

壳聚糖在中药材 HPLC 指纹图谱前处理 过程中的应用

于 靖¹, 翟宇君¹, 梁宗锁^{1,2}

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省中药指纹图谱与天然产物库研究中心, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】考察壳聚糖絮凝法去除中药材提取液中杂质及糖类的效果, 为中药材 HPLC 指纹图谱的建立提供理论依据。【方法】以玄参、天麻、半夏 3 种糖分含量高的中药材为供试材料, 分别采用醇沉法和壳聚糖絮凝法处理, 考察这 2 种方法对中药材提取液中的糖分和有效成分的影响, 比较 HPLC 指纹图谱的相似度。【结果】与醇沉法相比, 壳聚糖絮凝法使中药材有效成分得到了更好的保留, 澄清效果明显, 对糖分的去除也达到了要求; 壳聚糖絮凝剂的质量浓度和加入体积分别为 10 g/L 和 100 μ L (10 mL 提取液) 时效果最佳; 壳聚糖絮凝剂处理玄参提取液与模板的相似度为 0.989 2, 明显高于醇沉法 (0.892 1); 天麻及半夏与模板的相似度分别为 0.997 3 和 0.979 6。【结论】作为一种前处理方法, 壳聚糖絮凝法可用于中药材 HPLC 指纹图谱的分析及中药材提取与精制中。

【关键词】 壳聚糖; 中药材; HPLC 指纹图谱; 可溶性总糖; 相似度

【中图分类号】 R944.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0188-07

Chitosan's applications in HPLC fingerprint analysis for Chinese medical herbs

YU Jing¹, ZHAI Yu-jun¹, LIANG Zong-suo^{1,2}

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Research Centre of TCM Fingerprint and NP Library, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was done to investigate the effect of Chitosan-flocculant to remove the impurities and saccharide in the extract of three Chinese medical herbs for testifying HPLC fingerprint analysis. 【Method】 Three over-saccharide Chinese medical herbs (*Scrophularian ningpoensis* Hemsl., *Gstrodia elata* Hlume and *Typhonium flagelliforme* Blume) were used as materials. The extract was pretreated by Chitosan or Ethanol respectively. The contents of total saccharide and active components in the extract of three Chinese medical herbs were determined, and the similarities between the extract treated by Chitosan and the extract treated by Ethanol were compared. 【Result】 Compared with alcohol sedimentation, Chitosan-flocculation saved more trace componets, clarification effect was obvious, and the content of total saccharide was in an equal range. Concentration and volume of chitosan-flocculation were 10 g/L and 100 μ L (per 10 mL extract) respectively. Similarities of the HPLC fingerprint were analyzed, in the *Scrophularian ningpoensis* Hemsl., the similarity of chromatograms of samples dealt with Chitosan-flocculation and the standard fingerprint was 0.989 2, obviously higher than 0.892 1 which dealt with alcohol; the similarities of chromatographies of *Gstrodia elata* Hlume and *Typhonium flagelliforme* Blume were 0.997 3

* [收稿日期] 2009-03-24

[基金项目] 中国科学院知识创新项目 (KZ.CX2-XB1-05)

[作者简介] 于 靖 (1985—), 女, 河北沧州人, 在读硕士, 主要从事药用植物质量标准研究。E-mail: yujinghxy@163.com

[通信作者] 梁宗锁 (1965—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事中草药规范化栽培理论与技术研究。

E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

and 0.979 6 respectively. 【Conclusion】 As a new pretreatment, Chitosan-flocculation could be widely used in HPLC analysis, refinement and separation of Chinese medical herbs.

