

淮阳金花菜脂溶性成分分析

彭娟¹, 马伯艳², 范斌¹, 闫寒¹, 李杨¹, 聂颖兰¹, 孙健¹, 刘长喜^{3*}

(1. 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, “道地药材国家重点实验室”培育基地, 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 2. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040; 3. 北京中医药大学养生学研究所, 北京 100029)

[摘要] **目的:**探讨淮阳金花菜(秧草)脂溶性成分的组成。**方法:**石油醚提取秧草脂溶性成分,用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法进行定性分析,鉴定其化学成分,并归一化法测定其相对含量。对其中的脂肪酸成分甲酯化,以正十七烷酸甲酯为内标对 α -亚麻酸及棕榈酸进行了定量分析。**结果:**定性分析共检出26个色谱峰,鉴定出17个化合物,其中 α -亚麻酸和棕榈酸占到了相对质量分数的45%。定量分析表明 α -亚麻酸和棕榈酸的质量分数分别为0.62%,0.19%。**结论:**气相-质谱联用技术能够有效地分析秧草中脂溶性成分,秧草脂溶性成分中有益脂肪酸亚麻酸几乎为棕榈酸的3倍。以脂肪酸类化合物的现代研究结果阐明药食两用植物的营养价值,为其开发和利用提供更有力的依据。

[关键词] 淮阳金花菜; 脂肪酸; 气相色谱-质谱法

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0055-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210055

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0909.022.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:09

Analysis on Liposoluble Compounds of Huaiyang *Medicago polymorpha*

PENG Juan¹, MA Bo-yan², FAN Bin¹, YAN Han¹, LI Yang¹, NIE Ying-lan¹, SUN Jian¹, LIU Chang-xi^{3*}

(1. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Basic Research on Prevention and Treatment of Major Disease, the Cultivating Bases of the National Key Laboratory of Geo-Authentic Crude Drug, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. College of Basic Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. Health Preservation Institute, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the liposoluble compounds of Huaiyang *Medicago polymorpha*.

Method: The liposoluble compounds of *M. polymorpha* were extracted by petroleum ether and qualitatively analyzed by gas chromatography-mass spectrography (GC-MS) to identify its chemical components; the relative content of every compound was determined by normalization method. A sensitive and reliable quantitative analysis of α -linolenic acid and palmitic acid in *M. polymorpha* was carried out by using methyl heptadecanoate as internal standard. **Result:** The qualitative analysis showed that a total of 26 chromatographic peaks were detected and 17 components were identified. Among them, α -linolenic acid and palmitic acid accounted for 45% of the relative content. The quantitative analysis showed that the contents of α -linolenic acid and palmitic acid were 0.62% and 0.19% respectively. **Conclusion:** GC-MS method can be used to effectively analyze the liposoluble contents of *M. polymorpha*. In the liposoluble constituents, the content of beneficial fatty acids α -linolenic acid was almost 3 times of hexadecanoic acid. The nutritional value of Chinese ancient medicinal-edible plants was elucidated by modern research results of fatty acids, which provided a more powerful basis for the development and utilization of

[收稿日期] 20160302(008)

[基金项目] 中央本级重大增减支项目(2060302)

[第一作者] 彭娟, 硕士, 助理研究员, 从事药物分析研究, Tel:010-64089536, E-mail: lillejuan@163.com

[通讯作者] * 刘长喜, 博士, 教授, 从事中医中药的研究, Tel:010-64286989, E-mail: liuchangxi1963@vip.sina.com

M. polymorpha.

[Key words] Huaiyang *Medicago polymorpha*; fatty acid; chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

