

红车轴草不同部位多酚提取工艺优化及抗氧化活性研究

Optimization of extraction process of polyphenols from different parts of *Trifolium pratense* Linn and its antioxidant activity

李欣燃 王绪英 许子怡 潘永淇 翁贵英

LI Xin-ran WANG Xu-ying XU Zi-yi PAN Yong-qi WENG Gui-ying

(六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州 六盘水 553000)

(School of Biological Sciences and Technology, Liupanshui Normal University,
Liupanshui, Guizhou 553000, China)

摘要:目的:优化红车轴草多酚提取工艺,并评价其抗氧化活性。方法:采用超声波辅助提取红车轴草茎、叶和花各部位总多酚,选取多酚含量较高部位作为研究对象,采用响应面法优化红车轴草多酚提取工艺,并通过羟自由基和超氧阴离子自由基的清除效率检测总多酚的抗氧化活性。结果:红车轴草中叶的多酚含量较高,其最佳提取工艺为料液比为 1:79 (g/mL),提取时间 23 min,乙醇体积分数 38%,超声功率 800 W,超声温度 50 ℃,此时多酚得率为 2.31%,与预测值相近,相对标准偏差为 2.16% ($n=5$)。提取物对羟自由基和超氧阴离子自由基的 IC_{50} 值分别为 0.419, 0.428 mg/mL。结论:该提取方法稳定可靠,多酚提取物具有较好的抗氧化活性。

关键词:红车轴草;多酚;提取工艺;抗氧化活性

Abstract: Objective: The present study aimed to optimize the extraction process of polyphenols from *Trifolium pratense* Linn and evaluate the antioxidant activity in vitro. **Methods:** Ultrasonic-assisted extraction of total polyphenols from stems, leaves, and flowers was firstly performed, and the parts with higher polyphenol content were selected for further investigation. Then the response surface methodology was used to optimize the extraction process, and its antioxidant activity was evaluated by

scavenging rate of hydroxyl radical and superoxide anion radical.

Results: The results showed that the content of polyphenols in the leaves is relatively high. The optimal extraction process is as follows: the ratio of solid to liquid is 1:79 (g/mL), the extraction time is 23 min, the volume fraction of ethanol is 38%, the ultrasonic power is 800 W, and the ultrasonic temperature is 50 ℃; the yield of polyphenols is 2.31%, which is close to the predicted return of 2.26%, and the relative standard deviation is 2.16% ($n=5$). The IC_{50} to hydroxyl radical and superoxide anion radical was 0.419 mg/mL and 0.428 mg/mL, respectively. **Conclusion:** The results indicate that this extraction method is reliable and effective in extracting phenolic compounds from the leaves of *Trifolium pratense* Linn, and the extracts have good antioxidant activity.

Keywords: *Trifolium pratense* Linn; polyphenols; extraction process; antioxidant activity

基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合 LH 字[2014]7469 号);贵州省教育厅基金资助项目(编号:黔教合 KY 字[2019]135);六盘水师范学院天然产物综合利用创新团队项目(编号:LPSSYKJTD201904);六盘水师范学院高层次人才科研启动基金项目(编号:LPSSYKYJJ201803)

作者简介:李欣燃,男,六盘水师范学院副教授,博士。

通信作者:王绪英(1971—),女,六盘水师范学院教授,硕士。

E-mail:lpssywyx@163.com

收稿日期:2021-01-14

红车轴草,又名红花车轴草、红三叶,为豆科蝶形花亚科车轴草族车轴草属(*Trifolium*)多年生草本植物^[1-2],含有异黄酮、维生素、糖类、蛋白质、脂类和豆香素等成分^[3-4],具有抑菌^[5]、抗癌^[6]、预防骨质疏松^[7]、改善动脉血管柔性^[8]、调节免疫^[9]、神经保护作用^[10]以及调节雌激素样作用^[11]等多种生物活性。研究表明,红车轴草可通过调节 NF- κ B 和 NRF2 信号通路^[12]、参与调控抗氧化作用基因表达^[13]、清除血液中的过氧化氢酶、提高血液中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性^[14]等多种方式发挥抗氧化活性;还可以激活机体免疫反应,显著提高血清中 IgG 和 IgM 含量^[15],使免疫细胞因子浓度增加^[16];同时促进不饱和脂肪酸的摄入^[17-18]。

