

葛藤与葛根中异黄酮类成分的比较

孟祥颖 鲁歧 赵英 富力

(吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

刘银燕

(白求恩医科大学基础医学院, 长春 130071)

摘要 分析比较了野葛 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 的藤(葛藤)和根(葛根)的主要异黄酮类活性成分。从葛藤中首次分离得到3个化合物,经化学方法和光谱鉴定;证实为大豆甙元(A)、大豆甙(B)和葛根素(C)。采用双波长薄层扫描法测定葛藤与葛根中上述3种异黄酮化合物的含量,葛藤中大豆甙元、大豆甙和葛根素的含量分别为0.195%,3.933%和2.481%;葛根中则分别为0.059%,0.714%和4.315%。研究结果为葛藤新药源的开发利用提供了科学依据。

关键词 野葛;葛藤;葛根;大豆甙元;大豆甙;葛根素

Comparison of isoflavones in stem and root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi Meng Xiang-Ying, Lu Qi, Zhao Ying, Fu Li (College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118), Liu Yin-Yan (Department of Basic Medical Science, Bethune University of Medical Science, Changchun 130071), *J. Plant Resour. & Environ.* 1996, 5(4): 26~28

A comparison study was carried out on the isoflavones in the stem and root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. Three compounds were isolated from the stem and identified as daidzein, daidzin and puerarin by chemical and spectrum methods. By means of thin layer chromatographic double-wave scanning, the contents of the isoflavones in stem were daidzein 0.195%, daidzin 3.933% and puerarin 2.481% and in the root respectively 0.059%, 0.714% and 4.315%. This result provides the scientific basis for the development and utilization of the *Pueraria* stem resource.

Key words *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; stem; root; daidzein; daidzin; puerarin

葛根为豆科植物野葛 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 的干燥根,是常用中药,具有祛风解表等功效。近20年来临床上用葛根治疗心绞痛等疾病具有显著疗效^[1]。为了更好地保护野葛资源,开发利用其地上部分——葛藤新资源,本文分离鉴定了葛藤中的异黄酮类活性成分,并比较测定了葛藤与葛根中的异黄酮含量。

1. 材料与方 法

1.1 材料 野葛的根及藤,采自吉林省辉南县,由李向高教授鉴定,自然干燥。

1.2 仪器 XRC-1型显微熔点测定仪;430型红外光谱仪;300型紫外光谱仪;TMS-D300型

色谱-质谱联用仪。总异黄酮含量测定用 751-紫外分光光度计;3种异黄酮单体化合物含量测定用岛津 CS-930 型双波长薄层扫描仪。

1.3 方法

1.3.1 葛藤中异黄酮单体化合物的分离 干燥的葛藤粉末 1 kg(60 目),用石油醚脱脂两次(每次 3 000 ml),滤后残渣挥去石油醚,用甲醇回流提取 4 次(8 h/次),回收溶剂得干浸膏 150 g,上硅胶柱,用 CHCl_3 -MeOH- H_2O (7:5:1)洗脱,洗脱液用硅胶 G 薄层检查,合并相同流分,再次上柱,得混合物 I 8 g,混合物 II 75 g。I 经制备薄层 [CHCl_3 -MeOH(8.3:1.7)展开],刮取与大豆甙元标准品 Rf 值相同成分,甲醇洗脱,乙醇重结晶得无色针晶 A 24 mg。II 再行硅胶柱层析,先用 CHCl_3 -MeOH(8.3:1.7)洗脱,得白色针晶 B 420 mg,继续用甲醇洗脱得混合物 III,采用与混合物 I 相同的方法进行制备薄层分离,以 CHCl_3 -MeOH- H_2O (7:5:1)展开,刮板,甲醇洗脱,经甲醇和醋酸乙酯混合溶剂重结晶,得白色针晶 C 33 mg。