淮阳金花菜又名秧草、南苜蓿、草头、救命草等,为豆科苜蓿属一年生草本植物,盛产于江浙一带。明李时珍《本草纲目》将苜蓿列入菜部,“干食益人,可久食,利五脏……”。现国内对紫花苜蓿研究较多,集中在多糖、黄酮、皂苷类物质的研究^[1-3],张纵圆等^[4]对紫花苜蓿籽脂肪酸化学成分进行了研究,对于紫花苜蓿全草的脂肪酸化学成分还没有人涉及。中国植物物种信息数据库对秧草与紫苜蓿均有记载,秧草虽然是苜蓿属,但是与紫花苜蓿 *Medicago sativa* 为不同种,为一年生或者跨年生(秋季大棚栽培可存活至次年的 5 月左右),木本化程度较苜蓿轻。秧草是中国古老的药食两用植物,与之相关的资源与鉴定领域研究很少,也没有脂溶性成分及脂肪酸成分的研究报道。刘长喜教授等对秧草进行系统的营养学分析与评价,研究表明淮扬金花菜(秧草)嫩芽含有大量的蛋白质和膳食纤维,及丰富的维生素、微量元素和矿物质,蛋白质氨基酸模式十分接近于人体蛋白质氨基酸模式^[5]。本文的研究提取了秧草的脂溶性成分,运用气相色谱-质谱联用技术(GC/MS)对各成分加以分析鉴定,发现其富含多不饱和脂肪酸——亚麻酸。秧草廉价、资源充足,以脂肪酸类化合物的现代研究结果阐明了它的营养价值,为其开发和利用提供更有力的依据。相较于紫苜蓿的研究与开发利用,秧草还有许多研究空白,课题组将进一步深入的开展秧草化学成分的研究。

1 材料

淮阳金花菜于 2015 年 4 月在江苏扬中采集,由北京中医药大学刘长喜教授鉴定为淮阳金花菜(秧草) *Medicago polymorpha* 的全草。粉碎后,过二号筛,存放于实验室 -20 °C 冰箱。

7890A/5975C 型气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司),Buchi_R-3 型旋转蒸发器(瑞士步琦公司),GL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。正十七烷酸甲酯, α -亚麻酸,棕榈酸对照品,10% 三氟化硼甲醇溶液(Sigma 公司,批号分别为 51633,BCBP5563V,BCBN5629V,SHBF2545V);正辛烷(化学纯),氢氧化钾(分析纯),购于国药集团化学试剂有限公司;氯化钠(分析纯),石油醚(分析纯),购于北京化工厂;乙酸乙酯(色谱纯),购于 Thermo Fisher Scientific 公司。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

2.1.1 定性样品的制备 称取秧草粉末 280 g,以 5 倍量 95% 乙醇回流提取 1 h,将提取液以 4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,如此反复提取 3 次。合并上清液,减压回收至 100 mL,加入超纯水 150 mL 混匀,置 4 °C 冰箱放置过夜。以石油醚(30 ~ 60 °C)200,300,300 mL 萃取 3 次,合并上层萃取液,下层液体再以石油醚(60 ~ 90 °C)300,300 mL 萃取 2 次,合并上层萃取液。合并不同沸程石油醚的 2 次萃取液,80 °C 水浴浓缩,放冷,过滤,共得滤液 280 mL,该滤液为约含生药 1.0 g·mL⁻¹粗萃取液。取该粗萃取液 20 mL 置蒸发皿,80 °C 水浴蒸干,考察了脂溶性成分提取率为 8.12%,以乙酸乙酯复溶残渣,稀释至 10 mL 量瓶中,定容。将该样品以乙酸乙酯稀释 100 倍,过滤,即为待测样品。

2.1.2 定量样品制备 取秧草细粉约 0.1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入石油醚(60 ~ 90 °C)20 mL,超声处理 30 min,滤过,精密吸取滤液 1 mL 置于鸡心瓶中,精密加入 502.3 mg·L⁻¹正十七烷酸甲酯内标溶液 100 μ L,旋蒸至干,加入 0.5 mol·L⁻¹的氢氧化钾溶液 1 mL,置 60 °C 水浴中加热 30 min,取出,放冷,再加入 10% 三氟化硼的甲醇溶液 0.5 mL,置 60 °C 水浴中加热 15 min,取出,放冷,精密加入正辛烷 5 mL,充分振摇,加饱和氯化钠溶液 5 mL,取正辛烷液,滤过,取滤液,即得^[6]。考察了该方法的脂溶性成分提取率,其提取率为 1.7%。

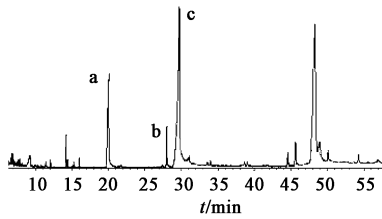
2.1.3 对照品溶液的配制 取正十七烷酸甲酯, α -亚麻酸,棕榈酸对照品各 500 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,前两者以正辛烷溶解定容,棕榈酸加入少量甲醇,之后以正辛烷溶解定容,为各对照品储备液,备用。正十七烷酸甲酯临用前以正辛烷配制成 502.3 mg·L⁻¹内标溶液。

