

岷山红三叶异黄酮的提取、纯化、含量测定方法及红三叶异黄酮应用概况

杨静^{1, 4}, 孙明香², 於军强³, 董钰明^{1, 4}

(1. 兰州大学药学院药物分析研究所, 兰州 730000;

2. 岷县人大常委会, 甘肃定西 748400;

3. 甘肃岷县军强电子商务有限公司, 甘肃定西 748400;

4. 兰州大学-天美(中国)科学仪器有限公司药物分析合作共建实验室, 兰州 730000)

摘要: 岷山红三叶是全国牧草品种审定委员会审定登记的3个红三叶品种之一, 它富含异黄酮类物质。红三叶异黄酮具有多种药理作用, 如抗肿瘤、抗氧化、改善更年期综合征等, 在医疗保健与畜牧业中的应用越来越广泛。本文综述了岷山红三叶异黄酮的提取、纯化、含量测定方法及红三叶异黄酮在国内外的应用概况, 为岷山红三叶的进一步开发利用提供参考。

关键词: 药学其他学科; 岷山红三叶异黄酮; 综述; 提取方法; 含量测定方法; 应用概况

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-2850(2018)11-1075-11

Research progress on extraction, purification, determination methods of isoflavones from *Trifolium pratense* cv. Minshan and applications of isoflavones from *T. pratense* L.

YANG Jing¹, SUN Mingxiang², YU Junqiang³, DONG Yuming^{1, 4}

(1. Institute of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. The Standing Committee of the National People's Congress of Minxian, Dingxi, Gansu 748400, China;

3. Gansu Minxian Junqiang Electronic Commerce Co., Ltd., Dingxi, Gansu 748400, China;

4. Lanzhou University-Techcomp (China) Ltd. Joint Laboratory of Pharmaceutical Analysis, Lanzhou 730000, China)

Abstract: *Trifolium pratense* cv. Minshan is one of the three varieties of *T. pratense* L. which has been checked, appraised and licenced by the Chinese Herbage Cultivar Registration Board. It is rich in isoflavones. Isoflavones from *T. pratense* L. have many pharmacological functions, such as anti-tumor, anti-oxidation, improving the climacteric syndrome, et al. The use of the isoflavones in health care and animal husbandry is more and more extensive. In this review, the methods of extraction, purification, determination of isoflavones from *T. pratense* cv. Minshan and applications of the isoflavones from *T. pratense* L. at home and abroad were reviewed, which could be a reference for the further development of *T. pratense* cv. Minshan.

Key words: other subjects of pharmacy; isoflavones from *Trifolium pratense* cv. Minshan; review; extraction methods; determination methods; applications

0 引言

红三叶(*T. pratense* L.)又名红车轴、红花苜蓿、红藏草、金雀菜、红荷兰翘摇等, 是豆科(Leguminosae)

作者简介: 杨静(1993—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 药物分析

通信联系人: 董钰明, 教授, 主要研究方向: 药物分析. E-mail: dongym@lzu.edu.cn

三叶草属 (*Trofilium* L.) 多年生草本植物^[1]。红三叶含有多种异黄酮类物质, 又称红三叶异黄酮 (red clover isoflavones, RCI), 这些异黄酮类物质发挥着重要的生物作用, 其抗肿瘤、抗氧化、清除自由基、抗痉挛、抗炎杀菌、改善更年期综合征及防治骨质疏松等作用越来越受到关注。此外, 在人体保健和畜牧业方面也有应用。岷山红三叶是岷县的当家草种之一, 其异黄酮含量高于大豆异黄酮含量^[2], 药用价值较高, 但目前并没有被深度开发加工成产品, 只是简单加工销售, 这制约了岷山红三叶的发展。若对其活性成分进行开发和利用, 研制出预防骨质疏松、治疗妇女更年期综合征的保健品和药品, 必将产生良好的经济效益和社会效益。本文以岷山红三叶为研究对象, 系统总结岷山红三叶异黄酮的提取、纯化、含量测定方法及红三叶异黄酮国内外应用概况, 以期为其深度开发利用提供参考。

1 岷山红三叶简介

岷县素有“千年药乡”和“中国当归之乡”之称。岷山红三叶是岷县当家草种之一, 是国内珍稀的高产优质牧草, 通过取样分析探明岷山红三叶富含异黄酮, 为药草兼用型牧草品种^[3]。岷山红三叶在1944年由美国引进^[4], 经驯化、培育了近60余年, 成为岷县的优势草种^[5]。1987年经全国牧草品种审定委员会审定登记为“岷山红三叶” (*T. pratense* cv. Minshan), 并被草产业誉为“中国第一草”^[6]。目前, 岷山红三叶在岷县的种植面积累计达到1.5万hm², 种植覆盖全县18个乡镇, 实现了规模化、区域化种植, 产业化开发正处于兴起阶段^[7]。

1.1 岷山红三叶的植物学特征

岷山红三叶根系发达, 茎直立或上升, 多分枝, 高15~30cm; 掌状复叶, 具3枚小叶; 头状花序、顶生, 花冠紫红色或红色; 荚果小, 通常具1粒种子; 花期和果期均为8月至9月。岷山红三叶种植当年可刈割利用1次, 第二年后每年可刈割利用2~3次, 可连续刈割利用5~7年。岷山红三叶株高65~115cm, 鲜草产量一般为46.0~67.5t/hm², 最高可达85t/hm², 鲜干比为6:1~7:1, 茎叶比接近1:1。