在国外,红车轴草是一种非常受欢迎的食品,其浸膏已被用于软饮料、冰制品、糖果、焙烤食品及三叶草型香

精配方等方面,以其为原料的保健食品也已进入国际市场^[19]。而在中国,尽管红车轴草资源丰富,却较少被利用。植物多酚对人体健康具有重要作用^[20-21],而红车轴草中含有丰富的多酚类化合物,是其发挥生物活性的重要物质基础。目前已有关于红车轴草内多酚鉴定的相关研究^[22-23],而有关红车轴草多酚提取及抗氧化性的研究尚未见报道。研究拟采用响应面法对红车轴草多酚提取工艺进行优化,同时通过检测其对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除效率评价其抗氧化活性,为红车轴草的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红车轴草:六盘水本地品种,2020 年 5 月采于六盘水师范学院校内;

酒石酸钾钠、硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、抗坏血酸对照品、没食子酸对照品、邻苯三酚以及水杨酸等均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

超声波清洗机:SB-800DT 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

紫外分光光度计:UV-1800 型,上海菁华科技仪器有限公司;

电子分析天平:ATY124 型,沈阳龙腾电子标量仪器有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:BGZ-30 型,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 材料预处理 取洗净的红车轴草茎、叶、花,烘干粉碎,过 40 目筛,备用。

1.3.2 多酚类化合物测定 采用酒石酸亚铁比色法^[24]。

1.3.3 标准方程绘制 取没食子酸 0.125 g 定容于 250 mL 蒸馏水中,得 0.5 mg/mL 的对照品溶液备用,准确吸取 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 mL 对照品溶液于 25 mL 容量瓶中,按 1.3.2 的方法测定 540 nm 处吸光度,测得标准曲线回归拟合方程为 $y = 14.56x + 0.002$ ($R^2 = 0.998$)。

1.3.4 多酚得率计算 按式(1)计算多酚得率。

$$c = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——多酚得率,%;

m_1 ——提取物总多酚质量,g;

m_2 ——样品干粉质量,g。

1.3.5 红车轴草各部位多酚含量比较 将红车轴草各部位(茎、叶、花)分别按如下条件进行多酚提取:料液比 1:80 (g/mL),提取时间 20 min,乙醇体积分数 40%,超声

功率 800 W,提取温度 50 ℃,进行 3 次重复试验,选取多酚含量最高的部位作为后续试验原料。

1.3.6 提取物单因素试验

(1) 料液比:固定超声时间 20 min,乙醇体积分数 40%,超声功率 800 W,超声温度 50 ℃,考察料液比[1:50,1:60,1:70,1:80,1:90 (g/mL)]对多酚得率的影响。

(2) 提取时间:固定料液比 1:70 (g/mL),乙醇体积分数 40%,超声功率 800 W,超声温度 50 ℃,考察提取时间(10,20,30,40,50 min)对多酚得率的影响。

(3) 乙醇体积分数:固定料液比 1:70 (g/mL),超声时间 20 min,超声功率 800 W,超声温度 50 ℃,考察乙醇体积分数(20%,30%,40%,50%,60%)对多酚得率的影响。