2.2 定性气相色谱-质谱分析条件 定性色谱条件^[7],HP-5 ms 超高惰性毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μ m),程序升温:起始温度 50 °C,以 25 °C·min⁻¹速率升至 170 °C,保持 10 min,再以 1 °C·min⁻¹升至 180 °C,不停留,继续以 5 °C·min⁻¹速率升至 190 °C,保持 5 min,再以 5 °C·min⁻¹速率升至 200 °C,保持 10 min,最后以 5 °C·min⁻¹速率升至 220 °C,保持 10 min。进样口温度 250 °C,不分流进样,载气为氦气,

恒流模式 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

定性质谱条件: 电离方式 EI, 电子能量 70 eV , 离子源温度 $230 \text{ }^\circ\text{C}$, 四级杆温度 $150 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样 6 min 后采集图谱, 质量扫描范围 $m/z 50 \sim 350$ 。色谱图中相应的质谱图采用工作站谱库 (NIST8.0 库) 进行检索。

2.3 定性气相色谱-质谱分析结果 按 2.2 项下试验方法, 得到秧草的脂溶性成分的 GC/MS 的总离子流图 (图 1)。用毛细管气相色谱分离出 26 种化学成分, 利用 GC/MS 仪 NIST8.0 谱图库自动检索被分析组分的物质名称, 对检索结果进行人工核对, 确定各成分的物质名称。共鉴定出其中 17 种成分, 采用峰面积归一法得到各主要成分的相对质量分数 (表 1)。



a. 棕榈酸; b. 植物醇; c. α -亚麻酸

图 1 秧草脂溶性成分气质联用总离子流色谱

Fig. 1 Total ion current chromatogram of liposoluble compounds of *Medicago polymorpha* by GC/MS

表 1 秧草脂溶性成分的分析

Table 1 Analytical results of liposoluble compounds of *Medicago polymorpha*

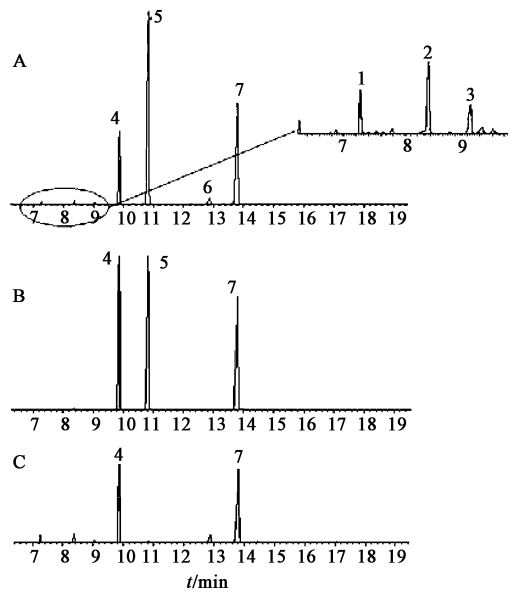
No.	t_R/min	成分	相对质量分数/%
1	11.48	肉豆蔻酸, 十四酸	0.297
2	14.47	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	0.434
3	14.97	正十五酸	0.051
4	15.26	1,13-十四烯二烯	0.296
5	16.03	1,4-二十碳二烯	0.474
6	20.03	棕榈酸	12.293
7	21.72	棕榈酸乙酯	0.173
8	27.4	亚麻酸甲酯	0.175
9	27.995	植物醇, 叶绿醇	2.640
10	29.74	亚麻酸	33.600
11	31.06	亚麻酸乙酯	0.828
12	31.60	棕榈酰胺	0.554
13	33.56	1-十八烷烯	0.194
15	50.07	正十七烷	1.590
16	54.26	2,6,10,15-四甲基十七烷	0.761
17	56.93	9-十八烯酰胺	0.723

2.4 定量气相色谱-质谱分析条件 定量色谱条件: 色谱柱为 DB-WAX 毛细管柱 ($0.25 \mu\text{m} \times 0.25 \text{ mm}, 30 \text{ m}$), 程序升温: 起始温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 1 min , 以 $25 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 速率升至 $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 再以 $3 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 $230 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 3 min , 进样口温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 不分流进样, 载气为氦气, 恒流模式 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

