

等吸光点紫外分光光度法测定红三叶草中 总异黄酮含量的研究

张晓松, 于丽娜, 张永忠, 许晶*

(东北农业大学理学院应用化学系, 哈尔滨 150030)

摘要: **目的** 应用等吸光点紫外分光光度法测定红三叶草中总异黄酮含量。**方法** 本文以芒柄花黄素(formononetin)和鸡豆黄素(biochanin A)为混合标准品, 应用紫外分光光度法在等吸光点处(253.5nm)测定红三叶草中总异黄酮含量。**结果** 研究表明等吸光点处的总吸光度与总异黄酮含量相关, 而与二者的相对比例无关。测定的线性范围为 2~8 $\mu\text{g/mL}$, 加样回收率为 97.3%, 相对标准偏差为 1.08%。**结论** 与已有的单标准品测试方法相比, 以芒柄花黄素(formononetin)和鸡豆黄素(biochanin A)为混合标准品的实验方法更加稳定、准确, 并且综合等吸光点紫外分光光度法快速、重复性好的优点, 使得此方法适用于红三叶草中异黄酮含量检测, 可为一般的红三叶草异黄酮的提取纯化研究和生产厂家提供参考。

关键词: 芒柄花黄素; 鸡豆黄素; 等吸光点; 紫外分光光度法

Isoabsorptive point determination of content of red clover isoflavones by ultraviolet spectrophotometry

ZHANG Xiao-Song, YU Li-Na, ZHANG Yong-Zhong, XU Jing*

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: Objective Isoabsorptive point ultraviolet spectrophotometry was used to determine the content of isoflavones in red clover. **Methods** The content of isoflavones in red clover was determined by ultraviolet spectrophotometry at isoabsorptive point (235.5 nm) and compared with the formononetin and biochanin A as mixture standard. **Results** The research showed that the absorbance at isoabsorptive point was related with the content of isoflavones but no relation with the respective percentage. The linear range of determination was 2~8 $\mu\text{g/mL}$, the average recovery was 97.3%, and the RSD was 1.08%. **Conclusion** Compared to conventional method using single standard, the detection with the mixture standard of formononetin and biochanin A is more steadily and accurately, with a rapid and good repeatability of isoabsorptive point. This method is suitable for the determination of content of red clover isoflavones, and can provide reference for extraction and purification of red clover isoflavones and manufacture factory.

KEY WORDS: formononetin; biochanin A; isoabsorptive point; ultraviolet spectrophotometry

基金项目: 中国博士后特别资助项目(2014T70306)、黑龙江省博士后基金(LBH-Z11237)、东北农业大学博士启动基金(2012RCB17)

Fund: Supported by China Postdoctoral Special Funding Project(2014T70306), the Postdoctoral Fund Projects of Heilongjiang Province (LBH- Z11237) and Doctor Start Funds of Northeast Agricultural University(2012RCB17)

*通讯作者: 许晶, 副教授, 主要研究方向为功能食品研究与开发。E-mail: xujing@neau.edu.cn

*Corresponding author: XU Jing, Associate Professor, College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China, E-mail: xujing@neau.edu.cn

1 引言

红三叶草异黄酮是在豆科多年生草本植物红三叶草(*Trifolium pratense* L.)中发现的异黄酮类物质的总称, 是国内外继大豆异黄酮之后又一种研究较多的植物雌激素。它的化学结构与内源雌激素相似, 能够与雌激素受体(ER- α 和 ER- β)以低亲和力结合而发挥弱雌激素样效应^[1,2], 是一种治疗具有雌激素依赖性的更年期综合症的良好雌激素替代品而备受人们关注。红三叶草异黄酮可以通过对情绪产生积极的影响改善潮热情绪^[3], 红三叶草异黄酮对多巴胺能神经元 LPS 诱导的损伤具有保护作用^[4], 通过抑制胶质细胞的活化和促炎因子的产生。此外红三叶草异黄酮抗氧化和雌激素作用还可以对人类皮质神经细胞对谷氨酸毒性和氧化应激起到保护作用^[5,6]。Kelly、Empie 和杨薇薇等^[7-11]采用红三叶草提取物为原料, 研制了多种产品, 可以作为功能食品添加剂或制成药片、胶囊等药剂, 用以有效地预防癌症、更年期综合症和高胆固醇症等多种疾病。国内也有应用用红三叶草异黄酮制备大豆异黄酮的国家发明专利^[12]。

