

红车轴草的最佳采收期和前处理加工方法研究

刘 晗^{1,3}, 罗 琪², 欧阳勇², 杜方麓^{1,3}, 曾建国^{1,2*}

(1. 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南长沙 410331; 2. 湖南九汇现代中药有限公司, 湖南长沙 410331;
3. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410007)

摘 要:目的 考察影响红车轴草中异黄酮量的因素, 确定最佳采收期和最适宜的前处理方法。方法 采用乙醇回流提取。以芒柄花素和鹰嘴豆芽素 A 的总量为指标, 采用 HPLC 法测定。色谱条件: 伊利特 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱; 柱温 25 ℃; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 10 μL。比较红车轴草不同采收时期、不同产地及栽培方式、不同方式的前处理干燥方法和不同采收部位中有效成分的差异。结果 野生青苗期的红车轴草中总异黄酮的量最高, 结合生物总量则花蕾期为最佳采收期; 同一植株中, 叶中的量最高, 茎中次之, 花中最低; 新鲜状态快速烘干能高水平保持其中的有效成分。结论 红车轴草中总异黄酮的量受采收时期、产地、干燥方式的影响; 红车轴草最适宜采收期为花蕾期至初花期, 鲜活状态下的异黄酮的总量最高。

关键词:红车轴草; 异黄酮; 采收期; 前处理方法

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)12-1821-03

Best harvest period and preprocessing method for *Trifolium pratense*

LIU Han^{1,3}, LUO Qi², OUYANG Yong², DU Fang-lu^{1,3}, ZENG Jian-guo^{1,2}

(1. Hunan Engineering Research Center of Botanical Extract, Changsha 410331, China; 2. Hunan Phytoway Inc., Changsha 410331, China; 3. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Key words: *Trifolium pratense* L.; isoflavones; harvest period; preprocess

红车轴草 *Trifolium pratense* L. 为豆科多年生草本植物, 又名红三叶、红花苜蓿、红菽草、三叶草, 原产小亚细亚和西南欧, 现在全球均有栽培, 在我国东北、华北、华东地区有栽培或野生, 是优良的豆科牧草。红车轴草中含有黄酮类、异黄酮类、香豆素类、皂苷类、蛋白质、糖类和维生素等成分^[1]。其中异黄酮类化合物具有植物雌激素样作用和抗癌作用^[2]。红车轴草主要含有芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A、大豆黄素、染料木素 4 种异黄酮化合物^[3]。因此本实验以芒柄花素和鹰嘴豆芽素 A 为指标, 考察了红车轴草不同采收时间、不同产地及不同部位和不同干燥处理方式的异黄酮量的变化, 为红车轴草提取物的工业化生产提供原药材选择依据和参考, 有助于红车轴草的质量控制和合理开发利用。

1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪, 包括 SPD-10A 紫外-可见检测器, LC-10AT 双泵, N2000 色谱工作站。

95% 乙醇、磷酸 (分析纯), 乙腈 (色谱纯), 重蒸水。芒柄花素对照品 (自制), 鹰嘴豆芽素 A 对照品 (批号 111708-200501) 购自中国药品生物制品检定所。

红车轴草为采于湖北建始、湖北恩施、甘肃岷县、湖南浏阳青苗期、花蕾期、初花期、盛花期和结籽期的药材。经湖南九汇现代中药有限公司曾建国教授鉴定为红车轴草 *Trifolium pratense* L.。

2 方法与结果

2.1 异黄酮的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件: 伊利特 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 10 μm) 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱; 柱温: 25 ℃; 体积流量: 0.8 mL/min; 进样量: 5 μL。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备: 精密称取 60 ℃ 干燥至恒重的芒柄花素和鹰嘴豆芽素 A 对照品适量, 加甲醇分别制成含芒柄花素 0.120 mg/mL、鹰嘴豆芽素 A 0.106 mg/mL 的溶液, 作为对照品贮备液, 4 ℃ 冰箱放置。分别精密吸取上述贮备液 4.0、3.0 mL 置同一 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 即得混合对照品溶液 (含芒柄花素 48 μg/mL, 鹰嘴豆芽素 A 31.8 μg/mL)。

