31 卷 04 期 草 业 科 学 771－775
Vol. 31, No. 04 PRATACULTURAL SCIENCE 04/2014

DOI: 10.11829\j.issn.1001-0629.2013-0220

航天紫花苜蓿中黄酮的提取及抑菌活性

董晓宁[1]，赵海福[2]，赵 强[1,3]，移瑞瑞[1,4]，靳正娟[1,4]

(1. 天水师范学院生命科学与化学学院，甘肃 天水 740001；2. 甘肃农业大学动物医学院，甘肃 兰州 730070；
3. 中国科学院西北高原生物研究所，青海 西宁 810001；4. 西北师范大学化工学院，甘肃 兰州 730070)

摘要：用索氏回流法正交提取航天紫花苜蓿(*Medicago sativa*)中的黄酮(芦丁)，以 510 nm 最大吸光度进行可见光谱检测，测定芦丁含量，并对两种供试菌进行体外抑菌活性测定。结果表明，通过单因素试验确定的各因素影响能力大小为超声提取时间＞料液比＞乙醇浓度，芦丁含量最高为 10.04 mg·g^{-1}；大肠埃希氏杆菌的最小抗菌浓度为 0.40 mg·g^{-1}，金黄色葡萄球菌的最小抗菌浓度为 0.70 mg·g^{-1}。

关键词：航天苜蓿；黄酮；抑菌

中图分类号：S816；S541^{+}.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1001-0629(2014)04-0771-05

Study on extraction technology and antibacterial of flavonoids from space breeding alfalfa

DONG Xiao-ning[1], ZHAO Hai-fu[2], ZHAO Qiang[1,3], YI Rui-rui[1,4], JIN Zheng-juan[1,4]

(1. College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China;
2. College of Vetetinary Medicine at Gansu Agriculture Univesity, Lanzhou 730070, China;
3. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;
4. Department of Chemistry, Northwest Normal Uniuersity, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Flavonoid was extracted from space breeding alfalfa with Soxhlet extraction with orthogonal design and content was determined with spectrophotometer at 510 nm. Two bacteria were selected for in vitro antibacterial activity test. The results show that each factor with various influence with the following order: Ultrasonic extraction time＞Liquid to solid ratio＞Ethanol concentration. The highest content was 10.04 mg·g^{-1}. The MIC of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 0.40 and 0.70 mg·mL^{-1}, respectively.

Key words: space breeding alfalfa; flavonoids; antibacterial

Corresponding author: ZHAO Qiang E-mail: zhaoq2000@163.com

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)为多年生草本植物，其主根较长、多分枝，茎常直立，几乎无毛，株高 30～100 cm[1]，在我国主要分布于青海、新疆、宁夏、甘肃和内蒙古等地[2]。营养价值丰富，粗蛋白含量通常在 22%左右，含有 20 种以上的氨基酸[3-5]。苜蓿黄酮类化合物相当丰富，据报道，苜蓿属植物所含的黄酮类化合物有 80 多种[6]，且结构多样、种类繁多[7-8]。黄酮类化合物可以清除自由基，有效抑制肾上腺素的氧化、降低低密度脂蛋白(LDL)浓度和过氧化物的浓度[9-10]；还可以降低心肌梗塞阻死和动脉粥样硬化的发病率及死亡率[11-13]。

航天育种为改性诱变，可以增加物种产量和各种指标的含量，是目前研究的热门课题，航天育种比常规育种变异频率高、幅度大、有益变异增多

*收稿日期：2013-04-27 接受日期：2013-09-04
基金项目：天水师范学院中青年教师科研资助项目(TSY201209)；甘肃省科技计划资助项目(1308RJZE305)
第一作者：董晓宁(1968-)，男，甘肃天水人，副教授，学士，主要研究方向药物分析与无机化学、电分析化学。
E-mail: dongxning@126.com
通信作者：赵强(1982-)，男，甘肃天水人，副教授，博士，主要研究方向为西北特色生物资源与生态学。E-mail: zhaoq2000@163.com

