

# 野葛及药材生物学特性的初步研究

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

**[摘要]** 目的: 解野葛生长习性和葛根活性物质含量的动态变化。方法: 以实地调查的方式观测野葛的生长发育情况, 《中国药典》方法测定醇溶性浸出物的含量, 高效液相法测定葛根中葛根素、大豆苷、大豆苷元的含量, 紫外分光光度法测定总黄酮含量, 苯酚-硫酸法测定葛根多糖含量。结果: 初步揭示了野葛的生长发育情况; 发现葛根中各活性物质含量变化有一定规律, 1~12月份中以8, 9月份各活性物质含量最高, 不同年限葛根各活性物质含量随年限增长而增高。结论: 研究了野葛生长发育过程与葛根各活性物质积累之间的关系和机制, 为野葛的采收、合理开发利用提供一定的科学依据。

**[关键词]** 野葛; 生物学特性; 生长习性; 有效成分

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0108-05

## Study on Biological Character of *Pueraria lobata* and Medicinal Materials

Ji Bao-yu, PEI Li-xin, CHEN Sui-qing\*, DONG Cheng-ming

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

**[Abstract]** **Objective:** Studies on growth habit of *Pueraria lobata* and dynamic changes of the active substance content of puerariae Lobatae Radix. **Method:** The method of determining the content of alcohol-soluble chemical composition was in line with Pharmacopeia; puerarin, aidzin, daidzein were determined by HPLC. The contents of flavonoids were assayed by ultraviolet spectroscopy. The contents of polysaccharide were determined by phenol-sulfuric acid method. **Result:** This paper elementarily reveals growth habit of *Pueraria lobata*. The content of active substance appeared regular changes and was highest in August and September of perennial Puerariae Lobatae Radix. **Conclusion:** This result fruther provides scientific basis for resoures protection, rational

**[收稿日期]** 20111102(008)

**[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

- [5] 王丹花, 翁新楚. 灵芝抗癌活性及放化疗对 HL-7702 细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1618.
- [6] 唐庆九, 季哲, 郝瑞霞, 等. 灵芝中性三萜类成分的抗肿瘤作用[J]. 食用菌学报, 2010, 17(1): 60.
- [7] 丁平, 梁英娇, 罗进辉, 等. 灵芝中 6 种主要三萜酸类成分的 HPLC 定量分析[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(11): 822.
- [8] 刘思好, 王艳, 何蓉蓉, 等. 灵芝的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(3): 183.
- [9] 高建莉, 禹志领, 李绍平, 等. 灵芝三萜类成分研究进展[J]. 中国食用菌, 2004, 24(4): 6.
- [10] 蔺丽, 方能虎, 吴旦. 灵芝有效成分的研究概况[J]. 中成药, 2002, 24(10): 793.
- [11] 钟小清, 徐鸿华. 灵芝研究概况[J]. 广西中医药, 1999, 22(6): 314.
- [12] 王瑜杰, 丁安伟, 张丽. 灵芝三萜类成分提取分离和质量控制研究进展[J]. 中国药业, 2008, 17(24): 60.
- [13] 贾晓斌, 宋师花, 陈彦, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和醇回流法提取灵芝中三萜类成分的比较[J]. 中成药, 2010, 32(5): 868.
- [14] 陆慧, 贾晓斌, 韦英杰, 等. 灵芝三萜类成分油水分配系数的测定及其在体肠吸收[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 12.

[责任编辑 蔡仲德]

development and comprehensive of *P. lobata*.

[Key words] *Pueraria lobata*; biological characteristics; growth habit; active componen

我国为葛属 *Pueraria* CD 植物分布中心,有 12 种,可入药的有 8 种<sup>[1]</sup>,其中野葛分布最广,所含的葛根素及黄酮量显著高于其他品种<sup>[2]</sup>。现今,葛根黄酮和葛根素被广泛应用到保健食品、生物制药等领域<sup>[3]</sup>,尤其近年来我国葛根研究、生产及开发利用形成了一个新的高潮<sup>[4-5]</sup>。葛藤既可防地面干燥,又可防水土流失。因此,野葛的种植不仅能创造经济效益,还能产生良好的生态效益。本研究对野葛的生长发育规律、葛根活性物质动态累积等生物学特性进行了系统研究,为开展野葛资源的合理开发利用提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 仪器与试剂** 岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPD-20A 型紫外检测器, CTO-10AS vp 型柱温箱, CBM-102 型工作站), HP-01 型无油真空泵, Aglient 8455 型紫外-可见分光光度计, 葛根素对照品 (11075200511, 中国药品生物制品检定所), 大豆苷对照品 (07030613, 中国深圳同田生物技术有限公司, 纯度 98.41%), 大豆苷元对照品 (07030614, 中国深圳同田生物技术有限公司, 纯度 99.70%), 甲醇为色谱醇, 水为双重蒸馏水, 乙醇为分析醇。

