

炒莱菔子中含芥子碱部位醇提工艺优选及市售样品含测分析

孟祥红, 苏永汶, 孙忠迪, 吕文海*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 对炒莱菔子中含芥子碱部位的醇提工艺进行优选, 测定 10 份市售炒莱菔子中芥子碱含量。方法: 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以芥子碱含量和醇浸膏得率为指标, 优选炒莱菔子中含芥子碱部位的醇提工艺。HPLC 测定市售炒莱菔子中芥子碱含量。结果: 确定醇提工艺为 25 倍量 75% 乙醇, 60 min 提取 1 次。不同炒莱菔子样品中芥子碱含量差异较大。结论: 优选的醇提工艺提取炒莱菔子中含芥子碱部位工艺稳定可行。对《中国药典》中芥子碱 HPLC 含测方法改进提出建议。

[关键词] 炒莱菔子; 正交试验; 芥子碱; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0005-04

Optimum Ethanol Extraction Process of Sinapine Effective-part from Roasted Semen Raphani and Determination of Commercial Samples

MENG Xiang-hong, SU Yong-wen, SUN Zhong-di, LV Wen-hai*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ethanol extraction technology of sinapine effective-part in roasted Semen Raphani and to determine the content of sinapine in Semen Raphani bought from ten different areas. **Method:** Optimum extraction process was established with $L_9(3^4)$ orthogonal design. The content of sinapine and extraction rate of extraction were chosen as indexes. The content of sinapine in commercial samples was determined by HPLC. **Result:** Optimum extraction process was as follows: 25 times of 75% alcohol, extracted 1 time for 60 minutes. The content of sinapine was different between different samples of roasted Semen Raphani. **Conclusion:** Optimized alcohol extraction process of sinapine effective-part from roasted Semen Raphani was stable and feasible. Some suggestion is raised to 《China Pharmacopoeia》 for the determination of sinapine by HPLC.

[Key words] roasted Semen Raphani; orthogonal test; sinapine; HPLC

莱菔子为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 干燥成熟种子, 具生、炒两种药用规格, 生品长于涌吐风痰, 炒品长于降气消食。莱菔子中主要含有硫代葡萄糖苷、芥子碱、脂肪油等。其中芥子碱在莱菔子中主要以芥子碱硫氰酸盐的形式存在, 研究证

实其具有显著的消炎、降压、抗腹泻、抗雄激素等药理活性^[1-3]。前期工作证实, 莱菔子炮制前后显著影响硫代葡萄糖苷类成分的含量^[4], 但对芥子碱几乎无影响^[5]。芥子碱的抗腹泻作用, 有可能影响胃肠运动, 为探讨炒莱菔子中芥子碱的提取方法, 了解其含量变化范围, 本文从药效部位层面探讨莱菔子炮制机理和制备新型炮制品, 对炒莱菔子中含芥子碱部位醇提工艺进行正交试验优选, 并对 10 份不同地区的市售炒莱菔子样品进行了芥子碱含测分析。

1 材料

药材购于鄞城良海中药饮片有限公司, 经山东中医药大学药学院生药系周凤琴教授鉴定为十字花科植物萝卜 *R. sativus* L. 的干燥成熟的种子。经优

[收稿日期] 20110519(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173554)

[第一作者] 孟祥红, 在读硕士, 从事饮片炮制理论与制备规范化研究, Tel: 0531-89623387, E-mail: mxh398@126.com

[通讯作者] * 吕文海, 教授, 从事饮片炮制理论与制备规范化研究, Tel: 0531-89628081, E-mail: luwenhaitcm@163.com

选工艺炒制^[6],粉碎过 20 目筛,石油醚索氏提取 6 h 脱脂,挥净石油醚,得脱脂粉末供优选含芥子碱部位醇提工艺。

市售炒莱菔子样品分别购于山东济南、莱州、临沂、东营、泰安、济宁、菏泽、河北石家庄、湖北随州、福建福州。经山东中医药大学药学院生药系周凤琴教授鉴定为十字花科植物萝卜 *R. sativus* L. 的干燥成熟种子。粉碎过 50 目筛,置干燥器内平衡水分后备用,供芥子碱含量分析。