1.2 岷山红三叶的化学成分

陈学福等^[8]对岷山红三叶的化学成分进行了系统的分析研究, 从中分离得到8个主要化合物(如表1所示)。

岷山红三叶含有重要的化学成分: 芒柄花素、芒柄花苷、鹰嘴豆芽素A、染料木素、染料木苷、大豆素和大豆苷等异黄酮, 它们的含量高达8%~20%, 其中鹰嘴豆芽素A和芒柄花素(化学结构如图1所示)的含量最高可达6%~18%, 这是其他植物无法与之相比的, 并且是其他地区红三叶的2~3倍^[9]。

表1 岷山红三叶的主要化学成分^[8]

Tab. 1 Main chemical compositions of *T. pratense* cv. Minshan^[8]

化合物名称	英文名	分子式
正二十四烷	tetracosane	C ₂₄ H ₅₀
十四烷酸	myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
β-谷甾醇	β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O
胡萝卜苷	daucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆
芒柄花素	formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
鹰嘴豆芽素A	biochanin A	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
芒柄花苷	ononin	C ₂₂ H ₂₂ O ₉
L-甲肌醇	L-quebrachitol	C ₇ H ₁₄ O ₆

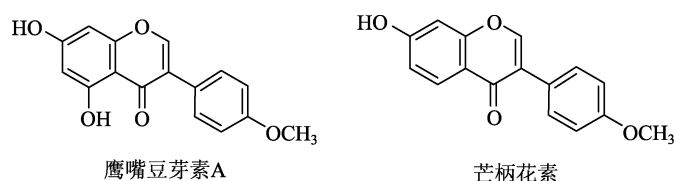


图1 鹰嘴豆芽素A与芒柄花素的化学结构式

Fig. 1 Chemical formulas of biochanin A and formononetin

2 岷山红三叶异黄酮的提取与纯化方法

2.1 岷山红三叶异黄酮的提取方法

目前, 对于红三叶总异黄酮的提取方法主要有索氏提取法、回流提取法、超声波提取法^[10]、微波提取法^[11]、超临界 CO₂ 萃取法和蒸汽破壁提取法等, 但岷山红三叶异黄酮最常用的提取方法是回流法。

2.1.1 回流提取法

回流提取法的常用溶剂主要有乙醇、甲醇、乙酸乙酯以及乙醇、甲醇的水溶液等。由于乙醇毒性低, 易回收利用, 因此在大量提取时, 一般采用一定浓度的乙醇进行提取。金加明^[12]采用不同有机溶剂, 通过紫外分光光度法测定提取液中的总异黄酮含量, 比较了回流提取法、冷浸法和索氏提取法对岷山红三叶异黄酮的提取效果, 结果(如表 2 所示)表明, 从提取方法考虑, 回流提取法的提取效果优于冷浸法和索氏提取法; 从提取溶剂考虑, 丙酮优于乙醇, 但由于其提取物中残留丙酮, 危害人体健康, 因此在实际生产中普遍以乙醇作为溶剂。

表 2 岷山红三叶异黄酮不同提取溶剂的提取结果^[12]

Tab. 2 Extraction results of isoflavones from *T. pratense* cv. Minshan with different solvents^[12]

提取方法	提取溶剂	总异黄酮含量/%
回流提取法	乙醇	1.65
	甲醇	2.12
	丙酮	4.07
冷浸法	乙醇	1.24
	甲醇	1.33
	丙酮	1.21
索氏提取法	乙醇	1.48
	甲醇	1.70
	丙酮	2.97

周振亚^[13]采用回流提取法, 利用乙醇体积分数、料液比(质量:体积)、提取温度、提取时间设计正交试验, 得出最佳工艺条件是乙醇体积分数 75%, 乙醇用量为原料的 10 倍(体积:质量), 提取温度 70℃, 浸提时间 1 h。

2.1.2 超声波提取法

超声波提取法是利用超声波作用于液体中产生的空化效应, 使生物细胞壁被破坏。陈学福等^[14]采用超声波提取法对岷山红三叶异黄酮提取工艺进行研究, 当乙醇体积分数为 95%、乙醇用量(料液比)为 1:10、提取时间为 20 min、提取温度为 20℃时, 异黄酮的得率最高。但由于超声波的强大作用力也使大量杂质溶出, 影响产品的纯度和后续的纯化, 并且高频率的超声波会使人出现恶心、胸闷和头晕等不适反应, 影响其在实际操作和工业化中的应用。

2.1.3 微波提取法

微波提取法的原理是在快速振动的微波电磁场中, 被辐射的物质分子产生热能, 使细胞内温度迅速上升, 导致细胞内部和细胞壁水分减少, 细胞收缩, 表面出现裂纹, 溶解并释放出胞内产物。赵国磊^[15]采用微波辅助萃取岷山红三叶异黄酮, 以 70%的乙醇作为提取溶剂, 料液比为 1:15, 微波功率 750 W, 微波时间为 1 min, 提取 3 次, 平均提取率可达 98.91%。与乙醇回流提取法、超声波提取法相比, 微波提取法具有易控制、穿透力强、选择性好、提取成本低、用时短、溶剂消耗少等特点。但是由于人体吸收微波会产生一定程度的危害, 并且此方法以电能为能源, 耗电量大, 加大了提取成本。因此, 这项技术并没有完全被投入使用, 投入工业化、规模化发展更有难度。

2.1.4 超临界 CO₂ 萃取法

超临界 CO₂ 萃取法以液态 CO₂ 为溶剂进行提取, 是一种不同于传统提取方法的新工艺, 其提取率与提取温度、压力、CO₂ 消耗量等因素有关。金汝城等^[16]采用超临界 CO₂ 萃取法对岷山红三叶异黄酮进行