且稳定性强，具有明显的优势[14-19]。随着航天育种越来越受到关注，苜蓿用于航天育种的研究也逐渐增多。航天育种紫花苜蓿各方面性能均高于普通紫花苜蓿，经航天育种得到的紫花苜蓿含有更多的黄酮类化合物，其中之一的芦丁，药用价值很高，可滋补强壮、健脾胃及调经活血，可治疗瘦弱、脾胃不和、气血两亏、月经不调、消化不良及腰腹疼痛等[20-22]。天水国家级高新农业园区甘肃省航天育种工程技术中心与神舟系列飞船课题组长期合作，致力于太空诱变和新品种选育，其苜蓿草种是神舟飞船搭载返回后培育的诱变新种，依托该育种基地，针对航天紫花苜蓿中的黄酮类化合物芦丁，优选提取工艺，以期筛选出最佳提取方案，以进行体外抑菌研究，旨在为航空天然绿色药材的培育及开发提供一定的借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

试材：航天紫花苜蓿采自天水神州绿鹏农业科技有限公司航天育种基地。风干、粉碎及过筛后备用。

仪器：UV751GD 型紫外－可见分光光度计（上海精密科学仪器有限公司）、KQ-300DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、RE52-99 型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂生产）、JY 型电子天平（上海方瑞仪器有限公司）、PHS-3D 型精密 PH 计（上海精密科学仪器有限公司）、TDZ5-W 型多管架自动平衡离心机（湘仪离心机仪器有限公司）、TD25-WS 多管架自动平衡高速离心机（湘仪离心机）、电热恒温水浴锅、SHB-Ⅳ型双 A 循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）、抑菌操作台等。

芦丁对照品（国药集团，批号：F20051222，规格：50 g），氢氧化钠、亚硝酸钠、95%乙醇、氯化铝 $AlCl_3$ 等试剂均为国产或进口分析纯。

普通肉汤培养基培养，按标准配制方法配制，分装，灭菌，备用。大肠埃希氏杆菌（*Escherichia coli*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）为甘肃农业大学动物医学院保存标准菌株。

1.2 方法

1.2.1 芦丁标准工作曲线的绘制 准确称取 0.100 4 g 芦丁标准品，溶解后移入 50 mL 容量瓶中，定容、摇匀，稀释 3 倍，得到质量浓度为 0.67 $g \cdot L^{-1}$ 的芦丁标准溶液。分别移取芦丁标准溶液 2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00 和 14.00 mL 置于 50 mL 容量瓶中，加入 5%的 $NaNO_2$ 溶液 5.0 mL，6 min 后加入 1% $Al(NO_3)_3$ 溶液 10.0 mL，6 min 后加入 4% NaOH 溶液 20.0 mL，15 min 后定容、摇匀，得到相应浓度的梯度溶液，以双重蒸馏水为参比，在 510 nm 处测定其吸光光度值，绘制浓度－吸光值标准曲线。

1.2.2 航天紫花苜蓿中芦丁提取及测定 选取乙醇浓度、料液比及超声提取时间 3 个因素，以 $L_9(3^3)$ 正交表进行试验设计（表 1）。准确称取航天紫花苜蓿粉末 10.0 g，转移至 500 mL 的烧杯中，并加入相应浓度和体积的乙醇，在室温下浸泡 5 h，封口静置。在 300 W 的功率下，超声处理不同时间，超声结束后，减压抽滤能得提取液，将提取液转入旋转蒸发仪，减压浓缩至无醇味，将浓缩液转入锥形瓶，加入 0.02 g 活性炭脱色，摇匀，封口，静置过夜，抽滤，将滤液按编号装入 50 mL 容量瓶，并定容，静置待测定。以芦丁为标准品，将样液用亚硝酸钠－硝酸铝显色法处理后，在 510 nm 处测定吸光光度值，对照标准曲线，计算苜蓿中黄酮类化合物的含量[23]。

1.2.3 抑菌试验 用普通肉汤培养基培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。两种供试菌接种于平皿培养基，接种后置于 37 ℃恒温培养箱中培养 24 h，待菌种复壮以后，用高压过的生理盐水将培养后的菌液进行稀释，与0.5麦氏比浊管进行比对，使菌液的浓

表 1 正交提取实验因素水平表

Table 1 The factor level table of orthogonal extraction

水平 Level	因素 Factor		
	A 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	B 料液比 Liquid to solid ratio	C 超声提取时间 Ultrasonic extraction time/min
1	30	1∶15	20
2	55	1∶30	50
3	80	1∶45	80

度大约在 1.5×10^8 CFU·mL^{-1},放入超净台中备用。挑选典型菌落,重新接种于液体培养基,37 ℃培养 36 h。倍比稀释航天紫花苜蓿的芦丁提取液,制备系列浓度稀释液。然后用无菌吸管按培养皿所标计量,将稀释液分别定量加入到无菌培养皿中,用移液管分别吸取定量待试菌液,涂于平板上培养。观测,完全没有菌落生长的航天紫花苜蓿的黄酮类化合物提取液最低浓度为最小抗菌浓度(MIC);未加药品的为空白。

