

紫花苜蓿不同品种和不同季节黄酮量的比较研究

徐文燕¹,高微微^{1*},何春年¹,佟建明^{2*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所,北京 100193;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,北京 100193)

摘要:目的 考察不同品种和采收季节对紫花苜蓿中黄酮量的影响。方法 以苜蓿素为对照品,对紫外分光光度法测定紫花苜蓿总黄酮的量进行方法学考察,对北京地区种植的9个紫花苜蓿品种在春、夏、秋季3个采收期总黄酮的量进行测定分析。结果 9个紫花苜蓿品种中,“费纳尔”和“爱维兰”总黄酮量显著高于其他品种($P < 0.05$),其他7个品种间无显著差异($P > 0.05$);在3个采收季节中,各品种在秋季的黄酮量均高于春、夏两季,其中“费纳尔”、“爱维兰”和“爱菲尼”总黄酮的量在3个季节差异不显著($P > 0.05$),“美标304”、“胜利者”和“改革者”则有显著差异($P < 0.05$)。结论 品种和采收季节对紫花苜蓿中的总黄酮的量均有明显影响,而不同品种中的总黄酮对季节变化的敏感性不同。

关键词:紫花苜蓿;黄酮;品种;采收季节;紫外分光光度法

中图分类号:R282.6 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)05-0815-03

紫花苜蓿 *Medicago sativa* L. 为多年生豆科 (Leguminosa) 草本植物^[1],世界各地广泛作为牧草使用。在我国主要分布于西北、华北、东北、西南地区,栽培面积达到 2×10^6 hm²。在我国民间用于治疗消化不良、肺热咳嗽、黄疸、膀胱结石等症^[2]。现代医学研究发现苜蓿具有降低胆固醇^[3]、防治冠心病^[4]等活性,紫花苜蓿主要含有黄酮、皂苷、香豆素、甾醇、单萜和有机酸等化学成分,其中黄酮类化合物是主要功效成分群^[5]。开发苜蓿的药用功能对于苜蓿产品的深层次开发以提高苜蓿的利用价值具有重要意义。

大量研究表明,环境因子包括光照、温度、CO₂浓度、矿质营养和土壤水分等因素对植物中黄酮类物质的合成具有显著影响^[6]。以往对紫花苜蓿中黄酮的研究主要集中在化合物鉴定^[5]、抗植物病原菌^[7]及其代谢调控等方面^[8],关于苜蓿黄酮的定量检测方法报道很少,品种及环境因子对其生物合成的影响尚不清楚。本实验选择目前广泛栽培的9个优良紫花苜蓿品种为研究对象,以本实验室纯化的苜蓿素为对照品,旨在建立紫花苜蓿中总黄酮的测定方法,并通过量的对比,探讨品种、采收期对紫花苜蓿黄酮生物合成的影响,为紫花苜蓿采收期的确定以及苜蓿资源的开发利用奠定方法学基础。

1 仪器与试剂

PEG-Unican PU8000-752C 紫外可见光分光

光度计(上海经三分析仪器厂);KQ-2500DB型超声清洗器(昆山超声仪器有限公司);HANG PING FA 1104天平(上海经三分析仪器厂)。对照品苜蓿素为本实验室自制,质量分数达到98%以上,实验所用试剂均为国产分析纯试剂。

9个紫花苜蓿品种“爱菲尼”、“爱维兰”、“改革者”、“阿波罗”、“美标304”、“胜利者”、“巨人”、“全能”和“费纳尔”由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所杨青川研究员提供,种植于北京畜牧兽医研究所苜蓿试验地,按随机区组设计,小区面积8.3 m²,重复3次,田间管理一致。采收期分别为2006年6月15日、8月15日和10月15日,样品生育期为初花期。每个品种在3个试验小区内分别随机取1个点,每点约20~30株,取植株地上部分,同一品种的3份样品混合,室温干燥。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备:苜蓿素对照品减压干燥至恒重,精密称定10.02 mg,加甲醇溶解定溶至25 mL,得到质量浓度为400.8 μg/mL的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备:干燥后的紫花苜蓿茎叶,粉碎,过40目筛,取1 g左右,精密称定,置于50 mL容量瓶中,加70%乙醇,超声提取60 min,补加70%乙醇至刻度,摇匀,滤过,为供试品溶液。

