

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-036-08

白花三叶草中酚类物质及其抗氧化活性的研究

刘萍,许慧敏,廖鲜艳,王亚茜,黄俊逸*

上海大学生命科学学院食品营养与慢性病干预研究室,上海 200444

摘要:本文测定了白花三叶草不同季节、不同部位的总多酚和总黄酮含量,并比较了它们的抗氧化能力。总多酚和总黄酮含量在不同季节均呈现为叶>叶柄>茎的趋势;而不同部位总黄酮的含量随季节变化不大。DPPH清除能力和FRAP还原力在不同季节也呈现为叶>叶柄>茎;Rancimat结果显示,各提取物对油脂均具有一定的保护作用。皮尔逊相关系数分析表明总多酚和总黄酮含量与抗氧化活性之间的相关性,肉桂酸、没食子酸和咖啡酸与金雀异黄酮之间的相关性均较好。该研究为开发白花三叶草作为潜在的膳食补充剂和天然抗氧化剂在食品工业中的广泛应用提供了理论基础。

关键词:白花三叶草;抗氧化活性;总多酚;总黄酮

中图分类号:S541.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.005

Studies on Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activities in *Trifolium Repens*

LIU Ping, XU Hui-min, LIAO Xian-yan, WANG Ya-xi, HUANG Jun-yi*

Laboratory of Food Nutrition and Function, School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China

Abstract: Phenolic compounds content and its antioxidant activities of *Trifolium repens* in different parts and seasons were performed. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) in different parts change in the following order: leaves > stems > shoots in four seasons. However, TFC in different parts change little with the seasons. Notably, the decreased trend of DPPH and FRAP was also in the same order of leaves > stems > shoots in four seasons. The results of Rancimat showed that the extract has a certain protective effect for the oxidation of oil and fat. Moreover, a strong correlation between TPC, TFC and antioxidant activities indicated that phenolic compounds as the main components were responsible for the antioxidant behavior of *Trifolium repens*, and there was a good correlation between cinnamic acid, gallic acid, caffeic acid and genistein. This study implies that *Trifolium repens* may be a potential dietary supplement and a valuable natural source of antioxidants used in food industries.

Key words: *Trifolium repens*; antioxidant activity; total phenolic; total flavonoid

三叶草广泛分布于地球的温带和亚热带地区,为豆科三叶草属多年生草本植物。代表物种之一的白花三叶草(*Trifolium repens* L.),其全草皆可用药,具有祛痰止咳、镇痉止痛等功效^[1],也可以作为肠道中抗蠕虫的药剂^[2]。因三叶草中粗蛋白含量高,且富含黄酮类化合物、钙、钾、镁、磷、维生素、烟酸等多种营养成分以及高富硒能力,成为其在牧草、饲料、医药、保健食品等方面开发的亮点^[3]。目前,关于三叶草中的功能性活性成分及其应用研究也越来越受到人们的关注。

现代研究发现,白花三叶草中含有的异黄酮类

物质,具有抗癌、植物雌激素样作用以及抗氧化和清除自由基的功能^[4];也具有抗菌、消炎功能,例如三叶草叶片释放的挥发性有机物对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌都有较明显的抑菌作用^[5]。白花三叶草的抑菌功能可能与所含有的黄酮类物质有关,也可能与紫苜蓿酚(Dicoumarol)、香豆雌酚(Coumestrol)等活性物质密切相关^[6]。另外,景书灏等^[7]对白花三叶草中的挥发性成分进行了研究,共检出39个成分,占挥发油总量的92.9%,其中含量较高的是棕榈酸(18.9%)。

但是目前对白花三叶草在活性成分和抗氧化能力方面的系统地分析还不多见。因此,本文拟对上海大学校内的白花三叶草在不同季节和不同部位的总多酚和总黄酮含量进行测定,并通过DPPH自

由基、羟基自由基 OH[·]的清除率、以及铁还原力(FRAP)和油脂氧化稳定性(Rancimat)实验来研究其抗氧化能力,最后试图通过白花三叶草醇提物的HPLC分析,建立其活性主成分与抗氧化间的关系,以期为白花三叶草的醇提物作为一种天然抗氧化成分在医药品、化妆品和食品领域的广泛应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白花三叶草,豆科三叶草属,经过上海大学生命科学学院植物生理学博士王伟鉴定与确认。猪油,购于当地菜市场,经实验室加热熬制而得。

三氯化铝、BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)、DPPH 试剂、福林酚试剂、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、硫酸亚铁、水杨酸、过氧化氢等试剂,均为分析纯级;芦丁、乙腈、咖啡酸、香豆酸、阿魏酸、二甲氧基肉桂酸、肉桂酸、木犀草素、槲皮素、芹菜素、山奈酚、白杨素、葛根素、大豆苷、大豆苷元、金雀异黄酮、芒柄花黄素、鹰嘴豆芽素 A 等,均为色谱纯级。以上试剂,均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