红三叶草异黄酮含量的测定方法目前主要有紫外分光光度法、纸色谱法、薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)和放射免疫测定法(RIA)等^[13]。紫外分光光度法具有简便、快捷, 能监测生产过程, 适用于工艺在线检测, 具有省时、省费用等优点, 但干扰多, 测定结果偏差较大; 纸色谱法及薄层色谱法存在分离效果差、定量不准确等缺点; 气相色谱法需把样品衍生后才能测定, 存在操作复杂、条件不易控制、杂质干扰严重等问题; HPLC 法由于具有样品处理简单、分析速度快、分离度好等优点而被广泛采用, 但是运行成本较高。放射免疫测定法具有高灵敏度、精确度优点, 但由于需要的设备和放射性同位素的价值不菲, 使之无法广为应用。

红三叶草异黄酮共有 40 多种, 其中含量最多的是芒柄花黄素(Formononetin)和鸡豆黄素(Biochanin A), 其化学结构如图 1:

Tsao 等^[14]测定叶片中芒柄花黄素和鸡豆黄素的含量分别为 9.65 mg/g 和 10.22 mg/g, 总异黄酮含量为 23.43 mg/g, 其中芒柄花黄素和鸡豆黄素的含量占总异黄酮含量的 84%。我国陈寒青等^[15]的研究也证明芒柄花黄素和鸡豆黄素是红三叶草异黄酮的主要成分。芒柄花黄素和鸡豆黄素在紫外光区都有吸收,

二者的最大吸收波长和摩尔吸光系数不同。应用紫外分光光度法进行定量测定时, 单独选用某一种物质做标准品, 对测定结果的准确性都会有一定的影响。本研究采用紫外分光光度法, 以芒柄花黄素和鸡豆黄素的混和物为标准品, 在等吸光点处(253.5 nm)测定红三叶草中总异黄酮含量。该研究可为红三叶草中总异黄酮测定提供更为简便、准确的方法, 为一般的红三叶草异黄酮的提取纯化研究和生产厂家提供参考。

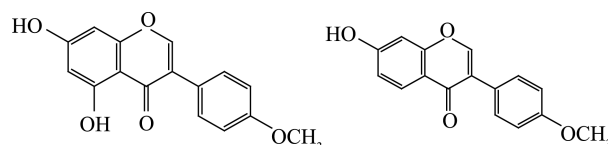


图 1 芒柄花黄素和鸡豆黄素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of formononetin and biochanin A

2 材料与方法

2.1 试验材料

红三叶草: 采于黑龙江省尚志市帽儿山镇南山(地理坐标: N45°20' ~ 25', E127°30' ~ 34')。红三叶草异黄酮制品: 实验室提供, 按文献^[12]制备。

2.2 试剂与仪器

标准样品芒柄花黄素和鸡豆黄素(纯度 99%, Fluka 公司); 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); MeTTLER TOLEDO AG135 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); FW 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); KQ-500DV 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 755 大屏紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); ZFQ85A 型旋转蒸发器(上海医械专机厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品的制备

将红三叶草自然晒干后用高速万能粉碎机粉碎, 过筛孔直径为 0.5 mm 的筛。准确称取红三叶草叶片粉 1.0000 g 于碘量瓶中, 加入 60% 的乙醇溶液, 进行超声波提取。超声温度 70 °C, 超声功率 250 w, 超声时间 40 min, 液料比为 20 mL/g, 提取液离心过滤, 减压蒸干, 用甲醇定容待测。实验室自制的红三叶草异黄酮样品, 直接用甲醇定容待测。

2.3.2 波长的选择

分别取芒柄花黄素和鸡豆黄素标准品储备液稀释至 6 μ g/mL, 以甲醇为参比, 在 200 ~ 400 nm 波长

范围内进行扫描, 得芒柄花黄素的鸡豆黄素的吸收光谱图。按吸收光谱曲线确定测定波长。

2.3.3 芒柄花黄素、鸡豆黄素浓度比对等吸光点吸光度的影响

配制浓度比为 1:1、1:2、1:5、2:1、5:1 的芒柄花黄素和鸡豆黄素标准品混合溶液, 在等吸光点处测定总吸光度, 确定吸收点的总吸光度与二者的含量及二者的相对比例关系。

