rev Meth Primers*, 2022, 2: 100.
- [30] 赵雪琴, 郭盛, 卢有媛, 等. 宁夏枸杞叶水溶性营养成分分析及产地差异研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(8): 2084-2093.
- [31] 周德来, 王苗, 冯金梁, 等. 基于广泛靶向代谢组学研究甘草不同年限差异代谢物 [J]. *药物分析杂志*, 2024, 44(1): 125-132.
- [32] 曹有龙. 宁夏枸杞产业高质量发展存在的问题与对策 [J]. *宁夏农林科技*, 2024, 65(5): 81-84.
- [33] Huang X, Rong W W, Zhang X X, *et al.* Transcriptome and metabolome analysis reveal the dynamic changes and biosynthesis pathways of alkaloids in *Sophora alopecuroides* L. under drought stress [J]. *Ind Crops Prod*, 2024, 212: 118365.
- [34] 郑慧丽, 郭盛, 朱悦, 等. 枸杞属植物中甜菜碱类物质功能价值研究进展与产业化展望 [J]. *中国现代中药*, 2022, 24(1): 28-40.
- [35] Arumugam M K, Paal M C, Donohue T M Jr, *et al.* Beneficial effects of betaine: A comprehensive review [J]. *Biology*, 2021, 10(6): 456.

[责任编辑 时圣明]