

紫花苜蓿中芦丁的提取及抗菌活性研究

赵强¹, 赵海福²

(1.中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2.甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

中图分类号: S858.23 文献标识码: A 文章编号: 1004-4264 (2013) 20-0025-03

摘要: 本研究通过正交试验优选了紫花苜蓿中芦丁的提取工艺, 以510nm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了体外抑菌活性测定。结果表明, 通过单因素试验确定的各因素影响能力大小为: 料液比>乙醇浓度>超声提取时间, 含量最高为10.04mg/g; 大肠埃希氏杆菌的MIC为0.40mg/mL, 金黄色葡萄球菌的MIC为0.70mg/mL。

关键词: 紫花苜蓿; 芦丁; 抗菌

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 为多年生的草本植物, 其主根较长、多分枝, 茎常直立, 几乎无毛, 株高一般30~100cm, 主要分布在甘肃、青海、新疆、宁夏、内蒙古等地^[1], 营养价值丰富, 粗蛋白含量通常在22%左右, 含有20多种氨基酸^[2-4]。紫花苜蓿中芦丁含量较高, 芦丁具有滋补强壮、健脾胃、调经活血等功效, 可治疗瘦弱、脾胃不和、气血两亏、月经不调、消化不良、腰腹疼痛等病症^[5-7], 还可以清除自由基, 有效抑制肾上腺素的氧化, 降低LDL和过氧化物的浓度^[8,9], 降低心肌梗塞和动脉粥样硬化的发病率及死亡率^[10-12]。

本研究通过正交试验优选了紫花苜蓿中芦丁的提取工艺, 最终得出最佳提取方案。在提取过程中, 采用了超声辅助法, 因为超声辅助法与单纯的提取法相比, 具有效率高、产品易于纯化和产品活性高的优点。本研究还对提取的芦丁进行了体外抑菌测定, 旨在为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 原料

紫花苜蓿采自甘肃农业大学植物园, 风干、粉碎后储存备用。

收稿日期: 2013-09-13

基金项目: 甘肃省技术与开发专项计划 (0912TCYL004) 基金资助。

作者简介: 赵强 (1982-), 男, 甘肃天水人, 博士, 副教授, 中国科学院西北高原生物研究所博士后, 研究方向为天然药物化学。

1.2 试剂

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

1.3 培养基及菌种

普通肉汤培养基 (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的标准菌株。

1.4 芦丁标准工作曲线的绘制

准确称取0.1004g芦丁标准品, 溶解后移入50mL容量瓶中, 定容、摇匀, 稀释3倍, 得到质量浓度为0.67g/L的芦丁标准溶液。分别移取芦丁标准溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0和14.0mL置于50mL容量瓶中, 加入5%NaNO₂溶液5.0mL, 6min后加入1%Al(NO₃)₃溶液10.0mL, 6min后加入4%NaOH溶液20.0mL, 15min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510nm处测定其吸光度值, 绘制浓度-吸光值标准曲线。

1.5 紫花苜蓿中芦丁的提取及测定

选取乙醇浓度、料液比、超声提取时间三个因素, 以L₉(3³)正交表进行试验设计。准确称取紫花苜蓿粉末10.0g, 转移至500mL的烧杯中, 并加入相应浓度和体积的乙醇, 在室温下浸泡5h, 封口静置。在300W功率下, 超声处理不同的时间, 超声结束后, 减压抽滤得提

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0.02g活性炭脱色,摇匀,封口,静置过夜,抽滤,将滤液按编号装入50mL容量瓶,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510nm处测定吸光度值,对照标准曲线,计算紫花苜蓿中芦丁的含量^[13]。选取乙醇浓度、料液比、超声提取时间三个因素,以L₉(3³)正交表进行试验设计,用以优化紫花苜蓿中芦丁提取的工艺,并以最佳工艺为提取条件,进行3次平行提取试验,以检测最佳工艺的稳定性。

1.6 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24h,待菌种复壮以后,用无菌生理盐水将培养后的菌液进行稀释,与0.5麦氏比浊管进行对比,使菌液的浓度大约为1.5×10⁸CFU/mL,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36h。倍比稀释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,然后观测,完全没有菌落生长的芦丁提取液的最低浓度为最小抗菌浓度(MIC);未加药品的为空白。

2 结果

2.1 纯品芦丁标准曲线

以标准品芦丁质量浓度梯度溶液的浓度为横坐标,以在510nm处测定的吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程:Y=3.9321X+0.0015, R²=0.9998(n=7)。由曲线可知,在0.02~0.20mg/mL范围内呈良好的线性关系。

2.2 芦丁提取试验

按照试验设计进行正交试验,每组重复三次,其结果见表1~3。

表1 正交提取试验因素水平表

水平	因素		
	乙醇浓度(%) A	料液比(g/mL) B	超声时间(min) C
1	30	1:15	20
2	55	1:30	50
3	80	1:45	80

表2 正交提取试验结果

试验编号	A	B	C	提取率(mg/g)
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	28.12	23.51	26.66	
K ₂	26.24	26.79	25.54	
K ₃	25.59	29.56	27.66	
R	2.53	6.05	2.12	

表3 正交提取试验方差分析表

误差来源	df	SS	S2	P
乙醇浓度	2	0.002	0.001	<0.05
料液比	2	0.002	0.001	<0.05
超声时间	2	0.000	0.000	<0.05
误差	2	0.000	0.000	