1.3.7 响应面试验 在单因素试验的基础上,以叶部多酚得率为响应值,利用 Box-Behnken 原理进行响应曲面试验设计,优化其多酚类化合物提取工艺。

1.3.8 抗氧化性试验 分别以超氧阴离子自由基和羟自由基的清除率为指标,测定红车轴草中多酚提取物的抗氧化活性。

1.3.9 方法学验证

(1) 重复性试验:按照曲面响应法的最优条件提取红车轴草叶多酚,进行 5 次平行试验,并检测其吸光度。

(2) 稳定性试验:取红车轴草叶同批次的花多酚提取物各 1 mL,分别避光放置 0.0,0.5,1.0,4.0,8.0 h 后,按 1.3.2 方法进行检测。

(3) 加标回收率试验:参照高林晓等^[25]的方法,在最优提取条件下制备红车轴草叶多酚提取物,取 1 mL 待测液至 25 mL 的棕色容量瓶中,再取 1 mL 待测液和 1 mL 没食子酸对照品至 25 mL 棕色容量瓶中,按 1.3.2 的方法测定各样品吸光度并进一步计算其多酚含量,进行 5 次平行试验。

1.3.10 数据处理 通过 Design-Expert 8.0.6 和 Excel 软件进行试验设计、数据处理及绘图,数据均为 3 次平行试验所得。

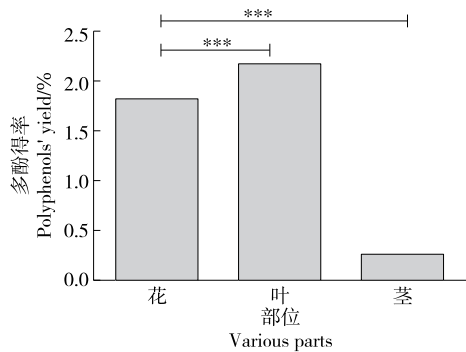
2 结果与分析

2.1 红车轴草各部位多酚含量比较

由图 1 可知,红车轴草花、叶和茎多酚平均得率分别为 1.82%,2.17%,0.25%,其叶部多酚含量显著高于茎($P < 0.01$)和花($P < 0.001$),故选择红车轴草叶部作为后续试验研究对象。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比对红车轴草叶多酚得率的影响 由图 2 可知,当料液比 $< 1:70$ (g/mL) 时,红车轴草叶多酚得率逐渐增加,当料液比 $\geq 1:70$ (g/mL) 时,多酚得率基本不再变化,说明在料液比为 1:70 (g/mL) 时,红车轴草叶中



** 表示差异显著($P<0.01$);*** 表示差异极显著($P<0.001$)

图1 红车轴草各部位多酚含量得率

Figure 1 Polyphenols contents in various in various parts of *Trifolium repens* Linn

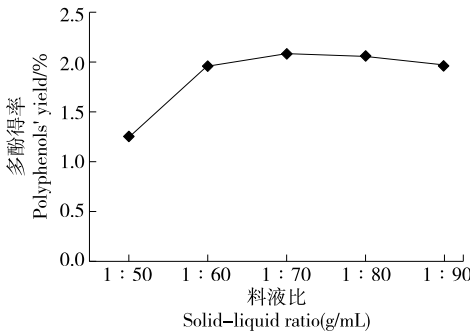


图2 料液比对红车轴草多酚得率的影响

Figure 2 Solid-liquid ratio's influence on the polyphenols' yield of *Trifolium pratense* Linn

多酚成分几乎达到完全溶解。综合考虑,选择最佳料液比为1:70(g/mL)。

2.2.2 提取时间对红车轴草叶多酚得率的影响 由图3可知,当提取时间为20 min时,多酚得率达最大,可能是此时叶部多酚类化合物基本全部析出,且随着提取时间的进一步延长,溶剂内杂质析出增多,并与多酚类化合物发生键合,导致其得率降低。故后续选择最佳提取时间为20 min。

2.2.3 乙醇体积分数对红车轴草叶多酚得率的影响 由图4可知,当乙醇体积分数为40%时,红车轴草叶多酚得率达最大,且随着乙醇体积分数的进一步增加得率反而降低。这可能是40%乙醇体积分数与其叶部多酚类化合物极性最为接近,根据相似相溶原理,故此浓度下,叶部多酚析出量达到最大,后续选择最佳乙醇体积分数为40%。