2.3 测定波长的选择:分别取供试品溶液和对照品溶液各2 mL,在紫外分光光度计上于200~500 nm

* 收稿日期:2008-08-09

基金项目:国家科技部“十一五”科技支撑项目(2006BAD12B05)

作者简介:徐文燕(1980—),女,河南省安阳市人,硕士研究生,主要从事植物化学与分析研究。

Tel:(010)62812809 E-mail:xuwenyan1980@126.com

*通讯作者 高微微 E-mail:wwgao@implad.ac.cn 佟建明 E-mail:tjm606@263.net

扫描,结果对照品溶液与供试品溶液在 207 和 354 nm 处有最大吸收,为了避免低波长处杂质的干扰,选择 354 nm 为检测波长进行样品测定。

2.4 标准曲线的制备:对照品溶液按 3.206、4.896、5.010、9.619、10.02、12.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 配出系列质量浓度对照品溶液,在 354 nm 波长处测定吸光度,扣除溶剂空白,以吸光度(A)对质量浓度(C)进行线性回归,得到标准曲线方程: $A = 0.0619C + 0.0146$, $R^2 = 0.9996$,线性范围:3.206~12.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.5 精密度试验:精密称取测试样品溶液,重复测定 6 次,吸光度的 RSD 为 0.11%。

2.6 稳定性试验:精密吸取供试品溶液,于室温分别放置 0、1、2、4、6、12、36、48 h 测定,吸光度的 RSD 为 3.1063%。

2.7 重现性试验:精密称取同批样品 5 份,按 1.3.2 方法制备供试品溶液,测定吸光度,计算,总黄酮的 RSD 为 0.549%。

2.8 回收率试验:取已测定的紫花苜蓿样品 5 份,每份约 0.073 g,精密称定,分别精密加入苜蓿素对照品 0.0308 g,按 1.3.2 方法制备供试品溶液并测定,加样回收率平均值为 98.36%,RSD 为 2.37%。

2.9 样品测定:紫花苜蓿样品按 1.3.2 方法制备供试品溶液并测定,每份样品重复 3 次。数据处理用 SPSS 10.0 软件进行单因子方差分析,LSD 测验进行多重比较。

2.9.1 不同品种紫花苜蓿黄酮量的比较:选择 6 月份采收的 9 个紫花苜蓿品种,分别测定其茎叶比(茎质量/叶质量)、叶片、茎及地上部植株样品中总黄酮的量,结果见表 1。茎部总黄酮的量以“胜利者”最高为 2.537 mg/g,“爱菲尼”最低为 1.753 mg/g;叶片中总黄酮的量以“阿波罗”最高为 8.83 mg/g,“改革者”最低 6.43 mg/g,各品种叶中黄酮的量差异显著($P < 0.05$);植株中总黄酮的量以“费纳尔”最高为 5.58 mg/g,“改革者”最低为 4.57 mg/g,其他品种中“爱维兰”量较高为 5.14 mg/g。

通过比较可以看出,叶片中黄酮的量远远高于茎,同一品种叶片中的黄酮量与茎中黄酮量没有明显相关性,因此叶片比例高的品种黄酮的量相对较高。不同品种之间植株黄酮的量存在差异,通过茎叶比例得出的黄酮量推算值与茎叶混合样品的测量结果相比差异不明显,说明样品的制备方法可以达到充分均匀的程度。

2.9.2 不同采收季节总黄酮量比较:栽培的紫花苜蓿在北京地区一年收获 3~4 茬,分别在春、夏、秋 3

表 1 不同品种紫花苜蓿黄酮量的比较 (n = 4)

Table 1 Comparison of flavonoids content in different *M. sativa* cultivars (n = 4)

