

芥子及莱菔子饮片炮制前后物质基础变化规律分析

苏慧^{1,2}, 岳琳¹, 刘颖¹, 麻印莲¹, 于定荣¹, 霍雨佳^{1,2}, 万超^{1,2}, 李丽^{1*}, 肖永庆^{1*}
(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230038)

[摘要] 目的:建立芥子、莱菔子炒制前后以及芥子不同品种饮片的UPLC图谱,分析3种中药饮片炒制前后化学成分的变化规律。方法:采用UPLC,ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×50 mm,1.8 μm),流动相乙腈(A)-含0.08 mol·L⁻¹甲酸铵的0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min,5%~20% A;5~7 min,20% A;7~25 min,20%~25% A;25~30 min,25%~90% A),柱温35℃,进样量10 μL,流速0.3 mL·min⁻¹,检测波长254 nm。结果:白芥子与炒白芥子饮片共检出7个共有峰,白芥子炒制后主要色谱峰的峰面积发生显著变化,新生成1个色谱峰a,但其原有色谱峰8~10均消失。黄芥子生品与炒制品有10个共有峰,黄芥子炒制后部分色谱峰的峰面积显著降低,色谱峰11几乎消失。莱菔子与炒莱菔子有6个共有峰,莱菔子炒制后主要色谱峰的峰面积变化显著,色谱峰a消失,新生成2个色谱峰。通过比较白芥子、黄芥子和莱菔子的UPLC图谱,发现3种中药饮片中均归属出其共性成分芥子碱硫氰酸盐,但在主要色谱峰峰面积及数量方面存在显著差异。结论:UPLC建立芥子不同品种及莱菔子生、炒饮片的图谱能全面反映出饮片的物质基础内涵以及炮制前后物质基础的变化规律,为揭示这3种中药饮片炮制原理和进一步诠释含硫代葡萄糖苷类中药饮片炒制共性原理的科学内涵提供实验依据。

[关键词] 白芥子;黄芥子;莱菔子;饮片;超高效液相色谱仪;芥子碱硫氰酸盐

[中图分类号] R22;R283;R943.1;R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0023-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180703

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180111.1017.018.html>

[网络出版时间] 2018-01-12 11:18

Analysis on Change Law of Material Basis of Sinapis Semen and Raphani Semen Before and After Processing

SU Hui^{1,2}, YUE Lin¹, LIU Ying¹, MA Yin-lian¹, YU Ding-rong¹, HUO Yu-jia^{1,2},
WAN Chao^{1,2}, LI Li^{1*}, XIAO Yong-qing^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To establish UPLC chromatograms of different botanical origins of Sinapis Semen and Raphani Semen before and after being processed, and to study on the change law of chemical composition in three kinds of Chinese herbal pieces before and after being processed. **Method:** UPLC was used with ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column, acetonitrile-0.1% formic acid solution containing 0.08 mol·L⁻¹ ammonium formate was employed as a mobile phase in gradient elution, detection wavelength was 254 nm and flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. **Result:** Seven common peaks were observed in the raw and stir-fired decoction pieces of *Sinapis alba*, the area of main peaks of *S. alba* was significantly changed after being fried, and a new peak a was generated, but the original peak 8-10 disappeared. There were ten common peaks in *Brassica juncea* and its stir-fried product, and the area of some peaks of *B. juncea* was significantly reduced after being processed, and the

[收稿日期] 20171106(019)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473355);国家科技基础性科研专项重点项目(2014FY111100)

[第一作者] 苏慧,在读硕士,从事中药炮制及质量评价研究,E-mail:463228043@qq.com

[通信作者] *李丽,博士,研究员,从事中药炮制及质量评价研究,Tel:010-84040221,E-mail:lili7755@163.com;

*肖永庆,研究员,博士生导师,从事中药炮制及质量评价研究,Tel:010-84040221,E-mail:x.heqi@163.com

peak 11 almost disappeared. There are six common peaks in the raw and stir-fired decoction pieces of Raphani Semen, and the area of main peaks of Raphani Semen was significant changed after being processed, and the peak a disappeared, and 2 new peaks were formed. By analyzing UPLC chromatograms of Sinapis Semen and Raphani Semen, all these three Chinese medicine decoction pieces belonged to sinapine thiocyanate, but there were significant differences in area and number of main peaks. **Conclusion:** UPLC chromatograms of Sinapis Semen and Raphani Semen can comprehensively reflect the material basis of decoction pieces, as well as their change law before and after processing, it provides experimental basis to reveal processing principle of the three Chinese medicine decoction pieces, and to further interpret the scientific connotation of processing generic principles of Chinese medicine decoction pieces containing glucosinolates.

