

HPLC法同时测定莱菔子中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的含量^Δ

高荣凯*,关亮俊,任海东,王敏,李琦,张宏桂[#](北京中医药大学中药学院,北京 102488)

中图分类号 R917;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)21-2898-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.21.05

摘要 目的:建立同时测定莱菔子中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Welch Ultimate LP-C₁₈,流动相为甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为235 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μL。采用建立的方法测定5个产地共15批样品中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的含量。结果:萝卜硫苷、4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷进样量分别在0.248~3.960、0.903~14.442 μg($r \geq 0.999 6$)范围内线性关系良好;检测限分别为0.009 9、0.003 5 μg,定量限分别为0.024 8、0.008 9 μg;精密度、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均 $< 2\%$ ($n=6$);平均回收率分别为99.83%、100.40%(RSD分别为1.42%、1.50%, $n=6$)。在安徽、甘肃、河北、山东、云南5个产地共15批的莱菔子中,萝卜硫苷的平均含量分别为1.881、5.120、3.634、3.237、2.856 mg/g($n=3$);4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的平均含量分别为37.561、46.389、40.136、37.000、41.101 mg/g($n=3$)。结论:所建立的含量测定方法简便、准确、重现性好,可用于莱菔子中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷含量的同时测定;5个产地莱菔子样品中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的平均含量均以甘肃产最高。

关键词 莱菔子;高效液相色谱法;萝卜硫苷;4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷;含量测定;产地

Simultaneous Determination of Glucoraphanin and 4-methylsulfoyl-3-butenyl Glucosinolate in the Seeds of *Raphanus sativus* by HPLC

GAO Rongkai, GUAN Liangjun, REN Haidong, WANG Min, LI Qi, ZHANG Honggui (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of TCM, Beijing 102488, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of glucoraphanin and 4-methylsulfoyl-3-butenyl glucosinolate in the seeds of *Raphanus sativus*. METHODS: HPLC was adopted. The determination was performed on Welch Ultimate LP-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.05 mol/L monobasic potassium phosphate (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 235 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. The established method was used to determine the contents of glucoraphanin and 4-methylsulfoyl-3-butenyl glucosinolate in 15 batches of samples from 5 producing areas. RESULTS: The linear range of glucoraphanin and 4-methylsulfoyl-3-butenyl glucosinolate were 0.248-3.960 and 0.903-14.442 μg ($r \geq 0.999 6$), respectively. The detection limits were 0.009 9 and 0.003 5 μg, and limits of quantitation were 0.024 8 and 0.008 9 μg, respectively. RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were all lower than 2% ($n=6$). The average recoveries were 99.83% and 100.40% (RSD=1.42%, 1.50%, $n=6$). The average contents of 15 batches of glucoraphanin in the seeds of *R. sativus* from producing areas (Anhui, Gansu, Hebei, Shandong, Yunnan) were 1.881, 5.120, 3.634, 3.237 and 2.856 mg/g ($n=3$). Average contents of 4-methylsulfoyl-3-butenyl glucosinolate were 37.561, 46.389, 40.136, 37.000, 41.101 mg/g ($n=3$). CONCLUSIONS: The established method is simple, accurate and repeatable, which can be used for content determination of glucoraphanin and 4-methylsulfoyl-3-butenyl glucosinolate in the seeds of *R. sativus*. Among samples of 5 producing areas, average contents of glucoraphanin and 4-methylsulfoyl-3-butenyl glucosinolate in the seed of *R. sativus* from Gansu province are the highest.

KEYWORDS Seeds of *Raphanus sativus*; HPLC; Glucoraphanin; 4-methylsulfoyl-3-butenyl glucosinolate; Content determination; Producing areas

莱菔子为十字花科植物萝卜(*Raphanus sativus* L.)

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31070328)

* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础。E-mail: 18364164718@163.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:中药药效物质基础。E-mail: bzy714@163.com

的干燥成熟种子,具有消食除胀、降气化痰的功效,多用于饮食停滞、脘腹胀痛、大便秘结、积滞泻痢、痰壅喘咳等症^[1]。莱菔子中异硫氰酸盐类成分莱菔硫烷是萝卜硫苷(4-甲基亚磺酰基丁基硫代葡萄糖苷)的主要酶解产物,具有很好的抗癌活性,且抗癌机制也较为清晰^[2-4]。由于莱菔硫烷的稳定性差,其较为稳定的前体成分萝卜硫