2.1.3 鲜活药材供试品溶液的制备: 取鲜活药材 50 g 切段, 立即用 95% 乙醇 200 mL 匀浆, 4 h 内完

收稿日期: 2007-05-10

作者简介: 刘晗 (1982-), 女, 湖南双峰人, 湖南中医药大学 2005 级硕士, 主要从事中药活性成分研究。

* 通讯作者 曾建国 Tel: (0731)4686478 E-mail: ginkgo@phytoway.com

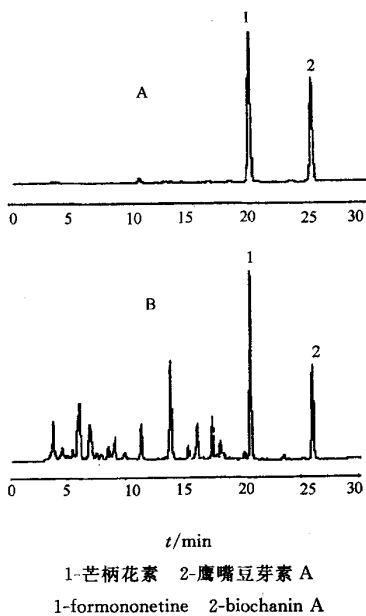


图 1 混合对照品(A)和红车轴草(B)的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A) and *T. pratense* (B)

成,回流提取 1 h,滤过,残渣用 95%乙醇洗涤,合并滤液,以 95%乙醇定容至 250 mL,摇匀,经 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液即得。

2.1.4 干药材供试品溶液的制备:取干样在烘箱中于 90~105 °C 烘烤 1 h 后粉碎,称取 5 g 左右药材粗粉,加 85%乙醇 50 mL 加热回流提取 1 h,滤过,残渣用 85%乙醇洗涤,合并滤液,以 85%乙醇定容至 100 mL,摇匀,经 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液即得。

2.1.5 线性范围考察:精密吸取混合对照品溶液 8、6、4、2、1 mL 分别加甲醇定容至 10 mL,稀释成不同质量浓度的对照品溶液,进样测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程。芒柄花素: $Y = 417.1 X + 30\ 387\ 671.7$, $r = 0.999\ 9$,线性范围 0.012~0.096 mg/mL;鹰嘴豆芽素 A: $Y = 45\ 529.5 X + 39\ 263\ 647.4$, $r = 0.999\ 9$,线性范围:0.010 6~0.084 8 mg/mL。

2.1.6 样品的测定:将不同采收时间、不同产地及栽培方式、不同干燥方式、不同部位的红车轴草制备供试品溶液,进样 10 μL 测定,按外标法计算药材折干后两种异黄酮总量占干物质的质量分数。

2.2 药材中水分的测定:参照《中国药典》2005 年版一部附录 IX H 项下第一法(烘干法)测定供试品中含水量。干燥品破碎成直径不超过 3 mm 的碎片。鉴于新鲜药材的各部位含水量差异较大,将方法改进为:下午从田间取样,并限在 4 h 内,快速切成长度

不超过 0.5~1 cm 的小段立即检测;测定时取 200.00 g,平铺于干燥至恒重的圆盘中,厚度不超过 20 mm,在 100~105 °C 干燥 5 h,将铝盘迅速移置干燥器中,冷却 30 min,精密称定质量,再干燥 1 h 后冷却,称定质量,至连续两次称量的差异不超 1 g 为止;根据减失的质量,计算含水量。

