

葛根不同生长期多糖含量的动态积累研究

纪宝玉, 裴莉昕, 陈随清*, 董诚明, 冯卫生
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**评价不同生长期及不同年限葛根多糖含量的动态积累。**方法:**以葡萄糖为对照品,采用以苯酚-硫酸法,在 486 nm 处测定不同生长期及不同年限葛根中多糖的含量。**结果:**在 0.020~0.142 mg·L⁻¹葡萄糖质量浓度与吸光度线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率 99.34%,RSD 1.82%。葛根中多糖的含量呈规律性变化,每年以 8、9 月份葛根多糖的含量较高,分别为 10.28% 和 11.35%。多年生葛根中多糖含量明显高于前 3 年,为 14.28%。**结论:**该文结果可为野葛规范化种植及药材采收加工提供科学依据。

[关键词] 葛根; 多糖; 动态积累

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0063-03

[doi] 10.11653/syfy2013160063

Determination of Total Polysaccharides in Different Growth Phase of Puerariae Lobatae Radix

Ji Bao-yu, PEI Li-xin, CHEN Sui-qing*, DONG Cheng-ming, FENG Wei-sheng

(School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the total polysaccharides in different growth phase and different years of Puerariae lobatae Radix. **Method:** Total polysaccharides content was also determined by pheno-sulfuric acid method using dextrose as standard sample. **Result:** Glucose was linear in the range of 0.020-0.142 mg ($r=0.9999$). The average recovery rate was 99.34% (RSD 1.82%). The content of total polysaccharides appeared regular changes and the content of total polysaccharides was highest in August and September of perennial Puerariae Lobatae Radix. **Conclusion:** The result might provide scientific basis for harvesting of Puerariae Lobatae Radix.

[Key words] Puerariae Lobatae Radix; total polysaccharides; accumulative dynamic state

葛根来源于豆科植物野葛的干燥根,习称野葛^[1]。我国最早的医学专著《神农本草经》将葛根列为中品^[2]。葛根是一种极具开发潜力的植物,常用于外感发烧、头痛、口渴等病症^[3]。葛根多糖是其含有的另一种重要的活性成分,具有抗血凝、降血压^[4]、减慢心率、治疗心脑血管疾病^[5-6]、抗癌等多种生理作用。目前《中国药典》对葛根多糖的测定方法还没有确切的规定,文献报道多集中在葛根多糖提取方法的研究、不同产地葛根多糖及不同品种

葛根多糖的研究,对葛根多糖积累动态研究未见报道。本实验采用苯酚-硫酸法对不同生长期葛根多糖含量的动态积累进行了研究,为野葛规范化种植及药材采收加工提供科学依据。

1 材料

梅特勒 AB135-S 型分析天平、岛津 UV-2201 型紫外分光光度计、KQ-500DV 型数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司)、葡萄糖对照品(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号 20060805)、其

[收稿日期] 20121024(003)

[基金项目] 科技部“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A10)

[第一作者] 纪宝玉,硕士,讲师,从事中药规范化种植及质量标准研究, Tel:13607669844, E-mail:jby19820429@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 陈随清,博士,教授,从事中药品种整理及质量标准研究, Tel:0371-65676686, E-mail:suiqingchen@sohu.com

余试剂均为国产分析纯。

葛根样品采自河南西峡,分别为 2007 年 1~12 月各月的多年生葛根和 2008 年 11 月的 1,2,3 年生及多年生葛根。以上样品经河南中医学院陈随清教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 标准溶液的配制 精密称取 105 ℃干燥至恒重的葡萄糖 50.56 mg,置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀备用。

2.2 5% 苯酚溶液的配制 取苯酚 100 g,加铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g,常压蒸馏,收集 82 ℃馏分。精密称取该馏分 10 g 溶于 200 mL 蒸馏水中,摇匀,置棕色瓶内,放冰箱中备用。