Key words: chitosan; Chinese medical herb; HPLC fingerprint; total soluble saccharide; similarity

玄参药材采用玄参科 (Scrophulariaceae) 玄参属植物玄参 (*Scrophularian ningpoensis* Hemsl.) 的干燥根入药, 其味甘、苦、咸, 微寒, 归肺、胃、肾经, 具有凉血滋阴、泻火解毒之功效^[1]。由于中药材化学成分及药效机理的复杂性导致有效成分难以确定, 而中药指纹图谱由于其能显示特征成分或混合成分, 已经越来越广泛的应用于中药材的质量评价^[2-3]。《中华人民共和国药典》中对玄参高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱没有描述, 只规定用 HPLC 法测定 2 种有效成分的含量, 玄参 HPLC 指纹图谱的建立是亟待解决的问题。

一般水溶性成分含量较高的中药材, 糖分含量也较高。使用高效液相色谱建立指纹图谱的过程中, 在有机流动相作用下, 会导致提取液中的糖类沉淀, 影响柱效并缩短 C₁₈ 柱的寿命。因此, 在尽量保留有效成分的前提下去除提取液中的糖分和杂质显得十分重要。中药材提取液的传统去糖方法是醇沉法, 但对有效成分损失过大^[4-5]。近年来, 壳聚糖作为一种澄清剂, 广泛应用于果酒、果汁、中药提取液等的精制^[6-8]。壳聚糖的絮凝机理是电中和作用和吸附架桥作用的结合, 一般认为, 壳聚糖絮凝澄清的原理是吸附架桥作用^[9-11]。

为此, 本试验比较了醇沉法和壳聚糖絮凝法对玄参提取液有效成分含量及指纹图谱相似度^[9]的影响, 以壳聚糖絮凝法作为去糖方法建立了玄参 HPLC 指纹图谱, 并将该法应用于 2 种糖含量较高的中药材 (天麻、半夏) 中, 对其应用效果进行了探讨, 旨在为壳聚糖絮凝法在建立中药材 HPLC 指纹图谱中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

微型植物试样粉碎机, 北京中兴伟业仪器有限公司; SB25-12DT 型超声波清洗机, 宁波新芝生物股份有限公司; 优普超纯水机, 上海亚荣生化仪器厂; Waters 高效液相色谱仪、Waters 2487 DAD 二极管阵列检测、Waters Sunfire C₁₈ 柱, 美国 Waters 公司。

1.2 试验材料及试剂

1.2.1 供试材料 (1) 玄参。于 2006-12 收集陕西

镇坪县农科所试验田的玄参芽头, 2007-03 种植于陕西杨凌水土保持研究所试验田, 2007-12 采收根部, 晒干。(2) 半夏。于 2008-12 在西北农林科技大学药用植物园采收根部, 晒干。(3) 天麻。于 2008-09 收集于四川成都药材市场。经西北农林科技大学生命科学院药用植物教研室鉴定, 3 种药材均为真实品种。

1.2.2 试剂 桃叶珊瑚苷 (批号 111761-200601)、哈巴苷 (批号 111729-200602)、哈巴俄苷 (批号 111730-200502)、肉桂酸 (批号 110786-200503)、梓醇 (批号 110808-200508)、天麻素 (批号 110807-200205) 等对照品, 均购自中国药品生物制品检定所; 葫芦巴碱、鸟苷、肌苷, 均购自 Sigma 公司; 甲醇为色谱纯; 试验用水为超纯水; 壳聚糖, 科邦生物公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 玄参提取液的制备 采收晒干后的玄参于 110 ℃ 恒温干燥 10 h, 用微型植物试样粉碎机粉碎, 过 0.125 mm 筛, 分别称取 0.500 g 玄参粉末置于 A、B 2 个 100 mL 具塞三角瓶中, 瓶 A 加入 50 mL 蒸馏水, 瓶 B 加入 50 mL 30% 体积分数甲醇, 称量并记录。室温放置 1 h, 然后超声提取 30 min, 待温度降到室温后, 用溶剂补平损失的质量。抽滤合并滤液。