定量质谱条件: 电离方式 EI, 电子能量 70 eV , 离子源温度 $230 \text{ }^\circ\text{C}$, 四级杆温度 $150 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样 6 min

后总离子图谱及提取离子图谱同时采集, 质量扫描范围 $m/z 50 \sim 550$, $6 \sim 11 \text{ min}$ 采集离子组^[8] $m/z 74, 270, 284$, 11 min 之后采集离子组 $m/z 79, 261, 292$ 。色谱图中相应的质谱图采用工作站谱库 (NIST8.0 库) 进行检索。

2.5 专属性考察 按 2.3 项下试验方法, 得到秧草的脂溶性成分的 GC/MS 的提取离子流图 (图 2)。除不加入内标正十七烷酸甲酯, 样品均按 2.1.2 项下步骤制备, 样品在约 11 min 无内标正十七烷酸甲酯的峰, 故以该化合物为内标进行 α -亚麻酸及棕榈酸的定量。



A. 样品; B. 对照品; C. 样品未加内标。1. 月桂酸甲酯; 2. 肉豆蔻酸甲酯; 3. 十五酸甲酯; 4. 棕榈酸甲酯; 5. 十七酸甲酯 (内标); 6. 亚油酸甲酯; 7. 亚麻酸甲酯

图 2 秧草脂溶性成分气质联用提取离子色谱

Fig. 2 Extract ion chromatograms of liposoluble compounds of *Medicago polymorpha* by GC/MS

2.6 线性关系考察 标准曲线的制备: 将 α -亚麻酸 ($48.74 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 棕榈酸 ($47.92 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 储备液以正辛烷为溶剂稀释, 配制成 α -亚麻酸质量浓度范围为 $121.9, 243.7, 487.4, 974.8, 1949.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 棕榈酸 $59.9, 119.8, 239.6, 479.2, 958.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 5 个系列质量浓度。分别精取 α -亚麻酸对照品溶液, 棕榈酸对照品溶液 $100 \mu\text{L}$, 按 2.1.2 项定量样品制备项下, 精密加入 $502.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 正十七烷酸甲酯内标溶液 $100 \mu\text{L}$ 步骤操作。 α -亚麻酸的定量离子为 $m/z 79$, 棕榈酸与内标定量离子为 $m/z 74$, 以 α -亚麻酸、棕榈酸与内标的峰面积比为 Y , 以 α -亚麻酸、棕榈酸的质量浓度为 X , 进行线性回归, 得到 α -亚麻酸在 $2.437 \sim 38.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性范围的回归方程 $Y =$

0.476 0X + 0.005 5, 相关系数 $r = 0.999 3$, 棕榈酸在 1.198 ~ 19.17 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性范围的回归方程 $Y = 1.149 3X - 0.059 2$ 相关系数 $r = 0.999 4$ 。

2.7 精密度试验 将制备的样品连续进样 6 次, α -亚麻酸色谱峰面积与内标色谱峰面积的比值的 RSD 0.3%; 棕榈酸色谱峰面积与内标色谱峰面积的比值的 RSD 0.5%, 说明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一样品平行制备 6 份, α -亚麻酸平均质量分数为 0.62%, RSD 1.6%; 棕榈酸平均质量分数为 0.19%, RSD 2.0%, 说明试验重复性良好。

2.9 加样回收率试验 取秧草样品 0.1 g, 精密称定, 精密加入 2.437 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ α -亚麻酸对照品, 1.198 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 棕榈酸对照品溶液各 0.1 mL, 平行 6 份, 按照 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4 项下条件测定含量, 计算回收率。 α -亚麻酸和棕榈酸回收率分别为 95.2%, 97.3%; RSD 分别为 2.8%, 3.2%。

2.10 稳定性试验 将制备的样品于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 内重复进样测定 6 次, α -亚麻酸峰面积的 RSD 1.2%; 棕榈酸峰面积的 RSD 1.8%, 显示样品溶液在 24 h 内稳定。

2.11 含量测定 按 2.1 项下样品及对照品制备方法, 测定了秧草头茬及二茬样品的 α -亚麻酸质量分数分别为 0.62%, 0.20%; 棕榈酸质量分数分别为 0.19%, 0.39%。