1.3 数据统计方法

采用 Excel 2010 和 SPSS 18.0 软件对数据结果进行处理和统计学分析及比较。

2 结果与分析

2.1 纯品芦丁标准曲线

以标准品芦丁溶液的浓度为横坐标,在 510 nm 处测得吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程:$y=3.932x+0.0015$,$R^2=0.9954$($n=7$)(图1)。可以看出,芦丁质量浓度与 510 nm 处的吸光光度值在 0.02~0.20 mg·mL^{-1}范围内呈良好的线性关系。

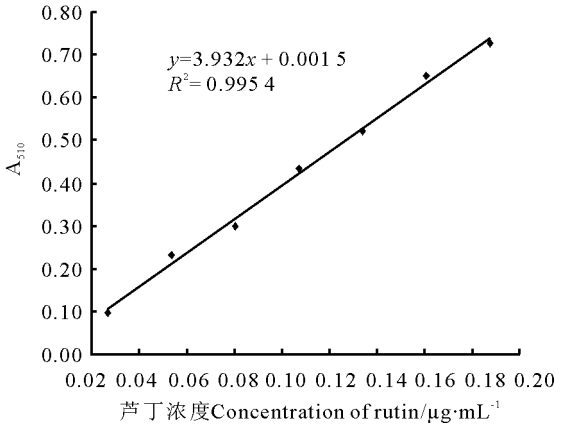

图1 芦丁的标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

2.2 芦丁提取试验的结果与分析

根据 $L_9(3^3)$正交试验的设计,每组重复 3 次,并通过标准曲线计算黄酮提取率,分析得出最佳正交提取工艺模式。

正交试验结果(表2)表明,A:$k_2>k_3>k_1$,B:$k_3>k_2>k_1$,C:$k_1>k_2>k_3$,即最佳提取因素水平值分别为:乙醇浓度 55%,液料比 1∶45,超声提取时间 20 min。乙醇浓度、液料比和超声提取时间 3 个因素均作用显著($P<0.05$)(表3),这表明试验设定的影响因素对航天紫花苜蓿黄酮类化合物得率均有显著影响,但影响因素的主次有所差异,由结果得 $R_1>R_3>R_2$,这表明因素影响主次为:乙醇浓度>超声提取时间>料液比。综合分析可得航天紫花苜蓿中黄酮类化合物的最佳正交提取工艺为:乙醇浓度 55%,液料比 1∶45,超声提取时间 20 min;在该工艺下,航天紫花苜蓿中黄酮类化合物含量最高,为 10.04 mg·g^{-1}。

表2 正交提取试验结果分析表

Table 2 The result analysis table of orthogonal extraction

实验号 No.	A 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	B 料液比 Liquid to solid ratio	C 超声提取时间 Ultrasonic extraction time/min	提取率 Extraction ratio/mg·g^{-1}
1	30	1∶15	20	9.01
2	55	1∶15	50	6.69
3	80	1∶15	80	7.81
4	30	1∶30	50	9.07
5	55	1∶30	80	9.81
6	80	1∶30	20	7.91
7	30	1∶45	80	10.04
8	55	1∶45	20	9.74
9	80	1∶45	50	9.78
k_1	15.16	17.81	20.71	
k_2	17.28	19.53	16.53	
k_3	15.48	19.84	15.43	
R	7.66	1.02	3.25	

表3 正交提取试验方差分析表

Table 3 Variance analysis table of orthogonal extraction

变异来源 Variation source	df	SS	S^2	P
A	2	0.002	0.001	<0.05
B	2	0.002	0.001	<0.05
C	2	0.000	0.000	<0.05
误差 Error	2	0.000	0.000	

2.3 抑菌试验结果与分析

航天紫花苜蓿的黄酮类化合物提取液对大肠埃希氏杆菌的最小抑菌浓度为 0.40 mg·mL^{-1},对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 0.70 mg·mL^{-1}(表4),对两种供试菌的抑制作用较为明显。

表 4 芦丁 MIC 的测定结果

Table 4 The flavonoids MIC results

供试菌	芦丁 Rutin/mg·mL^{-1}							
	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	对照 Control
大肠埃希氏杆菌 *Escherichia coli*	+++	++	−	−	−	−	−	+++
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	+++	++	++	+	+	−	−	+++

注:表中数据为 3 次重复实验的平均值。"+"表示有菌生长;"++"表示细菌生长较茂盛;"+++"表示细菌生长茂盛;"−"表示无菌生长。

Note: The data in table is the mean of three repeated experiments. "+" mean there is bacteria growth; "+ +", mean the bacteria grew more exuberant; "+ + +" mean bacteria thrive; "−" mean sterile growth.