SB-2000 型电热恒温水浴锅 上海爱朗仪器有限公司;N-1001 型旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司;SHZ-D(III)型循环水式真空泵,上海予华仪器有限公司;3K15 型台式离心机,德国 Sigma 公司;Agilent 1100 型蒸发光散射液相色谱仪,美国 Agilent 公司;Q-100A3 型高效多功能粉碎机,上海冰都电器有限公司;743Rancimat 油脂氧化稳定性分析仪,瑞士 Metrohm 公司;DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海慧泰仪器制造有限公司;CU-420 型离心机,上海安亭科学仪器厂;UV-1600PC 型紫外-可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品的收集和醇提物的制备

白花三叶草采自上海大学宝山校区,采集时间为 2014 年冬、春、夏、秋四季(分别是 1、4、7 和 10 月份),将其分为叶(Leaves)、叶柄(Stems)、地上茎(Shoots)三个部分,清洗干净后 50 °C 热风烘干,粉碎,过 50 目筛的粉末,冰箱保存备用。

根据陆俊等^[8]的方法进行活性物质的醇提,具体步骤如下:准确称取白花三叶草叶、叶柄、茎各 1 g,加入 50 mL 75% 乙醇(v/v)后,置于 70 °C 水浴

锅中加热提取 1.5 h,在 20 °C 条件下,9 000 rpm 离心 20 min,取上清液用布氏漏斗过滤,沉淀重新提取一次,合并滤液后于 40 °C 真空旋蒸,用甲醇复溶后,定容至 10 mL,避光保存。

1.3.2 总多酚含量测定

总多酚(TPC)的测定参照 Singleton 等^[9]的方法并加以改进。具体步骤如下:取适当稀释过的样品提取液 0.1 mL 加入到 10 mL 容量瓶中,再分别依次加入福林试剂 1.5 mL 和 10% 的 Na₂CO₃ 溶液 2 mL,然后用蒸馏水定容至 10 mL,充分混匀后于暗处放置反应 1 h,最后测定其在 765 nm 处吸光度值。以没食子酸为标准品,制作标准曲线,计算总多酚的含量,结果用 mg/g 来表示。

1.3.3 总黄酮含量测定

总黄酮(TFC)的测定参照 Park 等^[10]的方法并加以改进。具体步骤如下:取适当稀释过的样品提取液 0.1 mL 加入到 10 mL 容量瓶中,再加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀后静置反应 6 min,加入 10% 三氯化铝 0.3 mL,摇匀后静置 6 min,加入 4% 氢氧化钠 4 mL,最后纯水定容到 10 mL,静置反应 10 min 后,在 510 nm 处测其吸光度。以芦丁为标准品,制作标准曲线,计算总黄酮的含量,结果用 mg/g 来表示。

1.3.4 醇提物的 HPLC 分析

参照 Renda 等^[11]的方法并加以改进。具体如下:将样品用 0.22 μm 滤膜过滤,进样量为 10 μL。标准品配成 1 mg/mL 的甲醇溶液,进样量为 10 μL。流动相 A 为水,B 为乙腈,流速为 1 mL/min,洗脱梯度如表 1 所示,柱温 30 °C,紫外检测器波长为 280 nm。

表 1 HPLC 洗脱梯度

Table 1 The elution gradient of HPLC

保留时间 Retention time (min)	A (%)	B (%)
0	92	8
1	92	8
30	60	40
31	60	40
45	0	100
50	0	100
60	92	8

1.3.5 清除 DPPH 自由基能力的测定

参考 Sreeramulu 等^[12]的方法并加以改进,具体如下:用无水乙醇将 DPPH 配成 0.1×10^{-3} mol/L 溶液,各样品也用无水乙醇稀释成不同的浓度梯度。以无水乙醇为参比,分别测定 2 mL DPPH 溶液加 0.5 mL 不同浓度样品溶液反应后在 517 nm 处的吸光度,每个样品做三个平行实验,以 0.02% BHT 为阳性对照。清除率的计算,按照公式(1)进行。

$$\text{清除率}(\%) = 1 - 100\% \frac{(A_i - A_j)}{A_o} / A_o \quad (1)$$

A_i :2 mL DPPH 溶液 + 0.5 mL 样品溶液的吸光度; A_j :2 mL 无水乙醇 + 0.5 mL 样品溶液的吸光度; A_o :2 mL DPPH·溶液 + 0.5 mL 无水乙醇的吸光度

根据所得数据,利用统计软件 SPSS 22.0 计算醇提物对 DPPH 的半数清除率(IC_{50})。

1.3.6 铁还原力的测定(FRAP)

参照 Benzie 等^[13]的方法并加以改进,具体如下:在离心管中加入不同体积 (X mL) 样品待测液和 $(2.5-X)$ mL 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH6.6),再加入 2.5 mL 的 1% (w/v) 的铁氰化钾,混匀,50 °C 下保温 20 min,然后在混合液中加入 2.5 mL 的 10% (w/v) 的三氯乙酸溶液,混匀后以 4 000 rpm 离心 10 min,取 2.5 mL 上清液,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% (w/v) 的三氯化铁,充分反应后,测定其在 700 nm 处的吸光度。每个样品做三个平行实验,以 0.02% BHT 为阳性对照。

