

脱脂炒莱菔子提取物 HPLC 指纹图谱

刘梅,李书云,吕文海*
(山东中医药大学,济南 250355)

〔摘要〕 目的:建立脱脂炒莱菔子提取物的 HPLC 指纹图谱。方法:依利特 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~28 min,5%~30% A;28~30 min,30%~70% A;30~51 min,70%~88% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 225 nm,柱温 30 ℃。结果:建立了脱脂炒莱菔子提取物的 HPLC 指纹图谱,共标示出 10 个共有峰;不同产地脱脂炒莱菔子提取物的 HPLC 指纹图谱相似度>0.96。结论:该方法准确稳定,重复性好,可为脱脂炒莱菔子提取物的定性鉴别提供依据。

〔关键词〕 脱脂炒莱菔子提取物;高效液相色谱;指纹图谱

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)05-0071-04

〔doi〕 10.11653/syfy2014050071

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1418.017.html>

〔网络出版时间〕 2013-12-18 14:18

HPLC Fingerprint of the Extract of Physical Defatted
Roasted Raphani Semen

LIU Mei, LI Shu-yun, LV Wen-hai*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

〔收稿日期〕 20130306(020)

〔基金项目〕 国家自然科学基金面上项目(81173554)

〔第一作者〕 刘梅,硕士研究生,从事中药炮制研究,Tel:13793153591,E-mail:xiongmao0108@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

[5] 黄鑫,宋凤瑞,刘志强,等. 五味子中木脂素类成分的高效液相色谱-电喷雾质谱研究[J]. 化学学报,2008,66(9):1059.

[6] 黄文倩,李丽,肖永庆,等. HPLC 同时测定五味子中 6 种木脂素类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):63.

[7] 赵玥,王冰. 辽宁凤城地区不同生长环境五味子 5 种木脂素成分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):64.

[8] 楼招欢,吕圭源,陈素红. 南、北五味子及其炮制品中木脂素类成分比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):43.

[9] 高玲. 毛细管电泳在中药分析中的应用进展[J]. 赤峰学院学报:自然科学版,2009,25(9):102.

[10] 张丽媛. 毛细管电泳药物分析研究进展[J]. 固原师专学报:自然科学,2006,27(6):31.

[11] 吴娟芳,陈令新,罗国安,等. 毛细管电泳技术在药物分析中的应用研究进展[J]. 药学学报,2006,41(5):385.

[12] Sterbová H, Sevcíková P, Kvasnicková L, et al. Determination of lignans in *Schisandra chinensis* using micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Electrophoresis,2002, 23 (2):253.

[13] Lenka Březinová, Helena Vlašínová, Ladislav Havel. Validated method for bioactive lignans in *Schisandra chinensis in vitro* cultures using a solid phase extraction and a monolithic column application [J]. Biomed Chromatogr, 2010(24):954.

〔责任编辑 顾雪竹〕

[**Abstract**] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of the extract of physical defatted roasted Raphani Semen. **Method:** Yilit Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used; flow rate was 1.0 mL · min⁻¹; column temperature was kept at 30 ℃; the mobile phase was composed of acetonitrile (A) -0.1% H₃PO₄ (B) with gradient elution. The concentrations of solvent A were 5% , 30% , 70% and 88% at 0, 28, 30, 51 min respectively. **Result:** The HPLC fingerprint of the extract of physical defatted roasted Raphani Semen was set up, showing 10 characteristic peaks. The HPLC fingerprint similarity of the extract of physical defatted roasted Raphani Semen from ten different growing areas is greater than 0.96. **Conclusion:** This method is stable, accurate with a good reproducibility and can be used to evaluate the qualitative identification of the extract of physical defatted roasted Raphani Semen.