[**Key words**] *Sinapis alba*; *Brassica juncea*; Raphani Semen; decoction pieces; ultra performance liquid chromatograph; sinapine thiocyanate

中药饮片所含化学成分众多,不同中药往往含有相同或相似的成分,因而在生物活性和临床应用方面也有着一定的相似之处。硫代葡萄糖苷(glucosinolates, GS) 又称芥子油苷,简称硫苷,是植物中一类特有的次生代谢产物,广泛存在于十字花科植物中,具有较好的抗癌^[1-3]、抗肿瘤^[4]、抗菌^[5-6]等活性。该类化合物多与植物细胞质中的硫代葡萄糖苷酶(芥子酶)共存。当植物受到机械损伤、昆虫咬噬等破坏时,芥子酶即被释放,导致硫代葡萄糖苷的催化水解,生成一系列具有生物活性的降解产物。

白芥子、黄芥子和莱菔子均来源于十字花科,是含硫代葡萄糖苷类活性成分的代表性中药,这 3 种药材的生品具有较强的刺激性,一般不内服;炒制后均具有较好的镇咳、祛痰及平喘作用。这些相似之处提示,上述 3 种具有相似物质基础和炮制功效的中药饮片,其炮制原理必然有着相似之处。目前有关三者炮制原理的阐述均归结于“杀酶保苷”,实质上这只是从化学研究角度对炮制过程中化学成分变化的一种直观表述,并不能完全体现其炮制原理的科学内涵,特别是缺乏对其炮制共性原理的研究。本实验以白芥子、黄芥子及莱菔子为研究对象,对其炒制前后化学成分的变化情况进行分析,通过 UPLC 特征图谱的建立,探讨其共性物质基础的变化规律,为进一步揭示其炮制共性原理奠定基础。

1 材料

ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),FA2204B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),XS105 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。白芥子和炒白芥子、黄芥子和炒黄芥子、莱菔子和炒莱菔子饮片各 10 批,购自北京盛世龙药业有限公司等企业,经中国中医科学院中药研究所肖永庆研究员鉴定分别为十字花科植

物白芥 *Sinapis alba*, 芥 *Brassica juncea* 和萝卜 *Raphanus sativus* 的干燥成熟种子及其炮制品;芥子碱硫氰酸盐对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-17032910,纯度 99.45%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm),流动相乙腈(A)-含 0.08 mol·L⁻¹ 甲酸铵的 0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% ~ 20% A; 5 ~ 7 min, 20% A; 7 ~ 25 min, 20% ~ 25% A; 25 ~ 30 min, 25% ~ 90% A),柱温 35 °C,进样量 10 μL,流速 0.3 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芥子碱硫氰酸盐对照品适量,加 50% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中,制成质量浓度为 0.528 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取饮片粉末(过三号筛)0.5 g,置 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 20 mL,称定质量,超声处理 20 min,取出,放冷,加 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 精密称取白芥子、黄芥子、莱菔子饮片粉末各 0.5 g,按 2.3 项下方法分别制成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算各特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 精密称取同批白芥子、黄芥子、莱菔子饮片粉末各 6 份,每份 0.5 g,按 2.3 项下方法分别制成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算各特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%,

相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 精密称取白芥子、黄芥子、莱菔子饮片粉末各 0.5 g, 按 2.3 项下方法分别制成供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算各特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5 芥子与莱菔子生品、炒制品的 UPLC 比较 分别精密吸取 10 批白芥子和炒白芥子、黄芥子和炒黄芥子、莱菔子和炒莱菔子供试品溶液各 10 μ L, 按 2.1 项下色谱条件测定, 对上述 6 种中药饮片的 UPLC 进行分析并分别建立了饮片对照图谱, 见图 1~3。

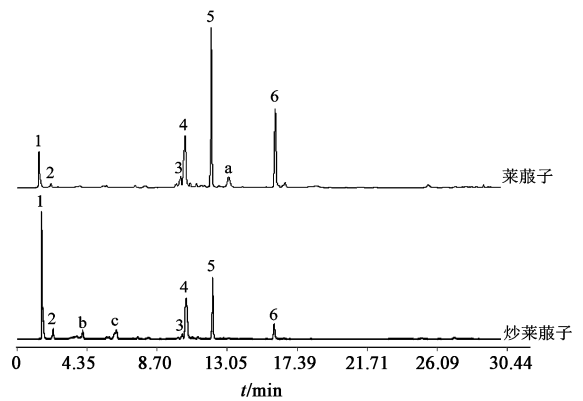


图 3 莱菔子和炒莱菔子的 UPLC 比较
Fig. 3 Comparison on UPLC chromatograms between raw and stir-fried decoction pieces of Raphani Semen