**1.2 药材** 生长习性研究以河南西峡野葛种质资源圃里生长正常、无病害的多年生植株为研究对象。

活性物质积累动态研究所用样品为 2007 年采自河南西峡, 分别为 1 月至 12 月各月的多年生葛根和 2008 年 11 月采自河南西峡的 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 及野葛的干燥根。

## 2 方法

**2.1 生长习性研究** 野葛适应性很强, 我国除青海、新疆、西藏以外的各省区均有分布。主产云南、广西、湖北以及河南省伏牛山区。多生长在海拔 1 700 m 以下温暖湿润的山坡、路旁、沟谷、林缘、河滩等地。野葛是喜温性植物, 种子萌发温度为 10 ℃ 以上, 在 18 ~ 22 ℃ 时, 8 ~ 10 d 即可发芽出苗。5 ~ 7 月份高温多雨时, 葛的生长最快, 其生长的适宜温度为 18 ~ 30 ℃, 超过 40 ℃ 时停止生长或叶干枯受害, 发育要求的年降雨量为 400 mm 以上, 前湿后干是理想的生长环境。葛喜光照, 子叶出土后, 在光照下很快由黄变绿, 进行光合作用。葛根对土壤要求不严, 能适应多种肥沃或干旱贫瘠的土壤。土壤酸碱度以 5.5 ~ 7.0 最为适宜。

本研究对野葛种质资源圃里的葛叶和葛花的生长发育进行跟踪记录, 结果见表 1 ~ 3, 图 1。

表 1 葛叶生长发育 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

时间/月-日	中间小叶长/cm	中间小叶宽/cm	侧生小叶长/cm	侧生小叶宽/cm	叶柄长/cm
6-25	1.53 ± 0.041	0.82 ± 0.049	1.32 ± 0.067	0.76 ± 0.062	1.22 ± 0.086
6-27	2.14 ± 0.055	1.44 ± 0.031	1.92 ± 0.057	1.35 ± 0.074	2.31 ± 0.083
6-29	3.97 ± 0.077	2.86 ± 0.067	3.90 ± 0.099	2.80 ± 0.081	4.17 ± 0.201
7-4	7.39 ± 0.208	5.61 ± 0.185	7.22 ± 0.265	5.38 ± 0.121	10.00 ± 0.435
7-8	10.43 ± 0.450	8.33 ± 0.286	10.02 ± 0.478	7.47 ± 0.332	12.92 ± 0.443
7-11	14.35 ± 0.596	13.08 ± 0.496	13.95 ± 0.589	11.42 ± 0.494	21.80 ± 1.542
7-15	14.89 ± 0.512	13.96 ± 0.518	14.05 ± 0.620	11.61 ± 0.393	22.65 ± 1.591

表 2 葛叶物候期

物候期	具体时段
展叶期	5 月 10 日 ~ 6 月 5 日
快速生长期	6 月 5 日 ~ 7 月 25 日
生长期	7 月 25 日 ~ 8 月 20 日
枯萎期	8 月 20 日 ~ 11 月降霜

表 3 葛花物候期

物候期	具体时段
花芽萌发期 (30% 花芽形成)	8 月 20 日 ~ 9 月 8 日
花开放期 (20% ~ 30% 花完全展开)	9 月 8 日 ~ 9 月 15 日
盛花期 (50% 以上花开放)	9 月 15 日 ~ 9 月 23 日
谢花期	9 月 23 日 ~ 9 月 29 日