[**Key words**] extract of physical defatted roasted Raphani Semen; HPLC; fingerprint

莱菔子又名萝卜子,为十字花科植物萝卜的干燥成熟种子^[1]。莱菔子作为常用中药,临床中主用炒制品,以使其性降,突出消食除胀、降气化痰之效^[2]。现代研究证明,莱菔子含有多种成分,如硫苷类、脂肪酸类、生物碱类、黄酮类、多糖和蛋白质类等^[3]。前期系列研究证明,规范炒制可抑制莱菔子所含硫代葡萄糖苷类分解酶的活性,防止萝卜苷在煎煮过程中的分解,并使其气味和挥发性成分发生系列的质变^[4-6],对芥子碱硫氰酸盐的影响不大^[7]。将炒莱菔子经物理方法脱脂^[8],可有效富集药效成分萝卜苷和芥子碱的含量,并可进一步提高其内在质量的稳定性。

本文分别收集 10 个不同产地莱菔子饮片,经规范炒制^[9]、脱脂、水提、精制工艺,制成脱脂炒莱菔子提取物。实验室前期建立了莱菔子主成分萝卜苷和芥子碱的含量测定方法^[10],在此基础上对脱脂炒莱菔子提取物进行了指纹图谱研究,以期从多成分角度确定其鉴别方法,为全面评价脱脂炒莱菔子提取物的质量和进一步合理应用提供依据。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪及化学工作站(美国 安捷伦科技有限公司),中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版(国家药典委员会),KQ-250E 型医用超声波清洗仪(江苏省昆山市超声仪器有限公司),FA1004 型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司)。

乙腈(山东禹王实业有限公司,批号 2012100706),磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20100720)为色谱纯,娃哈哈纯净水(济南娃哈哈饮料有限公司,批号 20121208),使用前均经 0.45 μm 滤膜滤过,其他试剂为分析纯。

脱脂炒莱菔子提取物 收集了 10 个不同产地的莱菔子饮片,来源见表 1。其中同仁堂样品为炒

品,其余为生品。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 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子。除同仁堂样品外,其余 9 产地样品用优选工艺^[9]规范炮制成炒莱菔子。经物理脱脂,获得脱脂炒莱菔子。取脱脂炒莱菔子粉,加水提取 3 次,滤过,合并滤液,滤液减压浓缩至规定密度,放冷,加乙醇沉淀,取上清液,减压回收乙醇,并浓缩至稠膏,真空干燥,即得脱脂炒莱菔子提取物。10 产地脱脂炒莱菔子提取物干膏得率平均为 18.9%,萝卜苷转移率约为 79.75%。

表 1 10 产地莱菔子样品来源

No.	产地	采集时间
S1	山东临沂	2012-01
S2	山东莱州	2011-11
S3	河北安国	2012-03
S4	宁夏石嘴山	2012-03
S5	广西	2011-09
S6	贵州	2012-01
S7	四川	2011-09
S8	黑龙江	2011-12
S9	安徽亳州	2011-11
S10	北京同仁堂	2012-03

芥子碱对照品,自制(经 IR,¹H-NMR,¹³C-NMR,测定证明为芥子碱硫氰酸盐,HPLC 面积归一化法证实纯度为 99%)。

萝卜苷对照品,自制(经 MS,¹H-NMR,¹³C-NMR,测定证明为萝卜苷,HPLC 面积归一化法证实纯度 >92%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

依利特-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 28 min,5% ~ 30% A;28 ~ 30

min,30% ~ 70% A;30 ~ 51 min,70% ~ 88% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 20 μL,检测波长 225 nm,分析时间 51 min。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取萝卜苷、芥子碱对照品适量,加纯净水制成每 1 mL 各含 0.25,0.03 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取脱脂炒莱菔子提取物约 0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入纯净水 250 mL,密塞,称重,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)20 min,放冷,称重,用纯净水补足失重,摇匀,取适量 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