1.3.2 葛藤与葛根中总异黄酮的含量测定 葛藤和葛根粉末(60 目、50℃干燥)各 25.00 mg,分别置于 50 ml 容量瓶中,加入 30 ml 95%乙醇,置 70℃水浴中加热 6 h,冷却后加 95%乙醇稀释至刻度,摇匀,澄清后吸取上清液 1.0 ml 置于 25 ml 容量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀。于 250 nm 处测定光密度,取 1 ml 95%乙醇置 25 ml 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度作空白对照,测光密度值,并计算总异黄酮含量^[2]。

1.3.3 异黄酮单体化合物的含量测定

1.3.3.1 标准品溶液的制备 大豆甙、葛根素、大豆甙元标准品各 5 mg,甲醇溶解,定容,前二者浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$,后者为 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.3.3.2 样品液制备 葛藤、葛根粉末各 200 mg,用 70%甲醇回流提取 8 h,过滤,浓缩至 2~3 ml,加甲醇定容至 10 ml,备用。

1.3.3.3 测定方法 在硅胶 G 薄层预制板 A 和 B 上分别点大豆甙元、大豆甙、葛根素标准品液各 $1\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$, $2\mu\text{l}$, 两种样品液各 $10\mu\text{l}$ 。A 板用 CHCl_3 -MeOH(8.3:1.7)展开, B 板用 CHCl_3 -MeOH- H_2O (7:5:1)展开(见图 1, A、B),采用双波长薄层扫描法,在 254 nm 紫外光下扫描,选用 250 nm 作 λ_S , 360 nm 作 λ_R , 外标两点法定量。

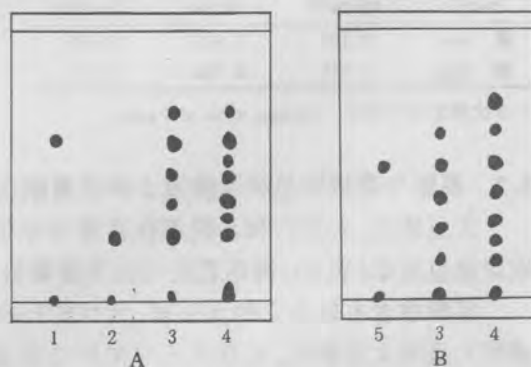


图 1 样品与标准品的层析图

Fig 1 Chromatogram of the sample and the standard sample
1. 大豆甙元 daidzein; 2. 大豆甙 daidzin; 3. 葛根 the root of *Pueraria lobata*; 4. 葛藤 the stem of *Pueraria lobata*; 5. 葛根素 puerarin

2. 结果与讨论

2.1 葛藤中的异黄酮化合物

结晶 A 无色针晶(乙醇), mp. 320℃(分解), FeCl_3 - $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 反应显蓝色, HCl - Mg 粉反应显橙红色。硅胶薄层:用 CHCl_3 -MeOH(8.3:1.7)和 CHCl_3 -EtOH(10:0.5)展开, FeCl_3 - $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 显色, Rf 值与标准品大豆甙元一致。该结晶的红外、紫外、质谱数据与大豆甙元标准

品谱图相同,确定结晶 A 为大豆甙元。

结晶 B 白色针状结晶(甲醇), mp 215~217°C, $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 反应显蓝色, HCl-Mg 粉反应显橙红色, Molish 反应显紫红色环, 经酸水解后 Fehling 反应阳性。硅胶薄层: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}(7:5:1)$ 和 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}(8.3:1.7)$ 展开, R_f 值与标准品大豆甙一致。将结晶 B 酸水解后, 得沉淀和母液, 沉淀用 50% 乙醇重结晶后得无色结晶, 其薄层层析、紫外光谱、红外光谱、质谱均与大豆甙元一致。母液经纸层析鉴定, 与已知葡萄糖对照 R_f 值一致。紫外、红外、 ^1H -核磁共振和其乙酰化物的质谱均与已知大豆甙一致, 确定结晶 B 为大豆甙。