萃取, 得出最佳的超临界萃取工艺条件为: 原料粒度 40 目, 无水乙醇作夹带剂, 无水乙醇用量相对于原料用量为 1 mL/g, 萃取温度 40°C, 压力 25 MPa, CO₂ 流量 6 mL/min, 静态萃取 60 min, 动态萃取 15 min, 异黄酮提取率可达 75%。超临界 CO₂ 萃取法的主要特点为提取率高、产品不含有害物质、无污染, 但由于超临界提取设备价格昂贵, 提取成本高, 目前不能实现大量使用, 因此仍无法代替回流提取法。

2.1.5 蒸汽破壁提取法

蒸汽破壁提取法是利用高压蒸汽产生的高温和高压加速溶剂分子的流动, 从而加快原料细胞壁破裂, 提高提取率。陈学福^[17]取岷山红三叶原草, 在 0.15 MPa 高温下蒸汽破壁 30 min, 然后结合回流提取法, 最终异黄酮得率和含量分别达 16.17% 和 4.15%。他还以岷山红三叶中芒柄花素的含量为指标, 比较了不同的提取方法, 结果如表 3 所示。

表 3 岷山红三叶异黄酮不同提取方法的提取结果^[17]

Tab. 3 Extraction results of isoflavones from *T. pratense* cv. Minshan with different methods^[17]

提取方法	固形物得率/%	芒柄花素总含量/%	浸膏中芒柄花素含量/%
索氏提取法	8.79	1.91	16.71
回流提取法	21.56	4.77	22.29
超声提取法	18.13	4.32	21.12
蒸汽破壁提取法	16.17	4.15	20.23

综上所述, 不论以总异黄酮含量为指标, 还是以芒柄花素含量为指标, 回流提取法的提取效果均为最佳, 所以岷山红三叶的提取方法多采用回流提取法, 其提取效率高, 且提取过程无有害物质产生, 提取成本小。

2.2 岷山红三叶异黄酮的纯化方法

目前, 异黄酮的纯化方法主要有大孔树脂吸附法、超滤膜法^[18-19]、溶剂提取法^[20-23]、色谱法、溶剂结晶法等^[24-26]。岷山红三叶异黄酮纯化方法多采用大孔树脂吸附法。

大孔树脂吸附法纯化异黄酮是近十年来发展起来的技术。吸附树脂是一类有机高分子聚合物吸附剂, 具有物理化学选择性高、吸附选择性独特、不受无机物存在的影响、再生简便、解析条件温和、使用周期长、节省费用等诸多优点。金汝城等^[27]对大孔树脂吸附纯化岷山红三叶异黄酮进行了研究, 通过静态吸附实验, 筛选出 D101 树脂为纯化红三叶异黄酮较为理想的吸附材料。马春燕^[28]采用 D101 大孔吸附树脂对岷山红三叶总异黄酮进行了分离纯化, 具体工艺条件为: 上样浓度 1.18 mg/mL, 上样速度 2 BV/h [BV/h 表示空间流速, 即单位时间 (h) 内流经单位体积树脂的平均液量], 依次用 4 BV 水、2 BV 30%乙醇、4 BV 70%乙醇洗脱, 收集 70%乙醇部分。研究表明, 大孔吸附树脂可用于异黄酮的纯化, 所制备异黄酮的含量达 80% 以上, 而且制备工艺稳定、重复性好, 可用于大规模纯化。但不足之处是, 大孔吸附树脂是一种化工产品, 存在有机物残留, 采用此法纯化的异黄酮不允许作为保健食品。朱宇旌等^[29]采用大孔吸附树脂 HPH480 对岷山红三叶异黄酮进行纯化, 并比较了大孔树脂吸附法与溶剂萃取法联用以及大孔树脂吸附法与重结晶法联用的优劣。大孔树脂吸附法与重结晶法联用虽然纯化纯度高, 但重复性差, 因此优选大孔树脂吸附法与溶剂萃取法联用。综上所述, 岷山红三叶的纯化多采用大孔吸附树脂法, 并可与溶剂萃取法、重结晶法、超滤膜法等联用, 以提高异黄酮纯度。

3 岷山红三叶异黄酮的含量测定

紫外分光光度法^[30-32]、高效液相色谱法^[33-35]、胶束电动毛细管色谱法^[36]等是红三叶异黄酮最常见的

含量测定方法。岷山红三叶异黄酮含量测定多采用紫外分光光度法和高效液相色谱法。紫外分光光度法以标准品的吸光度绘制标准曲线, 只能用于测定总异黄酮含量; 高效液相色谱法能准确测定异黄酮类物质的主要成分且快捷方便, 是异黄酮类物质测定的首选方法。

3.1 紫外分光光度法

紫外分光光度法主要用于测定岷山红三叶总异黄酮的含量。金加明等^[37]采用紫外分光光度法, 以鹰嘴豆芽素 A 为标准品, 在 260 nm 处测定一系列标准液的吸光度, 以吸光度 A 为纵坐标, 浓度 C 为横坐标, 求得线性方程 $A=0.133\ 2C$, 相关系数 $r=0.999\ 5$, 说明鹰嘴豆芽素 A 在 0~9.6 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系, 测得的总异黄酮含量准确。

3.2 高效液相色谱法

高效液相色谱法可用于分离异黄酮组分, 并分别测定其含量。马春燕^[28]建立了同时测定岷山红三叶中大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素和鹰嘴豆芽素 A 的高效液相色谱方法: 采用 Kromasil C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 248 nm 和 260 nm。测得大豆苷元、染料木素、刺芒柄花素和鹰嘴豆芽素 A 的含量分别为 0.20, 0.20, 2.23, 0.47 mg/g。