现在保留时间 20~30 min, 其中, 保留时间在 21 min 左右的峰 8~9, 经炒制后峰面积显著降低, 此外, 峰 11 为黄芥子生品中的特有成分, 可作为二者专属性识别的关键指标。莱菔子及炒莱菔子有 6 个共有峰, 炒制后除色谱峰 3, 4 的变化幅度较小外, 炒莱菔子饮片色谱峰 1, 5, 6 的峰面积均变化显著, 分别约为生品的 3, 0.5, 0.3 倍。此外, 莱菔子炒制后, 生品中的色谱峰 a 消失, 新增了色谱峰 b 和 c。

2.6 白芥子、黄芥子和莱菔子 3 种饮片的 UPLC 比较 通过分析 3 种中药饮片的 UPLC, 发现白芥子、黄芥子和莱菔子的 UPLC 谱有显著差异。白芥子和黄芥子中均以芥子碱硫氰酸盐(色谱峰 d)为主要成分, 炒制后该成分的峰面积略有降低。白芥子中除含有芥子碱硫氰酸盐外, 还有 8 个相对峰面积较大的主要色谱峰, 而黄芥子特征图谱中余下的色谱峰面积所占比例相对较小。莱菔子中也含有芥子碱硫氰酸盐, 但其峰面积远远低于保留时间 12 min 和 16 min 左右的 2 个色谱峰。另外, 对比白芥子和莱菔子炒制前后 UPLC 特征谱的变化, 发现生品中的小极性成分(白芥子色谱峰 10, 9; 莱菔子色谱峰 5, 6)在炒制后峰面积均显著降低, 甚至消失, 而大极性成分(白芥子色谱峰 1; 莱菔子色谱峰 1)的峰面积显著增加, 并有新的大极性成分生成(炒白芥子中色谱峰 a; 炒莱菔子中色谱峰 b, c), 见图 4。

3 讨论

在查阅文献的基础上^[7-9], 本文考察了水, 甲醇, 30% 甲醇, 50% 甲醇, 70% 甲醇等提取溶剂的提取效果, 结果发现以甲醇为溶剂提取时, 3 种中药饮片图谱中色谱峰数量较少, 而以水为提取溶剂则会使主要色谱峰的稳定性大大降低, 以不同体积分数甲醇作提取溶剂, 3 种中药饮片的特征图谱较为相

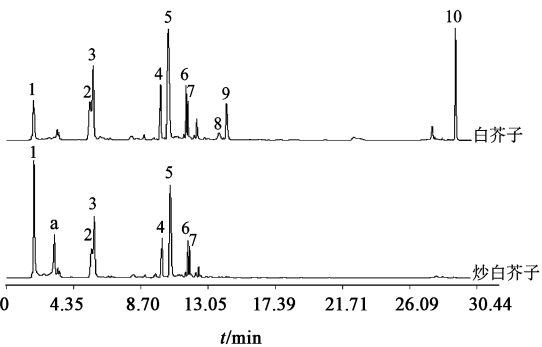


图 1 白芥子和炒白芥子饮片的 UPLC 比较
Fig. 1 Comparison on UPLC chromatograms between raw and stir-fried decoction pieces of Sinapis alba

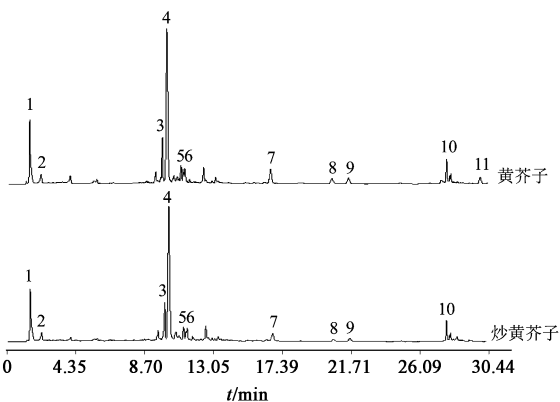
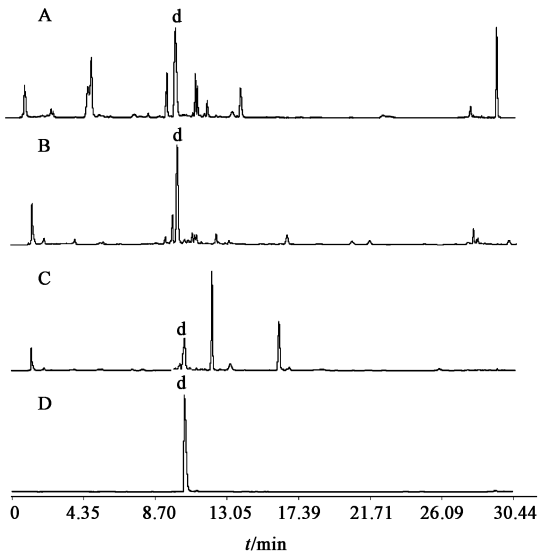


