Metoda wyodrębniania izoflawonów z koniczyny czerwonej jako standardów analitycznych

PIOTR M. GÓRSKI, STANISŁAW BURDA, MARIAN JURZYSTA
and MICHAŁ PŁOSZYŃSKI

Zakład Biochemii i Jakości Plonów, Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy

(Otrzymano dn. 15.12.1987)

P. M. Górski, S. Burda, M. Jurzysta, M. Płoszyński (*Department of Biochemistry and Crop Quality, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, 24-100 Puławy, Poland*). Acta Agrobotanica 42(1/2): 191-196.

A method of isoflavones isolation from red clover as standards for analyses

Abstract

Five compounds having an isoflavone structure were isolated from the tops of red clover (*Trifolium pratense*). On the basis of spectral (UV, MS) and chromatographic (TLC, HPLC) analyses the compounds were identified as biochanin A, formononetin, pratensein, genistein and daidzein. Biochanin A and formononetin — two main clover estrogens — were obtained in crystalline forms in the amounts of 50 mg and 15 mg, respectively (per 250 g of D. W.). Homogenous fractions of pratensein, genistein, and daidzein were also obtained. The obtained standards were used as markers for peak identification in HPLC. The presented method of isoflavone isolation is simple and quick. It allows for the simple isolation of a mixture of crude isoflavone aglycones which may be used in qualitative and semi-quantitative (TLC) analyses. The individual standards are obtained through column chromatography and may be used for quantitative analyses.

WSTĘP

Wiele gatunków koniczyny, a zwłaszcza koniczyna podziemna (*Trifolium subterraneum* L.) i koniczyna czerwona (*T. pratense* L.) zawierają izoflawony, związki o działaniu estrogenym (Bennetts i in., 1946; Beck 1964; Beck i Knax, 1971; Francis i Millington, 1965; Dedio i Clark, 1968). Związki te występują niekiedy w roślinach w dużych ilościach, powodując bezpłodność i poronienia u zwierząt. Najczęściej spotykanymi izoflawonami w koniczynach są: biochanina A, formononetyna, daidzeina i pratenseina. W literaturze światowej ukazało się wiele publikacji na temat występowania izoflawonów w koniczynie oraz metod badania ich zawartości. Brak danych dotyczących zawartości izoflawonów w uprawianych w kraju odmianach koniczyny czerwonej skłonił nas do podjęcia badań nad tym zagadnieniem. Warunkiem oznaczania jakościowego oraz ilościowego izoflawonów w materiale roślinnym jest posiadanie wzorców analitycznych. Celem niniejszej pracy

było opracowanie prostej metody wyodrębniania izoflawonów i uzyskanie odpowiednich ilości biochaniny A i formononetyny oraz potwierdzenie ich autentyczności na podstawie badań strukturalnych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto koniczynę czerwoną (*T. pratense*) odm. Hruszowska rosnącą w Zakładzie Doświadczalnym IUNG Kępa w Puławach. Rośliny ścinano na początku kwitnienia w pierwszym roku użytkowania. Materiał roślinny wysuszono w 60°C i zmielono.

Uzyskanie surowych aglikonów. 250 g suszu z koniczyny czerwonej zadano 850 ml H₂O (konsystencja gęstej papki) i pozostawiono na 2 godzin. Następnie dodano 0,5 kg bezwodnego siarczanu sodowego, rozsypano na bibule i pozostawiono do wyschnięcia. Suchy materiał ekstrahowano w aparacie Soxhleta przez 3 dni chloroformem. Ekstrakt chloroformowy wysuszono. Uzyskany osad zadano pięciokrotnie 200 ml 50% metanolu, ogrzewano do wrzenia, a następnie szybko schładzano i sączono w warunkach bez próżni na sączku porcelanowym G-2. Ekstrakty połączono, metanol odparowano, a roztwór wodny pozostawiono na noc w lodówce w 4°C. Wytrącony osad odwirowano i wysuszono w temp. 60°C. Uzyskano 1,75 g surowych izoflawonów.