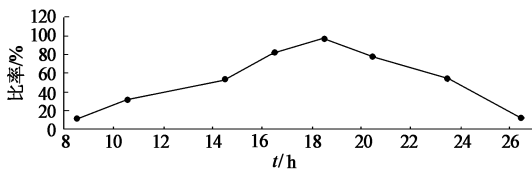


图 1 葛花生长发育曲线

2.2 葛根素含量测定 按照《中国药典》方法测定<sup>[6]</sup>,方法学考察均符合要求。结果见表 4,图 2。

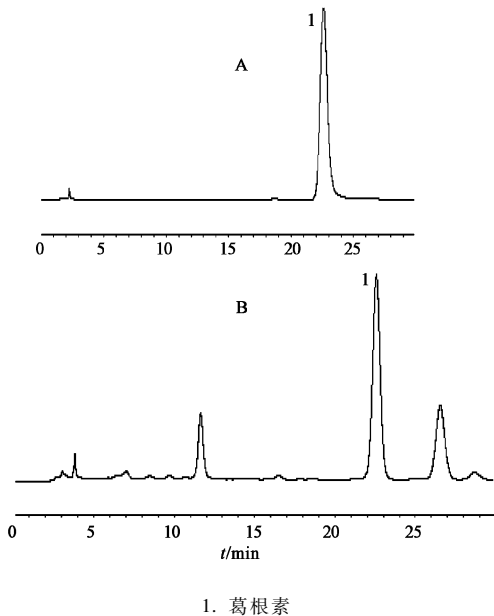
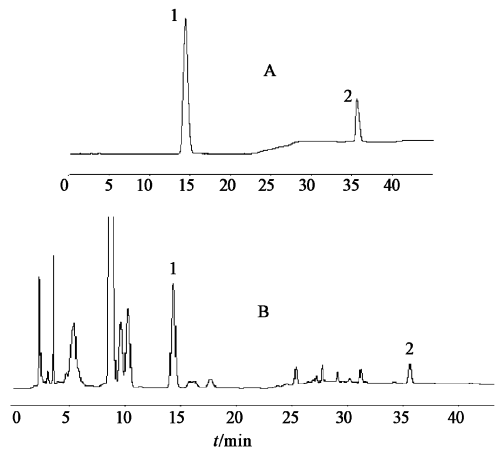


图 2 对照品(A)和样品(B) HPLC

2.3 大豆苷和大豆苷元的含量测定

2.3.1 色谱条件 Phenomenex C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-水

(B), 梯度洗脱: 0 ~ 18 min, 68% B; 18 ~ 20 min, 60% B; 20 ~ 22 min, 55% B; 22 ~ 45 min, 50% B; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 248 nm, 进样量 5 μL, 柱温 30 ℃。在上述色谱条件下,大豆苷、大豆苷元与其他成分分离良好,理论塔板数均不低于 4 000。见图 3。



1. 大豆苷; 2. 大豆苷元

图 3 对照品(A)和样品(B) HPLC

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取大豆苷、大豆苷元对照品适量,加 70% 乙醇分别制成 0.1, 0.05 g·L<sup>-1</sup>溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取药材细粉 0.1 g(过 3 号筛),置 50 mL 具塞平底烧瓶中,精密加 70% 乙醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流提取

表 4 葛根中各成分的含量测定 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时间	葛根素	大豆苷	大豆苷元	总黄酮	醇溶性浸出物	多糖
1 月	4.54 ± 0.050	0.64 ± 0.008	0.21 ± 0.012	7.98 ± 0.182	8.81 ± 0.215	5.40 ± 0.124
2 月	5.39 ± 0.141	0.69 ± 0.003	0.31 ± 0.014	11.75 ± 0.264	9.32 ± 0.256	6.38 ± 0.031
3 月	5.93 ± 0.144	0.94 ± 0.062	0.86 ± 0.015	10.58 ± 0.212	10.25 ± 0.261	7.73 ± 0.162
4 月	3.50 ± 0.101	0.48 ± 0.007	0.30 ± 0.007	9.82 ± 0.201	7.43 ± 0.192	4.28 ± 0.093
5 月	2.41 ± 0.095	0.12 ± 0.008	0.22 ± 0.009	3.76 ± 0.086	4.82 ± 0.084	0.91 ± 0.002
6 月	2.64 ± 0.111	0.21 ± 0.041	0.22 ± 0.013	5.49 ± 0.124	6.78 ± 0.097	2.10 ± 0.009
7 月	2.90 ± 0.052	0.42 ± 0.035	0.23 ± 0.007	10.89 ± 0.312	8.21 ± 0.015	3.55 ± 0.011
8 月	5.15 ± 0.150	1.66 ± 0.087	0.39 ± 0.009	14.95 ± 0.354	15.89 ± 0.428	10.28 ± 0.251
9 月	6.35 ± 0.170	1.63 ± 0.067	0.37 ± 0.008	13.89 ± 0.420	12.74 ± 0.312	11.35 ± 0.231
10 月	2.85 ± 0.053	0.22 ± 0.009	0.08 ± 0.001	6.76 ± 0.192	10.92 ± 0.305	3.15 ± 0.056
11 月	4.82 ± 0.121	0.96 ± 0.016	0.13 ± 0.007	8.70 ± 0.256	7.57 ± 0.198	5.91 ± 0.105
12 月	3.66 ± 0.091	0.62 ± 0.015	0.15 ± 0.010	6.94 ± 0.121	8.79 ± 0.024	4.42 ± 0.008
1 年	4.57 ± 0.121	0.48 ± 0.008	0.09 ± 0.011	8.50 ± 0.195	7.57 ± 0.036	5.91 ± 0.019
2 年	4.73 ± 0.090	0.50 ± 0.013	0.16 ± 0.012	8.66 ± 0.186	10.51 ± 0.268	6.97 ± 0.149
3 年	5.85 ± 0.085	0.46 ± 0.045	0.19 ± 0.011	12.82 ± 0.214	12.05 ± 0.289	10.15 ± 0.216
多年	10.15 ± 0.199	1.66 ± 0.009	0.39 ± 0.09	14.13 ± 0.451	12.89 ± 0.291	14.28 ± 0.341