1.3.2 不同质量浓度壳聚糖絮凝剂的制备及其絮凝处理 分别将 2, 1 和 0.5 g 的壳聚糖溶于 100 mL 体积分数 1% 的乙酸溶液, 配制成质量浓度为 20, 10 和 5 g/L 的溶液, 充分溶胀后立即使用。于具塞试管中分别加入玄参样品续滤液 5 mL, 再分别加入质量浓度为 20 g/L 壳聚糖絮凝剂 25, 50, 75, 100, 125 μL; 加入质量浓度为 10 g/L 壳聚糖絮凝剂 50, 100, 150, 200, 250 μL; 加入质量浓度为 5 g/L 壳聚糖絮凝剂 100, 200, 300, 400, 500 μL。分别在 40, 50, 60, 70 和 80 ℃ 下进行观察, 2 h 后记录试管中是否出现沉淀。每处理重复 3 次。

1.3.3 不同去糖方法处理后玄参有效成分及可溶性总糖含量的测定 选用质量浓度 10 g/L 的壳聚糖絮凝剂, 分别加入 100, 200 和 300 μL 于 10 mL 玄参样品续滤液中, 进行絮凝澄清处理, 壳聚糖终质量浓度分别为 1, 2 和 3 mg/L, 作为供试品 I、II 和 III;

同时取相同样品续滤液,加入乙醇,使乙醇在混合液中的体积分数达 70%,进行醇沉处理,作为供试品Ⅳ;另取未过滤的玄参样品液 10 mL,加入 100 μ L 的 10 g/L 壳聚糖絮凝剂,作为供试品Ⅴ;另取 10 mL 玄参样品续滤液作为对照(CK),以上样品均于 4 $^{\circ}$ C 冷藏过夜,用 2 mL 无菌注射器吸取备用液,过微孔滤膜(0.45 μ m)后转移至样品瓶中准备进样。

用 HPLC 法测定有效成分。色谱条件:色谱柱:Waters SunFire C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:A 甲醇,B 超纯水;梯度洗脱程序:0~10 min,5%~35% A;10~15 min,35%~45% A;15~20 min,45%~51% A;20~40 min,51%~61% A;40~45 min,61%~80% A;45~60 min,80% A。检测波长 200 nm,278 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 20 μ L。

用蒽酮比色法测定可溶性总糖含量^[12]。

1.3.4 壳聚糖絮凝法的普适性研究 选择糖含量较高的天麻和半夏 2 种中药材,应用 1.3.3 方法进行处理,分析其 HPLC 指纹图谱的相似度及主要指标成分含量变化,考察壳聚糖絮凝法的普适性。

(1)天麻提取液的制备及色谱条件。将收集的天麻药材于 110 $^{\circ}$ C 恒温干燥 10 h,用微型植物试样粉碎机粉碎,过 0.125 mm 筛。精确称取天麻粉末 0.500 g,加入 15 mL 体积分数 30% 的甲醇,超声提取 30 min,过滤,得到的续滤液作为供试品 G1。取 10 mL 续滤液,加入 100 μ L 质量浓度为 10 g/L 的

壳聚糖絮凝剂,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜后,取上清液过 0.45 μ m 滤膜,即得供试品 G2。

色谱条件:色谱柱:Waters SunFire C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:A 甲醇,B 体积分数 1%冰醋酸;梯度洗脱程序:0~35 min,5%~40% A;35~45 min,40%~80% A;45~55 min,80%~86% A;55~60 min,86%~100% A;检测波长 270 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 20 μ L。

(2)半夏提取液的制备及色谱条件。将采集的半夏药材于 110 $^{\circ}$ C 恒温干燥 10 h,用微型植物试样粉碎机粉碎,过 0.125 mm 筛。精密称取半夏粉末 0.100 g,加入 10 mL 蒸馏水,超声提取 45 min,过滤,得到的续滤液作为供试品 T1。取 10 mL 续滤液加入 100 μ L 质量浓度为 10 g/L 的壳聚糖絮凝剂,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜后,再取上清液过 0.45 μ m 滤膜,即得供试品 T2。