Izolacja pojedynczych izoflawonów. Mieszaninę izoflawonów rozdzielono na kolumnie z żelalem krzemionkowym (Kieselgel G-60, Merck) w układzie chloroform nasycony wodą — octan etylu — metanol — 96% etanol (92:4:2:2). Po przekrystalizowaniu z mieszaniny metanol — woda uzyskano: 50 mg biochaniny A, 15 mg formononetyny, 5 mg pratenseiny oraz daidzeinę i genisteinę w postaci chromatograficznie jednorodnych frakcji.

Identyfikacja wyodrębnionych izoflawonów. Analizę widmową aglikonów wykonano na spektrofotometrze Beckman DB-T w zakresie 200-400 nm z zastosowaniem odczynników diagnostycznych: metoksyłanu sodowego, chloru glinowego i kwasu solnego oraz octanu sodowego i kwasu borowego. Widma masowe wykonano na spektrometrze LKB 9000 przy energii jonizacji 70 eV. Rozdział analityczny izoflawonów prowadzono na chromatografii cieczowym typ 302 (IChF-PAN) na kolumnie o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4 mm. Faza stacjonarna — chemicznie związana faza RP-18 (ODS), średnica ziarna 10 µm, detektor 254 nm. Do chromatografii cienkowarstwowej stosowano płytki firmy Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, o grubości warstwy 0,25 mm. Układy rozwijające: S 1 chloroform — kwas octowy 85:15, S 2 chloroform — metanol 89:11, S 3 benzen — metanol 90:10. Chromatogramy oglądano w świetle UV 254 nm, przed i po ekspozycji w parach amoniaku.

CHARAKTERYSTYKA WYODRĘBNIONYCH ZWIĄZKÓW

Biochanina A (5,7-dihydroksy-4'-metoksyizoflawon) — biała krystaliczna substancja. Rf (TLC): w S1 — 0,66, S2 — 0,78, S3 — 0,52, barwa plamy na chromatogramie w UV — brunatna, po ekspozycji w parach NH_3 — brunatna. $\text{UV}\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$: MeOH — 259, (330); NaOMe — (248), 272, 328; AlCl_3 — 272, (312), 376; AlCl_3/HCl — 272, (312), 376; NaOAc — 272, 324; NaOAc/ H_3BO_3 — 261, 331. MS (int. wzgl.) — m/z 284 (100%) M^+ , 283 (16%) $[\text{M}^+ - \text{H}]^+$, 269 (16%) $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$, 255 (3%) $[\text{M} - \text{CHO}]^+$, 152 (14%) A_1^+ , 142 (16%) M^{++} , 132 (40%) B_1^+ .

Formononetyna (7-hydroksy-4'-metoksyizoflawon) — biała krystaliczna substancja. Rf (TLC): w S1 — 0,49, S2 — 0,70, S3 — 0,33, na chromatogramach w świetle UV niewidoczna, po ekspozycji w parach amoniaku fluoryzuje intensywnym światłem jasnoniebieskim. $\text{UV}\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$: MeOH — (240), 248, (259), 304; NaOMe — 256, (273), 336; AlCl_3 — (239), 248, (261), 301; AlCl_3/HCl — (239), 248, (261), 301; NaOAc — 243, (309), 333; NaOAc/ H_3BO_3 — 261, 303. MS m/z (int. wzgl.) — 268 (100%) M^+ , 267 (23%) $[\text{M} - \text{H}]^+$, 253 (9%) $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$, 134 (4%) M^{++} .

Pratenseina (4',5,7-trihydroksy-3'-metoksyizoflawon) — białe kryształy. Rf (TLC): w S1 — 0,19. Na chromatogramach widoczna w świetle UV jako brunatna plama, zarówno przed jak i po ekspozycji w parach amoniaku. $\text{UV}\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$: MeOH — 261, (293), (333); NaOMe — 269, 323; AlCl_3 — 272, (311), 368; AlCl_3/HCl — 272, (311), 368; NaOAc — 271, 325; NaOAc/ H_3BO_3 — 261, (291), (339). MS m/z (int. wzgl.) — 300 (100%) M^+ , 299 (8%) $[\text{M} - \text{H}]^+$, 285 (31%) $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$, 271 (8%) $[\text{M} - \text{CHO}]^+$.