图 2 黄芥子和炒黄芥子饮片的 UPLC 比较
Fig. 2 Comparison on UPLC chromatograms between Brassica juncea and its stir-fried product

由图 1~3 可知, 白芥子与炒白芥子饮片中共检出 7 个共有峰, 白芥子炒制后 1 号色谱峰面积显著增加, 约为生品的 2.5 倍, 但其原有色谱峰 8~10 均已消失; 此外, 炒制后新生成了 1 个色谱峰 a。黄芥子生品与炒制品有 10 个共有峰, 二者的差异主要体



A. 白芥子; B. 黄芥子; C. 莱菔子; D. 对照品; d. 芥子碱硫氰酸盐

图4 芥子及莱菔子饮片的UPLC比较

Fig. 4 Comparison on UPLC chromatograms among Sinapis Semen and Raphani Semen decoction pieces

近,但以50%甲醇为提取溶剂时,各色谱峰的稳定性较好,且能较全面地反映出饮片炒制前后的化学成分特征,故最终采用50%甲醇为提取溶剂。采用全波长扫描样品,在检测波长254 nm处,发现白芥子、黄芥子和莱菔子的色谱峰数量较多,可以明显看出在保留时间3~8 min内和11 min之后3种中药饮片UPLC图谱的差异,从而达到鉴别的目的。同时,通过比较芥子不同品种及莱菔子生品、炒制品饮片的图谱,发现饮片炮制前后各主要成分的变化规律。在所建立的色谱条件下,基线平稳,各主要色谱峰分离较好。

本文采用UPLC建立了十字花科中药白芥子、黄芥子和莱菔子的特征图谱鉴别方法,并应用于其生品、炒制品饮片的鉴别。与HPLC相比,在保持较高精密度的同时缩短了样品的分析时间,且提高了分离效率、减少了溶剂的损耗,结果能够同时得到3种饮片中大部分化学成分的信息。通过综合分析3种中药饮片及其炮制前后的UPLC图谱可知,白芥子、黄芥子和莱菔子虽为含有相似化学成分的同科植物,但其主要化学成分的组成还是存在较为显著的差异。3种中药均含有硫代葡萄糖苷类成分,并

均以芥子碱硫氰酸盐为2015年版《中国药典》规定的定量指标,但在3种中药及其炮制饮片中该成分所占比例有着显著的差异。同时还发现,3种中药饮片炒制后芥子碱硫氰酸盐的峰面积虽略有降低,但差异并不显著,而生品中所含的小极性成分峰面积却显著降低,甚至消失,大极性成分的峰面积显著增加,并伴有新的成分生成。由此可以推测,这两类成分间可能存在着相互转化的关系,而且芥子和莱菔子炒制后功效的改变可能主要源于这两类成分间的转化以及芥子碱硫氰酸盐与这些成分量比关系的变化。因此,芥子及莱菔子饮片的炒制原理除了“杀酶保苷”以外,还在于饮片中不同极性成分的相对改变,要证实本文的推测还需进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] 张小林. 萝卜硫烷的研究进展[J]. 化工中间体, 2008, 4(3): 20-23.
- [2] 汪俏梅, Abel S. 异硫代氰酸盐的抗癌机理及其相关研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2002, 24(3): 171-175.
- [3] Kim M K, Park J H. Conference on "Multidisciplinary approaches to nutritional problems". Symposium on "Nutrition and health". Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence [J]. Proc Nutr Soc, 2009, 68(1): 103-110.
- [4] 陈楠, 任玲燕, 戴传云. 两种异硫氰酸酯抗肿瘤的研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 241-244.
- [5] Snow E T. Effects of chromium on DNA replication *in vitro* [J]. Environ Health Perspect, 1994, 102 (Suppl 3): 41-44.
- [6] Beskid M, Jachimowicz J, Taraszewska A, et al. Histological and ultrastructural changes in the rat brain following systemic administration of picolinic acid [J]. Exp Toxicol Pathol, 1995, 47(1): 25-30.
- [7] 张村, 李丽, 肖永庆, 等. 白芥子炒制前后 HPLC 指纹图谱的比较分析 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2842-2845.
- [8] 夏青松, 卢金清, 黎强. HS-SPME-GC-MS 联用分析炒制前后莱菔子中挥发性成分变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 57-61.
- [9] 张村, 李丽, 肖永庆, 等. 白芥子饮片的质量评价研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 30-32.

[责任编辑 刘德文]