1.3.7 清除 OH 自由基能力的测定

参照 Cos 等^[14]的方法并加以改进,具体如下:在离心管中加入 1 mL 硫酸亚铁(9 mmol/L)和 1 mL 水杨酸-乙醇(9 mmol/L),再加入 0.5 mL 适当稀释的样品待测液,最后加入 1 mL 过氧化氢(8.8 mmol/L),混匀,37 °C 下保温 30 min,以 4 000 rpm 离心 5 min,取上清液,测定其在 510 nm 处的吸光度。以丙酮为空白对照,以 0.02% BHT 为阳性对照。每个样品做三个平行实验。清除率的计算,按照公式(2)进行。

$$\text{清除率}(\%) = 1 - 100\% \frac{(A_o - A_i)}{A_o} / A_o \quad (2)$$

A_o :为空白对照丙酮的吸光度; A_i :为样品的吸光度。

1.3.8 油脂抗氧化能力的测定

根据 Focke 等^[15]的方法,确定 Rancimat 油脂酸败仪工作的条件:反应温度,100 °C;通气量,20 L/h;反应底物(猪油)量: 3 ± 0.02 g。抗氧化剂抗氧化活性的强弱,主要是以加入抗氧化剂前后,底物氧化

诱导期(Induction period, IP)长短的变化来表示,通常采用抗氧化保护系数(Protection Factor, PF)来表示抗氧化剂的抗氧化性能。

$$PF = IP_{\text{antioxidant}} / IP_{\text{control}}$$

其中: PF :抗氧化保护系数; $IP_{\text{antioxidant}}$:添加抗氧化剂后油脂的氧化诱导期; IP_{control} :未添加抗氧化剂时油脂的氧化诱导期。

1.3.9 数据统计分析

所有试验均重复测定 3 次,数据表示为平均值($n=3$) ± 标准偏差(SD),并通过单因素方差分析(one-way ANOVA)对所有数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 认为具有显著性差异,所有数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析并作图。

2 结果与分析

2.1 白花三叶草醇提物中总多酚含量的分析

由图 1 可以看出,总多酚的含量随着植物部位和季节的变化而不同,在四个季节中,总多酚在叶中的含量显著高于叶柄和茎,呈现叶(Leaves) < 叶柄(Stems) < 茎(Shoots)。在叶中总多酚含量随季节的变化规律为秋季(Autumn) < 冬季(Winter) < 夏季(Summer) < 春季(Spring),其变化范围从 9.97 到 19.47 mg/g,在秋季的叶中最高,达到 19.47 mg/g。秋季是春季的 1.95 倍。叶柄和茎中总多酚含量变化不显著,其平均值分别为 5.22 mg/g 和 2.60 mg/g。

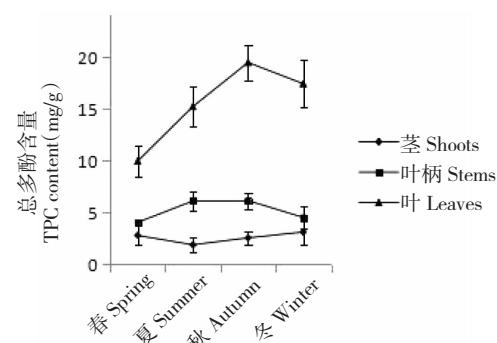


图 1 白花三叶草醇提物中总多酚的含量分析

Fig. 1 TPC content of ethanol extract in *T. repens*

2.2 白花三叶草醇提物中总黄酮含量的分析

由图 2 可以看出,总黄酮的含量随着植物部位的不同而有显著的差异,无论在哪一个季节,总黄酮在叶中的含量显著高于叶柄和茎,呈现叶 < 叶柄 < 茎的趋势。这一结果与沈玥等^[16]的相似,其研究发现红三叶草中不同部位的异黄酮含量也在叶中最

高,明显高于茎和花。

从图2还可看出,同一部位的总黄酮含量在不同季节虽有波动,但变化不大。总黄酮的含量在叶、叶柄和茎中的平均含量分别是31.19、8.17和4.62 mg/g。冬季的叶中最高,达到32.64 mg/g,远高于王芳等^[6]提取的黄酮含量为13.89 mg/g。其差异的原因可能是由测定方法或样品生长的环境不同造成的,但具体的原因还需要进一步研究。