3.3 胶束电动毛细管色谱法

张玉等^[36]采用胶束电动毛细管色谱法对红三叶中 4 种异黄酮(染料木素、鹰嘴豆芽素 A、大豆黄素和刺芒柄花素)的含量进行了测定, 其实验条件为: 缓冲液含 20 mmol/L 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS), 4 mg/mL 羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD), 30 mmol/L 硼砂及 5%乙醇, pH=10.1, 毛细管温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 运行电压 25 kV, 检测波长 254 nm。结果显示, 4 种异黄酮在比较宽的浓度范围内, 样液浓度与峰面积呈现良好的线性关系。

4 红三叶异黄酮的药理作用

4.1 在医学方面的作用

4.1.1 雌激素样作用

曾伶等^[38]通过摘除大鼠双侧卵巢制作大鼠雌激素水平低下的模型, 观察了不同剂量红三叶异黄酮对去势大鼠生殖器官和血清雌二醇水平的影响, 结果发现红三叶异黄酮浓度增大, 大鼠生殖器官雌性化程度也提高, 说明红三叶异黄酮具有雌激素样作用。KELLY 等^[39]从红三叶中分离出刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 等活性成分, 发现此类物质可治疗因雌激素分泌失调而引发的疾病。BECK 等^[40]、DORNSTAUER 等^[41]认为, 红三叶异黄酮中的刺芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A 与雌激素受体 β 受体间的亲和力高于 α 受体, 表现出较弱的雌激素活性。妇女更年期综合征是妇女从生育年龄过渡到老年阶段时, 因卵巢功能减退, 体内雌激素水平下降, 导致内分泌功能失调而引起的疾病^[42]。红三叶异黄酮具有弱雌激素活性, 可弥补妇女更年期减少的雌激素, 从而显著改善更年期综合征症状^[43]。

4.1.2 抗癌作用

红三叶提取物能通过抑制相关酶类而发挥抗癌作用。研究表明, 人体摄入动物性激素可诱发或加剧癌症的发生, 但补充植物性激素则可抑制癌细胞的繁殖^[44]。EMPIE 等^[45]从红三叶、苜蓿等植物中提取出异黄酮、皂苷等活性成分, 用制成的混合物治疗前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、尿道癌等。SLATER 等^[46]发现在饲喂红三叶异黄酮小鼠的前列腺上皮细胞中雌激素 β 受体和钙粘蛋白显著增加, 表明红三叶异黄

酮能减少前列腺增生的致癌性转化。尹春萍等^[47]研究发现红三叶总异黄酮可抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖并诱导其凋亡, 具有治疗乳腺癌的作用。

4.1.3 抗氧化、清除自由基作用

红三叶异黄酮可以抑制膜质过氧化^[48], 并能保护 DNA 不被氧化破坏, 有效消除紫外线引起的 DNA 损伤^[49], 还能抑制小鼠肝组织匀浆液中脂质的过氧化, 防止维生素 C (Vc) 的氧化^[50]。朱宇旌等^[51]研究证实, 红三叶异黄酮对猪油具有良好的抗氧化作用, 另外 Vc 和维生素 E (Ve) 等对红三叶异黄酮具有明显的协同抗氧化作用。杨丽珍等^[52]用红三叶异黄酮高、低剂量及大豆异黄酮对比治疗衰老大鼠, 结果表明红三叶异黄酮通过提高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、降低丙二醛 (MDA) 浓度来提高机体清除氧自由基的能力, 从而有效延缓衰老。

4.1.4 提高机体免疫力作用

在国外, 民间有将红三叶草做抗疟药使用, 也有将其用于解痉挛、祛痰、治支气管炎和百日咳等疾病^[53]。红三叶草花粉能抵抗某些革兰氏阴性杆菌, 因此可用于治疗皮肤病, 如湿疹、烧伤、溃疡和牛皮癣等^[54]。异黄酮还能提高动物机体细胞免疫、体液免疫。秦亮^[55]发现, 适量的红芪多糖和红三叶异黄酮能够增强小鼠非特异性免疫、细胞免疫和体液免疫功能, 促进免疫器官的发育。刘宝剑^[56]发现红三叶异黄酮在适宜浓度范围内具有增强小鼠免疫功能的作用。

4.1.5 防治骨质疏松的作用

红三叶异黄酮具有植物雌激素活性, 与破骨细胞内的受体结合后, 可降低破骨细胞的活性, 抑制其破骨活动和骨吸收过程, 预防和治疗绝经后骨质疏松^[54]。红三叶异黄酮能减缓雌激素水平低下, 其对维甲酸致小鼠骨质疏松有一定的预防作用^[57-58]。李颖等^[59]研究发现, 红三叶异黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松症具有明显的防治作用。

4.2 在畜牧业生产中的作用

红三叶异黄酮在畜牧业生产中能促进动物生长发育, 提高动物机体的免疫力, 促进乳腺发育并提高泌乳能力, 提高家禽的产蛋性能, 促进生殖系统发育等。姜义宝等^[60]发现, 红三叶异黄酮能提高肉鸡的日增重, 可以显著改善肉鸡生产性能。王元生^[61]研究了岷山红三叶异黄酮对产蛋后期母鸡生产性能及营养物质利用的影响, 结果表明, 在饲料中添加 0~20 mg/kg 红三叶异黄酮可提高血清钙与胫骨灰含量; 添加 5 mg/kg 红三叶异黄酮对钙利用有一定促进作用; 添加 20 mg/kg 红三叶异黄酮可显著提高脾脏指数。王伟群等^[62]的实验研究表明, 红三叶中的刺芒柄花素有弱的雌激素活性, 能引起小公鸡血清睾酮水平升高, 提高瘦肉率, 促进生长。