1 h,冷却。用乙醇补足,摇匀,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过,即得。

**2.3.4 线性关系考察** 分别精密称取对照品大豆苷 1,5,8,10,12  $\mu\text{L}$ ,大豆苷元 1,4,6,8,10  $\mu\text{L}$ ,以进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ )绘制标准曲线。得大豆苷回归方程  $Y = 358\ 582X - 115\ 648$  ( $r = 0.999\ 9$ ),线性范围 0.1 ~ 1.2  $\mu\text{g}$ ;大豆苷元回归方程为  $Y = 104\ 365X - 35\ 887$  ( $r = 0.999\ 2$ ),线性范围 0.05 ~ 0.5  $\mu\text{g}$ 。

**2.3.5 精密度试验** 精密吸取大豆苷对照品溶液、大豆苷元对照品溶液各 5  $\mu\text{L}$ ,重复进样 6 次,记录峰面积,计算 RSD,结果见表 5。

**2.3.6 稳定性试验** 取同一份药材,按 2.3.3 项下供试品溶液制备方法平行制备 6 份,分别于 0,2,4,8,12,24 h 后进样,记录峰面积,计算 RSD,结果见表 6。

表 5 2 种成分精密度试验结果

峰面积		平均峰面积		RSD/%	
大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元
1651 914	448 723				
1681 541	449 995				
1655 648	434 023	1674 852	444 053	1.45	1.36
1679 281	441 875				
1705 875	445 651				

**2.3.7 重复性试验** 取同一份药材,按 2.3.3 项下供试品溶液制备方法平行制备 6 份,分别进样检测,计算 RSD,结果见表 7。

表 8 2 种成分加样回收率试验

成分	取样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
大豆苷	0.050 4	0.207	0.200	0.414	101.7	99.2	1.77
	0.050 9	0.209	0.220	0.418	97.4		
	0.050 2	0.206	0.200	0.398	98.0		
	0.050 7	0.208	0.200	0.411	100.7		
	0.050 4	0.207	0.200	0.406	99.7		
	0.050 7	0.208	0.210	0.409	97.8		
	0.050 4	0.186	0.190	0.378	100.5		
大豆苷元	0.050 9	0.188	0.190	0.384	101.5	99.1	2.21
	0.050 2	0.186	0.190	0.379	100.8		
	0.050 7	0.188	0.210	0.383	96.2		
	0.050 4	0.186	0.210	0.384	96.9		
	0.050 7	0.188	0.200	0.383	98.7		

## 2.4 总黄酮含量测定

**2.4.1 对照品溶液的制备** 精确称取葛根素纯品

表 6 2 种成分稳定性试验

$t/h$	峰面积		RSD/%	
	大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元
0	798 599	11 981		
2	781 541	11 651		
4	765 206	11 677	1.94	1.30
8	799 725	11 992		
12	772 106	11 905		
24	799 065	11 738		

表 7 2 种成分重复性试验

含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		RSD/%	
大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元	大豆苷	大豆苷元
791 989	11 951				
779 898	11 712				
789 421	11 938	0.41	0.37	2.18	1.41
798 051	11 989				
786 492	11 784				
779 586	11 723				

**2.3.8 加样回收率** 取已知大豆苷、大豆苷元含量的葛根粉末 6 份,各约 0.05 g,于每份样品中加入适量对照品,按照 2.3.3 项下制备供溶液,计算回收率和 RSD,结果见表 8。

**2.3.9 大豆苷、大豆苷元的含量测定** 分别精密吸取大豆苷、大豆苷元供试品溶液 5  $\mu\text{L}$  进样检测。结果见表 4。

10 mg 于 50 mL 量瓶中,加 70% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。

**2.4.2 供试品的制备** 精密称取葛根药粉 0.2 g (过 60 目) 于 50 mL 三角瓶中, 加 70% 乙醇 30 mL 置热水浴加热 30 min 并时时振摇, 冷却后加乙醇至刻度, 摇匀, 澄清后吸取上清液 1 mL 于 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀。