2.3 不同加工状态方式下红车轴草中总异黄酮的比较:将湖南浏阳种植的红车轴草在青苗期、花蕾期、初花期、盛花期、结籽期的鲜采药材分别烘干(在采样地将鲜采的样品切碎后于 24 h 内于 105 °C 快速烘干)、晒干(太阳下直晒)、阴干(室内晾干),制备供试品溶液,测定。结果鲜活状态下的红车轴草中异黄酮的总量最高,烘干处理的次之,阴干的总量最低,可见干燥方式对异黄酮总量的影响较大。结果见表 1。

表 1 湖南浏阳产的红车轴草不同干燥方法下的异黄酮的比较

Table 1 Comparison of total isoflavones in *T. pratense* grown in Liuyang, Hunan Province dried by different methods

药材状态	异黄酮/%				
	青苗期	花蕾期	初花期	盛花期	结籽期
鲜活	1.14	0.85	0.76	0.58	0.40
烘干	1.09	0.84	0.73	0.54	0.36
晒干	0.87	0.71	0.67	0.41	0.23
阴干	0.65	0.58	0.55	0.31	0.16

2.4 不同产地、采收时期和栽培方式红车轴草中异黄酮的比较:在现场鲜采样品后,切段,立即于烘箱中 90~105 °C 烘烤 1 h,得药材样品,制备供试品溶液,测定,结果不同采收时期、种植产地和栽培方式对红车轴草中异黄酮总量均有影响,见表 2。可以看出各地药材中异黄酮的量在个生长时期变化明显,花期后生长过程中总量降低趋势明显,其中青苗期的量最高,结籽期的量最低。不同种植基地和栽培方式对红车轴草中异黄酮总量也有影响,其中湖北恩施野生采区药材的量最高,由于气候原因,甘肃岷县种植区的红车轴草中异黄酮总量比湖南浏阳、湖北建始种植区的量稍高。

2.5 最佳采收期的确定:结合红车轴草亩产量和单位质量中异黄酮总量计算其各生长时期异黄酮的质量分数,根据湖南浏阳种植基地不同采收期的每亩药材中异黄酮的总量变化确定最佳采收期为花蕾期,结果见图 2。

2.6 红车轴草不同部位中异黄酮总量的比较:取湖北建始和湖南浏阳产盛花期红车轴草,鲜采时立即快速烘干,分别测定花、茎、叶中的异黄酮总量,结果

见表 3。可见叶中的异黄酮总量最高,茎中的量次之,花中的量最低。

表 2 不同采收时期、产地和栽培方式红车轴草中异黄酮的比较

Table 2 Comparison of total isoflavones in *T. pratense* from different collection times, habitats, and cultivation

采收时期	异黄酮/%			
	湖南浏阳	湖北建始	湖北恩施	甘肃岷县
青苗期	1.09	1.15	1.36	1.20
花蕾期	0.84	0.78	0.86	0.78
初花期	0.73	0.74	0.68	0.60
盛花期	0.54	0.58	0.56	0.57
结籽期	0.36	0.35	0.24	0.23

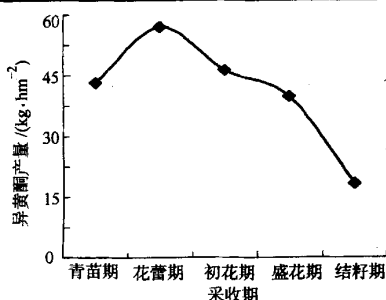


图 2 异黄酮的亩产量与采收期的关系

Fig. 2 Relationship between isoflavone yield per mu and collection time

表 3 红车轴草不同部位中异黄酮总量的比较

Table 3 Comparison of total isoflavones in different part of *T. pratense*

不同部位	异黄酮/%	
	湖北建始	湖南浏阳
全株	0.58	0.54
花	0.21	0.21
茎	0.34	0.33
叶	1.18	1.09

3 讨论

红车轴草中含有芒柄花素、鹰嘴豆芽素 A、大豆黄素、染料木素 4 种主要异黄酮,但大豆黄素和染料木素在原药材中的量较低,芒柄花素和鹰嘴豆芽素 A 的量之和能相对准确地反映红车轴草中总异黄酮量的高低,因此本实验选其为衡量指标。