5 红三叶异黄酮的应用

红三叶含有丰富的异黄酮, 国内已有 145 家公司生产红三叶提取物, 但检索国家食品药品监督管理局保健食品审评数据库发现, 只有湖南春光九汇现代中药有限公司将红三叶提取物制备成红研牌长青胶囊[卫食健字(2002)第 0123 号]出售, 除此之外并未发现有相关产品上市。国外对于红三叶的研究相对成熟, 已有红三叶胶囊、红三叶蜂蜜等相关产品(如表 4 所示)上市。其中红三叶胶囊主要作为膳食补充剂, 可缓解更年期症状。

表 4 国外红三叶产品概况

Tab. 4 Overview about foreign products of *T. pratense* L.

英文名	中文名	所属公司	国家	功效
Red Clover	红三叶胶囊	Nature's Way	美国	膳食补充剂
Meno Rotklee	红三叶营养胶囊	Doppelherz	德国	缓解更年期症状
Rotklee Kapseln	红三叶营养胶囊	Avitale	德国	膳食补充剂
Arkogelules Trefle Rouge	红三叶草胶囊	Arkopharma	法国	减轻更年期焦躁症状
Clover honey	三叶草蜂蜜	Y. S. Organic Bee Farm	法国	增强抵抗力、美容养颜

注: 数据来源于 <http://www.haituncun.com/yybaoj/jichuyy/1018961>

检索国家食品药品监督管理局保健食品审评数据库发现, 与大豆异黄酮相关的保健食品有 185 种。与大豆相比, 岷山红三叶具有更好的经济效益(如表 5 所示), 因此岷山红三叶异黄酮在应用方面可效仿大豆异黄酮的应用。

表 5 大豆和岷山红三叶经济效益比较

Tab. 5 Comparison of economic benefits in soybean and *T. pratense* cv. Minshan

植物类别	受益年限/年	收获	异黄酮存在部位	异黄酮含量/%	商品价格/(元/t)
大豆	1	1 年 1 茬	籽粒	0.1~0.2	3 900~4 500
岷山红三叶	5~7	1 年 2~3 茬	全株	1.0~1.5	约 1 000

注: 数据来源于 <http://www.zgncpw.com/news/show-8777.html>

6 结论与展望

岷山红三叶作为天然牧草, 富含异黄酮。红三叶异黄酮具有提高免疫力、防治骨质疏松、抗肿瘤及防止炎症等多种药理作用, 并且在畜牧业方面也有一定的应用。但岷山红三叶至今未被产业化发展, 其主要原因是当地缺少龙头企业, 资金匮乏, 缺少先进设备和技术, 再者消费者对岷山红三叶并不熟知, 影响销量, 影响企业效益。

产业化发展岷山红三叶需要岷县政府的大力支持, 积极与科研院所合作, 招商引资, 科技振兴岷县。由于岷山红三叶具有丰富的异黄酮类物质, 将其作为食品添加剂、饲料添加剂、日化用品等开发具有极大的潜力。岷山红三叶具有更好的经济效益, 可用来代替大豆, 提取异黄酮; 可将其开发成保健食品, 如红三叶蜂蜜、红三叶茶饮等; 也可将其开发成药品, 用于治疗妇女更年期综合征, 如红三叶胶囊等。

随着今后不断深入的探讨, 岷山红三叶将发挥其在临床和医疗保健方面更大的作用。

[参考文献] (References)

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1975.
Jiangsu New Medical College. Traditional Chinese medicine dictionary[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publisher, 1975. (in Chinese)
- [2] BATESMITH E C, SWAIN T. The isolation of 7-hydroxy-4'-methoxyiso-flavone (formononetin) from red clover (*Trifolium pratense* L.) and a note on the identity of pratol[J]. Chemistry & Industry, 1953(42): 1127.
- [3] 王力学. 岷山红三叶草规范化种植技术[J]. 农业科技与信息, 2012 (21): 62-63.
WANG L X. Standardized planting techniques of Minshan red clover[J]. Agricultural Science-Technology and Information, 2012(21): 62-63. (in Chinese)
- [4] 郑鹏. 岷山红车轴草资源调查与生物活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2008.
ZHENG P. Study on investigation and bioactivity of *Trifolium pratense* cv. Minshan mongolicum resources[D]. Xi'an:

- Shaanxi Normal University, 2008. (in Chinese)
- [5] 齐素芳. 岷县草产业发展现状及策略[J]. 草业科学, 2012, 29 (3): 495-498.
QI S F. Development status and strategy of grass industry in Minxian[J]. Pratacultural Science, 2012, 29(3): 495-498. (in Chinese)
- [6] 刘兰芳. 浅析岷县特色草产业开发现状及市场前景[J]. 定西科技, 2010 (2): 33-34.
LIU L F. Study on the present situation and market prospect of characteristic grass industry in Minxian county[J]. Dingxi Technology, 2010(2): 33-34. (in Chinese)
- [7] 严肃和, 张小虎. 岷山红三叶深度开发利用前景[J]. 当代畜牧, 2012 (3): 59-60.
YAN S H, ZHANG X H. Prospects for the development and utilization of red clover in Minshan[J]. Contemporary Animal Husbandry, 2012(3): 59-60. (in Chinese)
- [8] 陈学福, 隗惠玲, 史高峰, 等. 岷山红三叶草化学成分的研究[J]. 中草药, 2007, 38 (2): 176-178.
CHEN X F, JUAN H L, SHI G F, et al. Study on chemical constituents of red clover in Minshan[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(2): 176-178. (in Chinese)
- [9] 陈学福, 史高峰. 红三叶异黄酮的研究进展[J]. 中草药, 2006, 37 (2): 309-312.
CHEN X F, SHI G F. Research progress of isoflavones in red clover[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(2): 309-312. (in Chinese)
- [10] 于丽娜, 张永忠, 辛禹. 超声波法提取红三叶草总异黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2006 (9): 124-126, 129.
YU L N, ZHANG Y Z, XIN Y. Study on extraction of total isoflavones from red clover by ultrasonic method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006(9): 124-126, 129. (in Chinese)
- [11] 杨薇薇, 张永忠, 王丽娟. 微波辅助萃取红三叶草总异黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2009 (2): 226-229.
YANG W W, ZHANG Y Z, WANG L J. Research on extraction of isoflavone from red clover by microwave-assisted treatment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009(2): 226-229. (in Chinese)
- [12] 金加明. 岷山红三叶总异黄酮提取方法的研究[J]. 中国饲料, 2008 (18): 40-41.
JIN J M. Study on the extraction methods of total isoflavones from Minshan *Trifolium pratense* L.[J]. China Feed, 2008(18): 40-41. (in Chinese)
- [13] 周振亚. 红三叶草总异黄酮提取、分离、纯化工艺研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2008.
ZHOU Z Y. Studies on extraction, separation and purification of isoflavones from *Trifolium pratense*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2008. (in Chinese)
- [14] 陈学福, 史高峰, 孙浩冉. 超声波提取红三叶异黄酮工艺的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34 (24): 6426-6427.
CHEN X F, SHI G F, SUN H R. Extraction of *Trifolium pratense* isoflavones with ultrasonic wave[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(24): 6426-6427. (in Chinese)
- [15] 赵国磊. 红车轴草异黄酮提取及纯化方法的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2008.
ZHAO G L. Study on extraction and purification of *Trifolium pratense* isoflavones[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2008. (in Chinese)
- [16] 金汝城, 赵国磊, 贾超. 超临界 CO₂ 萃取红车轴草异黄酮的工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2008, 25 (7): 625-628.
JIN R C, ZHAO G L, JIA C. Study on extraction of isoflavones from *Trifolium pratense* by supercritical CO₂[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2008, 25(7): 625-628. (in Chinese)
- [17] 陈学福. 岷山红三叶草化学成分及异黄酮提取工艺的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2006.
CHEN X F. Study on chemical constituents and isoflavones extraction technology of *Trifolium pratense* cv. Minshan[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2006. (in Chinese)
- [18] 刘晶莹, 刘宝兴, 张莹. 大豆异黄酮精制工艺研究[J]. 辽宁化工, 2003, 32 (10): 428-429.
LIU J Y, LIU B X, ZHANG Y. Study on refining process of soybean isoflavones[J]. Liaoning Chemical Industry, 2003, 32(10): 428-429. (in Chinese)
- [19] 王成章, 郁青, 谭卫红, 等. 超滤在纯化银杏叶黄酮甙中的应用[J]. 林业科技通讯, 1997 (2): 21-22.
WANG C Z, YU Q, TAN W H, et al. Application of ultrafiltration in purification of flavonoid glycosides from *Ginkgo*