结晶 C 白色针状结晶, mp 187~188°C, 与标准品混合熔点不下降, $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 反应阳性, HCl-Mg 粉反应阳性, 硅胶薄层: 以 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}(7:5:1)$ 与 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}(8.3:1.7)$ 展开, $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 显蓝色, R_f 值与标准品相同。紫外、红外光谱均与已知葛根素谱图一致, 故确定结晶 C 为葛根素。

通过以上分离鉴定, 确定了葛藤中确实含有葛根中的 3 大有效成分——大豆甙、大豆甙元和葛根素。

表 1 葛藤与葛根中 3 种异黄酮化合物的含量*
Tab 1 Contents of 3 kinds of isoflavone compound in the stem and the root of *Pueraria lobata*

样品 Sample	大豆甙元 Daidzein	大豆甙 Daidzin	葛根素 Puerarin
藤 Stem	0.195	3.933	2.481
根 Root	0.059	0.714	4.315

* 3 次测定的平均值 Average value of 3 tests

表 2 葛藤与葛根中总异黄酮含量*
Tab 2 Contents of the total isoflavones in the stem and the root of *Pueraria lobata*

样品 Sample	光密度值 A	含量(%) Content
藤 Stem	0.097	7.50
根 Root	0.101	7.80

* 3 次测定的平均值 Average value of 3 tests

2.2 葛藤与葛根中总异黄酮及 3 种异黄酮含量比较

大豆甙元、大豆甙和葛根素在葛藤中不仅存在, 且含量较高(表 1), 葛根与葛藤中总异黄酮含量也近似(表 2), 说明葛藤可以代替葛根使用, 有利于植物资源的保护和利用。

葛藤中含有大量的大豆甙, 大豆甙对抗急性心肌缺血作用较强, 而且大豆甙水解后, 可得到大量的大豆甙元, 大豆甙元对治疗心绞痛等有一定疗效^[3,4]。因此利用葛藤可为大豆甙元提供丰富的来源, 还可节省化学合成所需的人力和物力, 为原料资源的开发开辟一条捷径, 具有一定的经济效益和推广价值。

参 考 文 献

- 1 方起程, 孙庆民, 林 茂等. 1974: 中华医学杂志 (5): 271~274.
- 2 中国医学科学院药物研究所. 1980: 药学通报 15(7): 40.
- 3 郑俊民, 逢秀娟, 王 星. 1987: 沈阳药学院学报 4(2): 89~92.
- 4 刘仲则. 1987: 中草药 4: 34~42.

(责任编辑: 惠 红)

R-A 型甜菊糖甙的研制

黄应森 郭爱桂

(江苏省植物研究所, 南京 210014)
中国科学院

摘要 以甜菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)的干叶为原料生产的甜菊糖甙是一种食用天然甜味剂。提高甜菊糖甙(Steviosides)中优质甜味成分 R-A(甜菊 A₃甙; Rebaudioside A)的含量比例是生产中急待解决的课题。本文以 R-A 型和 St(甜菊甙 Stevioside)型甜菊叶为原料,采用 A 和 B 两种方法进行甜菊糖甙的提取,通过 B 法获得 R-A 含量比例高的甜菊糖甙即 R-A 型甜菊糖甙,为甜菊糖甙产品优质化提供了新方法、新技术。

关键词 甜菊;甜菊糖甙;R-A 型甜菊糖甙;甜菊加工

Investigation and production on the type R-A steviosides Huang Ying-Sen and Guo Ai-Gui (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014), *J. Plant Resour. & Environ.* 1996, 5(4): 29~32

Steviosides made from air-dried leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni is a edible natural non-toxic and low calorie sweetener. Increasing the percentage of R-A (Rebaudioside A) in steviosides is a pressing problem in production. Two methods (A and B) for the extraction of steviosides from type St (Stevioside) and type R-A plant materials were investigated. The results showed that the good quality steviosides containing high percentage of R-A can be produced by only process B. It will provide a new way and new technological method for improving quality of steviosides production.