色谱条件:色谱柱:Waters SunFire C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:A 甲醇,B 超纯水;以 5% A 洗脱 20 min;检测波长 265 nm;流速 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 20 μ L。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度壳聚糖絮凝剂絮凝效果的比较

不同质量浓度壳聚糖絮凝剂絮凝效果的比较见表 1。

表 1 不同质量浓度壳聚糖絮凝剂絮凝效果的比较

Table 1 Flocculation effect of chitosan with different mass concentrations

壳聚糖 Chitosan		温度/ $^{\circ}$ C Temperature				
质量浓度/(g $\cdot$ L ⁻¹) Concentration	体积/ μ L Volume	40	50	60	70	80
20	25					
	50					
	75					
	100					
	125	—	—	—	—	—
10	50					
	100	—				
	150	—	—			
	200	—	—	—	—	
	250	—	—	—	—	—
5	100	—	—			
	200	—	—			
	300	—	—	—		
	400	—	—	—	—	
	500	—	—	—	—	—

注:“—”表示无沉淀。
Note:“—”means no sediment.

表 1 显示,絮凝剂的质量浓度及温度共同影响絮凝效果。20 g/L 的壳聚糖絮凝剂絮凝效果最好,

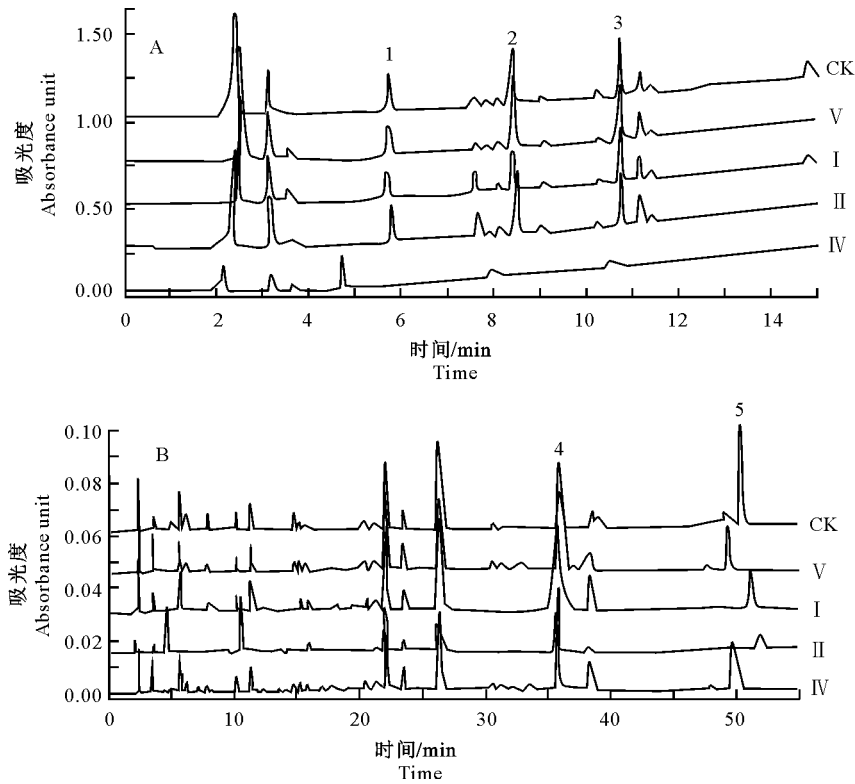


图 2 不同去糖方法处理玄参样品 HPLC 指纹图谱的比较

A. 检测波长 200 nm;B. 检测波长 278 nm;1. 梓醇;2. 桃叶珊瑚苷;3. 哈巴苷;4. 哈巴俄苷;5. 肉桂酸

Fig. 2 HPLC fingerprint of different treatments to *Scrophularian ningpoensis* Hemsl.