- biloba*[J]. Forestry Science and Technology, 1997(2): 21-22. (in Chinese)
- [20] 闫祥华, 刘大星, 何传民, 等. 大豆异黄酮的提取工艺及其对血凝调节的影响[J]. 食品科学, 2001, 22 (5): 70-73.
YAN X H, LIU D X, HE C M, et al. Study on extraction technology of soybean isoflavoues and their ameliorative effect on blood coagulation[J]. Food Science, 2001, 22(5): 70-73. (in Chinese)
- [21] 李晓霞, 雷继鹏, 谷克仁. 大豆异黄酮、大豆皂甙纯化工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2003 (3): 3-6.
LI X X, LEI J P, GU K R. Study on purifying technique of soybean isoflavones and saponins[J]. Cereals & Oils, 2003(3): 3-6. (in Chinese)
- [22] 贾乃莹, 袁其朋. 高纯度大豆黄苷及大豆黄素的制备[J]. 大豆科学, 2004, 23 (1): 11-14.
JIA N K, YUAN Q P. Preparation of high purity daidzin and saidzein[J]. Soybean Science, 2004, 23(1): 11-14. (in Chinese)
- [23] 江和源, 吕飞杰, 邵建祥, 等. 高效液相色谱法测定大豆中异黄酮的含量[J]. 食品科学, 2000, 21 (4): 56-58.
JIANG H Y, LÜ F J, TAI J X, et al. Determination of isoflavones in soybean by HPLC[J]. Food Science, 2000, 21(4): 56-58. (in Chinese)
- [24] 李崇明, 向阳, 翟莉, 等. 红车轴草中总异黄酮提取精制工艺研究[J]. 中草药, 2004, 35 (10): 1135-1136.
LI C M, XIANG Y, ZHAI L, et al. Research on the technology of extraction and purification of total isoflavones from the red clover[J]. Chinese Traditonal and Herbal Drugs, 2004, 35(10): 1135-1136. (in Chinese)
- [25] NILSSON A. Quantitative determination of biochanin A in red clover samples by means of an isotope dilution method[J]. Arkiv for Kemi, 1963, 21(1): 87-89.
- [26] 边清泉, 刘家琴, 杨振萍. 微波法提取红车轴草中染料木素和刺芒柄花素工艺的研究[J]. 中成药, 2005, 27 (9): 1015-1017.
BIAN Q Q, LIU J Q, YANG Z P. Study on the extraction of genistein and radix glaubera in *Trifolium pratense* L. by microwave method[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2005, 27(9): 1015-1017. (in Chinese)
- [27] 金汝城, 赵国磊, 谢伟雪, 等. 大孔树脂吸附纯化红车轴草异黄酮的研究[J]. 中成药, 2008, 30 (11): 1615-1619.
JIN R C, ZHAO G L, XIE W X, et al. Study on adsorption and purification of isoflavones from *Trifolium pratense* L. by macroporous resin[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2008, 30(11): 1615-1619. (in Chinese)
- [28] 马春燕. 红三叶异黄酮分离纯化工艺及定量分析方法的研究[D]. 保定: 河北大学, 2011.
MA C Y. Study on the separation and purification process and quantitative analysis method of isoflavones in red clover[D]. Baoding: Hebei University, 2011. (in Chinese)
- [29] 朱宇旌, 孙景霞, 李新华, 等. 红三叶异黄酮纯化工艺研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39 (5): 588-592.
ZHU Y J, SUN J X, LI X H, et al. Purification of isoflavonoids from red clover[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2008, 39(5): 588-592. (in Chinese)
- [30] 朱贤森, 黄志勤, 杨庆春, 等. 红车轴草总异黄酮粉剂中总异黄酮含量测定研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (8): 1961-1962.
ZHU X S, HUANG Z Q, YANG Q C, et al. Study on the determination of the content of isoflavones in *Trifolium pratense* Fenji[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(8): 1961-1962. (in Chinese)
- [31] 陈寒青, 金征宇. 三波长紫外分光光度法测定红车轴草异黄酮含量的研究[J]. 食品科学, 2005, 26 (5): 194-197.
CHEN H Q, JIN Z Y. Study on determination of *Trifolium pratense* isoflavones by three-wavelength UV spectrophotometry[J]. Food Science, 2005, 26(5): 194-197. (in Chinese)
- [32] 吴敏, 袁建, 俞阗, 等. 三波长紫外分光光度法测定鹰嘴豆籽粒总异黄酮含量的研究[J]. 干旱地区农业研究, 2007, 25 (6): 96-101.
WU M, YUAN J, YU T, et al. Determination of the total isoflavone content of chickpea seeds by three-wavelength UV spectrophotometry[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2007, 25(6): 96-101. (in Chinese)
- [33] 陈娟, 刘勇, 师彦平. 红三叶中四种异黄酮的高效液相色谱分析方法研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30 (11): 2034-2036.
CHEN J, LIU Y, SHI Y P. Method development and validation for HPLC analysis of four isoflavones in red clover[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 30(11): 2034-2036. (in Chinese)
- [34] 马强, 周玉新, 雷海民, 等. 高效液相色谱法-蒸发光散射检测器和二级管阵列检测器测定红车轴草提取物中鹰嘴豆

- 芽素 A 和芒柄花素的含量[J]. 中草药, 2005, 36 (3): 372-375.
- MA Q, ZHOU Y X, LEI H M, et al. Determination of biochanin A and formononetin in *Trifolium pratense* extract by HPLC-ELSD and DAD[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005, 36(3): 372-375. (in Chinese)
- [35] 马强, 张金兰, 周玉新, 等. 高效液相色谱-电喷雾质谱法测定红车轴草中异黄酮类化合物[J]. 分析化学, 2006, 34: S247-S250.
- MA Q, ZHANG J L, ZHOU Y X, et al. Analysis of isoflavonoids in *Trifolium pratense* L. by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34: S247-S250. (in Chinese)
- [36] 张玉, 师彦平. 胶束电动毛细管色谱法测定红车轴草中四种异黄酮的含量[C]//甘肃省化学会第二十五届年会、第七届甘肃省中学化学教学经验交流会论文集. 2007: 2.
- ZHANG Y, SHI Y P. Measurement of four isoflavones in *Trifolium pratense* by micellar electrokinetic capillary chromatography[C]//The 25th Annual Meeting of Gansu Chemical Society, the 7th Gansu Province Journal of Gansu Institute of Chemistry. 2007: 2. (in Chinese)
- [37] 金加明, 车爱霞, 任春明. 红三叶提取物中总异黄酮含量测定的研究[J]. 饲料工业, 2009 (16): 45-46.
- JIN J M, CHE A X, REN C M. Study on determination of total isoflavones in extraction of Minshan *Trifolium pratense* L.[J]. Feed Industry, 2009(16): 45-46. (in Chinese)
- [38] 曾伶, 李颖, 薛存宽. 红车轴草异黄酮雌激素样作用研究[C]//中华医学会第九次全国核医学学术会议论文摘要汇编. 2011: 1.
- ZENG L, LI Y, XUE C K. Study on the estrogen-like activity of isoflavones from *Trofilium pratense* L.[C]//Chinese Medical Association, the Ninth National Nuclear Medicine Academic Conference Abstract Compilation. 2011: 1. (in Chinese)
- [39] KELLY G E, HUSBAND A J. Therapy of estrogen-associated disorders: US, 6599536[P]. 2003-07-29.
- [40] BECK V, UNTERRIEDER E, KRENN L, et al. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progesterin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 84(2-3): 259-268.
- [41] DORNSTAUDER E, JISA E, UNTERRIEDER I, et al. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavin[®]) intended for large scale use in hormone replacement therapy[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 78(1): 67-75.
- [42] TANG G W K. The climacteric of Chinese factory workers[J]. Maturitas, 1994, 19(3): 177-182.
- [43] BOULET M J, ODDENS B J, LEHERT P, et al. Climacteric and menopause in seven south-east Asian countries[J]. Maturitas, 1994, 19(3): 157-176.
- [44] 刘宝剑, 魏彦明. 红车轴草异黄酮的生理及药理作用的研究进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2010, 26 (1): 29-34.
- LIU B J, WEI Y M. Advances in physiological and pharmacological effects of isoflavones in *Trofilium pratense* L.[J]. Journal of Hebei North University (Natural Science Edition), 2010, 26(1): 29-34. (in Chinese)
- [45] EMPIE M, GUGGER E. Method of preparing and using isoflavones for the treatment of blood related illnesses: US, 6391308[P]. 2002-05-21.
- [46] SLATER M, BROWN D, HUSBAND A. In the prostatic epithelium, dietary isoflavones from red clover significantly increase estrogen receptor β and E-cadherin expression but decrease transforming growth factor β 1[J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2002, 5(1): 16.
- [47] 尹春萍, 樊龙昌, 何俊文, 等. 红三叶总异黄酮对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中草药, 2007, 38 (2): 232-234.
- YIN C P, FAN L C, HE J W, et al. Effect of red clover total isoflavones on cell proliferation and apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(2): 232-234. (in Chinese)
- [48] 沈玥, 张永忠. 红三叶草总异黄酮抗氧化活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35 (11): 122-124.
- SHEN Y, ZHANG Y Z. Studies on antioxidant activity of total isoflavones from *Trifolium pratense* L.[J]. Food and Fertilizer