3 讨论与结论

采用超声波提取这一物理过程,利用超声波产生空化作用,从而加大溶剂分子的运动速度,增强分子穿透力,加速植物有效成分的提取;再配合使用索氏回流法,从而更为充分地提取了航天紫花苜蓿中黄酮类化合物。用苜蓿作为黄酮类化合物的来源,具有以下的优势[24-25]:1)与传统草药相比,苜蓿是大田作物,且适宜大规模种植,产量较高,具有资源丰富、价格低廉等特点;2)将苜蓿提取物加工后作为饲料添加剂应用,具有安全、环保的特点;3)把苜蓿黄酮类化合物等活性成分的产品加入到草业产业链中,不但提升了苜蓿的经济附加值,而且还可以延长产业链,提升产业层次,促进生产和科研的发展;4)将苜蓿黄酮类化合物等活性成分开发成苜蓿黄酮系列保健产品或药品,生产含有苜蓿黄酮的日常食品,则苜蓿黄酮类化合物等活性成分的开发利用将有广阔的前景。本研究对航天育种苜蓿中的黄酮含量做了测定,结果表明,与普通的紫花苜蓿相比,航天育种紫花苜蓿黄酮含量高,并且航天育种得到的航天紫花苜蓿品种也适宜大田种植和大规模种植。

航天紫花苜蓿提取物和其他中草药一样,抑菌效果低于抗生素,相关研究表明,相当大量的中药才可以达到抗生素的效果[26]。但其合理的中药量具有很好的抑菌效果,据统计中草药的抑菌浓度是抗生素的 1 000 倍[27],只是目前所应用的中药成分及剂型很难达到理想的浓度,航天育种紫花苜蓿依然如此。本研究实际操作中,由于航天紫花苜蓿提取液多为悬浊液,成分较为复杂,且颜色较深,在做抑菌试验时,加入适量的葡萄糖和品红试剂,就可以明显的看出最小的抑菌浓度颜色变化,进而方便计算出最小抑菌浓度。

本研究通过正交提取试验得到,超声提取时间、料液比和乙醇浓度 3 个因素对航天紫花苜蓿中黄酮类化合物的提取率均有显著影响。3 个因素的影响程度依次为超声提取时间>料液比>乙醇浓度;最佳提取工艺:液料比 1∶45,乙醇浓度 55%,超声提取时间 50 min。在该工艺下,航天紫花苜蓿中黄酮类化合物含量最高,为 10.04 mg·g^{-1}。在此工艺条件下进行 3 次平行试验,以检测稳定性,测定结果分别为 10.141、10.013 和 10.029 mg·g^{-1},平均值为 10.061 mg·g^{-1},与理论值的误差为 0.209%,这说明采用该工艺模型和提取工艺条件是可靠的,能够较好地预测实际航天育种紫花苜蓿中黄酮类化合物的含量。此外,用该方法提取航天育种紫花苜蓿中黄酮类化合物的含量(10.040 mg·g^{-1})比普通紫花苜蓿中黄酮类化合物的含量(6.320~7.080 mg·g^{-1})高[28],这表明航天育种紫花苜蓿中黄酮类化合物的含量本身比普通紫花苜蓿的高,这充分肯定了航天育种的优越性。采用最佳工艺下的航天紫花苜蓿黄酮类化合物提取液进行体外抑菌试验,其对大肠埃希氏杆菌的 MIC 为 0.40 mg·g^{-1},对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.70 mg·g^{-1},抑菌效果较为明显。

在试验操作过程中,对各种操作细节加以严格控制,做到定量准确,故其结果相对较为可靠,可以作为进一步筛选的参考资料,但其具体的作用效果有待深入研究,因此本试验为进一步研究和开发我国航天育种紫花苜蓿药物成份及药理作用提供了一定的理论参考。就航天育种紫花苜蓿黄酮作用机理的研究,下一步将从体外试验深入到动物体内的消化、吸收、转运、代谢、分布及排泄等方面进行研究,以期为我国航天育种紫花苜蓿药物成份及药理作用的研究和开发提供更有价值的理论参考。

参考文献

[1] 卢欣石. 中国苜蓿属植物遗传资源分类整理探究[J]. 中国草地学报,2009,31(5):21-22.