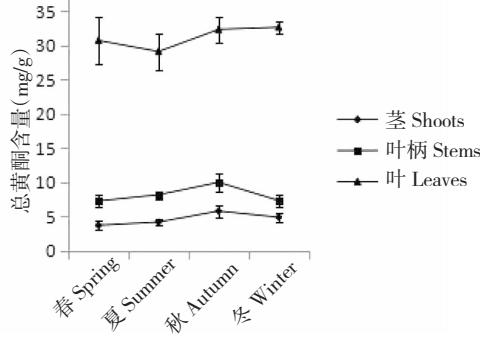


图2 白花三叶草醇提物中总黄酮的含量分析

Fig. 2 TFC content of ethanol extract in *T. repens*

2.3 抗氧化性能测定

白花三叶草提取物的抗氧化性通过体外实验来进行评价,结果见图3。所有的白花三叶草提取物都能还原紫色的DPPH自由基转变成黄色物质,表现出一定的抗氧化性(图3A),其IC₅₀值越低,表明抗氧化性越强。白花三叶草不同部位的DPPH自由基清除活性存在明显差异,表现出叶>叶柄>茎的趋势,该趋势不随季节的变化而变化(图3A)。其中,白花三叶草的叶提取物的清除DPPH自由基的活性最高,为0.46 mg/mL,略低于Liu等^[17]的0.28 mg/mL的结果。该醇提物的清除能力达到0.02% BHT(IC₅₀ 0.04 mg/mL)的十分之一,由于是粗提物,其抗氧化能力还有上升的空间。

总还原力的评价是通过对吸光度进行线性回归分析,得出样品的IC₅₀值,该IC₅₀值即是指吸光度为0.5时所需的抗氧化剂的有效浓度。从图3B可以看出,叶提取物的还原力最强,平均IC₅₀值达到0.47 mg/mL。其中,冬季白花三叶草的叶表现出最高铁还原力,IC₅₀值可达到0.43 mg/mL。但与0.02% BHT(IC₅₀ 0.01 mg/mL)相比,还有明显差距。由此可见,白花三叶草不同部位醇提物铁还原力的趋势仍然是叶>叶柄>茎,这与清除DPPH自由基活性的趋势基本一致。

过量的OH·不仅会造成细胞膜的损伤,而且几乎会损伤每一个生物系统中的大分子物质,具有致癌、致突变和细胞毒性等作用。由图3C可见,叶和叶柄提取物对OH·表现出较强的清除活性,平均IC₅₀值分别是4.96 mg/mL和4.82 mg/mL。冬季的叶柄提取物对OH·的清除活性最强(IC₅₀为3.12 mg/mL)。

Rancimat法是以油脂(猪油)为底物,通过提高温度和增加氧的浓度来加速油脂氧化的方法来测定物质的抗氧化作用。该方法被广泛用于测定天然油脂的氧化稳定性,也为抗氧化剂的筛选提供了一种便捷的途径,另外也是食品体系中检测抗氧化剂活性的一种常用方法。此方法具有快速、简便、结果自动给出等优点。

一般来说,PF值越大,说明该样品抗氧化活性越强。PF<1,该物质具有催化氧化活性;PF=1,该物质既无抗氧化活性也无催化氧化活性;2≥PF>1,该物质具有抗氧化活性;2<PF≤3,该物质具有明显抗氧化活性;PF>3,该物质具有较强抗氧化活性。

由图3D可以看出,与阳性对照(0.02% BHT, PF=7.21)相比,无论是季节还是部位,白花三叶草提取物的PF值均在1和2之间,表明其醇提物均具有一定的油脂抗氧化性,且这些抗氧化的活性成分不随部位和季节的变化而有显著性的变化。春季的叶提取物有最高的PF值,达到1.40。

综上所述,白花三叶草不同部位醇提物均具有一定的抗氧化能力,且在一定范围内随季节的变化而变化,而且对不同自由基的清除率存在一定的差异,这些结果表明还需进一步了解白花三叶草醇提物中的活性成分的组成及其与抗氧化能力之间的关系。

2.4 总多酚、总黄酮与抗氧化活性间的相关关系

有研究表明,植物酚类含量及种类与抗氧化活性强弱有关^[18]。例如,多酚抗油脂氧化性实验的结果发现:表棓儿茶素棓酸酯>棓酸>表棓儿茶素>咖啡酸>表儿茶素>阿魏酸>鞣花酸^[19]。而在黄酮类化合物抗氧化活性强弱的研究发现:黄酮结构中具有B-4'-OH时,其抗氧化活性强于B环其他羟基基团,而C-3-OH基则无抗氧化性表现,同时C-2,3双键和A环OH基对黄酮的抗氧化活性也有较强的影响^[20]。可见多酚和黄酮的抗氧化活性与其结构有着非常密切的关系。皮尔逊相关系数能反映两个不同的指标间的相关性,R值越大,相关系数越大。