Key words *Stevia rebaudiana* Bertoni; steviosides; type R-A (Rebaudioside A) of steviosides; stevia processing

1. 引言

自从南京中山植物园在国内首先研制食用新型天然甜味剂甜菊糖甙以来^[1],全国已有 30 多家甜菊糖甙生产厂,年产量 700~800 t(相当于 150 000~200 000 t 蔗糖的甜度),外销 10 多个国家,年产值 2 亿多元。中国已成为甜菊糖甙的主要生产国和出口国。

甜菊糖甙的甜度和口感取决于它的甜味成分及含量,即取决于甜味成分 R-A(甜菊 A₃甙; Rebaudioside A 或 Stevioside A₃)和 St(甜菊甙; Stevioside)的含量比例。这 2 种甜味成分相比较, R-A 更接近蔗糖,因而口感优于 St。R-A 的甜味强度也大于 St,前者为蔗糖的 450 倍,后者为蔗糖的 300 倍。目前我国甜菊糖甙中的甜味成分主要是 St,占 65%~70%,而优质甜味成分 R-A 只占 30%~35%,还存在口感问题。因此,如何提高 R-A 在甜菊糖甙中的含量比例是生产中迫切需要解决的课题。它关系到甜菊糖甙作为食用甜味剂的应用范围、应用价值及

与其他甜味剂的竞争力。

提高甜菊糖甙产品中 R-A 含量比例不仅与原料有关,而且与加工工艺技术有关。作者在甜菊含糖量的研究中已选育 R-A 型甜菊良种^[2,3],从而可以为甜菊糖甙加工提供 R-A 含量高的原料甜菊叶,制出 R-A 含量比例高的 R-A 型甜菊糖甙。这一结果可为我国甜菊糖甙产品优质化和原料甜菊叶生产良种化提供科学依据。

2. 材料与方 法

2.1 甜菊叶的来源

在初蕾期分别收割实生甜菊和良种无性系 J-2 植株的头刀叶,经干燥,统一取样,粉碎备用。

2.2 甜菊糖甙制品的提取方法

采用下述两种方法提取甜菊糖甙。

方法 A:原料 $\xrightarrow{\text{水浸提}}$ 浸提液 $\xrightarrow{\text{沉淀分离}}$ 分离液 $\xrightarrow{\text{吸附提纯}}$ 初步提纯液 $\xrightarrow{\text{浓缩}}$ 浓缩液 $\xrightarrow{\text{甲醇}}$ 结晶 $\xrightarrow{\text{干燥}}$ 甜菊糖甙制品。

方法 B:原料 $\xrightarrow{\text{水浸提}}$ 浸提液 $\xrightarrow{\text{沉淀分离}}$ 分离液 $\xrightarrow{\text{吸附提纯}}$ 初步提纯液 $\xrightarrow{\text{浓缩}}$ 浓缩液 $\xrightarrow{\text{干燥}}$ 甜菊糖甙制品。

方法 A 和方法 B 的基本区别在于:方法 A 包含了浸提、固液分离、初步纯化、高度纯化和成品加工等 5 个阶段,而方法 B 只包含浸提、固液分离、初步纯化和成品加工等 4 个阶段,而少去了高度纯化这一精制阶段。

2.3 甜味成分的测定

甜菊叶原料和甜菊糖甙制品的甜味成分 R-A 和 St 含量由江苏省植物研究所技术室中国科学院用高效液相色谱法(日本岛津 LC-6A 型色谱仪)测定。R-A 和 St 标准品均为日本和光纯药工业株式会社所制。

3. 结 果

3.1 不同类型甜菊叶中甜味成分 R-A 和 St 含量的差异

实生甜菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)和 J-2 无性系叶片的 R-A 和 St 测定结果如表 1。

表 1 不同类型甜菊叶中 R-A 和 St 含量(%)的比较*

Tab 1 Comparison of R-A and St contents in different type *Stevia rebaudiana* leaves

