

光果葶苈中莱菔硫烷的提取及含量测定

王丽红, 刘娟, 王桂艳, 杜娟(佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 目的 研究十字花科葶苈属植物光果葶苈(*Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl.)中莱菔硫烷的最佳提取工艺, 为进一步研究开发此植物奠定基础。方法 利用正交实验设计确定最佳提取工艺, 考察因素包括缓冲溶液 pH 值, 超声提取时间和提取温度。使用 HPLC 检测提取物中莱菔硫烷含量: 采用 Eclipse XDB- II C₁₈ 柱, 以乙腈和水进行梯度洗脱; 梯度洗脱条件: A 泵为乙腈, B 泵为水; 30 min 内乙腈的浓度从 20% 升至 50%; 检测波长为 254 nm; 室温。结果 所考察的因素中, 对光果葶苈中莱菔硫烷提取率影响程度为: 缓冲溶液 pH 值 > 超声提取时间 > 提取温度, tris-HCl 缓冲溶液的 pH 对提取率的影响最大; HPLC 测定的线性范围为 0.45~5.4 μg($r=0.9968$)。结论 光果葶苈中莱菔硫烷最佳提取工艺为: 超声提取 30 min, tris-HCl 缓冲溶液 pH 值为 5.5, 提取温度 30 ℃; HPLC 测定光果葶苈中莱菔硫烷含量的方法快速、准确。

关键词: 光果葶苈; 莱菔硫烷; 正交试验设计; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)04-0316-04

Extraction Technology and HPLC Determination of Sulforaphane in *Draba Nemorosa* L.var. *Leiocarpa* Lindl.

WANG Lihong, LIU Juan, WANG Guiyan, DU Juan(College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the extraction technology of sulforaphane from *Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl. to provide scientific data for further exploitation. **METHODS** The extraction condition was optimized with orthogonal design considering the following factors: the pH of the buffer solution, the time of extraction and the temperature. The HPLC separation was performed on Eclipse XDB- II C₁₈ column with a room column temperature, a mobile phase consisted of acetonitrile and water with UV detection wavelength at 254 nm. **RESULTS** Sulforaphane extraction was affected by pH of tris-HCl, extraction time and temperature. The calibration curve was linear in the range of 0.45–5.4 μg($r=0.9968$). **CONCLUSION** The optimum extraction condition was as follows: temperature 30 ℃, extract for 30 min with buffer pH 5.5. The sulforaphane from *Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl. could be determined by HPLC on the optimum condition, and this method was rapid and specific.

KEY WORDS: *Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl.; sulforaphane; orthogonal design; HPLC

光果葶苈(*Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl.)是十字花科葶苈属植物, 资源丰富, 分布广泛, 资料报道东北地区有将该植物种子作葶苈子入药^[1]。近几年研究表明十字花科的主要成分硫代葡萄糖苷(glucosinolates, 简称硫苷, GLUs)的水解产物异硫氰酸酯(ITCs)具有高度的生物学活性, 莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)是异硫氰酸酯类物质中生物学活性最强的物质, 能有效地防止多种致癌物所引起的 DNA 损伤和癌症^[2]。因此, 目前对十字花科植物的研究方兴未艾, 而该科植物光果葶苈尚无人研究。本试验通过对 SFN 的提取工艺进行研究,

采用 HPLC 对 SFN 含量进行测定, 确定了光果葶苈中 SFN 的最佳提取工艺。

1 试剂及仪器

光果葶苈于 2007 年 5 月初采自黑龙江省佳木斯市区, 经本校生药学教研室刘娟教授鉴定为十字花科葶苈属植物光果葶苈 *Draba nemorosa* L. var. *leiocarpa* Lindl.。SFN(Sigma 公司, 含量 90%, 批号: S4441); 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水。其它试剂均为分析纯。