昔是一种非常好的抗癌前体药物,已经被开发为多种抗癌或抗癌产品,比如主要有效成分为萝卜硫苷的西兰花种子水提物作为2017年国家卫生和计划生育委员会公布的新食品原料已被广泛应用^[6]。萝卜硫苷主要存在于西兰花籽中,在菜蓟子中含量并不高^[6],但菜蓟子中的主要硫苷类成分4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷与萝卜硫苷结构十分相似,两者只在侧链R的结构上有一个双键的区别,4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷降解产物莱菔素也具有与莱菔硫烷类似的活性^[7-9],但有研究表明莱菔素粗提物对部分癌细胞的抑制效果不明显^[9],且抗癌机制研究较少,并不明确^[10-11],所以萝卜硫苷更具有应用和开发前景。由于西兰花籽来源较少、价格昂贵,而菜蓟子来源更加广泛、价格更加低廉,且4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷氢化加氢转化为萝卜硫苷的研究有了很大进展,主要包括化学转化法^[11-12]及生物转化法^[13]两个方面,这使得两者之间的转化更具有可行性,所以建立一种能同时快速检测菜蓟子中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷含量的方法更具有实际意义。由于硫苷类成分为含硫的阴离子亲水性化合物,特别是萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷这类大极性硫苷,在普通的反相色谱柱上的保留时间较短,得不到好的分离效果。本研究旨在建立一种能同时对菜蓟子中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷两种大极性葡萄糖硫苷类成分分析定量,且简便、快速的高效液相色谱(HPLC)法。随后用此方法对菜蓟子几个主要产地,包括甘肃、河北、云南、安徽、山东的共15批药材中2种葡萄糖硫苷类成分的含量进行测定,并对测定结果进行初步分析。萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的结构式见图1。

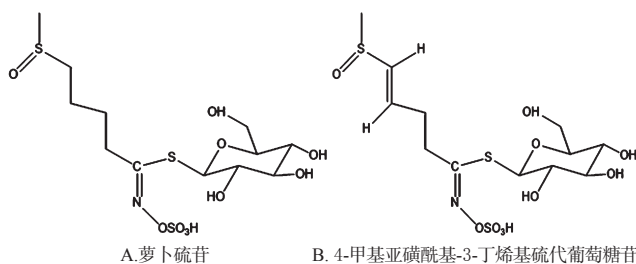


图1 萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的结构式

Fig 1 The structures of glucoraphanin and 4-methylsulfoyl-3-butenyl glucosinolate

1 材料

1.1 仪器

1525-2489 HPLC仪,包括Breeze2色谱工作站、2489紫外-可见检测器(美国Waters公司);LD5-2B低速离心机(北京京立离心机有限公司);FA1004B分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

甘肃、河北、云南、安徽、山东5个产地共15批菜蓟子药材样品(序号分别为S1~S15)均购自安国药材市场及亳州药材市场,经北京中医药大学张宏桂教授鉴定为十字花科植物萝卜*Raphanus sativus* L.的干燥成熟种子;萝卜硫苷对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号:L-030-180413,纯度:≥98.5%);4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷对照品(上海子起生物科技有限公司,批号:29510701,纯度:≥98.5%);甲醇为色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Welch Ultimate LP-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(B),梯度洗脱(1~10 min,100%→95%B;10~25 min,95%→80%B);流速:1.0 mL/min;检测波长:235 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷对照品适量,精密称定,加纯水制成质量浓度分别为0.247 5、0.902 6 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取菜蓟子样品(100 ℃烘箱中烘2 h)粉末(过40目筛)约1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入沸水30 mL,沸水水浴加热30 min,离心(4 000 r/min)10 min,取上清液,如此反复3次,纯水定容在100 mL量瓶中,摇匀,取适量溶液用0.45 μm的微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 空白溶液 取流动相适量作为空白溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,在该色谱条件下,各待测成分间、待测成分与杂质峰间均能达到基线分离,分离度大于1.5,理论板数以4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷计不低于5 000,色谱图见图2。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.5、1、2、4、6、8 mL,用纯水定容在10 mL量瓶中,即得6个不同质量浓度的对照品溶液。取适量溶液,用0.45 μm的微孔滤膜过滤后,分别精密吸取20 μL注入HPLC仪,记录峰面积。以进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归。结果,萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的回归方程分别为 $y=366\ 211x+608.16$ ($r=0.999\ 7$)、 $y=789\ 864x+63\ 620$ ($r=0.999\ 6$),表明进样量分别在0.248~3.960、0.903~14.442 μg范围内线性关系良好。