品种	总黄酮 (mg · g ⁻¹)			
	茎	叶	植株推算值*	植株样品**
爱菲尼	1.753 ± 0.001 a**	7.175 ± 0.001 c	4.632 ± 0.001	4.656 ± 0.012 a
巨人	2.052 ± 0.004 c	7.725 ± 0.006 e	4.650 ± 0.004	4.662 ± 0.044 a
胜利者	2.537 ± 0.007 e	7.399 ± 0.006 d	4.603 ± 0.006	4.650 ± 0.287 a
美标 304	1.909 ± 0.006 b	6.760 ± 0.011 b	4.800 ± 0.008	4.835 ± 0.105 ab
改革者	1.911 ± 0.008 b	6.427 ± 0.003 a	4.522 ± 0.005	4.570 ± 0.077 a
阿波罗	2.167 ± 0.010 c	8.830 ± 0.015 i	4.664 ± 0.011	4.680 ± 0.096 a
全能	2.172 ± 0.004 c	8.346 ± 0.001 g	4.781 ± 0.003	4.793 ± 0.305 a
爱维兰	2.293 ± 0.009 d	8.122 ± 0.001 f	5.123 ± 0.005	5.144 ± 0.410 b
费纳尔	1.917 ± 0.004 b	8.809 ± 0.002 h	5.436 ± 0.003	5.581 ± 0.017 b

* 茎叶推算值 = 茎的黄酮量 × 茎在植株地上部分所占比例 + 叶的黄酮量 × 叶在植株地上部分所占比例

** 植株样品:为植株地上部分茎叶测定值

*** LSD 测验 ($P = 0.05$),同一列标记字母相同差异不显著 ($P > 0.05$)

* calculated values of content = flavonoids content of stem × ratio of stem to aerial part of plant + flavonoids content of leaves × ratio of leaves to aerial part to plant

** measurement values of aerial part of plant

*** values in same column followed by same letter are not statistically different at $P = 0.05$ by LSD test

个季节,本实验对春、夏、秋季 3 次采收的 9 个紫花苜蓿品种中总黄酮量的测定分析结果见表 2。结果表明所有品种 10 月采收的样品中总黄酮量普遍高于 6 月和 8 月采收的样品。各季节采收的苜蓿品种中总黄酮的量均以“费纳尔”和“爱维兰”较高,“改革者”较低。各品种中“爱菲尼”、“爱维兰”和“费纳尔”3 个采收期总黄酮的量差异未达到显著水平 ($P < 0.05$),说明这 3 个品种的总黄酮的量受季节影响相对较小;而“美标 304”、“胜利者”和“改革者”中总黄酮的量在 3 个季节中均表现出显著差异 ($P < 0.05$),黄酮对季节变化较为敏感。

3 讨论

紫花苜蓿中已报道的黄酮类(flavonoid)成分共 40 个,是紫花苜蓿的主要化合物类型^[5],苜蓿素(tricin)是其中的活性成分之一^[9]。紫外分光光度方法利用黄酮类化合物有明显紫外吸收的特性,普遍用于测定植物中总黄酮的量。选择合适的对照品和测定波长是该方法需要考察的主要因素,由于不同植物所含黄酮类型不同,在对照品和测定波长的选择上有明显差异。丛媛媛等^[10]以芦丁为对照品,测定了新疆地区紫花苜蓿中总黄酮的量为 0.258%,与本实验测定的结果 4.6%~5.6%有较大差距,一方面可能是苜蓿品种与栽培地区不同,另一方面对照品不同也是重要的原因。Gammal^[11]曾报道褐斑

表 2 不同采收期紫花苜蓿总黄酮量的变化 (n = 4)
Table 2 Variations in content of flavonoids in *M. sativa* at different harvest seasons (n = 4)

品 种	总黄酮/(mg · g ⁻¹)		
	6 月	8 月	10 月
爱菲尼	4.656 ± 0.012 a	4.818 ± 0.513 a	4.947 ± 0.016 a
胜利者	4.650 ± 0.287 a	4.229 ± 0.011 b	5.050 ± 0.016 c
巨人	4.662 ± 0.044 a	4.783 ± 0.158 a	5.582 ± 0.020 b
美标 304	4.835 ± 0.105 a	4.247 ± 0.053 b	5.017 ± 0.015 c
改革者	4.570 ± 0.077 a	3.811 ± 0.136 b	4.962 ± 0.012 c
阿波罗	4.680 ± 0.096 a	4.721 ± 0.009 a	5.405 ± 0.102 b
全能	4.793 ± 0.305 a	4.959 ± 0.078 a	5.202 ± 0.063 b
爱维兰	5.144 ± 0.410 a	4.992 ± 0.045 a	5.618 ± 0.024 a
费纳尔	5.581 ± 0.017 a	5.329 ± 0.036 a	5.595 ± 0.070 a