安捷伦高效液相色谱仪系统(美国安捷伦公司): Agilent 1100 四元泵; Agilent 柱温箱; Agilent

基金项目: 黑龙江省科技厅自然基金项目(D200875)

作者简介: 王丽红, 女, 硕士, 副教授 Tel: 13846175975 E-mail: wlh_6663@163.com

色谱数据工作站; Agilent 二极管阵列紫外检测器。其它仪器均由黑龙江省生物制剂重点实验室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3-4]

色谱柱: Eclipse XDB-II C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长: 254 nm; 柱温: 室温。采用乙腈和水进行梯度洗脱, 梯度洗脱条件: A 泵为乙腈, B 泵为水, 30 min 内乙腈的浓度从 20% 升至 50%。进样量: 20 μL。

2.1.1 标准曲线的绘制 精密称取 SFN 对照品 1.8 mg, 加入到 1 mL 量瓶中, 加乙腈定容, 制成 1.8 mg·mL⁻¹ 的储备液。精密吸取标准储备液 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 3.0 μL 分别于 5 mL 量瓶中, 加乙腈定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。按“2.1”色谱条件进样进行测定, 以峰面积为纵坐标(Y), 进样量(μg)为横坐标(X), 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=3\,214.2X-0.788\,4$, $r=0.996\,8$ 。对照品在 0.45~5.4 μg 内进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.2 稳定性试验 取同一浓度样品溶液在 4, 8, 12, 24, 48 h 进样测定, 测其峰面积, RSD 为 1.12%。表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.1.3 仪器精密度试验 取同一对照品溶液连续进样 5 次, 测其峰面积, RSD 为 1.05%。表明仪器精密度良好。

2.1.4 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的光果荜苈 SFN 提取液, 分别精确加入 SFN 对照品, 按“2.1”项下方法操作。计算 SFN 的回收率为 98.61%, RSD=1.52%。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验($n=6$)

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

已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收 率/%	平均 回收率/%	RSD/ %
0.001 8	0.003 6	0.005 3	97.22		
0.001 8	0.003 6	0.005 4	97.22		
0.001 8	0.003 6	0.005 4	100.0	98.61	1.52
0.001 8	0.003 6	0.005 4	100.0		
0.001 8	0.003 6	0.005 3	97.22		
0.001 8	0.003 6	0.005 4	100.0		

2.2 SFN 提取工艺单因素考察

在提取溶剂确定的条件下, 影响 SFN 得率的主要因素, 即硫苷水解的主要因素是温度、时间、

pH 及金属离子(Fe^{2+} , Fe^{3+})^[5]。为避免金属离子对 SFN 得率的影响, 本试验使用的所有容器均使用水清洗, 所有试剂的配制亦采用水配制。采用超声提取, 提取工艺流程: 称取粉末 2 g→加入 Tris-HCl 缓冲溶液 16 mL→超声水解→无水乙醇 4 mL→过滤→20 mL 乙酸乙酯萃取(3 次)→加入无水硫酸钠干燥→过滤→浓缩至乙酸乙酯挥尽→加入 5 mL 乙腈溶解^[6]。

2.2.1 温度对提取的影响 提取温度分别为 30, 45, 60, 75 °C, Tris-HCl 缓冲溶液 pH 为 6.5 时超声水解 30 min, HPLC 测定 SFN 含量。结果见表 2。在 45 °C 时, 样品中 SFN 含量最高。而随着温度的升高, 样品中 SFN 含量下降。这可能与酶在高温时易发生钝化及温度过高会导致 SFN 分解有关, 使提取的 SFN 含量降低。

2.2.2 超声时间对提取的影响 加入 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 6.5)16 mL, 提取温度为 30 °C, 超声时间分别为 15, 30, 45, 60 min, HPLC 测定 SFN 含量。结果见表 2。随着超声时间的增加, 样品中 SFN 的含量也在增加, 在 30 min 时 SFN 含量最高。但随着提取时间的延长, 样品中 SFN 含量下降。这种现象可能与 SFN 不稳定, 超声时间长, 会使 SFN 发生分解有关。