乙腈为色谱纯,水为纯净水,芥子碱硫氰酸盐自制(经 IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS 测定证明为芥子碱硫氰酸盐, HPLC 面积归一化证实纯度为 99%)。

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦), Phenomenex-C₁₈(4.6 mm × 250 mm 5 μm) 色谱柱, FA1004 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司)。

2 芥子碱醇提工艺的优选

2.1 因素水平的确定 使用 65% 乙醇, 75% 乙醇, 85% 乙醇, 通过单因素考察确定乙醇体积分数为 75%。影响莱菔子中芥子碱醇提工艺的其他因素主要为提取时间、料液比例、提取次数, 以此为因素, 各选 3 个水平, 因素水平见表 1。

表 1 芥子碱醇提工艺因素水平

水平	A 料液比	B 提取时间 /min	C 提取次数 /次
1	1:15	20	1
2	1:20	40	2
3	1:25	60	3

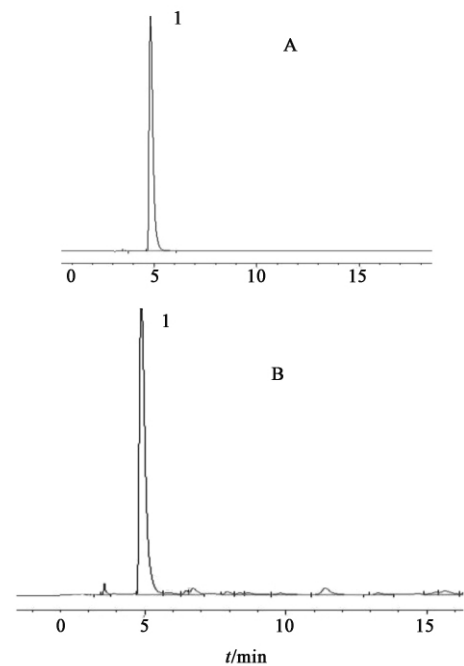
平行称取脱脂炒莱菔子粉末 9 份, 每份 10.00 g, 按照 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 过滤, 滤液减压蒸馏至小体积, 转移到干燥恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干溶剂, 称定浸膏质量, 干燥备用。

2.3 芥子碱的 HPLC 测定

2.3.1 色谱条件 Phenomenex-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm), 流动相乙腈-3% 的醋酸水溶液(15:85), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL, 检测波长 326 nm, 见图 1。

2.3.2 供试样品溶液的制备 称取干浸膏 0.2 g, 精密称定, 纯净水溶解, 定容至 100 mL 量瓶摇匀放置, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3.3 标准曲线的绘制 称量芥子碱对照品 0.020 g 定容至 100 mL 量瓶, 纯净水溶解配制成 0.20 g·L⁻¹ 对照溶液, 分别精密量取 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL 稀释



A. 对照品; B. 样品; 1. 芥子碱

图 1 炒莱菔子 HPLC

定容至 10 mL, 配制成浓度为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 g·L⁻¹ 的对照品溶液。按色谱条件进样测定, 以芥子碱含量与峰面积进行线性回归, 计算得回归方程 $Y = 58.347 + 45.997X$ ($r = 0.99998$)。可知芥子碱在 0.02 ~ 0.12 g·L⁻¹ 线性关系良好。

2.3.4 芥子碱含量的测定 取 2.3.2 项下供试品溶液, 在上述色谱条件下重复进样 3 次, 每次 20 μL, 进行定量分析, 结果见表 2, 方差分析见表 3~4。

以醇浸膏得率为考察指标, 各因素影响程度为 $C > A > B$, 提取次数对浸膏得率影响较大; 以芥子碱在浸膏中含量为考察指标, 各因素影响程度为 $A > C > B$, 考虑到经济能源及生产应用因素, 优选其提取工艺为 $A_3B_3C_1$, 即加入 25 倍量的乙醇, 60 min 提取 1 次。方差分析表明 3 个因素对芥子碱的提取均无显著性影响。