A. Determined wavelength 200 nm;B. Determined wavelength 278 nm;1. Catalpol;2. Aucubin;3. Harpagide;4. Harpagoside;5. Cinamic acid

2.3 壳聚糖絮凝法在中药材 HPLC 指纹图谱中的应用

2.3.1 天 麻 天麻供试品 HPLC 指纹图谱如图 3 所示。选定 24 个共有峰,以未经去糖处理的天麻样品续滤液为模板,经计算可知,经过壳聚糖处理供

试品 G2 的相似度为 0.997 3,供试品 G1 和 G2 的 HPLC 指纹图谱峰型高度相似。供试品 G1 和 G2 的天麻素含量分别为 9.246,8.987 mg/g。表明将壳聚糖絮凝法作为前处理方法在天麻 HPLC 指纹图谱中取得了良好的效果。

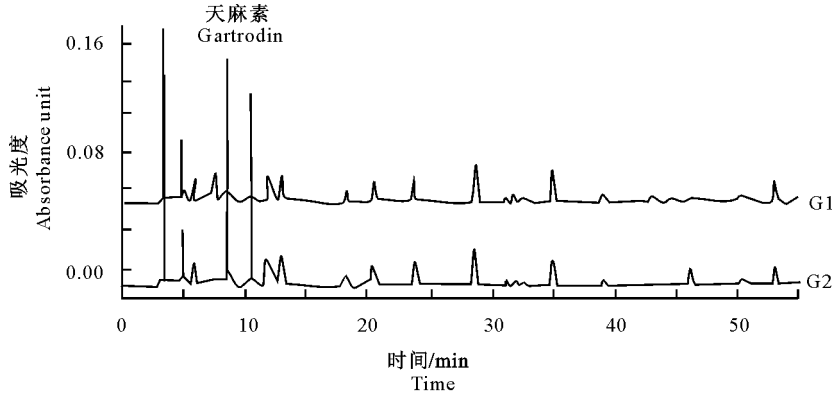


图 3 天麻供试品 G1 和 G2 HPLC 指纹图谱的比较

Fig. 3 HPLC fingerprint of sample G1 and G2 of *Gastrodia elata* Hlume

2.3.2 半 夏 半夏供试品 T1 和 T2 的 HPLC 指纹图谱如图 4 所示。选定 10 个共有峰,以未经去糖处理的半夏样品续滤液为模板,经计算可知,壳聚糖处理供试品 T2 的相似度为 0.979 6,可知供试品

T1 与 T2 的 HPLC 指纹图谱峰型相似度较高。其中供试品 T1 的葫芦巴碱含量为 0.467 mg/g,鸟苷含量为 0.254 mg/g,肌苷含量为 0.405 mg/g;供试品 T2 的葫芦巴碱含量为 0.508 mg/g,鸟苷含量为

0.610 mg/g,肌苷含量为 0.521 mg/g。半夏提取液经过壳聚糖处理后葫芦巴碱、鸟苷、肌苷含量均明显

增加,说明在其有效成分的提取中,壳聚糖絮凝剂可能有促进作用。

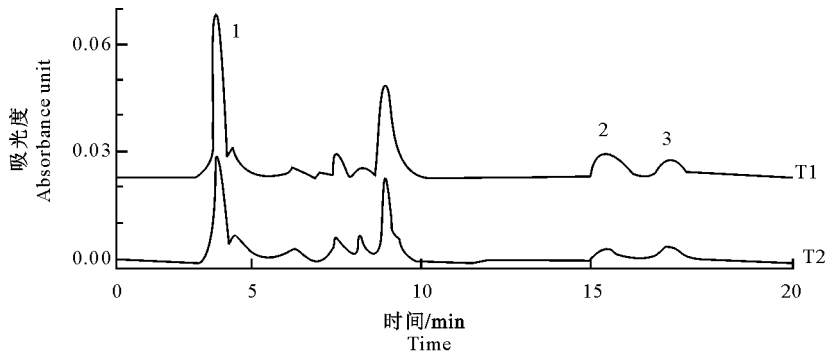


图 4 半夏供试品 T1 和 T2 HPLC 指纹图谱的比较

1. 葫芦巴碱;2. 鸟苷;3. 肌苷

Fig. 4 HPLC fingerprints of sample T1 and T2 of *Typhonium flagelliforme* Blume

1. Trigonelline; 2. Guanosine; 3. Inosine

3 讨 论

壳聚糖的絮凝作用在农林牧渔中的应用很广泛^[6-8],但有关其在中药材 HPLC 指纹图谱建立前处理中的应用还是首次。在 HPLC 法分析中糖分对色谱柱的损害一直被忽视,而醇沉法严重损失了提取液中的有效成分,壳聚糖絮凝法较好的解决了这一问题。