从表2可以看出,DPPH·和铁还原力有很好的

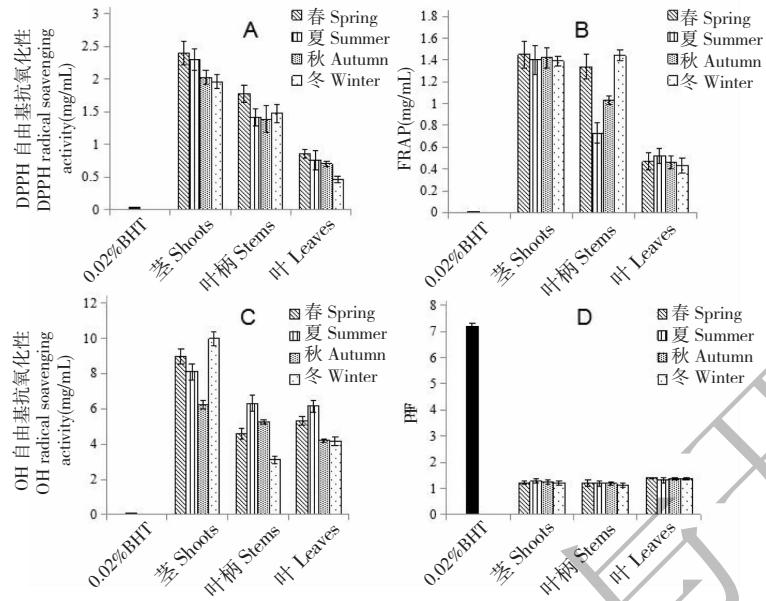


图3 白花三叶草不同季节和部位的提取物抗氧化性 (IC₅₀值)

Fig. 3 Antioxidant assay of *T. repens* extract for different parts and seasons

注: A. DPPH·自由基清除能力; B. 铁还原力; C. OH·自由基清除能力; D. 油脂抗氧化能力。

Note: A. the scavenging ability of DPPH· free radicals; B. iron reducing power;

C. the scavenging ability OH· radical; D. the antioxidant capacity in oils.

正相关性,相关性达到0.918。总多酚、总黄酮的含量和DPPH·、铁还原力的IC₅₀值呈现显著的负相关关系,其中总多酚与DPPH·、铁还原力之间的负相关性分别达到0.914、0.894;总黄酮与DPPH·、铁还原力之间的负相关性分别达到0.924、0.922。这表

明总多酚、总黄酮对抗氧化性的贡献很大^[21]。此外,对油脂的保护作用也与总多酚、总黄酮的含量有显著的正相关关系。总多酚、总黄酮与Rancimat相关性分别达到0.724、0.842,这表明总多酚、总黄酮对油脂抗氧化性的贡献也很大。

表2 不同指标间的皮尔逊相关系数

Table 2 Pearson's correlation coefficient between different parameters

	Correlation (R)					
DPPH· (IC ₅₀)	1	0.653 *	0.918 **	-0.609 *	-0.914 **	-0.924 **
OH· (IC ₅₀)		1	0.420	-0.131	-0.498	-0.483
FRAP (IC ₅₀)			1	-0.746 **	-0.894 **	-0.922 **
Rancimat				1	0.724 **	0.842 **

注: 显著性差异分析, * P < 0.05, ** P < 0.01。

Note: Significant difference analysis, * P < 0.05, ** P < 0.01.

2.5 白花三叶草醇提物的 HPLC 分析

为了探讨白花三叶草醇提取物中活性物质的组成对抗氧化能力的贡献,本实验利用HPLC法对其进行定性和定量分析,根据所购的17种标准品的HPLC混标图谱(图4A),确认了白花三叶草的醇提取物中含有的活性成分达到17种以上(见图4B)。图4B为白花三叶草秋季的茎提取物,其他部位和季节样品的图谱与此图谱基本类似。

所确定的17种活性物质的含量结果如表3所示。由表3可以看出,有些季节和部位的活性成分的含量还是有一定的差别。其中,木犀草素是最丰富的黄酮类化合物,在茎中含量最高,达到351.0 μg/g,分别是叶柄(200.8 μg/g)和叶(159.7 μg/g)的1.75和2.20倍。另外,没食子酸、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸、山柰酚、葛根素和大豆苷的含量在叶中最高,分别达到288.4、192.7、100.6、333.5、58.6、175.3、347.7 μg/g。

g)。槲皮素、白杨素、大豆昔元的含量在叶柄中最高，

分别达到 112.9、135.8、183.4 $\mu\text{g/g}$ 。

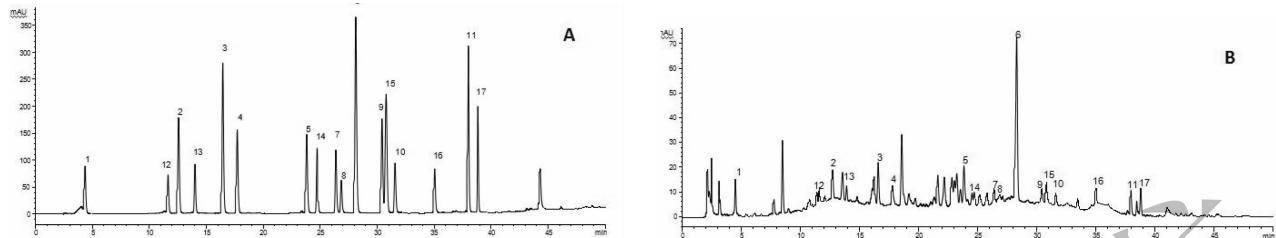


图 4 白花三叶草提取物的 HPLC 分析. A, 标准品的 HPLC 图谱; B, 白花三叶草秋季的茎提取物的 HPLC 图谱.