2.3 检测波长的选择 精密吸取标准溶液 2.0 mL 置于 10 mL 的具塞试管中,另取蒸馏水 2.0 mL 作为空白对照,两管中分别加入 1.0 mL 苯酚溶液,混匀,再加入 5.0 mL 浓硫酸。摇匀后静置 5 min,置沸水浴中加热 15 min,取出置冷水浴中冷却后,在可见光区测定吸收曲线,找出最大吸收波长为 486 nm。

2.4 工作曲线的绘制 精密量取标准溶液 0.5,1,2,3,4,5,7 mL 分别置 50 mL 量瓶中,加蒸馏水置刻度,摇匀,各精密吸取 2 mL,置塞试管中,分别加 5% 苯酚溶液 1.0 mL,浓硫酸 5.0 mL,摇匀,静置 5 min,至 90 ℃的水浴锅中保温 15 min,取出迅速放入冷水浴中冷后,在 486 nm 处测定吸光度。以葡萄糖浓度 (X) 为横坐标,吸光度 (Y) 为纵坐标,得工作曲线, $Y = 0.1467X - 0.0462$ ($r = 0.9999$)。表明葡萄糖浓度在 0.020~0.142 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.5 葛根粗多糖的提取与精制 葛根粗粉 100 g,加石油醚 500 mL,回流 1 h,过滤,滤渣挥干后再用 80% 乙醇 500 mL 回流 1 h,过滤,挥干,残渣加蒸馏水 1 500 mL,回流 4 h,趁热滤过,滤液减压浓缩至 150 mL,用氯仿-正丁醇(3:2)萃取 2 次,水层加乙醇使含醇量达 80%,冰箱中静置过夜,滤过,残渣用乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤多次,60 ℃烘干,得精制葛根粗多糖。

2.6 换算因子的测定 精密称取干燥至恒重的葛根粗多糖 100 mg,置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取该溶液 2.0 mL,按 2.4 项下方法测定葡萄糖浓度,按下式计算换算因素: $f = W / (C \times D)$;其中 W 为多糖的质量(μg), C 为多糖稀释液中葡萄糖的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), D 为多糖的稀释因素。测得 $f = 3.07$ 。

2.7 供试品溶液的制备 精密称取葛根粗粉 0.2 g,加入 80% 乙醇溶液 80 mL,超声 1 h,趁热过滤,滤渣用 80% 热乙醇洗涤 3 次(10 mL×3)。挥干溶剂,连同滤纸置烧瓶中,加入 60 mL 蒸馏水,于 90 ℃水浴内保温 1 h。趁热过滤,取续滤液 5.0 mL 置于 50 mL 量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀备用。

2.8 精密度考察 精密吸取取同一供试品溶液 2.0 mL,按 2.4 项下方法测定吸收度,得 RSD 1.84%,表明精密度良好。

2.9 稳定性考察 同一样品分别在 0,0.5,1,2,3 h 测定吸光度,得 RSD 1.74%,结果表明供试品溶液在 3 h 内稳定。

2.10 重复性考察 平行称取 5 份葛根粉末各 0.2 g,按 2.7 项下方法制备供试品溶液,测定、计算含量 RSD 1.65%,表明重复性良好。

2.11 加样回收率试验 精密称取葛根粗粉 6 份,按 2.7 项下方法制备供试品溶液,每份加入一定量的精制葛根粗多糖,测定,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 葛根粗多糖加样回收率试验

称样量 /g	样品中含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.100 1	7.510	7.50	14.98	99.6		
0.100 3	7.721	7.51	15.15	98.92		
0.100 1	7.591	7.52	15.21	101.31	99.34	1.82
0.100 2	7.553	7.50	14.96	98.76		
0.100 2	7.724	7.50	14.98	96.74		
0.100 3	7.547	7.51	15.11	100.70		

2.12 结果 精密吸取供试品溶液 2.0 mL,按 2.4 项下方法显色,测定样品液中葡萄糖的含量,按下式计算样品中多糖的含量,结果见表 2,图 1。

$$\text{多糖含量}/\% = \frac{C \times D \times f}{W} \times 100\%$$

C 为样品溶液中葡萄糖的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), D 为样品溶液的稀释因素, f 为换算因素, W 为样品的质量(μg)。