2.3.4 标准曲线的制作

按芒柄花黄素和鸡豆黄素为 1:1 配制总浓度为 0~8 $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液, 在等吸光点处测定二者含量吸光度, 绘制芒柄花黄素和鸡豆黄素含量的标准曲线。

2.3.5 样品测定

将待测液稀释到在 253.5 nm 下吸光度值在 0.2~0.8 之间, 读取吸光度值后, 根据标准曲线求得待测样品中红三叶草异黄酮的含量。

2.3.6 精密度试验

将一定浓度的红三叶草异黄酮提取物, 重复测定 5 次 ($n=5$), 根据测得的红三叶草异黄酮浓度, 计算相对标准偏差(RSD)。

2.3.7 回收率试验

准确吸取一定量芒柄花黄素和鸡豆黄素标准品混合溶加入样品中, 与样品一同稀释至线性范围内, 进行紫外光谱分析。将所得结果减去未加标准品的样品在紫外光谱分析中测得的值作为标准品的测定值, 测定值与加入量的比值即为回收率。

3 结果与分析

3.1 测定波长的确定

芒柄花黄素和鸡豆黄素标准溶液的紫外吸收光谱图如图 2 所示。

从图 1 可知, 芒柄花黄素(F)的最大吸收波长为 249 nm, 鸡豆黄素(B)的最大吸收波长为 261 nm, 二

者在波长 253.5 nm 处有一个相对较大的等吸光点。吸光度具有加和性, 等吸光点处二者的摩尔吸光系数相等($\epsilon_F = \epsilon_B$), 根据 Lambert-Beer 定律:

$$A_{\text{总}} = A_F + A_B = \epsilon_F \cdot c_F \cdot l + \epsilon_B \cdot c_B \cdot l = \epsilon \cdot (c_F + c_B) \cdot l$$

即总吸光度与总浓度成正比, 所以选择 253.5 nm 为测定波长。

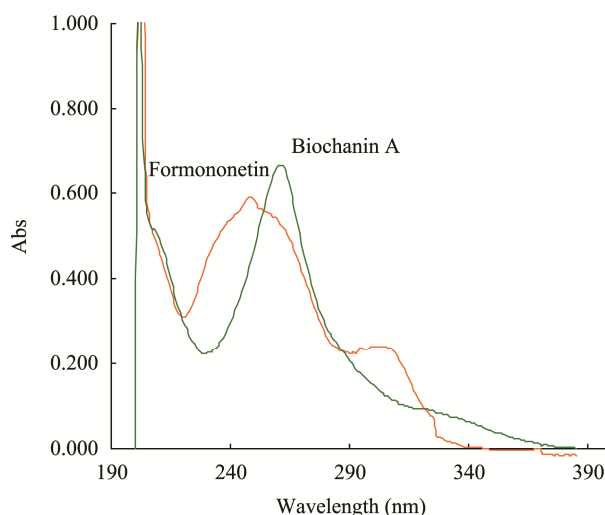


图 2 芒柄花黄素和鸡豆黄素的紫外吸收光谱图

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum of formononetin and biochanin A

3.2 芒柄花黄素和鸡豆黄素浓度比在等吸光点处对吸光度的影响

由表 1 可知, 不同浓度比的芒柄花黄素和鸡豆黄素标准混合溶液, 在等光点(253.5 nm)处测得总吸光度的 RSD 为 0.42%, 结果基本恒定, 表明等吸光点的总吸光度决定于二者的总含量而与二者的相对比例无关。

3.3 标准曲线的制作

按芒柄花黄素和鸡豆黄素为 1:1 配制总浓度为 0~8 $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液, 在等吸光点 253.5 nm 处测

表 1 芒柄花黄素、鸡豆黄素不同浓度比的等吸光点吸光度

Table 1 Absorbance of different concentration ratio of formononetin to biochanin A at isoabsorptive point

总浓度 (芒柄花黄素、鸡豆黄素)	浓度比 (芒柄花黄素、鸡豆黄素)	$A_{(253.5 \text{ nm})}$	$\bar{A}_{(253.5 \text{ nm})}$	RSD
6 $\mu\text{g/mL}$	1 : 1	0.610	0.616	0.42%
	1 : 2	0.618		
	1 : 5	0.604		
	2 : 1	0.627		
	5 : 1	0.619		