2.2.3 pH 对提取的影响 加入 pH 分别为 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液 16 mL, 提取温度为 30 °C, 超声水解 30 min, HPLC 测定 SFN 含量。结果见表 2。当 Tris-HCl 缓冲溶液在 pH 5.5 时, 提取液中 SFN 含量最高, 随着 pH 的增高, SFN 含量迅速下降, 这与资料^[7]记载的 SFN 的前体硫苷在弱酸或弱碱内生成异硫氰酸酯为主的规律相适应。该试验证明, 光果荜苈中 SFN 易在弱酸性条件下产生。

2.3 SFN 提取工艺-正交试验

将光果荜苈全草粉碎, 精确称取粉末 16 份, 每份 2 g, 选用 L₁₆(4⁵)正交表进行试验设计, 确定最佳提取工艺。以 SFN 得率为指标, 考察提取体系温度、提取时间、pH 3 因素对 SFN 得率的影响。因素水平安排见表 3。分别吸取正交试验设计中待测的 16 份光果荜苈的 SFN 提取溶液, 与一定量的乙腈 1:2 混合均匀后作为待测样品溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按照“2.1”项下色谱条件测定光果荜苈全草中 SFN 含量。16 份样品溶液的 HPLC 测定结果见表 2。

表 2 正交试验结果

Tab 2 The results of orthogonal test

试验号	A 温度/℃	B pH	C 时间/min	峰面积 /mAU* ^s	1:2 稀释后 20 μL 样品中 SFN 含量/μg	光果葶苈中 SFN 含量/ μg·(2 g) ⁻¹
1	30	4.5	15	8.025 69	0.002 742(1:1)	1.371 1
2	30	5.5	30	41.406 48	0.013 13	9.845 7
3	30	6.5	45	24.392 47	0.007 834	5.875 7
4	30	7.5	60	15.243 48	0.004 988	3.740 9
5	45	4.5	30	17.109 00	0.005 568	4.176 2
6	45	5.5	15	16.076 70	0.005 247	3.935 3
7	45	6.5	60	15.218 44	0.004 980	3.735 0
8	45	7.5	45	16.511 55	0.005 382	4.036 8
9	60	4.5	45	15.332 77	0.005 016	3.7617
10	60	5.5	60	17.547 13	0.005 705	4.278 4
11	60	6.5	15	18.813 17	0.006 098	4.573 8
12	60	7.5	30	15.680 18	0.005 124	3.842 8
13	75	4.5	60	18.236 14	0.005 919	4.439 2
14	75	5.5	45	18.296 87	0.005 938	4.453 3
15	75	6.5	30	17.604 37	0.005 722	4.291 8
16	75	7.5	15	18.463 79	0.005 990	4.492 3
K1	20.833 4	13.748 2	14.372 5			70.850 0
K2	15.883 3	22.512 7	22.156 5			
K3	16.456 7	18.476 3	18.127 5			
K4	17.676 6	16.112 8	15.833 5			
k1	5.208 4	3.437 1	3.593 1			
k2	3.970 8	5.628 2	5.539 1			
k3	4.114 2	4.619 1	4.531 9			
k4	4.719 2	4.028 2	3.958 8			
极差	1.237 6	2.191 1	1.946 0			
最优方案	A1	B2	C2			

表 3 因素水平表

Tab 3 Factors and levels

水平	因素		
	温度/℃	tris-HCl 缓冲溶液/pH	时间/min
1	30	4.5	15
2	45	5.5	30
3	60	6.5	45
4	75	7.5	60

2.4 验证性实验

按“2.3”项正交试验的最佳方案 A1B2C2, 称取同一批次光果葶苈 3 份, 每份 2 g, 提取 SFN, 按“2.1”项下方法测定 SFN 含量。SFN 含量分别为 9.831, 9.902, 9.876 μg·(2 g)⁻¹, RSD 为 3.59%。