Fig. 4 Analysis of HPLC for the extract of *T. repens*. A, HPLC chromatogram of standard products; B, HPLC chromatogram of stem extract of *T. repens* in autumn

注:1:没食子酸;2:咖啡酸;3:对香豆酸;4:阿魏酸;5:3,4-二甲氧基肉桂酸;6:肉桂酸;7:木犀草素;8:槲皮素;9:芹菜素;10:山柰酚;11:白杨素;12:葛根素;13:大豆昔;14:大豆昔元;15:金雀异黄酮;16:芒柄花黄素;17:鹰嘴豆芽素 A。

Note: 1: Gallic acid; 2: Caffeic acid; 3: Cumaric acid; 4: Ferulic acid; 5: 3,4-Dimethoxycinnamic acid; 6: Cinnamic acid; 7: Luteolin; 8: Quercetin; 9: Apigenin; 10: Kaempferol; 11: Chrysin; 12: Puerarin; 13: Daidzin; 14: Daidzein; 15: Genistein; 16: Formononetin; 17: Biochanin A.

Kicel 等^[22]的研究也证实,白花三叶草中含有山柰酚、槲皮素和芒柄花黄素,但金雀异黄酮(化合物 15)的含量变化范围从 6.2 到 20.5 $\mu\text{g/g}$,低于红三叶草中金雀异黄酮的含量(88.7 $\mu\text{g/g}$)。孙琳等^[23]从白花三叶草中分离得到 10 个化合物,分别鉴定为伞形花内酯、芒柄花素、水杨酸、双白瑞香素、美迪紫檀素等。

2.6 活性组分间的相关关系分析

为了探讨活性成分间的表达差异以及代谢产物间的相互关系,利用皮尔逊相关系数法分析了 17 种化合物间的关系,结果见表 4。从表 4 可看出,它们的相关性分别如下:

其中,没食子酸(1)与咖啡酸(2)、阿魏酸(4)、金雀异黄酮(15);咖啡酸(2)与阿魏酸(4)、肉桂酸(6)、金雀异黄酮(15);肉桂酸(6)与金雀异黄酮(15);木犀草素(7)与芹菜素(9);槲皮素(8)与山柰酚(10)化合物之间,其相关系数达到 0.7 以上,处于极显著的水平。而没食子酸(1)与肉桂酸(6);对香豆酸(3)与阿魏酸(4)、鹰嘴豆芽素 A(17);阿魏酸(4)与大豆昔(13);3,4-二甲氧基肉桂酸(5)与肉桂酸(6);肉桂酸(6)与芒柄花黄素(16);槲皮素(8)与葛根素(12);白杨素(11)与大豆昔元(14)化合物之间的相关系数均在 0.55~0.70 之间,达到显著水平,其他活性物质之间的相关性均不显著。

表 3 不同季节和部位的白花三叶草提取物 HPLC 分析结果
Table 3 HPLC analysis for different seasons and locations of the *T. repens*

Compounds No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
SH-SP	ND	30.7	24.3	25.3	19.8	11.6	163.8	101.3	37.7	53.2	15.4	90.8	40.3	16.2	ND	20.8	7.3
SH-SU	21.9	36.4	57.1	53.9	21.1	7.9	188.9	43.1	18.1	ND	26.5	87.8	52.1	113.1	ND	26.1	21.6
SH-AU	68.1	41.0	79.3	42.8	45.7	30.1	245.2	94.4	55.2	32.6	41.6	70.6	111.5	114.2	8.8	47.6	19.3
SH-WI	91.8	81.2	34.0	58.2	13.9	21.6	351.0	84.8	65.0	45.5	52.0	125.7	131.5	81.7	17.3	22.3	5.8
ST-SP	87.1	32.7	94.8	155.1	31.7	11.9	157.4	112.9	20.5	35.1	12.7	140.7	37.7	27.6	6.2	17.6	6.5
ST-SU	44.3	60.7	64.5	99.4	53.5	15.9	200.8	88.1	40.2	23.3	15.6	136.8	80.6	123.9	ND	11.7	12.4
ST-AU	12.0	32.5	38.4	175.8	28.2	13.4	160.1	58.8	28.6	32.3	135.8	71.5	128.3	183.4	ND	26.0	9.1
ST-WI	83.5	30.5	34.6	52.4	8.3	5.34	85.9	81.9	14.4	40.5	43.4	48.1	49.6	92.6	ND	ND	8.4
L-SP	288.4	192.7	75.6	331.8	35.3	33.2	159.7	99.5	21.3	25.2	28.1	121.7	128.4	63.3	19.9	40.7	5.5
L-SU	169.1	125.1	100.6	242.1	47.1	45.2	90.2	74.4	24.4	29.1	4.8	46.5	190.5	61.6	20.5	28.8	38.9
L-AU	76.4	48.7	86.5	194.0	46.0	21.5	117.8	111.5	38.2	58.6	26.1	129.8	258.2	77.5	13.6	9.8	29.8
L-WI	162.6	88.6	97.5	333.5	17.5	18.3	152.5	111.8	41.7	55.2	78.3	175.3	347.7	64.0	3.3	28.4	18.1

