

不同生长期紫花苜蓿中苜蓿素的测定

王淑惠¹, 李兰芳^{2*}, 张勤增³, 刘智鹏⁴, 徐兴俊^{5**}

(1. 石家庄市疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050011; 2. 河北省医学科学院, 河北 石家庄 050021;

3. 黄骅市骨科医院, 河北 黄骅 061100)

摘要:目的 测定紫花苜蓿在不同生长期苜蓿素的量, 为合理利用资源提供实验依据。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Zorbax SB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (65:35) 为流动相, 体积流量为 0.8 mL/min, 检测波长为 349 nm, 进样量为 5 μL。结果 在紫花苜蓿不同生长期苜蓿素的量不同, 8 月份量最高。结论 苜蓿在不同生长期苜蓿素的量不同, 如果主要利用紫花苜蓿中的苜蓿素时应在 8 月中旬采收。

关键词:不同生长期; 紫花苜蓿; 苜蓿素; HPLC**中图分类号:** R286.02**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2670(2009)02-0311-03

紫花苜蓿 *Medicago sativa* L. 为多年生宿根草本植物, 本属约有 70 余种, 分布于地中海区域、西南亚、中亚和非洲。紫花苜蓿在我国种植已有 2 000 多年的历史, 主要在畜牧业作为饲料应用。民间作为传统的草药用于治疗细菌性痢疾、肺热咳嗽、黄疸、膀胱结石等症^[1]。国内外学者报道苜蓿皂苷具有防治高脂血症和动脉粥样硬化作用^[2~4]。苜蓿中的黄酮类成分苜蓿素具有抗氧化^[5]、松弛平滑肌、抗肿瘤^[6]和植物生长调节作用。本研究考察不同生长期紫花苜蓿中苜蓿素的变化, 为苜蓿的深加工和合理利用这一受到广泛关注的资源提供理论依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统, 包括二极管阵列检测器 (DAD), 四元低压梯度泵, 真空脱气机, 柱温箱, 自动进样器。KQ-250 DB 型数控超声波仪 (昆山市超声仪器有限公司), Mettler AE240 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]。甲醇为色谱纯, 水为 2 次蒸馏水。其他试剂均为分析纯。

苜蓿素对照品由本室自制, 经熔点、光谱、核磁共振、质谱鉴定结构, 质量分数为 99.1%。苜蓿采自河北沧州黄骅, 经河北省药品检验所孙惠葆主任药师鉴定为紫花苜蓿 *M. sativa* L. 的全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与适应性试验: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ (250 mm × 4.5 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (65:35); 体积流量为 0.8 mL/min; 波长为 349 nm; 检测温度: 室温; 理论塔板数按苜蓿素计不

低于 3 000; 分离度 > 1.5。色谱图见图 1。

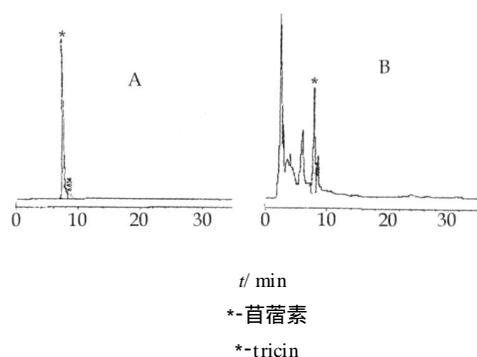


图 1 苜蓿素对照品 (A) 和苜蓿 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC Chromatograms of triclin reference substance (A) and *M. sativa* sample (B)

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取苜蓿素对照品 1.0 mg, 加甲醇制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的溶液, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备^[7]: 取干燥后紫花苜蓿全草粉末 (20 目) 约 1 g, 精密称定, 加入 70% 乙醇 20 mL, 浸泡过夜, 超声处理 20 min, 滤过, 保留提取液, 残渣再加 70% 乙醇 20 mL, 超声 20 min, 滤过, 共超声提取 3 次, 合并 3 次提取液, 回收乙醇, 浓缩至干。残渣加 10 mL 蒸馏水溶解, 用醋酸乙酯萃取 3 次 (15、15、10 mL), 合并萃取液, 水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 2 mL, 作为供试品溶液。

2.4 标准曲线与线性关系考察: 精密吸取苜蓿素对照品溶液适量, 分别制成 5、10、20、40、60、100 μg/mL 的对照品工作溶液, 精密吸取 5 μL, 注入液相色谱仪。质量浓度为横坐标, 峰面积积分为纵坐标,

* 收稿日期: 2008-05-13

基金项目: 河北省科技攻关计划课题 (04276101D-51)

作者简介: 王淑惠 (1966—), 女, 河北满城人, 副主任检验技师, 研究方向为药物分析研究。 E-mail: shuhuiwang8888@163.com