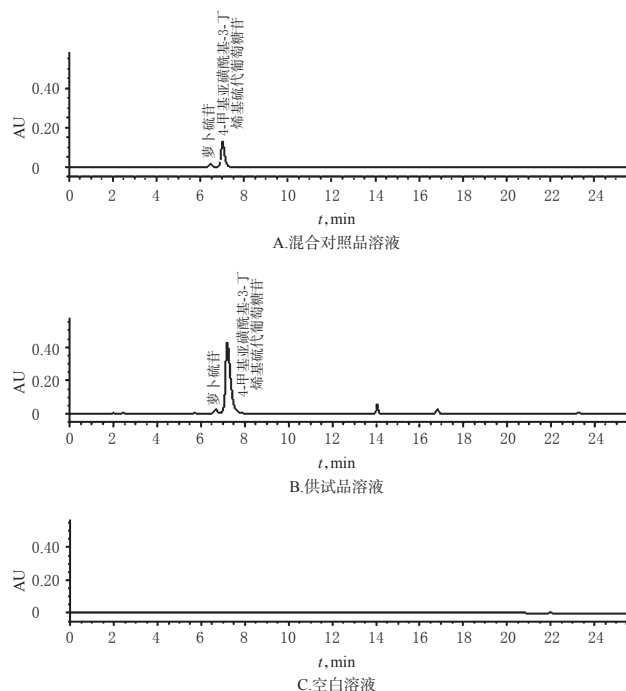


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并分别把不同质量浓度的稀释液按“2.1”项下色谱条件进样测定。当信噪比为3:1时,得检测限;当信噪比为10:1时,得定量限。结果,萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的检测限分别为0.009 9、0.003 5 μg ,定量限分别为0.024 8、0.008 9 μg 。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷峰面积的RSD分别为0.67%、0.65% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取样品序号为S6的莱菔子药材1 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷峰面积的RSD分别为0.96%、0.97% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品序号为S6的莱菔子药材6份,每份约1 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷含量的平均值分别为3.660、44.449 mg/g, RSD分别为1.77%、1.65% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收试验

精密称取样品序号为S6的莱菔子药材约0.5 g,共6份,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入一定量的萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表1。

表1 回收率结果 ($n=6$)

Tab 1 Results of recovery ($n=6$)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %		
					计算值	平均值	RSD
萝卜硫苷	0.501 2	1.834	1.832	3.693	101.47	99.83	1.42
	0.501 8	1.837	1.847	3.674	99.46		
	0.500 9	1.833	1.861	3.687	99.62		
	0.502 1	1.838	1.816	3.627	98.51		
	0.502 3	1.838	1.798	3.606	98.33		
	0.501 1	1.834	1.875	3.739	101.60		
4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷	0.501 2	22.278	22.468	45.152	101.81	100.40	1.50
	0.501 8	22.304	22.697	45.293	101.29		
	0.500 9	22.265	22.932	44.982	99.54		
	0.502 1	22.318	22.905	45.585	100.27		
	0.502 3	22.327	22.793	44.683	98.96		
	0.501 1	22.273	22.859	45.263	101.08		

2.10 样品含量测定

分别精密称取5个产地共15批药材样品粉末3份,每份约1 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果 ($n=3$, mg/g)

Tab 2 Content determination of samples ($n=3$, mg/g)

产地	样品序号	样品来源	萝卜硫苷		4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷	
			测得值	平均值	测得值	平均值
安徽	S1	亳州药材市场	1.740	1.881	32.115	37.561
安徽	S2	亳州药材市场	1.977		50.473	
安徽	S3	亳州药材市场	1.925		30.096	
甘肃	S4	安国药材市场	7.329	5.120	45.320	46.389
甘肃	S5	安国药材市场	4.372		49.397	
甘肃	S6	安国药材市场	3.660		44.449	
河北	S7	安国药材市场	3.086	3.634	41.355	40.136
河北	S8	安国药材市场	3.054		37.868	
河北	S9	安国药材市场	4.763		41.185	
山东	S10	安国药材市场	2.894	3.237	37.229	37.000
山东	S11	安国药材市场	4.514		33.418	
山东	S12	安国药材市场	2.304		40.354	
云南	S13	亳州药材市场	4.116	2.856	34.355	41.101
云南	S14	亳州药材市场	2.064		52.052	
云南	S15	亳州药材市场	2.387		36.896	

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备条件考察

3.1.1 提取方式的选择 笔者在供试品溶液制备时,提取方式选择了直接加入沸水,并在沸水中水浴加热提取的方法,主要因为多数文献在制备硫苷用于分析定量时均采用沸水提取^[14-15],也有文献证明沸水是更好的硫苷提取溶剂^[16]。有研究表明,在45℃或室温条件下黑芥子酶酶解4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的速率最高,但过高的温度会使酶的活性降低^[9]。所以,直接

加入沸水既减少了葡萄糖硫苷类成分在水升温过程中被黑芥子酶酶解的损失,还能节约提取时间。

3.1.2 料液比的选择 笔者在试验中考察了20、30、40、50、60共5个提取溶剂倍量,含量测定结果表明,萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的含量在溶剂倍量为30之前随提取溶剂倍量增加而增加,当溶剂倍量 ≥ 30 时,2个目标成分的含量均无显著增加,故提取溶剂倍量选择30。