注:SP:春季;SU:夏季;AU:秋季;WI:冬季;SH:根;ST:茎;L:叶;SH-SP:春季白花三叶草的根;编号 1-17 与图 4 一致。

Note: SP:spring; SU:summer; AU:autumn; WI:winter; SH:shoot; ST:stem; L:leaf; SH-SP:shoots of *T. repens* in spring. No. 1-No. 17 are same as Fig. 4.

由以上相关关系可以看出,多酚类物质(化合物1~6)之间及多酚类与异黄酮类物质(化合物12~17)之间的相关性较好,这可能是因为异黄酮类

物质很多都是经由酚类物质代谢而来^[24],但具体原因还需要进一步的分析与探讨。

表4 白花三叶草中多酚类和黄酮类化合物含量的皮尔逊相关系数分析

Table 4 Pearson's correlation coefficient between polyphenols and flavonoids compounds content in *T. repens*

No.	Correlation (R)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1	1	0.921 **	0.531	0.780 **	0.121	0.644 *	-0.173	0.338	-0.154	0.016	-0.165	0.226	0.418	-0.329	0.709 **	0.381	0.084	
2		1	0.377	0.718 **	0.216	0.724 **	-0.037	0.152	-0.059	-0.111	-0.170	0.173	0.354	-0.225	0.741 **	0.459	0.100	
3			1	0.651 *	0.567	0.552	-0.308	0.339	-0.103	-0.014	-0.285	0.341	0.546	-0.248	0.423	0.302	0.583 *	
4				1	0.209	0.488	-0.390	0.321	-0.226	0.142	0.166	0.408	0.702 *	-0.140	0.443	0.281	0.230	
5					1	0.576 *	-0.115	0.154	0.093	-0.189	-0.341	0.022	0.134	0.144	0.325	0.245	0.496	
6						1	-0.004	0.136	0.210	-0.012	-0.235	-0.134	0.411	-0.135	0.842 **	0.596 *	0.532	
7							1	-0.072	0.777 **	-0.070	0.123	0.269	-0.146	0.161	0.131	0.327	-0.377	
8								1	0.273	0.720 **	-0.268	0.597 *	0.342	-0.642	0.229	-0.048	-0.139	
9									1	0.420	0.144	0.310	0.293	0.059	0.207	0.264	-0.049	
10										1	0.147	0.310	0.490	-0.404	0.103	-0.027	-0.056	
11											1	-0.011	0.289	0.652 *	-0.293	0.125	-0.261	
12												1	0.425	-0.264	0.024	-0.037	-0.237	
13													1	0.002	0.344	0.162	0.499	
14														1	-0.299	0.064	0.019	
15															1	0.380	0.326	
16																1	0.098	
17																	1	

注:显著性差异分析: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 编号1-17与图4一致。

Note: Significant difference analysis, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. No. 1-No. 17 are same as Fig. 4.

3 结论

实验的结果表明:总多酚和总黄酮的含量在四季均呈现为叶>叶柄>茎,在叶中总多酚含量随季节的变化规律为秋季>冬季>夏季>春季,而总黄酮的含量随季节变化不大;DPPH·清除能力和FRAP还原力也呈现出叶>叶柄>茎的趋势,与总多酚和总黄酮含量变化趋势相一致;Rancimat分析的结果显示,各提取物的PF值在1~2之间,说明其对油脂氧化均具有一定的保护作用。皮尔逊相关系数的分析结果表明总多酚和总黄酮与抗氧化活性之间具有较强的线性相关关系,多种活性物质之间也具有密切的相关性。由此可见,白花三叶草是多酚类和黄酮类化合物的天然来源,其醇提物具有较强的抗氧化能力,可作为潜在的膳食补充剂和天然抗氧化剂,将会在食品和医疗行业中有广阔的应用前景。

参考文献

1 Demirkiran O, Sabudak T, Ozturk M, et al. Antioxidant and

tyrosinase inhibitory activities of flavonoids from *Trifolium nigrans* Subsp. *petrisavii* [J]. *J Agr Food Chem*, 2013, 61: 12598-12603.