实验选择了不同体积分数乙醇为提取溶剂,考察了热回流、超声提取,结果 85%乙醇回流提取较

完全,且考虑到鲜药材与干药材含水量的差别,因此实验采用 95%乙醇回流提取鲜药材,85%乙醇提取干药材。

不同种植产地及栽培方式的红车轴草药材中异黄酮的量不同,进一步实验探讨红车轴草药材的适宜生长环境和栽培方式,结果红车轴草在青苗期时总异黄酮的量最高,但青苗期的药材亩产量太少;综合考虑药材亩产量和目标代谢产物在不同生长期的比例和产品工艺对原药材材料量的要求,认为红车轴草最适宜采收期为花蕾期至初花期,并非有效成分质量分数最高的花前期青苗。在药材的各部位中,以叶中的量最高,茎中的量次之,花中的量最低,将原药材用于提取物生产时,可考虑到分类提取,使能源、溶剂、资源获最佳状态利用。

中药标准化提取物是现代中药的一种产品形式,由于我国的提取物产业目前发展非常迅速,因此应对中药提取物的产业化生产整个过程包括中药材的种植、提取工艺进行控制^[4]。实验结果表明,红车轴草新鲜药材中的异黄酮的量最高,深入研究其提取工艺,可以最大限度地保持有效成分,较大幅度提高目标成分的提取率,从而较大幅度降低生产成本,对于实现红车轴草提取物的工业化大生产有极大的现实意义。同时提醒我们探讨中药炮制的新方法。

鲜药材、烘干、晒干、阴干几种不同状态方式导致药材中目标代谢产物的巨大差异(酶及微生物影响)值得进一步研究,提示可为中药炮制行业提供方法乃至理论研究的参考。

致谢:湖南九汇现代中药有限公司研发部、质管部、物资部同仁的帮助。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1992.

[2] Zheng J, Liu Y P, Zong Y L et al. Effect of Trifolium pratense L. extract on apoptosis of BGC-823 Cells [J]. *Life Sci Res* (生命科学研究), 2006, 10(2): 178-181.

[3] Ma Q, Zhou Y X, Lei H M, et al. Determination of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A in *Trifolium pratense* L. by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2005, 27(10): 1193-1195.

[4] Zeng J G. Development with question and suggestions for medicinal plant extract industry in China [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(1): 2-12.

红车轴草的最佳采收期和前处理加工方法研究

作者: [刘晗](#), [罗琪](#), [欧阳勇](#), [杜方麓](#), [曾建国](#), [LIU Han](#), [LUO Qi](#), [OUYANG Yong](#), [DU Fang-lu](#), [ZENG Jian-guo](#)

作者单位: [刘晗, 杜方麓, LIU Han, DU Fang-lu\(湖南省中药提取工程研究中心, 湖南, 长沙, 410331; 湖南中医药大学, 湖南, 长沙, 410007\)](#), [罗琪, 欧阳勇, LUO Qi, OUYANG Yong\(湖南九汇现代中药有限公司, 湖南, 长沙, 410331\)](#), [曾建国, ZENG Jian-guo\(湖南省中药提取工程研究中心, 湖南, 长沙, 410331; 湖南九汇现代中药有限公司, 湖南, 长沙, 410331\)](#)

刊名: [中草药](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年, 卷(期): 2007, 38(12)

被引用次数: 3次

参考文献(4条)

1. [Jiangsu New Medical College](#) [中药大辞典](#) 1992
2. [Zheng J;Liu Y P;Zong Y L](#) [Effect of Trifolium pratense L. extract on apoptosis of BGC-823 Cells](#)[期刊论文]-[生命科学](#) 2006(02)
3. [Ma Q;Zhou Y X;Lei H M](#) [Determination of daidzein, genistein, formononetin and biochanin A in Trifolium pratense L. by HPLC](#)[期刊论文]-[中成药](#) 2005(10)
4. [Zeng J G](#) [Development with question and suggestions for medicinal plant extract industry in China](#) [期刊论文]-[中草药](#) 2006(01)