2.3 响应面分析

2.3.1 回归模型建立与分析 试验因素水平表见表1,试验设计及结果见表2。

对表2的试验数据进行多元回归拟合,得到红车轴草叶多酚得率对料液比、提取时间、乙醇体积分数的二次线性回归方程为:

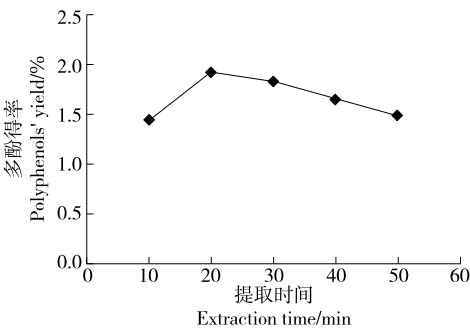


图3 提取时间对红车轴草多酚得率的影响

Figure 3 Extraction time's influence on the polyphenols' yield of *Trifolium pratense* Linn

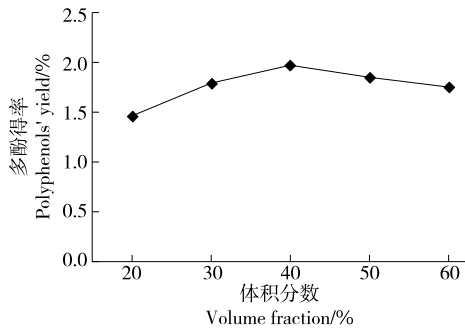


图4 乙醇体积分数对红车轴草多酚得率的影响

Figure 4 Ethanol volume fraction's influence on the polyphenols' yield of *Trifolium pratense* Linn

$$R = -10.233\ 25 + 0.138\ 4A + 0.046\ 65B + 0.340\ 05C + 1.675 \times 10^{-3} AB - 1.725 \times 10^{-3} AC + 6.25 \times 10^{-4} BC - 6.975 \times 10^{-4} A^2 - 4.497\ 5 \times 10^{-3} B^2 - 2.847\ 5 \times 10^{-3} C^2. \quad (2)$$

由表3可知,回归模型的 F 值为88.11, $P<0.000\ 1$,该模型达到极显著水平;失拟项 $P=0.512\ 7$,表明其与真实值之间拟合性较好。一次项 A 、 B 、交互项 AB 、 AC 和二次项 B^2 、 C^2 极显著($P<0.01$),表明其对红车轴草叶多酚得率影响很大,一次项 C 、交互项 BC 和二次项 A^2 差异显著($P<0.05$),表明其对红车轴草叶多酚得率影响较大。由 F 值可知,各因素对多酚得率影响程度依次为 B (提取时间) $>C$ (乙醇体积分数) $>A$ (料液比)。

表1 响应面试验因素及水平

Table 1 Variables and levels in the response surface experiment design

水平	A 料液比(g/mL)	B 提取时间/min	C 乙醇体积分数/%
-1	1:60	10	30
0	1:70	20	40
1	1:80	30	50

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Experimental corresponding results of Box-Behnken

试验号	A	B	C	多酚得率/%
1	0	-1	1	1.41
2	0	-1	-1	1.43
3	0	1	1	1.69
4	0	1	-1	1.50
5	1	-1	0	1.54
6	-1	-1	0	1.72
7	0	1	0	2.04
8	-1	1	0	1.55
9	1	0	-1	2.03
10	1	0	1	1.78
11	-1	0	-1	1.63
12	-1	0	1	2.07
13	0	0	0	2.21
14	0	0	0	2.19
15	0	0	0	2.20
16	0	0	0	2.30
17	0	0	0	2.26

2.3.2 因素交互作用分析 由图 5 可知,响应面曲面坡度变化陡峭,说明料液比和提取时间、料液比和乙醇体积分数的交互作用较强,对红车轴草叶多酚得率影响较大;而提取时间与乙醇体积分数的响应面曲面坡度变化较陡,说明其交互作用一般,对红车轴草叶多酚得率影响一般。