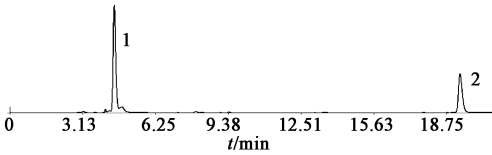
2.4 精密度试验 取四川产地供试品溶液,连续进样 6 次,计算各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 <3%,相对峰面积的 RSD 均 <5%,显示精密度良好,符合指纹图谱的要求^[11]。

2.5 稳定性试验 取四川产地供试品溶液,分别在 0,2,4,6,8 h 进样,计算各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 <5%,相对峰面积的 RSD 均 <5%,显示样品在 8 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 取四川产地脱脂炒莱菔子提取物同一批次 6 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,进样,计算各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 <5%,相对峰面积的 RSD 均 <5%,显示重复性良好。

2.7 指纹图谱的分析及评价^[12]

2.7.1 脱脂炒莱菔子提取物指纹图谱的建立 精密吸取 2.2 项下的对照品溶液及 2.3 项下制备的供试品溶液各 20 μL,按 2.1 项下的色谱条件分别进样,进行分析测定,建立样品 HPLC 色谱图。对照品图谱见图 1,10 产地指纹图谱见图 2。



1. 萝卜苷; 2. 芥子碱
图 1 对照品溶液 HPLC

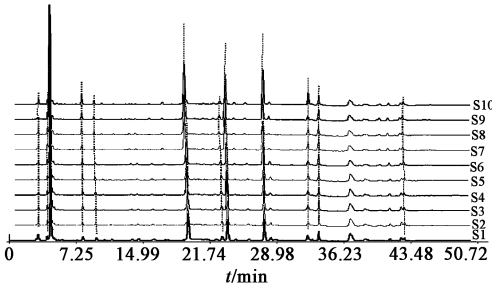


图 2 脱脂炒莱菔子提取物指纹图谱

2.7.2 脱脂炒莱菔子提取物对照指纹图谱的建立 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”对 10 产地脱脂炒莱菔子提取物指纹图谱进行评价,采用自动匹配和中位数法生成对照指纹图谱,见图 3。

2.7.3 共有峰的标定及归属 与对照品色谱图比较,确认样品指纹图谱中 1 号峰和 4 号峰分别为萝卜苷和芥子碱,见图 3。由于萝卜苷含量最高且较稳定,故将其指认为参照峰(S 峰)。比较 10 产地样品色谱图,结果表明 1 ~ 10 号峰在 10 产地脱脂炒莱菔子提取物指纹图谱中均出现,因此标定此 10 个峰为共有指纹峰,约占总峰面积的 90%。

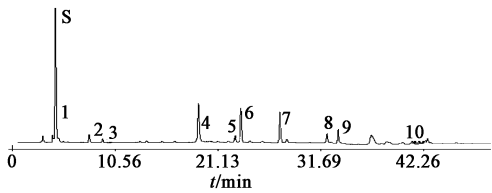


图 3 脱脂炒莱菔子提取物对照指纹图谱

2.7.4 指纹图谱相似度评价^[13] 将 10 产地脱脂炒莱菔子提取物的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”,以对照指纹图谱为标准,进行整体相似度评价,结果 10 产地样品的相似度均 >0.96,见表 2。

3 讨论

中药 HPLC 指纹图谱是一种综合、量化的鉴别手段,通过指纹特征相似程度的比较,判断真伪、评价优劣、考察稳定性和一致性,是一种符合中药特色的质量控制模式之一^[14]。目前莱菔子的药效成分尚未完全阐明,利用中药指纹图谱作为其质量控制指标是一种有效的质量控制方法。在对脱脂炒莱菔子提取物进行萝卜苷、芥子碱定量分析^[10]的基础上,建立其 HPLC 指纹图谱,可在主成分含量确定的基础上,检测成分群的综合特征,完善其质量控制,以提高脱脂炒莱菔子提取物质量的稳定性和可控性。