- 2 Khalid M, Bilal M, Hassani D, et al. Mitigation of salt stress in white clover (*Trifolium repens*) by *Azospirillum brasiliense* and its inoculation effect [J]. *Bot Stud*, 2017, 58(1): 5-10.
- 3 Wang YX(王亚茜), Chen NN(陈楠楠), Lin JJ(林晶晶), et al. The new research of *Trifolium* [J]. *Food R&D*, 2016, 37: 197-201.
- 4 Hu DH(胡冬华), Yan N(闫娜), He ZY(何振洋), et al. Analysis and comparison of isoflavones in trifolium plants [J]. *J Changchun Univ Tradit Chin Med*(长春中医药大学学报), 2014, 30: 822-824.
- 5 Shi J(石婧), Zhao YM(赵咏梅), Zhang Q(张强). Study on the antibacterial effect of the volatile organic compounds extracted from six green plants [J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2011, 39: 13929-13930.
- 6 Wang F(王芳), Gao J(高瑾), Zhang Y(张艳), et al. Flavonoids content and anti-microbial activity of extracts from *Trifolium repens* [J]. *J Cent South Univ T*(中南大学林业技术学报), 2015, 35(3): 43-47.
- 7 Jing SH(景书灏), Wang BC(王伯初), Pan WD(潘卫)

- 东). GC-MS analysis of volatile components on white clover (*Trifolium repens*) produced in Guizhou [J]. *Guizhou Agric Sci(贵州农业科学)*, 2010, 38(4): 82-85.
- 8 Lu J(陆俊), Luo D(罗丹), Zhang JQ(张佳琦), et al. Comparative study on polyphenol, flavonoid and antioxidant activities from different parts of *Akebia trifoliata* [J]. *Food & Mach(食品与机械)*, 2016, 32: 132-135.
- 9 Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. *Methods Enzymol*, 1999, 299: 152-178.
- 10 Park YS, Jung ST, Kang SG, et al. Antioxidants and proteins in ethylene-treated kiwifruits [J]. *Food Chem*, 2008, 107: 640-648.
- 11 Renda G, Yal NFN, Nemuthu E, et al. Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium L.* extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148: 423-432.
- 12 Sreeramulu D, Raghunath M. Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India [J]. *Food Res Int*, 2010, 43: 1017-1020.
- 13 Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay [J]. *Anal Biochem*, 1996, 239(1): 70-76.
- 14 Cos P, Ying L, Calomme M, et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(1): 71-76.
- 15 Focke WW, Westhuizen IVD, Oosthuysen X. Biodiesel oxidative stability from Rancimat data [J]. *Thermochim Acta*, 2016, 633: 116-121.
- 16 Shen Y(沈玥), Zhang YZ(张永忠). Study on antioxidation activity of isoflavones from *Trifolium pratense* L. [J]. *Food Ferment Ind(食品与发酵工业)*, 2009, 11: 122-124.
- 17 Liu S, Li S, Sun Z, et al. Evaluation of a *Trifolium Repens L.* extract as a potential source of antioxidants [J]. *Austin J Pharmacol Ther*, 2014, 2(10): 5-6.
- 18 Mikulic PM, Slatnar A, Stampar F, et al. The Influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year Period [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90: 2366-2378.
- 19 Zhang WH(张文华), Cao MR(曹明容). Theoretical study on the relationship between structure and antioxidative activity of typical phenols in lipid [J]. *Leather Sci Engineering(皮革科学与工程)*, 2010, 20(5): 11-16.
- 20 Huang CB(黄池宝), Luo ZM(罗宗铭). Study on the relation between structure and antioxygenic activity of flavonoid [J]. *J Guangdong Univ Tech(广东工业大学学报)*, 2000, 17(2): 71-75.
- 21 Erkan N, Ayrancı G, Ayrancı E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol [J]. *Food Chem*, 2008, 110(1): 76-82.
- 22 Kicel A, Wolbis M. Phenolic content and DPPH radical scavenging activity of the flowers and leaves of *Trifolium repens* [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(1): 99-102.
- 23 Sun L(孙琳), Li ZL(李占林), Peng JB(彭静波), et al. Isolation and identification of whole plant of chemical constituents from *Trifoliumrepens L.* [J]. *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)*, 2010, 27(1): 40-43.
- 24 Chen XQ(陈宣钦), Zhang L(张乐), Xu HN(徐慧妮), et al. Key enzymes in soybean isoflavones biosynthesis and its metabolic engineering [J]. *China Biotechnol(中国生物工程杂志)*, 2012, 32: 133-138.

(上接第 25 页)

- 12 Xu Y(徐媛), Wang LF(王鲁峰), Xu XY(徐晓云), et al. Response surface method to optimize the extraction process of red grapefruit lycopene [J]. *Food Sci*, 2010, 31: 255-259.
- 13 Wang HB(王海滨). Ultraviolet-visible spectra of carotenoids and applications [J]. *J Wuhan Ins Tech(武汉工业学院学报)*, 2004, (4): 10-13.

- 14 Hu WR(胡位荣), Sun R(孙茹), Wen YG(温焱光), et al. Optimization of lycopene extraction from red grapefruit by response surface methodology [J]. *Guangdong Agric Sci(广东农业科学)*, 2012, 39(17): 86-89.
- 15 Hui BD(惠伯棣). Chemical and biochemistry of carotenoids [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005.