本文读者也读过(10条)

1. [崔红花](#). [王振月](#). [王宗权](#). [李瑞明](#). [康毅华](#). [CUI Hong-hua](#). [WANG Zhen-yue](#). [WANG Zong-quan](#). [LI Rui-ming](#). [KANG Yi-hua](#) [主成分分析考察毛脉酸模最佳采收期](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#)2005, 30(11)
2. [莫新民](#). [曾英](#). [彭琼辉](#). [金红](#). [朱莹](#) [壮骨止痛胶囊治疗去卵巢雌鼠骨质疏松症疗效的实验研究](#)[期刊论文]-[中国中医基础医学杂志](#)2007, 13(3)
3. [秦民坚](#). [吉文亮](#). [王峥涛](#). [QIN Min-jian](#). [JI Wen-liang](#). [WANG Zheng-tao](#) [HPLC测定射干中6种异黄酮含量的动态变化](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#)2006, 31(20)
4. [王秀敏](#). [邓英杰](#). [钟海军](#). [郝艳丽](#). [陈妍](#). [王栋](#) [河北怀柔栽培黄芩最佳采收期研究](#)[期刊论文]-[中药材](#)2005, 28(1)
5. [李顺祥](#). [张志光](#). [龙勉](#). [蔡光先](#). [LI Shun-xiang](#). [ZHANG Zhi-guang](#). [LONG Mian](#). [CAI Guang-xian](#) [骨碎补超微饮片的HPLC指纹图谱研究](#)[期刊论文]-[中草药](#)2005, 36(11)
6. [刘阳云](#). [刘庚勋](#). [李正贤](#). [孙正良](#). [周光华](#). [江文](#). [LIU Yang-yun](#). [LIU Geng-xun](#). [LI Zheng-xian](#). [SUN Zheng-liang](#). [ZHOU Guang-hua](#). [JIANG Wen](#) [诱导型一氧化氮合酶与β-链接素在鼻咽癌中的表达及其意义](#)[期刊论文]-[中国癌症杂志](#)2009, 19(12)
7. [魏立花](#). [李维明](#). [陶学英](#). [柴宗华](#). [景彦彪](#) [准确测定种子水分之关键](#)[期刊论文]-[种子科技](#)2007, 25(4)
8. [严付华](#). [陈波](#). [曾建国](#). [缪建荣](#). [YAN Fu-hua](#). [CHEN Bo](#). [ZENG Jian-guo](#). [MIAO Jian-rong](#) [高效液相色谱法荧光检测红车轴草提取物中的苯并\(α\)芘](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#)2007, 32(10)
9. [汪勇](#). [肖陈贵](#). [薛枫](#). [黄楚瑜](#). [WANG Yong](#). [XIAO Chen-gui](#). [XUE Feng](#). [HUANG Chu-yu](#) [改善大豆浓缩磷脂色泽的研究](#)[期刊论文]-[食品研究与开发](#)2006, 27(4)
10. [唐灿](#). [李云鹏](#). [张彦燕](#). [罗早文](#). [蒲清荣](#). [赵剑](#) [不同采收期对江西栀子熊果酸含量的影响](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#)2008, 19(8)

引证文献(3条)

1. [许龙](#). [陈应庄](#). [曾建国](#). [罗琪](#) [红车轴草提取物中多环芳烃脱除工艺的研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2009(8)

2. [曾建国](#) [基于鲜药材的中药现代炮制技术](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2009(1)
3. [连连](#), [刘晓艳](#) [车轴草异黄酮提取技术的研究](#)[期刊论文]-[黑龙江中医药](#) 2013(4)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200712020.aspx