Genisteina (4',5,7-trihydroksyflawon). Rf (TLC): w S1 — 0,13. Na chromatogramach w świetle UV widoczna jako brunatna plama, przed i po ekspozycji w parach NH_3 . $\text{UV}\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$: MeOH — 264, (328); NaOMe — 275, (331); AlCl_3 — 272, (309), 365; AlCl_3/HCl — 272, (309), (365); NaOAc — 269, 323; NaOAc/ H_3BO_3 — 265, (341).

Daidzeina (4',7-dihydroksyflawon). Rf (TLC): w S1 — 0,13. Na chromatogramach w świetle UV niewidoczna, po ekspozycji w parach amoniaku fluoryzuje intensywnym światłem jasnoniebieskim. $\text{UV}\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$: MeOH — 247, 261, (309); NaOMe — 257, (275), 325; AlCl_3 — 249, 263, (309); AlCl_3/HCl — 249, 263, (309); NaOAc — 256 (270), (312), (328); NaOAc/ H_3BO_3 — 261, (313), MS m/z (int. wzgl.) — 254 (58%) M^+ , 127 (40%) M^{++} .

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Izolacja wzorców. Celem uzyskania wolnych izoflawonów (aglikonów), które następnie mogą być wykorzystane jako standardy analityczne, prowadzono autohydrolizę enzymatyczną. Przy użyciu chromatografii cienkowarst-

wowej stwierdzono, że dwugodzinna hydroliza w warunkach uprzednio opisanych jest wystarczająca i pozostawia w materiale roślinnym jedynie śladowe ilości glikozydów izoflawonów. Wolne izoflawony ekstrahowano następnie z wysuszonego materiału roślinnego chloroformem. Ekstrakt chloroformowy zawierał jednak bardzo dużą ilość zanieczyszczeń (głównie chlorofil i tłuszczowce). Izoflawony oczyszczono przez ługowanie na gorąco 50% metanolem. W ten sposób uzyskano stosunkowo czystą mieszaninę surowych izoflawonów. Analiza chromatograficzna wykazała obecność w mieszaninie dwóch głównych składników, biochaniny A i formononetyny oraz niewielkie ilości pratenseiny, genisteiny i daidzeiny. Dzięki chromatografii kolumnowej uzyskano biochaninę A i formononetynę w postaci krystalicznej w ilościach, odpowiednio, 50 mg i 15 mg (z 250 g s.m.), a pozostałe trzy izoflawony w formie chromatograficznie jednorodnych frakcji.

Przedstawiona metoda izolacji jest stosunkowo szybka i prosta. Pozwala na łatwe uzyskanie mieszaniny aglikonów izoflawonów o stosunkowo dużej czystości. Mieszaninę tę można wykorzystać do badań jakościowych i półilościowych metodą chromatografii cienkowarstwowej. Uzyskane przez rozdział metodą chromatografii kolumnowej wzorce biochaniny A i formononetyny mogą być stosowane do oznaczeń ilościowych tych związków dowolną metodą analityczną.

Identyfikacja wyodrębnionych związków. Podstawową metodą identyfikacji związków flawonoidowych jest analiza spektralna w nadfiolecie (Mabry i in., 1970). Wszystkie flawonoidy charakteryzuje występowanie w widmie UV charakterystycznych pasm absorpcji w zakresie 200-400 nm. Zastosowanie odczynników jonizujących i kompleksujących pozwala na ustalenie rozmieszczenia w cząsteczce podstawników hydroksylowych. W przypadku znanych związków wyniki analizy widmowej w UV stanowią z reguły wystarczającą podstawę do identyfikacji badanego związku flawonoidowego (Harborne i in., 1975; Markham, 1982). Dla związków, które uzyskano w wystarczających ilościach wykonano również widma masowe (MS).