甜菊叶类型 Type	R-A	St	Total	R-A/Total	St/Total
实生甜菊(St 型)	4.25	7.43	11.68	36.39	63.61
无性系 J-2 (R-A 型)	9.10	4.40	13.50	67.41	32.59

* R-A: Rebaudioside A; St: Stevioside; Total: R-A + St (%)

从表 1 看出:实生甜菊叶中甜味成分主要是 St(占甜菊甙总量的 63.61%),称为 St 型甜菊叶,而良种无性系 J-2 叶中甜味成分主要是 R-A(占 67.41%),称为 R-A 型甜菊叶。显然,为

了提制 R-A 型甜菊糖甙必须选用 R-A 型甜菊叶作为原料。

3.2 不同提取方法对甜菊糖甙制品中甜味成分 R-A 和 St 含量的影响

不同提取方法所得甜菊糖甙制品中甜味成分含量的差异见表 2。

表 2 不同提取方法所得甜菊糖甙制品甜味成分的含量

Tab 2 The content of sweet constituents in steviosides products from different extract methods

提取方法 Extract method	甜菊糖甙成分的含量 Content of steviosides constituent (%) [*]									
	St 型原料 Type St					R-A 型原料 Type R-A				
	Total	R-A	St	R-A/Total	St/Total	Total	R-A	St	R-A/Total	St/Total
A ^{**}	97.25	0	97.25	0	100	98.10	0	98.10	0	100
B	62.82	20.30	42.52	32.31	67.69	68.42	38.43	29.99	56.17	43.83

* R-A: Rebaudioside A; St: Stevioside; Total = R-A + St

** 提取方法 A 的制品中仅为 St, 而 R-A 尚在母液中 Only St in the product from method A, R-A still remains in solution.

从表 2 中看出: 两种类型的甜菊叶通过方法 A 加工获得甜味成分 St 高达 97% ~ 98% 的试制产品; 而采用方法 B 提取加工, 在获得的试制品中, 甜味成分 R-A 和 St 的含量及其所占的比例, 因甜菊叶类型不同而不同; 加工 St 型甜菊叶获得 St 型甜菊糖甙制品, 加工 R-A 型甜菊叶获得 R-A 型甜菊糖甙制品, 前者甜味成分 St 含量占总量的 67.69%, 后者甜味成分 R-A 含量占总量的 56.17%, 两种类型甜菊糖甙制品的高效液相色谱图如图 1。