根据正交试验以及方差分析结果可知, 3 个因素对提取效果影响的顺序为缓冲溶液 pH 值>超声提取时间>提取温度, 说明 tris-HCl 缓冲溶液的 pH 对提取率的影响最大, 因此因素 B(缓冲溶液 pH)是所需考虑的主要因素。根据表中数据可知光果葶苈全草中 SFN 提取的最优方案是 A1B2C2: 超声提取 30 min, 缓冲溶液 pH 值为 5.5, 提取温度 30 ℃。

该方案正是正交试验中的第 2 号, 从实际结果可看出第 2 号试验条件下提取得到的光果葶苈干燥全草中 SFN 含量是 9.845 7 μg·(2 g)⁻¹, 是 16 次试验中最高的, 这也说明正交试验得出的最好方案是符合实际的。2 号试验结果见图 1。

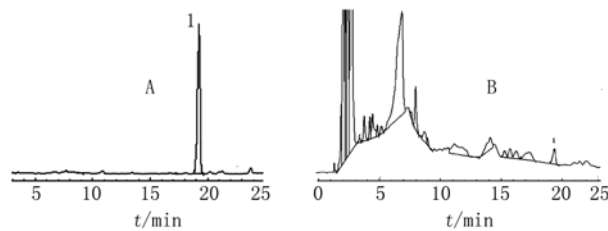


图 1 2 号样品 SFN 含量测定

A-对照品; B-2 号样品; 1-SFN

Fig 1 SFN determination of No. 2

A-control; B-No.2 sample; 1-SFN

3 讨论

采用最佳方案提取光果葶苈干燥全草中 SFN 含量为 4.922 9 μg·g⁻¹, 验证性实验结果表明该方法重复性好。与资料^[8]报道的其他十字花科植物相比, SFN 含量较高, 且 HPLC 色谱图表明光果葶苈中的

SFN 能与所含的其他物质很好地分离,为今后进一步从光果萆薢中分离 SFN 打下了良好的基础,也为将光果萆薢开发成原料药材提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] ZHOU Y L. Flora of Heilongjiang Province(黑龙江省植物志) [M]. Haerbin: Northeast Forestry University Press, 1985: 300.
- [2] SUN J, HUANG J. The effects of prevention of cancer by cruciferous vegetables [J]. Foreign Med Sci (Hyg)(国外医学卫生学分册), 2003, 30(1): 19-23.
- [3] BERTELLI D, PLESSI M, BRAGHIROLI D, et al. Separation by solid-phase extraction and quantification by reverse phase HPLC of sulforaphane in broccoli [J]. Food Chem, 1998, 63(3): 417-421.
- [4] MATUSHESKI N V, WALLIG M A, JUVIK J A, et al. Preparative HPLC method for the purification of sulforaphane and sulforaphane nitrile from *Brassica oleracea* [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(4): 1867-1872.
- [5] YEN G C, WEI O K. Myrosinase activity and total glucosinolate content of cruciferous vegetables, and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan [J]. J Sci Food Agric, 1993, 61(4): 471-475.
- [6] JI Y B, CHI W J, ZOU X, et al. Study on extraction, isolation and anticarcinogenic activity of sulforaphane in broccoli [J]. J Harbin Univ Commerce: Nat Sci (哈尔滨商业大学学报: 自然科学版), 2005, 21(3): 270-273.
- [7] PALMIERI S, ROLLIN P, SORENSEN H, et al. Myrosinase technology for a potential glucosinolate utilization in agro-industry[J]. Agro Food Ind Hi-tech, 1998, 9(1): 24-27.
- [8] LIANG H, YUAN Q P, DONG H R, et al. Comparison of sulforaphane content in seeds of cruciferous plant[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2004, 39(12): 898-899.

收稿日期: 2009-07-27