定不同浓度标准混合溶液的吸光度 $A_{253.5\text{nm}}$ 。以吸光度为纵坐标, 以芒柄花黄素和鸡豆黄素标准混合溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线如图 3 所示:

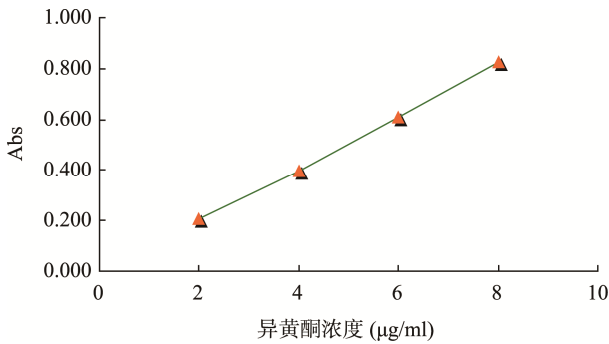


图 3 红三叶草总异黄酮含量标准曲线

Fig. 3 Standard curve for isoflavones content determined by ultraviolet spectrophotometry

试验表明, 二者总含量在 $2 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ 范围内符合比尔定律, 线形回归方程为 $Y = 0.1028X - 0.0032$, 相关系数 $R=0.9998$ 。最低检测浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$ 。

3.4 精密度试验

精密度试验结果如表 2 所示。

3.5 回收率试验

回收率试验结果如表 3 所示。

3.6 样品的测定结果

样品测定结果见表 4。

4 讨论

本研究采用的等吸光点紫外分光光度法可以快速、准确地测定红三叶草中及红三叶草提取物中总异黄酮的含量。分光光度法应用普遍、运行成本低, 特

表 2 紫外分光光度法测定红三叶草异黄酮的精密度

Table 2 The result of precision experiment determined by ultraviolet spectrophotometry

测定次数	吸光度(253.5 nm)	对应浓度(μg/mL)	得率(mg/g)	平均得率(mg/g)	标准差(%)	变异系数(%)
1	0.455	4.46	22.3	22.2	0.24	1.08
2	0.457	4.48	22.4			
3	0.451	4.42	22.1			
4	0.447	4.38	21.9			
5	0.459	4.50	22.5			

表 3 紫外分光光度法测定红三叶草异黄酮的回收率

Table 3 Isoflavones' recovery rate determined by ultraviolet spectrophotometry

试验次数	加入量(μg/mL)	实测量(μg/mL)	回收率(%)	平均回收率(%)
1	2.00	1.96	97.8	97.3
2	2.00	1.97	98.7	
3	2.00	1.94	97.0	
4	2.00	1.91	95.5	

表 4 样品中红三叶草异黄酮总含量的测定结果

Table 4 The determined result of red clover isoflavones in samples

样品	红三叶草总异黄酮含量(mg/g)	样品	红三叶草总异黄酮含量(mg/g)
嫩叶(花蕾期)	3.16	茎 (花蕾期)	0.994
中叶(花初期)	2.34	茎 (盛花期)	0.887
大叶(盛花期)	1.02	花 (盛花期)	0.605
按文献 10 自制的红三叶草异黄酮样品	214.6	整株(盛花期)	0.974

别适用于红三叶草异黄酮提取纯化工艺研究中异黄酮的快速检测。应用分光光度法除了要注意测定波长的选择、吸光度的范围、溶剂的选择外, 还要注意选择适合的标准品。不同的红三叶草异黄酮标准品, 摩尔吸光系数不同, 所测定的结果不同。一般要选择待测试样中目标化合物含量最多的物质为标准品。红三叶草异黄酮中含有的异黄酮主要是芒柄花黄素和鸡豆黄素。吸光度具有加和性。芒柄花黄素(F)的最大吸收波长为 249 nm, 鸡豆黄素(B)的最大吸收波长为 261 nm。如果选用芒柄花黄素为标准品, 选用 249 nm 为测定波长, 则 249 nm 下鸡豆黄素摩尔吸光系数比较小, 将使测定结果产生较大误差; 如果选用鸡豆黄素为标准品, 选用 261 nm 为测定波长, 则 261 nm 下芒柄花黄素摩尔吸光系数比较小, 也将使测定结果产生较大误差。研究表明等吸光点处二者的摩尔吸光系数相等。等吸光点的总吸光度决定于二者的总含量而与二者的相对比例无关。总浓度相同、不同浓度比的芒柄花黄素和鸡豆黄素混合溶液, 在等吸光点(253.5 nm)处测得总吸光度基本恒定, RSD 为 0.42%, 所以采用等吸光点紫外分光光度法测定红三叶草中及红三叶草提取物中总异黄酮的含量对于科研及生产实践都具有较大意义。