3 讨论

秧草的脂溶性成分以脂肪酸、植物醇类化合物为主, 烯类和炔类化合物少量。定性试验发现秧草中有益脂肪酸 α -亚麻酸的含量比例非常高, 相对质量分数达到了 33.6%。于是将秧草样品甲酯化进行 α -亚麻酸的定量分析。由于甲酯化并优化气相色谱条件以后, 检测的杂质及背景干扰降低, 检测到秧草中 7 种脂肪酸成分, 并利用 GC/MS 仪 NIST8.0 谱图库自动检索被分析组分的物质名称, 并对检索结果进行人工核对, 确定各成分的物质名称, 发现有月桂酸、肉豆蔻酸、正十五酸、棕榈酸、亚油酸及 α -亚麻酸。其中 α -亚麻酸含量最高, 秧草头茬达到了 0.62%。

α -亚麻酸是 ω -3 不饱和脂肪酸系列中唯一的人体不能自身合成、需从食物中摄取的必需脂肪酸, 在体内代谢可生成二十二碳六烯酸 (DHA) 和二十碳五烯酸 (EPA), 对血脂代谢、心脑血管系统疾病的防治、免疫功能异常、精神障碍、致老年痴呆等均有重要影响。流行病学研究表明, 利用从海洋资源、植物

资源中获得的或直接补充 α -亚麻酸均对包括心脑血管疾病和癌症在内的几种疾病的发病有很好的预防作用, 对儿童大脑发育也具有特别重要的作用, 产妇缺乏 α -亚麻酸可能会导致几种神经系统疾病^[9-10]。增加 α -亚麻酸摄取量可以促进婴幼儿视网膜、大脑和神经系统发育, 降低糖尿病患者血清低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和甘油三酯 (TG) 水平; 抑制体外培养的乳腺、前列腺和结肠癌细胞增生, 促进细胞凋亡^[11]。

秧草耐寒、抗旱、抗病虫害能力强, 整个生长过程无需施化肥以及其他农药, 是真正意义上的无公害绿色食品, 其高蛋白、高膳食纤维、低脂肪的营养特征非常适宜于糖尿病、高血脂、高血压、痛风以及肥胖等代谢综合征人群的饮食营养干预, 具有十分广阔的开发应用前景。

[参考文献]

- [1] 杨恒拓, 余凡, 葛亚龙, 等. 苜蓿多糖的微波提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2013, 34(2): 120-122.
- [2] 米丽班·霍加艾合买提, 阿不都热合曼·艾拉. 紫花苜蓿中黄酮类化合物的分离及初步鉴定[J]. 食品科技, 2012, 37(9): 201-204.
- [3] 贾秀峰, 李波, 王佳莹. 苜蓿皂苷提取方法的研究及皂苷含量的测定[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(9): 11-13.
- [4] 张纵圆, 李茂华, 张涛. 新疆紫花苜蓿籽脂肪酸化学成分的分析[J]. 光谱实验室, 2009, 26(2): 354-356.
- [5] 马伯艳, 刘长喜, 李雨庭, 等. 淮扬金花菜(秧草)不同生长期苜蓿嫩芽干粉营养成分的分析与评价[J]. 营养学报, 2015, 37(1): 102-104.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 28.
- [7] 徐辉旺, 吴军, 程凡, 等. 木果楝果实中脂肪酸成分的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 144-146.
- [8] 吴慧勤, 黄晓兰, 林晓珊, 等. 脂肪酸的色谱保留时间规律与质谱特征研究及其在食品分析中的应用[J]. 分析化学研究报告, 2007, 35(7): 998-1003.
- [9] Shahidi F, Miraliakbari H. Omega-3 (*n*-3) fatty acids in health and disease: part 1-cariovascular disease and cancer[J]. J Med Food, 2004, 7(4): 387-401.
- [10] Shahidi F, Miraliakbari H. Omega-3 (*n*-3) fatty acids in health and disease: part 2-health effect of omega-3 fatty acids in autoim-mune disease, mental health and gene expression[J]. J Med Food, 2005, 8(2): 133-137.
- [11] Cybulska I. N-3 polyunsaturated fatty acid in cardiovascular disease [J]. Przegl Lek, 2006, 63(8): 685-689.

[责任编辑 邹晓翠]