* 通讯作者 李兰芳 Tel: (0311) 86573415 E-mail: yaoyanllf@163.com

绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 6.9996 X - 8.1037 (r = 0.9999)$ 。结果表明在 $0.025 \sim 0.5 \mu\text{g}$ 苜蓿素质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取苜蓿素对照品溶液($20 \mu\text{g}/\text{mL}$)进样量为 $5 \mu\text{L}$,连续进样 5 次,测定其峰面积,结果峰面积 RSD 为 0.68% 。

2.6 重现性试验:取同一份紫花苜蓿样品,精密称取 5 份,按供试品溶液制备方法平行操作。结果苜蓿素质量分数的 RSD 为 1.79% ,说明方法重现性较好。

2.7 稳定性试验:同一批苜蓿供试品溶液,分别在制备后 $0、2、4、6、8 \text{ h}$ 检测。结果以苜蓿素峰面积计,RSD 为 1.66% 。

2.8 回收率试验:采用加样回收法。精密称定已知苜蓿素量的同一批样品 6 份,分别加入苜蓿素对照品溶液($0.5004 \text{ mg}/\text{mL}$) $0.090、0.120、0.160 \text{ mL}$,按供试品溶液的制备方法制备。测定,结果苜蓿素的平均回收率为 96.81% ,RSD 为 3.95% 。

2.9 样品测定:分别精密吸取对照品溶液和样品溶液各 $5 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测定,计算。河北沧州黄骅不同生长期的紫花苜蓿样品测定结果见表 1。

表 1 不同生长期的紫花苜蓿中苜蓿素的测定结果($n = 2$)

Table 1 Determination of tricin in *M. sativa* in different growth periods ($n = 2$)

| 采收日期 | 苜蓿素/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ |
|------------|--|
| 2006-06-15 | 0.174 0 |
| 2006-07-01 | 0.242 6 |
| 2006-07-15 | 0.256 6 |
| 2006-08-01 | 0.291 7 |
| 2006-08-15 | 0.319 8 |
| 2006-09-01 | 0.173 1 |
| 2006-09-15 | 0.129 7 |

3 讨论

经对河北黄骅栽种紫花苜蓿一年不同生长期中苜蓿素的量考察,结果表明,从 6 月份后随着紫花苜蓿的生长过程苜蓿素量有逐渐增加的趋势,到 8 月

中旬量最高,9 月份量下降。为利用紫花苜蓿中苜蓿素的开发项目提供了合理利用资源的实验依据。

3.1 样品的前处理参照文献方法^[7]采用了正交试验设计,筛选乙醇体积分数、超声时间、溶剂用量、提取次数等影响因素,以苜蓿素量为考察指标进行考察。结果表明,用 20 倍量的 70% 乙醇,提取 3 次,每次超声处理 20 min 为最佳提取条件。

3.2 本试验比较了 70% 乙醇、 70% 甲醇为提取溶剂时的提取效率。以上 2 种溶剂在相同条件下分别测定样品中苜蓿素的量,结果表明两种溶剂提取率相近,因为甲醇毒性大,所以选择 70% 乙醇为本试验的提取溶剂。

3.3 在样品进样量选择上,试验开始时分别选择 $2.5、5、10、15 \mu\text{L}$ 对照品进行试验,结果上述 4 种条件均出现不同程度的拖尾现象,其中 $10、15 \mu\text{L}$ 的进样量拖尾现象较为严重, $2.5 \mu\text{L}$ 的进样量过少,受偶然因素影响较多,因此选择进样量为 $5 \mu\text{L}$ 为最佳进样量。

参考文献:

- [1] 宋立人,洪 恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [2] 丛学滋,秦孟根,李子行,等. 苜蓿皂苷的降胆固醇及减轻实验性动脉粥样硬化形成的作用 [J]. 中国药理学通报, 1988, 4(5): 293-296.
- [3] Malinow M R, McLaughlin P, Naito H K, et al. Effect of alfalfa meal on shrinkage (regression) of atherosclerotic plaques during cholesterol feeding in monkeys [J]. *Atherosclerosis*, 1978, 30: 27.
- [4] Malinow M R, McLaughlin P, Stafford C, et al. Alfalfa saponins and alfalfa seeds: dietary effects in cholesterol-fed rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 1980, 37(3): 433.
- [5] 卢 成,曾昭海,张 涛,等. 紫花苜蓿生物活性成分研究进展 [J]. 草业科学, 2005, 22(9): 28-31.
- [6] Wang H K, Xia Y, Yang Z Y, et al. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as anti-tumor and anti-HIV agents [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 439: 191.
- [7] 李存满,李兰芳,张勤增. 高效液相色谱法测定苜蓿中苜蓿素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(4): 494-496.