参考文献

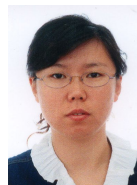
- [1] Ranich T, Bhathena SJ, Velasquez MT. Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease [J]. *J Ren Nutr*, 2001, 11(4): 183-193.
- [2] 陈学颖, 张永忠. 红三叶草异黄酮及其代谢研究进展[J]. *中草药*, 2007, 38(11): 1741-1744.
Chen XY, Zhang YZ. Advances in studies on isoflavones in *Trifolium pratense* and the irmetabolism [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2007, 38(11): 1741-1744.
- [3] Lipovac M, Chedraui P, Gruenhut C *et al*. Improvement of postmenopausal depressive and anxiety symptoms after treatment with isoflavones derived from red clover extracts [J]. *Maturitas*, 2010, (65): 258-261.
- [4] Chen HQ, Wang XJ, Jin ZY, *et al*. Protective effect of isoflavones from *Trifolium pratense* on dopaminergic neurons [J]. *Neurosci Res*, 2008, 62: 123-30.
- [5] Occhiuto F, Zangla G, Samperi S, *et al*. The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15: 676-82.
- [6] Occhiuto F, Palumbo DR, Samperi S, *et al*. The isoflavones mixture from *Trifolium pratense* L. protects HCN 1-A neurons from oxidative stress [J]. *Phytother Res*, 2008, 23: 192-196.
- [7] Kelly GE, Husband AJ. Cardiovascular and bone treatment using isoflavones [P]. US: 20040072765, 2004-04-15.
- [8] Kelly GE. Methods of cholesterol reduction using isoflaovens[P]. US: 20110305782, 2011-12-15.
- [9] Kelly GE. Dietary supplements comprising soy hypocotyls containing ar least one isoflaone [P]. US: 6497906, 2002-12-24.
- [10] Mark E, Eric G. Enriched in at least two of the phytochemicals selected from the group consisting of isoflavones, lignans, saponins, catechins and phenolic acids [P]. US: 6900240, 2005-05-31.
- [11] 杨薇薇, 张永忠. 加压提取红三叶草总异黄酮的研究[J]. *中草药*, 2009, 40(9): 1406-1407.
Yang WW, Zhang YZ. Extraction of pressure from red clover isoflavones [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2009, 40(9): 1406-1407.
- [12] 张永忠, 孙艳梅, 张晓松, 等. 用红三叶草异黄酮制备染料木黄酮和黄豆苷元的方法[P]. 专利号: ZL200810137151.6.
Zhang YZ, Sun YM, Zhang XS. Preparation method isoflavones genistein and daidzein red clover [P]. Patent No: ZL 200810137151.6.
- [13] 于丽娜. 红三叶草异黄酮的提取纯化及其生物活性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006: 15-16.
Yu LN. Studies of red clover isoflavones purification and biological activity [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006: 15-16.
- [14] Tsao R, Papadopoulos Y, Yang R. *et al*. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(16): 5797-5805.
- [15] 陈寒青, 金征, 陶冠军, 等. 红车轴草不同部位中异黄酮含量的测定[J]. *食品科学*, 2004, 25(6): 150-153.
Chen HQ, Jin Z, Tao GJ, *et al*. Determination of isoflavones in different parts of *trifolium pratense* by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2004, 25(6): 150-153.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



张晓松, 实验师, 硕士, 主要研究方向为天然生物活性物质提取及应用。
E-mail: liuxing167@163.com



许晶, 副教授, 主要研究方向为功能食品研究与开发。
E-mail: xujing@neau.edu.cn