脱脂炒莱菔子提取物所含化学成分复杂,采用梯度洗脱的方法可使各成分得到较好的分离。通过对流动相进行考察,采用乙腈-0.1% 磷酸水系统时,基线平稳,色谱信息较丰富,各个色谱峰均实现较好分离。经 HPLC-DAD 在 200 ~ 600 nm 下进行全波长扫描,确定在 225 nm 处出峰最多且整体信号明显,因此选择 225 为检测波长。

本实验通过测定 10 产地脱脂炒莱菔子提取物

表 2 脱脂炒莱菔子提取物指纹图谱相似度评价

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	对照图谱
1	1.000	0.997	0.994	0.999	0.998	0.995	0.978	0.976	0.982	0.966	0.997
2	0.997	1.000	0.998	0.998	0.996	0.995	0.972	0.965	0.981	0.955	0.996
3	0.994	0.998	1.000	0.997	0.993	0.993	0.974	0.965	0.982	0.95	0.996
4	0.999	0.998	0.997	1.000	0.998	0.996	0.98	0.976	0.985	0.963	0.998
5	0.998	0.996	0.993	0.998	1.000	0.994	0.978	0.972	0.982	0.972	0.997
6	0.995	0.995	0.993	0.996	0.994	1.000	0.982	0.982	0.993	0.955	0.999
7	0.978	0.972	0.974	0.98	0.978	0.982	1.000	0.989	0.991	0.974	0.986
8	0.976	0.965	0.965	0.976	0.972	0.982	0.989	1.000	0.987	0.953	0.981
9	0.982	0.981	0.982	0.985	0.982	0.993	0.991	0.987	1.000	0.954	0.991
10	0.966	0.955	0.95	0.963	0.972	0.955	0.974	0.953	0.954	1.000	0.966
对照图谱	0.997	0.996	0.996	0.998	0.997	0.999	0.986	0.981	0.991	0.966	1.000

的 HPLC 指纹图谱,共标出 10 个色谱共有峰,各产地样品间稳定性较好,相似性较好,具有指纹图谱的特征意义,可用于对脱脂炒莱菔子提取物的定性鉴别,为有效控制脱脂炒莱菔子提取物的质量提供新方法。

脱脂炒莱菔子提取物的制备有利于脂肪油部位的综合利用,同时使硫苷、芥子碱等药效部位有效富集,为制备炒莱菔子精制功效饮片和组分间的功效优化配伍提供借鉴。

由于莱菔子的研究有限,我们只指出 2 个色谱峰,图谱中有些特征峰尚未确认归属,进一步的实验中我们将结合 HPLC-MS,对特征图谱中的信息进行归属定性,进而制备谱效相关图谱,以达到整体质量控制的目的。

[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,2010:255.

[2] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2005:109.

[3] 王浴生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,1983:976.

[4] 李贵海,巩海涛,刘逢琴. 炮制对莱菔子部分成分的

影响[J]. 中国中药杂志,1993, 18(2):89.

[5] 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实验研究[J]. 中国中药杂志,2011, 36(8):980.

[6] 张欣,王爱武,宿廷敏,等. 莱菔子生制品挥发性成分 GC-MS 分析[J]. 中成药,2008, 30(1):96.

[7] 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.

[8] 郑岩. 莱菔子等 5 种种子类药材炮制前后脂肪油分析及成分溶出的研究[D]. 长春:长春中医药大学,2011.

[9] 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.

[10] 苏永汶. 脱脂炒莱菔子总水提物制备工艺及质量控制方法研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2012.

[11] 屠鹏飞. 高效液相色谱法制定中药材和中药注射剂特征指纹图谱的探讨[J]. 中成药, 2000, 22(7):516.

[12] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药,2000,22(10):671.

[13] 苗爱东,孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹谱相似度计算中的应用[J]. 药学进展,2003, 27(1):51.

[14] 梁鑫淼,徐青. 中药药效组分的指纹图谱分析思路与方法[J]. 中国天然药物,2003, 1(1):57.

[责任编辑 顾雪竹]