Przeprowadzone badania pozwoliły na ustalenie, że wyodrębnione z koniżyny czerwonej dwa główne składniki flawonoidowe to biochanina A i formononetyna. Pozostałe trzy substancje, otrzymane w niewielkich ilościach, zidentyfikowano jako pratenseinę, genisteinę i daidzeinę. Podstawę identyfikacji stanowiło porównanie kształtu widma UV i położenia pasm absorpcji w UV z danymi z literatury (Wong, 1962; Tamura i in., 1969; Mabry i in., 1970; Markham, 1982) oraz analizy TLC i charakterystyczna fluorescencja obserwowana na chromatogramach w świetle UV. Ilościowe oznaczenie izoflawonów w dużej liczbie prób materiału roślinnego wymaga szybkiej i prostej metody analitycznej. Dlatego opracowano wstępnie metodę analizy ilościowej, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami na wypełnieniu z chemicznie związaną fazą organiczną RP-18. Zadowolający rozdział uzyskano na kolumnie o długości 250 mm przy

Rys. 1. Chromatografia cieczowa (HPLC) ekstraktu z koniczyny czerwonej (po hydrolizie enzymatycznej). Na chromatogramie zaznaczono zidentyfikowane piki izoflawonów: B – biochanina A, F – formononetyna, P – pratenseina, G – genisteina, D – daidzeina

Fig. 1. HPLC of extract from red clover (after enzymatic hydrolysis). On chromatograms indicated indentified peaks of isoflavones: B – biochanin A, F – formononetin, P – pratensein, G – genistein, D – daidzein

szybkości przepływu fazy ruchomej (metanol- H_2O 50:40) 1,2 ml/min (rys. 1). Piki biochaniny A i formononetyny są dobrze izolowane i symetryczne. Wystarczające do celów analitycznych jest rozdzielenie pików pratenseiny, genisteiny i daidzeiny. Identyfikację pików na chromatogramach wykonano przez kochromatografię ekstraktów z koniczyny z otrzymanymi wzorcami izoflawonów. Opracowana metoda umożliwia badanie surowych ekstraktów z koniczyny czerwonej po autohydrolizie enzymatycznej. W dalszych badaniach przewiduje się badania zawartości i dynamiki nagromadzenia oraz wpływu czynników agrotechnicznych na zawartość izoflawonów w koniczynie czerwonej.

STRESZCZENIE

Z suszu koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense*) wyodrębniono pięć związków o budowie izoflawonów, które na podstawie analizy chromatograficznej, widm masowych i analizy widmowej w nadfiolecie zidentyfikowano

jako: biochaninę A, formononetynę, pratenseinę, genisteinę i daidzeinę. Dwa pierwsze izoflawony, stanowiące główne składniki estrogenne koniczyny czerwonej, otrzymano w stanie krystalicznym w ilościach odpowiednio 50 i 15 mg (z 250 g s.m.). Pratenseinę, genisteinę i daidzeinę otrzymano w postaci chromatograficznie jednorodnych frakcji. Otrzymane wzorce izoflawonów wykorzystano do identyfikacji pików na chromatogramach HPLC. Przedstawiona metoda izolacji jest stosunkowo szybka i prosta. Pozwala na łatwe uzyskanie mieszaniny aglikonów izoflawonów o stosunkowo dużej czystości. Mieszaninę tę można wykorzystać do badań jakościowych i półilościowych (TLC). Po rozdziale metodą chromatografii kolumnowej uzyskane wzorce mogą być stosowane do oznaczeń ilościowych.

LITERATURA

- Beck A. B., 1964. The oestrogenic isoflavones of subterranean clover. *Aust. J. Agric. Res.* 15: 223-230.
- Beck A. B., Knax J. R., 1971. The acylated isoflavone glycosidies from subterranean clover and red clover. *Aust. J. Chem.* 24: 1509-18.
- Bennetts M. W., Underwood C. J., Shier F. L., 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 22: 2-8.
- Dedio W., Clark K. W., 1968. Biochanin A and formononetin content in red clover varieties at several maturity stages. *Can. J. Plant Sc.* 48: 175-181.
- Francis C. M., Millington A. J., 1965. Varied variation in the isoflavone content of subterranean clover — its estimation by a microtechnique. *Aust. J. Agric. Res.* 16: 557-561.
- Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H., 1975. *The flavonoids*. Chapman and Hall, London.
- Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B., 1970. *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin.
- Markham K. R., 1982. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London-New York.
- Tamura S., Chang Ch. F., Suzuki A., Kumai S., 1969. Chemical studies of "clover sicnes". *Agr. Biol. Chem.* 33: 391-397.
- Wong E., 1962. Detection and estimation of oestrogenic constituents in red clover. *J. Sci. Food Agric.* 13: 304-307.