LSD 测验 ($P = 0.05$), 同一行标记字母相同为差异不显著 ($P > 0.05$)

Values in same line followed by same letter do not indicate significant difference at $P = 0.05$ by LSD test

苜蓿 *M. arabica* (Linn.) Huds. 中含有芦丁, 而在紫花苜蓿中未见含有芦丁的报道, 笔者用 HPLC 检测了试验所用的紫花苜蓿样品, 未发现含有芦丁, 因此本研究选用苜蓿素为对照品, 建立紫花苜蓿总黄酮量的测定方法, 其重现性和回收率的 RSD 值均在 3% 以下。

遗传与环境是影响植物次生代谢产物的两个主要方面。本实验采用的品种均采自中国农业科学院北京畜牧兽医研究所苜蓿品种对比试验地, 气候、土壤等环境差别不大, 栽培管理措施一致, 可以认为同一采收期的品种间黄酮量的差异主要来源于遗传的差异。9 个参试品种总黄酮的量有明显差异, 其中“费纳尔”和“爱维兰”为黄酮量较高的品种, “爱菲尼”和“改革者”黄酮量较低, 并且在 3 个采收季节表现基本一致。由于紫花苜蓿叶片中黄酮的量远远高于茎中的量, 因此叶片比例高的品种黄酮量相对较高。

紫花苜蓿在北京地区一年收割 3~4 次, 分别为 5 月中下旬、6 月中下旬、8 月中下旬和 10 月中下旬, 由于采收季节不同, 生长过程中温度、光照、湿度

有很大差异。来自于同一试验地同一品种的样品, 在不同采收季节黄酮量的变化主要来源于气候差异。一般认为, 高光照强度、低温以及较低的湿度有利于黄酮类物质的合成^[6]。根据记录的气象数据, 实验当年 6 月平均温度为 25, 紫外线强度为 3.6 级, 平均湿度为 55%; 8 月平均温度为 28, 紫外线强度为 3.8 级, 平均湿度为 70%; 10 月平均温度为 19, 紫外线强度为 3.5 级, 平均湿度为 45%。在紫外线强度相差不大的情况下, 10 月较低的温度和湿度可能是样品中黄酮量较高的主要原因。

本实验首次报道了紫花苜蓿不同品种中的总黄酮对季节变化的敏感性不同, 即某些品种中黄酮的量随季节变化不明显, 而另外一些品种中黄酮的量则显著受季节影响, 具体机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第四十二卷, 第二分册. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 李时珍. 本草纲目 (校点本) [M]. 第三册, 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
- [3] 刘 凯, 余书勤. 苜蓿皂甙对胆固醇排泄和内皮细胞释放一氧化氮的影响 [J]. 徐州医学院学报, 1999, 19(6): 443-444.
- [4] Hwang J, Hodis H N, Sevanian A. Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(1): 308-314.
- [5] 何春年, 李 展, 高微微, 等. 苜蓿属植物的黄酮类化学成分研究概况 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(8): 565-568.
- [6] 徐文燕, 高微微, 何春年. 环境因子对植物黄酮类化合物生物合成的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2006, 8(6): 68-72.
- [7] Liu C J, Deavours B E, Richard S B, et al. Structural basis for dual functionality of isoflavonoid O-methyltransferases in the evolution of plant defense responses [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3656-3669.
- [8] Paiva N L, Oommen A, Harrison M J, et al. Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1994, 38(2): 213-220.
- [9] Cai H, Mohammad A, Richard G, et al. The rice bran constituent tricin potentially inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in ApcMin mice [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(9): 1287-1292.
- [10] 丛媛媛, 帕丽达·阿不力孜, 赵文惠. 紫外分光光度法测定紫花苜蓿黄酮的含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 363.
- [11] Gammal A A, Mansour R M A. Antimicrobial activities of some flavonoid compounds [J]. *Zentralbl Mikrobiol*, 1986, 141(7): 561-565.