2.3.3 工艺优化与验证 利用 Design-Expert 8.0.6 软件分析得到红车轴草叶多酚的最优提取工艺为料液比 1 : 78.94 (g/mL),提取时间 22.55 min,乙醇体积分数 38.26%,超声功率 800 W,超声温度 50 ℃,此时多酚得率预测值为 2.26%。为了操作方便,将其工艺条件修正为料液比 1 : 79 (g/mL),提取时间 23 min,乙醇体积分数 38%,超声功率 800 W,超声温度 50 ℃,在该条件下进行 5 次平行实验,多酚得率为 2.31%,与预测值的相对误差较小,说明该试验方法准确,工艺可靠。

表 3 红车轴草响应面结果方差分析表[†]

Table 3 Analysis of variance in the response surface regression model of *Trifolium pratense* Linn

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.650	9	0.180	88.11	<0.0001 * *
A	0.022	1	0.022	10.59	0.014 0 *
B	0.065	1	0.065	31.11	0.000 8 * *
C	0.013	1	0.013	6.15	0.042 3 *
AB	0.110	1	0.110	53.88	0.000 2 * *
AC	0.120	1	0.120	57.15	0.000 1 * *
BC	0.016	1	0.016	7.50	0.029 0 *
A ²	0.020	1	0.020	9.83	0.016 5 *
B ²	0.850	1	0.850	408.90	<0.000 1 * *
C ²	0.340	1	0.340	163.91	<0.000 1 * *
残差	0.015	7	2.083×10 ⁻³		
失拟项	5.900×10 ⁻³	3	1.976×10 ⁻³	0.91	0.512 7
纯误差	8.680×10 ⁻³	4	2.170×10 ⁻³		
总和	1.670	16			

[†] * P<0.05,差异显著; * * P<0.01,差异极显著。

2.3.4 抗氧化性检测 由图 6 可知,红车轴草叶多酚提取物对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除能力与维生素 C 的变化趋势基本一致,但整体略低于维生素 C,二者的 IC₅₀ 值分别为 0.419,0.428 mg/mL,抗氧化能力清除率均超过 50%,可认为其叶部多酚具有较好的抗氧化性。刘宝剑^[26]研究发现,红车轴草黄酮提取物对羟自由基和超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 值分别为 44.06,54.57 mg/mL,说明红车轴草中多酚的抗氧化活性显著高于黄酮。王晓燕^[27]发现,红车轴草异黄酮对羟自由基和超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 值分别为 0.346,0.282 mg/mL,其抗氧化活性高于试验中的多酚提取物,可能是因为多酚提取物中含有脂溶性成分,而该成分的抗氧化活性较低^[28],使提取物整体的抗氧化活性降低。