[2] 刘瑛心. 中国沙漠植物志[M]. 北京:科学出版社,1987:35-38.

[3] 李富娟. 苜蓿蛋白质及影响苜蓿粗蛋白含量的主要因素[J]. 四川草原,2006(2):6-7.

[4] 许淑芳. 测定苹果浓缩汁生产中的蛋白含量[J]. 饮料工业,2005(8):45-46.

[5] 张春兰. 莜面与其他面粉蛋白质含量的比较[J]. 现代面粉工业,2010(3):41-42.

[6] Price K R,Johns on I T,Fenwick G R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feeding stuffs. CRC Crit[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2007,26(1):27-135.

[7] 赵强,陈虹,赵海福. 航天紫花苜蓿中黄酮提取工艺及抑菌活性研究[A]. 第五届中国苜蓿发展大会论文集[C]. 赤峰:中国畜牧业协会,2013:254-258.

[8] Tava A,Mella M,Avato P,Argentieri M P,Bialy Z,Jurzysta M. Triterpenoid glycosides from leaves of *Medicago arborea* L.[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2005,53(26):9954-9965.

[9] Dornbos D L,Spencer G F,Miller R W. Medicarpin delays alfalfa seed germ ination and seedling growth[J]. Crop Science,2010,30:162-166.

[10] Juliana H,Howard N H,Alex S. Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2001,49:308-314.

[11] Aedin C. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks[J]. Proceedings of the Nutrition Society,2006,55:399-417.

[12] Hawryelwica E J,Zapata J J,Blair W H. Soy and experimental cancer:animal studies[J]. Journal of Nutrition,1995,125:698-705.

[13] Kenneth D R S,Aedin C. Dietary isoflav ones:Biological effects and relev ance to human health.[J]. Journal of Nutrition,2009,129:758-767.

[14] 范润钧,陈本建,邓波,柴小琴. 航天搭载紫花苜蓿 SSR-PCR 反应体系的优化以及引物的筛选[J]. 草原与草坪,2010,30(2):22-26.

[15] 董晓宁,赵海福. 苦荞麦中芦丁正交提取工艺的建立[J]. 中国食品工业,2012(2):65.

[16] 傅珏生,张健,王振羽,解燕. 实验设计与分析[M]. 第6版. 北京:人民邮电出版社,2009:347-392.

[17] 赵选民. 实验设计方法[M]. 第2版. 北京:科学出版社,2006:191-198.

[18] Mauricio A R. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour[J]. Food Chemistry,2002,78(1):111-117.

[18] Rostagno M A,Araújo J,Sandi D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2002,78(1):111-117.

[19] Wu J Y,Lin L D,Foo-tim C. Ultrasound assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells[J]. Ultrasonics Sonochemistry,2001,8(2):347-352.

[20] 董晓宁,赵强,杨明. 苦荞麦中芦丁的提取及体外抑菌研究[J]. 中兽医医药杂志,2010(1):20-21.

[21] 董晓宁,赵强,杨明. 秃疮花生物碱的提取与体外抑菌研究[J]. 中兽医学杂志,2010,2:6-11.

[22] 赵强,余四九,王廷璞,刘犇. 响应面法优化秃疮花中生物碱提取工艺及抑菌活性研究[J]. 草业学报,2012,21(4):206-214.

[23] 赵海福,魏彦明,董晓宁,王廷璞,赵强,刘文博. 响应面法优化玉米须中芦丁的提取工艺及检测[J]. 草业科学,2013,30(6):964-972.

[24] 朱见明,李娜,张亚军. 苜蓿黄酮的研究进展[J]. 草业科学,2009,26(9):156-162.

[25] 夏素银,严学兵,王成章. 紫花苜蓿生物活性成分在畜禽生产中的应用[J]. 草业科学,2010,27(7):133-140.

[26] 赵瑛. 鱼腥草等中药注射液体外抗菌活性测定方法的初步探讨[J]. 重庆师范学院学报(自然科学版),1998,15(1):79-82.

[27] 刘玉庆,李晔,车程川. 大肠杆菌对中草药敏感性试验及其方法研究[J]. 中兽医医药杂志,2003(1):3-5.

[28] 高微微. 苜蓿生物活性及影响其黄酮和皂甙成分因素的研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2004.

(责任编辑 王芳)