3.1.3 提取时间的选择 笔者在试验中考察了15、30、45、60 min共4个提取时间,结果发现,在提取时间 ≥ 30 min时,2个目标成分的含量无显著增加,故提取时间选择30 min。

3.1.4 提取次数的选择 笔者在试验中考察了2、3、4次共3个提取次数,结果发现,提取次数为3次及以上时,2个目标成分的含量无显著增加,故提取次数选择3次。

3.2 检测波长和色谱柱的选择

在关于萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷分析的多数文献中,检测波长均选择了235 nm^[14-15,17],本文也以235 nm作为检测波长。本文分析的2种葡萄糖硫苷属于极性大的硫苷,普通的反相色谱柱不能实现两者的分离,本文选择的Welch Ultimate LP-C₁₈色谱柱可以用纯水冲洗,增大了分离样品的极性范围,在调整好流动相后,萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷两者的分离度大于1.5,分离效果良好。

3.3 不同产地样品中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷含量测定结果分析

本文建立了同时测定菜菔子中萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷含量的HPLC法,并对5个产地共15批样品中两者的含量进行了测定。结果显示,在安徽、甘肃、河北、山东、云南5个产地中,萝卜硫苷和4-甲基亚磺酰基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷的含量均以甘肃产菜菔子最高。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:272-273.

[2] MUNDAY R, MUNDAY CM. Selective induction of phase II enzymes in the urinary bladder of rats by allyl isothiocyanate, a compound derived from Brassica vegetables[J]. *Nutr Cancer*, 2002, 44(1): 52-59.

[3] JUGE N, MITHEN RF, TRAKA M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(9): 1105-1127.

[4] CLARKE JD, DASHWOOD RH, HO E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(2): 291-304.

[5] 国家卫生和计划生育委员会.解读《乳木果油等10种新

食品原料的公告》[EB/OL].(2017-06-09)[2018-06-06].
<http://www.nhfpc.gov.cn/zwgk/jdjd/201706/92a2559116-1546e3914ebc02cb52b11b.shtml?winzoom=1>.

- [6] WEST LG, MEYER KA, BALCH BA, et al. Glucoraphanin and 4-hydroxyglucobrassicin contents in seeds of 59 cultivars of broccoli, raab, kohlrabi, radish, cauliflower, brussels sprouts, kale, and cabbage[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(4): 916-926.
- [7] SHISHU, INDUPAL K. Inhibition of cooked food-induced mutagenesis by dietary constituents: comparison of two natural isothiocyanates[J]. *Food Chem*, 2009, 112(4): 977-981.
- [8] PAPI A, ORLANDI M, BARTOLINI G, et al. Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) sprouts[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(3): 875-883.
- [9] 陈阳.基于菜菔素的现代五类中药的制备及其药理毒理初步研究[D].北京:北京化工大学,2015.
- [10] POSNER GH, CHO CG, GREEN JV, et al. Design and synthesis of bifunctional isothiocyanate analogs of sulforaphane: correlation between structure and potency as inducers of anticarcinogenic detoxication enzymes[J]. *J Med Chem*, 1994, 37(1): 170-176.
- [11] WEST LG. *Method of enriching glucoraphanin in radish seed preparations: US, US7371419*[P]. 2008-05-13.
- [12] 胡晔.中药中硫代葡萄糖苷及其降解产物的分析和中药菜菔子中Glucoraphenin的提取纯化与催化加氢工艺研究[D].北京:北京化工大学,2009.
- [13] 李立光.硫代葡萄糖苷Glucoraphanin和Glucoraphenin生物转化的研究及Glucoraphenin降解产物菜菔硫烷稳定性研究[D].北京:北京化工大学,2010.
- [14] SZMIGIELSKA AM, SCHOENAU JJ, LEVERS V. Determination of glucosinolates in canola seeds using anion exchange membrane extraction combined with the high-pressure liquid chromatography detection[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(10): 4487-4491.
- [15] FORCE LE, O' HARE TJ, WONG LS, et al. Impact of cold storage on glucosinolate levels in seed-sprouts of broccoli, rocket, white radish and kohlrabi[J]. *Postharvest Biol Tec*, 2007, 44(2): 175-178.
- [16] 张胜智.西兰花种子中硫代葡萄糖苷的提取及高纯度菜菔硫烷的制备工艺研究[D].北京:北京化工大学,2012.
- [17] 王兆玲,冯尚彩,况鹏群,等.萝卜芽苗中还原型萝卜硫苷的提取、纯化及结构鉴定[J]. *食品科技*, 2017, 42(12): 204-209.

(收稿日期:2018-06-19 修回日期:2018-08-06)

(编辑:余庆华)