从表2~3可知, K₃A<K₂A<K₁A、K₁B<K₂B<K₃B、K₂C<K₁C<K₃C,三个因素P<0.05;极差分析可知, R₂>R₁>R₃,即影响紫花苜蓿中芦丁得率的因素是料液比>乙醇浓度>超声提取时间。所以最佳提取工艺为:料液比1:45,乙醇浓度30%,超声提取时间80min。在该工艺下,从紫花苜蓿中提取芦丁含量最高,为10.040mg/g。以最佳工艺为提取条件,进行3次平行提取试验,以检测稳定性,测定结果分别为10.141mg/g、10.013mg/g、10.029mg/g,平均值为10.061mg/g,与理论值的误差为0.209%,这表明该试验设计及提取工艺条件是可靠的,能够较好地预测实际紫花苜蓿中芦丁。

2.3 抑菌试验

表4 芦丁MIC的测定结果

供试菌	n	不同浓度芦丁溶液的MIC							
		0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	对照组
大肠埃希氏杆菌	3	+++	++	-	-	-	-	-	+++
金黄色葡萄球菌	3	+++	++	++	+	+	-	-	+++

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。

从表4可知,紫花苜蓿中芦丁提取液对大肠埃希氏杆菌的最小抑菌浓度为0.40mg/mL,对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为0.70mg/mL,对两种供试菌的抑制作用较为显著。

3 讨论

超声波产生的空化作用可提高溶剂分子的运动速度,增强分子的穿透力,从而加速植物有效成分的提取,再配合索氏回流法,则能更为充分地提取紫花苜蓿中的芦丁。苜蓿作为黄酮类化合物(芦丁)的来源,具有下列优势^[14,15]:(1)与传统草药相比,苜蓿是大田作物,适宜大规模种植,具有资源丰富、价格低廉等优势;(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(芦丁)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;(4)将苜蓿黄酮类化合物(芦丁)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(芦丁)的日常食品,将有广阔的前景。

本研究正交提取试验表明,超声提取时间、料液比和乙醇浓度3个因素对紫花苜蓿中芦丁的提取率具有显著影响。3个因素的影响主次为料液比>乙醇浓度>超声提取时间。最佳提取工艺为:液料比1:45,乙醇浓度30%,超声提取时间80min。在该工艺下,紫花苜蓿中所提取的芦丁含量最高,为10.040mg/g。并且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紫花苜蓿中芦丁的含量。

由于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,可以较为容易地看出来最小的抑菌浓度颜色变化,进而方便计算最小抑菌浓度。体外抑菌试验表明,紫花苜蓿芦丁提取液对大肠埃希氏杆菌的MIC为

0.40mg/mL,对金黄色葡萄球菌的MIC为0.70mg/mL,抑菌效果较为明显。本试验为进一步研究和开发我国紫花苜蓿药物成分及药理作用提供了参考。

参考文献

- [1] 刘璞心.中国沙漠植物志[M].北京:科学出版社,1987:35-38.
- [2] 李富娟.苜蓿蛋白质及影响苜蓿粗蛋白含量的主要因素[J].牧草科学,2006,2:6-7.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 赵强,余四九,王廷璞,等.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.
- [8] Dombos D L, Spencer G F, Miller R W. Medicarpin delays alfalfa seed germ inat ion and seedling g rowth[J]. Cr op Sci, 2010, 30:162-166.
- [9] Juliana H, Howard N, H odis Alex S. Soy and Alfalfa Phytoestrogen Extracts Become Potent Low-Density Lipo protein Antiox idants in the Presence of Acerola Cherry[J]. JFood Chem, 2001, 49: 308-314.
- [10] Cassidu A. Physio logical effects of phytoest rogens in relation to cancer and other human health risks[J]. Proc Nutr Soc, 2006, 55: 399-417.
- [11] Hawr yelwica EJ, Zapata J J, Blair W H. Soy and experimental cancer: animal studies[J]. J Nutr, 2005, 125:698-705.
- [12] Setchell KDR, Cassidy A. Dietary isoflav ones: biological effects and relev ance to human health [J]. J Nutr, 2009,129: 758-767.
- [13] 赵海福,魏彦明,董晓宁,等.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.
- [14] 朱见明,李娜,张亚军,等.苜蓿黄酮的研究进展[J].草业科学, 2009,26(9):156-162.
- [15] 夏素银,严学兵,王成章,等.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.

Study on Extraction and Antibacterial of Rutin from Alfalfa

ZHAO Qiang¹, ZHAO Hai-fu²

(1.Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining 810001;

2. College of Vetetinary Medicine at Gansu Agricultural Univesity, Lanzhou 730070)

Abstract: The extraction method of rutin from alfalfa was selected through an orthogonal test, the content determination of rutin was test 510 nm maximum spectrophotometry visible spectrum, and the antibacterial activity for two selected bacteria in vitro was determination. The results showed that the order for the influence of various factors was Liquid to solid ratio > Ethanol concentration > Ultrasonic extraction time, the highest content was 10.04 mg/g, the MIC for *E.coli* and *S.aureus* were 0.40 mg/mL and 0.70 mg/mL respectively.

Key words: Alfalfa; Rutin; Antibacterial 