壳聚糖溶于偏酸性的溶剂,但溶剂中的酸会导致壳聚糖分解,所以壳聚糖都是现配现用^[9-11],本研究中,不同质量浓度的壳聚糖絮凝剂,加入剂量相同时,絮凝效果仍出现差异(质量浓度为 20 g/L 时最易沉淀),这说明较高质量浓度壳聚糖溶液具有较强的稳定性,不易分解,所以絮凝效果较好。

本研究中,玄参、天麻、半夏 3 种中药材加入壳聚糖絮凝剂的质量浓度和体积分别为 10 g/L 和 100 μ L(10 mL 提取液)时效果最佳,总糖含量达到要求,HPLC 指纹图谱的相似度分别达到 0.989 2、0.997 3 和 0.979 6,与醇沉法相比,壳聚糖絮凝法会使中药材的部分有效成分含量增加,这在优化提取中药材中的水溶性成分中,有一定的指导意义。

本研究中,壳聚糖絮凝剂处理后,与对照相比,玄参提取液中有效成分哈巴俄苷含量明显增加;先加壳聚糖后抽滤处理比抽滤后加壳聚糖处理的哈巴俄苷含量增加,可能是壳聚糖絮凝剂促进了玄参粉末中哈巴俄苷的溶出。玄参提取液中的成分复杂,这些成分与壳聚糖絮凝剂(主要是乙酸)共同作用,促进了提取液中环烯醚萜类前体物质的水解^[14],生成更多的哈巴俄苷。作为载体,壳聚糖对药物有增

溶缓释作用^[15-16]。而哈巴俄苷有一个肉桂酰基,可以水解出肉桂酸,加入壳聚糖絮凝剂后的弱酸环境,会促进这种水解作用的进程,但哈巴俄苷含量增高而肉桂酸含量降低,其原理需要进一步探讨。

4 结 论

作为建立 HPLC 指纹图谱的去糖方法,壳聚糖絮凝法与醇沉法相比表现出明显的优势;壳聚糖絮凝剂在其质量浓度为 10 g/L、以每 10 mL 中药材提取液中加入 100 μ L 时的效果最佳,有效成分得到了较好的保留,对糖分的去除也达到了要求,在 3 种糖分含量较高的中药材(玄参、天麻和半夏)的 HPLC 指纹图谱建立前处理过程中,具有普遍适用性。壳聚糖絮凝剂处理后,部分有效成分(哈巴俄苷、葫芦巴碱、鸟苷和肌苷)的含量升高,说明壳聚糖对这些物质的提取有一定的促进作用。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2005 年版一部 [M]. 北京:化学工业出版社,2005:76.
Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1 2005 [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 76. (in Chinese)
- [2] 杨东风,梁宗锁. 中药指纹图谱研究进展 [J]. 中国药房,2006, 18(6): 467-470.
Yang D F, Liang Z S. Research development of Chinese Medicine Fingerprint [J]. China Pharmacy, 2006, 18(6): 467-470. (in Chinese)
- [3] 王永刚,吴 忠,魏凤环,等. 中药指纹图谱研究的现状与未来 [J]. 中药材,2003, 26(11): 820-825.
Wang Y G, Wu Z, Wei F H, et al. Current situation and pros-