**2.4.3 最大吸收峰的确定** 精密吸取 2.4.1 项下的对照品溶液适量, 以 1 mL 乙醇加水至 10 mL 量瓶中作为空白对照, 于 190 ~ 900 nm 扫描, 结果在 250 nm 处有最大吸收。

精密吸取供试品溶液适量, 以 70% 乙醇 1 mL 加水于 25 mL 量瓶中做空白对照, 于 190 ~ 900 nm 扫描, 结果在 250 nm 处有最大吸收。

**2.4.4 总黄酮方法学考察** 经试验考察, 总黄酮回归方程为  $Y = 61.142X - 0.0656$  ( $r = 0.9995$ ), 线性范围 4 ~ 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。精密度试验吸光度平均值为 0.43, RSD 2.03%, 稳定性试验吸光度平均值 0.69, RSD 2.25%, 供试液在 60 min 内基本稳定。重复性试验 RSD 1.67%, 加样回收率试验 RSD 1.86%。以上结果均符合试验要求。

**2.5 醇溶性浸出物的测定** 按照《中国药典》(2010 年版): 附录 56(冷浸法)的方法测定。

**2.6 葛根多糖测定<sup>[7]</sup>** 方法学考察该结果符合要求, 测定结果见表 8。

### 3 结果与讨论

由表 8 可知葛根各活性物质动态积累趋势为: 一年中 8, 9 月份葛根各活性物质含量最高, 10 月份出现一个低谷后, 又逐渐上升, 2, 3 月份各活性物质含量略低于 8, 9 月份, 5 月份再次出现一个低谷后又呈上升趋势。不同年限葛根各活性物质含量均随年限的增高而增高, 前 2 年各活性物质含量增长缓慢, 含量差异不显著, 第 3 年增长明显加快, 以多年生各活性物质含量最高。

本研究测得 11 月至次年 3 月葛根各活性物质仅略低于 8, 9 月份, 另据王德立等<sup>[8]</sup>报道, 葛根 11 月份产量最高, 综合葛根各活性物质含量和产量因素考虑, 初步认为葛根最佳采收期为 11 月至次年 3

月, 与根类药材适宜在传统秋冬季节采收相符合, 为葛根的合理开发及质量评价提供科学依据。另由表 8 可知葛根各活性物质随年限增长而逐渐升高, 3 年生以上的葛根各活性物质含量明显增大, 由于野葛为多年生植物, 对其具体年限的确定有一定难度, 本资源圃里仅有 1 ~ 3 年生的葛根, 因此我们又在野外采挖了多年生的葛根作对比, 对 3 年后葛根的具体考察有待进一步研究。

我国野葛资源极为丰富, 通过野外调查研究发现, 野葛具有极其旺盛的生命力, 尤其当生态因子适宜时, 常大面积积聚成群落, 当竞争优势突出时会将其伴生植物缠绕致死, 以至于危害生态环境。因此应该充分、合理地利用野葛资源。本研究在充分认识野葛及药材生物学特性的基础上, 进一步研究野葛生长发育过程与葛根各活性物质积累之间的关系和机制, 发现环境条件和不同生长期都会直接影响野葛块根的膨大和有效物质的积累。

### [参考文献]

- [1] 陶娟, 许慕农, 路秋生. 中国葛属植物资源和利用情况[J]. 中国野生植物源, 2007, 26(3): 38.
- [2] 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, 11(12): 60.
- [3] 郭宇洁, 孟硕, 徐辉, 等. 葛根素和葛根黄酮的药代动力学研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 83.
- [4] 陈荔焜, 陈树和, 刘焱文. 葛根资源、化学成分和药理作用研究概况[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2305.
- [5] 杨晓春, 宛晓春. 葛根的研究及其开发前景[J]. 林业科技通讯, 1996(1): 16.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2010: 312.
- [7] 陈随清, 王利丽, 杨晋, 等. 不同栽培品种山茱萸药材中多糖的含量测定[J]. 河南科学, 2005, 23(4): 513.
- [8] 王德立, 张兴翠, 孙滢. 野葛主要成分积累动态变化研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(13): 974.

[责任编辑 邹晓翠]