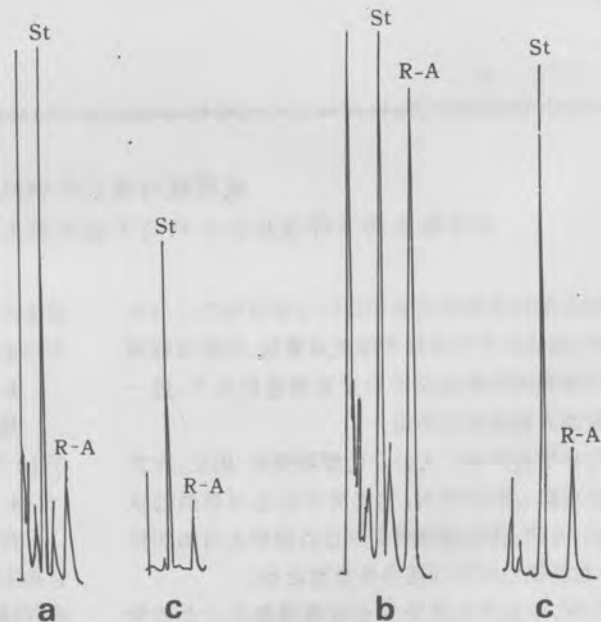


图 1 不同类型的甜菊糖甙高效液相色谱图

Fig 1 HPLC of steviosides in different type *Stevia rebaudiana* leaves

a. St(Stevioside)型; b. R-A(Rebaudioside A)型; c. 标准品 Standard

4. 讨论和小结

(1) 本试验结果表明, 为提高甜菊糖甙产品中的甜味成分 R-A

含量比例, 使甜菊糖甙作为食用甜味剂的质量(口感和甜度)优化, 首先必须提高原料甜菊叶中 R-A 含量。为此, 选育和推广 R-A 型甜菊良种是必要的。

(2) 以 R-A 型甜菊叶为原料, 采用提取方法 B, 获得了高含量 R-A 的甜菊糖甙, 为甜菊糖甙产品优质化提供了新方法和新技术。

(3) 过去由于不重视产品中甜味成分 R-A 含量的比例, 采用提取方法 A 提取甜菊糖甙, 使本来含量不多的 R-A 在结晶母液中损失不计。今后, 由于原料甜菊叶中的主要甜味成分是 R-A, 因此, 可用提取方法 A 来富集甜味成分 R-A 于结晶母液中, 经处理母液而制成 R-A 含量

高的 R-A 型甜菊糖甙产品。

(4) 随着 R-A 型甜菊糖甙的研制投产,今后对原料甜菊叶和产品甜菊糖甙不仅要区分 St 型和 R-A 型,而且应该把原料甜菊叶和产品甜菊糖甙中的 R-A 含量比例高低作为主要的质量指标。

参 考 文 献

- 1 陆荣刚,黄应森,史肖白等. 1981:甜菊精提取工艺和应用研究,见:南京中山植物园研究论文集 1981,江苏科学技术出版社,南京. 139~143.
- 2 黄应森,单文璜,郭爱桂. 1983:甜菊含甙量的研究,见:南京中山植物园研究论文集 1983,江苏科学技术出版社,南京. 52~57.
- 3 黄应森,郭爱桂,钱 愉等. 1995:植物资源与环境 4(3):28~32.
- 4 黄应森,单文璜,郭爱桂. 1985:甜菊叶含甙量的地域性变动规律研究,见:植物引种驯化集刊,第四集,科学出版社,北京. 79~83.

(责任编辑:许定发)

我国植物园系统积极行动

为国际生物多样性保护公约的实施和国民经济的可持续发展作贡献

在全球的可持续发展和国际生物多样性公约的实施中,植物园的作用越来越受到重视,国际植物园保护组织和国际植物园协会正在制定任务书,进一步发挥世界植物园的作用。

植物园有面向广大公众的鲜明特征,因此,在提高大众理解方面的作用,尤其受到社会各界的公认和重视,为此,我国植物园系统也以前所未有的积极态度,在各植物园内开展科普教育活动。

今年,中国环境科学学会植物园保护分会的学术活动包括:

1. 国际植物园科普教育培训班

已在今年3月下旬到4月上旬在南京中山植物园进行,培训班得到中国科学院植物园工作委员会、中国环境科学学会、江苏省科学技术协会和国外学术团体的支持。目的是交流经验,以环境科学为中心,促进植物园科普教育。

2. 我国特有观赏植物对世界园林的贡献

这次学术活动将作为杭州植物园成立40周年

纪念活动的一部分,于10月9日~11日在杭州植物园进行。

3. 水生植物的保护和开发利用

是武汉植物园40周年纪念活动的内容之一,将于10月25日~31日在武汉植物园进行。

4. 棕榈科植物的种质保护和开发利用

将在12月2日~9日在广州华南植物园进行,它是主持单位30周年园庆的一部分,也是我国第一次《棕榈节》。

这些学术活动的特点和目的是围绕国民经济主战场,调动各地植物园的积极性,有层次有针对性地发挥植物园的作用,因而受到了社会各界的广泛欢迎。中国植物学会植物园分会也已在8月18日~20日在陕西榆林召开年度学术讨论会,会议中心是迎接21世纪植物园的物种保护和利用问题。

我国植物园系统正以积极主动的态度迎接和适应全国科学普及活动的新任务和新形势。

(本刊专访组)