- pect of Chinese Medicine Fingerprint [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003, 26(11): 820-825. (in Chinese)
- [4] 陈 勇, 李页瑞, 金胤池, 等. 中药醇沉工艺及装备研究进展与思考 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9(5): 16-19.
Chen Y, Li Y R, Jin Y C, et al. Study progresses: TCM ethanol precipitation techniques and associated equipment [J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2007, 9(5): 16-19. (in Chinese)
- [5] 李淑莉, 宋志前, 刘振丽. 超滤膜截留分子量对金银花单味药超滤效果的影响及与醇沉法的比较 [J]. 中药材, 2005, 28(10): 945-947.
Li S L, Song Z Q, Liu Z L. Studies on the process of herba clinopodii saponins purified with macroporous adsorption resin [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2005, 28(10): 945-947. (in Chinese)
- [6] 王 华, 管敬喜, 杨 莹. 壳聚糖对桑葚汁澄清度及理化成分的影响 [J]. 酿酒科技, 2007(3): 22-24.
Wang H, Guang J X, Yang Y. Effects of chitosan on the clarity and the compositions of mulberry juice [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007(3): 22-24. (in Chinese)
- [7] 龙仲涛, 黄永兴, 陈禧翎. 壳聚糖用于金银花等絮凝澄清研究 [J]. 药物研究, 2007, 13(23): 81-83.
Long Z T, Huang Y X, Chen X L. Study on clarification process of flosloniceræ japonicæ and fructus gardeniæ by Chitosan [J]. Drug Research, 2007, 13(23): 81-83. (in Chinese)
- [8] 张建伟, 范红伟. 壳聚糖对银杏叶水提液的絮凝工艺研究 [J]. 化学工程, 2008, 36(2): 71-74.
Zhang J W, Fan H W. Study on flocculation of water-extraction solution of ginkgo leaves with chitosan [J]. Chemical Engineering, 2008, 36(2): 71-74. (in Chinese)
- [9] 花蓉蓉, 周恭明, 曹大伟. 壳聚糖的絮凝性能研究进展 [J]. 化工进展, 2008, 27(3): 335-339.
Hua R R, Zhou G M, Cao D W. Research advances in flocculation properties of chitosan [J]. Chemical Industry And Engineering Progress, 2008, 27(3): 335-339. (in Chinese)
- [10] 祝连彩, 王伯初. 壳聚糖在中药药液澄清中的应用 [J]. 重庆大学学报, 2003, 26(12): 55-57.
Zhu L C, Wang B C. Application of chitosan to technology of clarification for Chinese traditional medicine extraction [J]. Journal of Chongqing University, 2003, 26(12): 55-57. (in Chinese)
- [11] 周庆芬, 林 军, 刘冬生. 壳聚糖澄清吸附作用的研究进展 [J]. 中国药业, 2003, 12(5): 76-77.
Zhou Q F, Lin J, Liu D S. Research advances in flocculation properties of chitosan [J]. China Pharmaceuticals, 2003, 12(5): 76-77. (in Chinese)
- [12] 陈毓荃. 生物化学实验方法与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 171-174.
Chen L Q. Biochemical experimental methods and techniques [M]. Beijing: Science Press, 2002: 171-174. (in Chinese)
- [13] 梁宗锁, 杨东风. 中药指纹图谱相似性评价研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(5): 55-59.
Liang Z S, Yang D F. Research progress of similarity assessment of fingerprint of traditional Chinese medicine [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2006, 20(5): 55-59. (in Chinese)
- [14] 董娟娥, 张 靖. 植物中环烯醚萜类化合物研究进展 [J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 131-135.
Dong J E, Zhang J. Advances in the research of iridoids occurring in plants [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19(3): 131-135. (in Chinese)
- [15] Zhao H R, Wang K, Zhao Y, et al. Novel sustained-release implant of herb extract using chitosan [J]. Biomaterials, 2002, 23: 4459-4462.
- [16] Soo P L, Cho J, Grant J, et al. Drug release mechanism of paclitaxel from a chitosan-lipid implant system: Effect of swelling, degradation and morphology [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, 69: 149-157.