表 2 不同生长期葛根中多糖含量测定

时间	含量/%	时间	含量/%
1 月	5.40	9 月	11.35
2 月	6.38	10 月	3.15
3 月	7.73	11 月	5.91
4 月	4.28	12 月	4.42
5 月	0.91	1 年	5.91
6 月	2.10	2 年	6.97
7 月	3.55	3 年	10.15
8 月	10.28	多年生	14.28

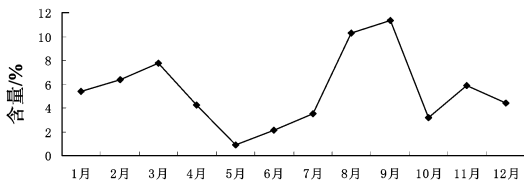


图1 不同月份葛根多糖含量变化

3 讨论

苯酚-硫酸比色法是 Dubois M 等^[9]在 1951 年提出并建立的一种用于多糖含量测定的方法,其原理是利用多糖在浓硫酸作用下水解成单糖,并迅速脱水生成糠醛衍生物,进而和苯酚缩合成有色化合物,在 490 nm 处进行比色测定。该操作的关键环节是显色。影响显色的最重要因素是水浴温度和水浴时间,沸水浴加热优于室温放置以促使缩合反应完全^[10]。另外实验过程中发现,浓硫酸加入速度的快慢,加入方式的不同均会对实验结果产生影响。作者采用沿管壁慢慢滴加浓硫酸,颠倒试管实现快速混匀,放置 5 min,在 90 ℃ 水浴中加热 15 min 后立即用冷水冷却到室温,以上的操作均保证试剂的加入量精确、反应时间和温度恒定,操作平行,即能得到重复性较好的结果,确保了试验数据的可靠性。该方法不仅精密度高,准确可靠,简便快速,而且重复性好,颜色稳定,可作为葛根多糖含量的测定方法。

全年不同月份葛根多糖积累动态进行了研究,并对葛根多糖含量变化的原因进行了初步分析:5, 10 月多糖含量最低,5 月葛根地上部分开始发芽,10 月结实^[7],发芽、结实使营养物质大量消耗,多糖可能受多种内外因素的影响不断的损耗、水解,含量降低;8,9 月多糖含量达到最高,夏季阳光、雨量充沛,葛根不断生长充实,趋于成熟,其多糖成分不断的积累,含量持续增长,9 月份葛根地上部分生长停滞,茎叶枯萎,地下部分根积累的多糖含量达到最高点;

11~3 月多糖含量达到第 2 个积累高峰,含量增加缓慢并趋于稳定,葛根进入休眠期,此时葛根产量也最高^[8],因此建议葛根最佳采收期为秋、冬季。

从不同年限的葛根看,多糖含量随年限的增加而增高。多糖广泛存在于自然界,具有多种生物活性,是理想的免疫增强剂,多糖还具有降低血糖、降血脂、抗血凝及止吐、抗衰老、抗辐射、抗病毒等生理活性。因此建议将多糖的含量作为葛根的质量评价指标之一。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:312.
- [2] 罗琼,郝近大,杨华. 葛根的本草考证[J]. 中国中医药志, 2007, 12(32):1141.
- [3] 白海波,李波,宋子荣. 葛根提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(6):14.
- [4] 易红,杨华. 葛根的品种产地和提取工艺研究进展概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(11):61.
- [5] 杨艳. 葛根素治疗冠心病心绞痛 60 例临床观察[J]. 临床合理用药杂志, 2009, 2(4):61.
- [6] 狄灵,于燕,杨海侠,等. 葛根素对心血管病作用机制的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(3):328.
- [7] 纪宝玉,裴莉昕,陈随清. 野葛及药材生物学特性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):108.
- [8] 王德立,张兴翠,孙滢. 野葛主要成分积累动态变化研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(13):974.
- [9] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. A colorimetric method for the determination of sugars [J]. Nature, 1951, 28(7):167.
- [10] 项艳,朱苏文,程备久,等. 板栗基因组 DNA 几种提取方法比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(1):36.

[责任编辑 顾雪竹]