2.4 方法学验证

2.4.1 重复性试验 经计算,按响应面法的最优条件提取红车轴草叶多酚,其相对标准偏差(RSD)较小,为

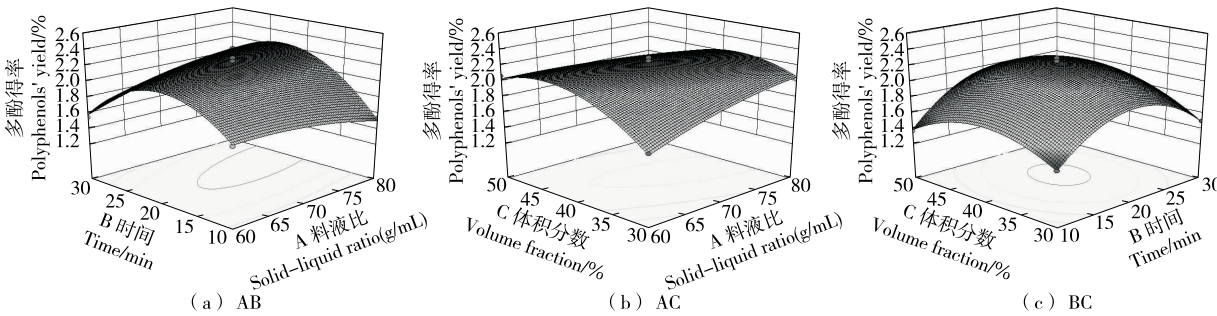


图 5 各因素交互作用对多酚得率的影响

Figure 5 Interaction effects of reaction conditions on the yield of polyphenols

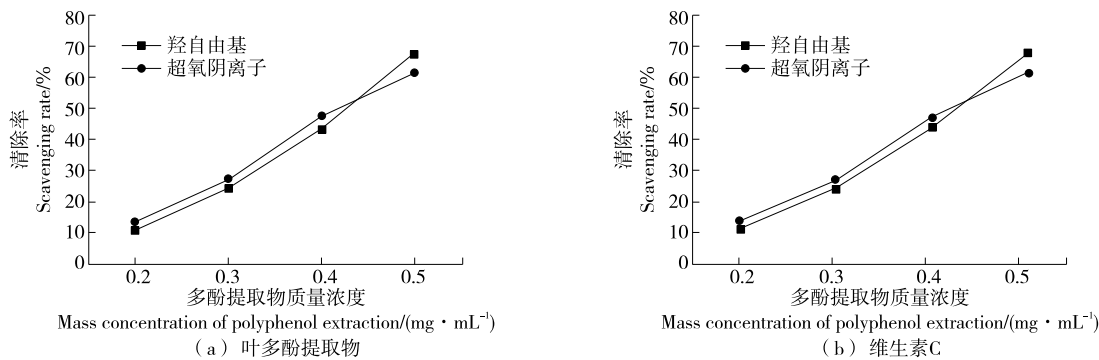


图 6 红车轴草叶多酚提取物和维生素 C 的抗氧化能力比较

Figure 6 Comparison of antioxidant capacity between polyphenol extraction and vitamin C

1.73%,说明该试验重复性较为可靠。

2.4.2 稳定性试验 按 1.3.2 方法检测发现,红车轴草叶多酚提取物的吸光度基本无明显变化,其 RSD 为 0.71%,说明红车轴草叶的多酚提取物在避光放置 8 h 内是稳定的。

2.4.3 加标回收率试验 由表 4 可知,红车轴草叶总多酚类化合物的平均回收率为 99.44%,RSD 为 1.38%,说明该试验对红车轴草多酚提取物检测方法准确。

表 4 加标回收率试验结果

Table 4 Experiment results of average recovery

本底值/ mg	加标量/ mg	检测量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.369 043		0.876 850	100.56		
0.365 648		0.860 557	98.98		
0.367 006	0.5	0.869 382	100.48	99.44	1.38
0.392 621		0.874 134	98.30		
0.376 511		0.865 988	97.90		

3 结论

采用超声辅助提取的方法对红车轴草茎、叶和花中多酚类化合物进行提取比较,发现叶中多酚含量最高。经响应面法优化得到红车轴草叶多酚提取最佳工艺参数为料液比 1:79 (g/mL),提取时间 23 min,乙醇体积分数 38%,超声功率 800 W,超声温度 50 ℃,此条件下多酚得率为 2.31%。该提取物对羟自由基及超氧阴离子自由基的 IC₅₀值分别为 0.419,0.428 mg/mL,可认为其叶部多酚具有较好的抗氧化性。后续应对多酚提取物进行分离纯化以及鉴定,同时对获取的纯化物进行抗氧化活性测定或者其他生物学功能探究。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 329-339.

Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. The flora of China [M]. Beijing: Science Press, 1998: 329-339.

[2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1 410-1 411.

Nanjing University of Chinese Medicine. Chinese traditional medicine dictionary[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2006: 1 410-1 411.