2.3.5 优选醇提工艺验证 取 3 份脱脂莱菔子粉末, 每份 10.00 g, 加入 25 倍量 75% 乙醇回流, 提取 60 min, 滤液蒸干乙醇, 称重浸膏, 计算浸膏得率分别为 23.28%, 23.53%, 24.52%, 精密称定干浸膏 0.2 g, 水转溶定容至 100 mL, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 按照 2.3.1 项下色谱条件测定样品中芥子碱质量分数分别为 2.74%, 2.76%, 2.83%。说明本实验所优选的提取工艺稳定合理。

表2 炒莱菔子中含芥子碱部位优选工艺正交试验

指标	No.	A	B	C	D	醇浸膏得率/%	芥子碱在浸膏中含量/%
	1	1	1	1	1	14.79	1.98
	2	1	2	2	2	25.92	2.21
	3	1	3	3	3	25.75	1.70
	4	2	1	2	3	23.57	2.32
	5	2	2	3	1	28.34	1.98
	6	2	3	1	2	24.84	2.66
	7	3	1	3	2	30.32	2.32
	8	3	2	1	3	23.77	2.39
	9	3	3	2	1	24.13	2.28
醇浸膏得率	K_1	66.46	68.68	63.40			
	K_2	76.75	78.03	73.62			
	K_3	78.22	74.72	84.41			
	R	11.76	9.35	21.01			
芥子碱含量	K_1	5.89	6.62	7.03			
	K_2	6.96	6.58	6.81			
	K_3	6.99	6.64	6.00			
	R	1.10	0.06	1.03			

表3 醇浸膏得率方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
A	27.371	2	13.686	0.853	>0.05
B	14.984	2	7.492	0.467	>0.05
C	73.588	2	36.794	2.293	
D	32.091	2	16.046		>0.05

注: $F_{(2,2)} = 19.00$ (表4同)。

以醇浸膏得率为考察指标,各因素影响程度为 $C > A > B$,提取次数对浸膏得率影响较大;以芥子碱在浸膏中含量为考察指标,各因素影响程度为 $A > C > B$,考虑到经济能源及生产应用因素,优选其提取工艺为 $A_3B_3C_1$,即加入25倍量的乙醇,60 min 提取1次。方差分析表明3个因素对芥子碱的提取均无显著性影响。

2.3.5 优选醇提工艺验证 取3份脱脂莱菔子粉末,每份10.00 g,加入25倍量75%乙醇回流,提取60 min,滤液蒸干乙醇,称重浸膏,计算浸膏得率分别为23.28%、23.53%、24.52%,精密称定干浸膏0.2 g,水转溶定容至100 mL,取上清液过0.45 μm 微孔滤膜,按照2.3.1项下色谱条件测定样品中芥子碱质量分数分别为2.74%、2.76%、2.83%。说明

表4 芥子碱含量方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
A	0.262	2	0.131	1.530	>0.05
B	0.001	2	0.000	0.004	>0.05
C	0.196	2	0.098		>0.05
D	0.171	2	0.086	1.147	

本实验所优选的提取工艺稳定合理。

3 市售炒莱菔子中芥子碱含测分析

3.1 供试样品溶液的制备 参照2010年版《中国药典》以及相关文献^[7],取样品粉末(50目筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率250 W,频率50 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀滤过,蒸干甲醇,残渣用水溶解并定容至50 mL量瓶中,摇匀,过0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液进样20 μL ,依法测定。

3.2 芥子碱 HPLC 含测方法学考察

3.2.1 线性关系考察 色谱条件同2.3.1,线性关系考察见2.3.3项下。

3.2.2 精密度试验 取2.3.3项下0.06 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芥子碱对照品溶液,按2.3.1项下色谱条件连续进样5次,RSD 1.16%,表明仪器精密度良好。