- Industry, 2009, 35(11): 122-124. (in Chinese)
- [49] WEI H, CAI Q, RAHN R O. Inhibition of UV light-and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein[J]. Carcinogenesis, 1996, 17(1): 73-77.
- [50] MAZUR M W, ADLERCREUTZ H. Dietary derived phytoestrogens-health aspects in the human[J]. Klin. Lab, 1998, 15: 128-142.
- [51] 朱宇旌, 张勇, 王纯刚. 红三叶黄酮抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2006 (4): 78-81.
ZHU Y J, ZHANG Y, WANG C G. Study on the anti-oxidizing action of flavonoids extracted from red clover[J]. Food Science and Technology, 2006(4): 78-81. (in Chinese)
- [52] 杨丽珍, 周俊芬, 王喜军. 红车轴草异黄酮对老年雌性大鼠性激素水平及 SOD 活性、MDA 含量的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13 (7): 513-514.
YANG L Z, ZHOU J F, WANG X J. Effect of isoflavone from *Trifolium pratense* L. on levels of sex hormones, activity of SOD and content of MDA in senile female rats[J]. Chinese Journal of Basic Medicine of Traditional Chinese Medicine, 2007, 13(7): 513-514. (in Chinese)
- [53] McGRAW L. Red clover silage boasts benefits over alfalfa silage[J]. Agricultural Research, 2001, 49(7): 7.
- [54] PETERSON G, BARNES S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation[J]. The Prostate, 1993, 22(4): 335-345.
- [55] 秦亮. 两种中草药提取物对小鼠免疫功能和肉鸡生产性能的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
QIN L. Effects of two kinds of herbal extracts on immune function and performance of broiler chickens[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [56] 刘宝剑. 红车轴草总黄酮抗氧化作用及其对免疫功能的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
LIU B J. Study on the effect of total isoflavones from *Trofilium pratense* L. on the immune function of mice[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [57] 周延萌, 宋立群, 马晓茜, 等. 红车轴草异黄酮对维甲酸致小鼠骨质疏松的预防作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26 (12): 1658-1661.
ZHOU Y M, SONG L Q, MA X Q, et al. Preventive effect of *Trifolium pratense* isoflavones on retinoic acid induced osteoporosis in mice[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010, 26(12): 1658-1661. (in Chinese)
- [58] 于海涛. 红车轴草有效部位化学成分及活性研究[D]. 济南: 济南大学, 2016.
YU H T. Study on chemical constituents and pharmacological activity of *Trofilium pratense* L. effective parts[D]. Jinan: Jinan University, 2016. (in Chinese)
- [59] 李颖, 薛存宽, 何学兵, 等. 红车轴草异黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松防治作用的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11 (4): 509-511.
LI Y, XUE C K, HE X B, et al. Effect of *Trofilium pratense* L. isoflavones on osteoporosis of ovariectomized rats[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2005, 11(4): 509-511. (in Chinese)
- [60] 姜义宝, 杨玉荣, 张蕊, 等. 红车轴草异黄酮对肉鸡生长性能和血清生化指标的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42 (6): 28-31.
JIANG Y B, YANG Y R, ZHANG R, et al. Effect of red clover isoflavone on growth performance, biochemistry indexes in serum of broilers[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(6): 28-31. (in Chinese)
- [61] 王元生. 岷山红三叶异黄酮对产蛋后期母鸡生产性能及营养物质利用的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
WANG Y S. Effect of *Trofilium paretense* L. cv. 'Minshan' isoflavoneon performance and nutrients utilization of laying hens in later period[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [62] 王伟群, 韩正康. 芒柄花素的放射免疫测定法[J]. 云南植物研究, 1990, 12 (4): 427-433.
WANG W Q, HAN Z K. Radiroimmunoassay for formononetin[J]. Acta Botanica Yunnanica, 1990, 12(4): 427-433. (in Chinese)