[3] RAHELE K, HODA A, ROSHANAK S, et al. A review of effective herbal medicines in controlling menopausal symptoms[J]. Electron Physician, 2017, 9(11): 5 826-5 833.

[4] 于海涛, 白少岩, 杨尚军. 红车轴草化学成分研究[J]. 食品与药品, 2016, 18(2): 87-91.

YU Hai-tao, BAI Shao-yan, YANG Shang-jun. Chemical constituents from *Trifolium pratense* L.[J]. Food and Drug, 2016, 18 (2): 87-91.

[5] BRONISLAVA B, AUDRIUS P, JURGITA C, et al. Perennial legumes as a source of ingredients for healthy food: Proximate, mineral and phytoestrogen composition and antibacterial activity[J]. Journal of Food Science and Technology-mysore, 2017, 54(9): 2 661-2 669.

[6] MOHSEN A, MOHAMMAD R K, MOZAFAR K. Phytochemicals and antioxidant activity of alcoholic/hydroalcoholic extract of *Trifolium pratense* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2020, 12 (3): 326-335.

[7] SAIOA G, MAITANE G A, ALFREDO F Q, et al. Scientific evidence supporting the beneficial effects of isoflavones on human health[J]. Nutrients, 2020, 12(12): 3 853.

[8] TOMMASO S, SILVIA G, FUX D, et al. Effects of phytoestrogens derived from red clover on atherogenic adhesion molecules in human endothelial cells[J]. Menopause, 2008, 15(3): 542-550.

[9] 刘宝剑, 郭慧敏, 魏东, 等. 红车轴草总黄酮抗氧化及增强机体免疫力的研究[Z]. 河北省, 河北北方学院, 2010-07-25.

LIU Bao-jian, GUO Hui-min, WEI Dong, et al. Antioxidant and boost immunity of total flavonoids from *Trifolium Pretense* L.[Z]. Hebei province, Hebei North University, 2010-07-25.

[10] AURELIE R J, MITALI A T, SIN Y M, et al. Pikuni-blackfeettraditional medicine: Neuroprotective activities of medicinal plants