3.2.3 稳定性试验 按3.1项下方法制备供试品溶液,分别于0、0.5、1、2、4、6、8 h时按2.3.1项下色谱条件进样,RSD 2.34%,表明供试品在制备8 h内稳定性良好。

3.2.4 重复性试验 按3.1项下方法,平行制备供试品溶液5份,并按2.3.1项下色谱条件进样,计算其平均质量分数为0.4621%,RSD 1.71%,表明方法的重复性良好。

3.2.5 加样回收试验 精密称取5份已知质量分数(为0.44%)的炒莱菔子样品各0.5 g,分别精密加入一定量芥子碱对照品,按照样品测定方法处理测定,计算加样回收率,回收率平均值为99.07%,RSD 1.99%。

4 讨论

炒莱菔子中脂肪油含量高达45%^[8],在传统水煎剂中,脂肪油利用率极低,脱脂处理,可集中获取炒莱菔子中的脂肪油部位,为综合利用提供条件,又有利于含芥子碱部位的提取。正交试验醇浸膏得率在23%左右,其中芥子碱质量分数达2.7%,是《中

表 6 芥子碱 HPLC 含测加样回收试验

No.	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	2.19	2.20	4.34	97.72	99.08	1.99
2	2.20	2.13	4.29	98.12		
3	2.23	2.19	4.36	97.26		
4	1.94	2.17	4.12	100.46		
5	2.15	2.18	4.37	101.83		
6	2.13	2.19	4.35	101.37		

表 7 市售莱菔子中芥子碱含量测定 (n=3) %

供试样品	芥子碱含量	RSD
莱州	0.53	2.72
济南	0.56	1.95
石家庄	0.42	2.35
临沂	0.27	2.81
东营	0.29	2.63
泰安	0.35	2.47
济宁	0.44	2.11
菏泽	0.26	2.29
随州	0.34	2.08
福州	0.46	2.30

《中国药典》2010 年版莱菔子项下芥子碱质量分数 0.4% 的近 7 倍, 可达到有效富集芥子碱的目的, 且提取工艺稳定可靠。为对富含芥子碱部位的进一步研究奠定了基础。使用新建的 HPLC 分析方法测定 10 地市售炒莱菔子中芥子碱含量表明, 不同样品中

芥子碱含量差异较大, 变化在 0.26% ~ 0.56%, 有 5 份样品低于《中国药典》2010 年版莱菔子药材中芥子碱不得低于 0.4% 的限量要求。

《中国药典》2010 年版莱菔子项下 HPLC 含量测定要求使用苯基硅烷基键合硅胶柱, 成本较高, 本研究使用价廉易得的 C₁₈ 色谱柱测定莱菔子中芥子碱含量, 方法稳定可靠, 精密度好, 可降低分析成本, 建议予以推广使用。

[参考文献]

- [1] 张明发, 沈雅琴. 芥子碱的抗炎和抗腹泻作用[J]. 中药药理与临床, 1996(1): 29.
- [2] 李晶, 石卓, 赵丽娟, 等. 芥子碱硫酸盐对自发性高血压大鼠血压和心率的影响[J]. 吉林中医药, 2002, 22(6): 55.
- [3] 吴国欣, 林跃鑫, 欧敏锐, 等. 芥子碱的抗雄激素作用[J]. 中国医药学报, 2003, 18(3): 142.
- [4] 吕文海, 任涛, 苏永汶, 等. 炮制抑制莱菔子中萝卜苷酶解转化的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 980.
- [5] 谭鹏. 莱菔子炮制工艺与质量控制方法研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2005.
- [6] 任涛, 吕文海. 以硫代葡萄糖苷相对含量优选莱菔子炮制工艺研究[J]. 中成药, 2010, 32(7): 1159.
- [7] 刘丽芳, 王宇新, 张新勇, 等. 莱菔子中芥子碱含量的测定[J]. 中成药, 2002, 24(1): 52.
- [8] 王威, 王永奇. 气相色谱-质谱联用技术在中草药脂肪油化学成分研究中的应用[J]. 中草药, 1998, 29(6): 420.

[责任编辑 仝燕]