- used to treat Parkinson's disease-related symptoms[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 206: 393-407.
- [11] VALENTINA E, FLORENCIA E, GEORGE E B, et al. Estrogenic plants: to prevent neurodegeneration and memory loss and other symptoms in women after menopause [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 644103.
- [12] SANG G L, CINDI R B, SUNO L, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of anthocyanins of *Trifolium pratense* (Red Clover) in lipopolysaccharide-Stimulated RAW-267. 4 Macrophages[J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 1 089.
- [13] GEETA P, LI L, NORBERT G, et al. Influence of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on gene and protein expression profiles in liver of ovariectomized rats[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(9): 845-855.
- [14] 王凯, 王洋, 孙娟娟, 等. 苜蓿和红车轴草黄酮提取物对绵羊生长性能和血液相关指标的影响[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(4): 704-709.
- WANG Kai, WANG Yang, SUN Juan-juan, et al. Effect of flavonoids of *Medicago sativa* L. and *Trifolium pratense* L. extraction on growth performance, blood biochemical indexes of sheep[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(4): 704-709.
- [15] 姜义宝, 王成章, 崔国文. 红车轴草异黄酮对肉鸡免疫器官、免疫球蛋白及抗氧化性能的影响[J]. *草地学报*, 2011, 19(3): 520-524.
- JIANG Yi-bao, WANG Cheng-zhang, CUI Guo-wen. Effect of red clover isoflavone on immune organs, Igs and anti-oxidation activity of broiler chicks[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2011, 19(3): 520-524.
- [16] 陈洪博, 张雪, 刘龙思, 等. 红车轴草异黄酮免疫佐剂作用的研究[C]//中国畜牧兽医学学会兽医病理学分会会议论文集. 海口: 中国畜牧兽医学学会兽医病理学分会, 2016: 1.
- CHEN Hong-bo, ZHANG Xue, LIU Long-si, et al. Immunoadjuvant function research on the isoflavone from red clover[C]//Assembly Documents of Veterinary Pathology Branch in Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine. Haikou: Veterinary Pathology Branch in Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 2016: 1.
- [17] GADEYNE F, RUYCK D K, RANST V G, et al. Effect of changes in lipid classes during wilting and ensiling of red clover using two silage additives on in vitro ruminal biohydrogenation[J]. *The Journal of Agricultural Science*, 2016(3): 1-14.
- [18] GADEYNE F, RANST V G, VLAEMINCK B, et al. Protection of polyunsaturated oils against ruminal biohydrogenation and oxidation during storage using a polyphenol oxidase containing extract from red clover[J]. *Food Chemistry*, 2015, 171: 241-250.
- [19] 赵卫星, 姜红波, 温普红, 等. 红车轴草的化学成分及药理作用[J]. *化学与生物工程*, 2010, 27(10): 6-9.
- ZHAO Wei-xing, JIANG Hong-bo, WEN Pu-hong, et al. Chemical constituents and pharmacological actions of *Trifolium pratense*[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2010, 27(10): 6-9.
- [20] 田富林, 黄文晶, 王展, 等. 植物多酚提取研究进展[J]. *食品与机械*, 2020, 36(9): 211-216.
- TIAN Fu-lin, HUANG Wen-jing, WANG Zhan. Research progress on the extraction of plant polyphenols[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(9): 211-216.
- [21] CHIARA D L, FRANCESCA C, SIMONE B, et al. Polyphenols and human health: The role of bioavailability[J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 273.
- [22] ELENA R C, CARMEN L C, SANDRU C, et al. Comparative study of the bioactive properties and elemental composition of red clover (*Trifolium pratense*) and alfalfa (*Medicago sativa*) sprouts during germination[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(20): 7 249.
- [23] ELENA R C, CARMEN L C, DANIELA B, et al. Comparison of the polyphenolic profile of *Medicago sativa* L. and *Trifolium pratense* L. sprouts in different germination stages using the UHPLC-Q exactivehybrid quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. *Molecules*, 2020, 25(10): 2 321.
- [24] 谢佳函, 刘回民, 刘美宏, 等. 红豆皮多酚提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(1): 147-157.
- XIE Jia-han, LIU Hui-min, LIU Mei-hong, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity analysis of polyphenols from azuki bean coats (*Vigna angularis*) [J]. *Journal of Chinese Food Science and Technology*, 2020, 20(1): 147-157.
- [25] 高林晓, 郭蒙, 郭茂鸿, 等. 正交试验设计优化刺三加根中总多酚的提取工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(13): 57-62.
- GAO Lin-xiao, GUO Meng, GUO Mao-hong, et al. Study on optimization of extraction technology of total polyphenols in *Acanthopanax trifoliatum* roots by orthogonal experiment design[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(13): 57-62.
- [26] 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: 19-23.
- LIU Bao-jian. Studies on the antioxidant activity and immune function of total flavones from red clover[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2008: 19-23.
- [27] 王晓燕. 红车轴草异黄酮提取、分离纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 西安: 西北大学, 2013: 42-44.
- WANG Xiao-yan. The effect on extraction, isolation and purification and antioxidant activity of the isoflavones in *Trifolium pratense* L.[D]. Xi'an: Northwest University, 2013: 42-44.
- [28] 郑鹏, 俞君如, 白成科. 红车轴草种子脂溶性成分 GC-MS 分析及抗氧化活性研究[J]. *西安文理学院学报(自然科学版)*, 2008(2): 24-28.
- ZHENG Peng, YU Jun-ru, BAI Cheng-ke. Analysis of GC-MS and study of antioxidant activity of fat-soluble components in the seeds of *Trifolium pratense* L.[J]. *Journal of Xi'an University of Arts & Science (Nat Sci Ed)*, 2008(2): 24-28.