

湿法装, 20 mL 甲醇预洗), 依次用甲醇、80 % 甲醇各 50 mL 洗脱, 收集上样流出液和甲醇洗脱液合并收集, 80 % 甲醇每 10 mL 收集一份, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过微孔滤膜, 取续滤液 20 μ L 进样分析。结果发现甲醇、80 % 甲醇各 50 mL 已经能完全洗脱, 最终确定洗脱剂的用量为甲醇和 80 % 甲醇各 50 mL。

3.5 结果分析 不同厂家的小柴胡颗粒中柴胡皂苷的含量差异很大, 高低悬殊达近 10 倍, 可见质量差异之大, 有必要对其进行质量控制。本研究可为小柴胡颗粒中柴胡的质量控制提供实验依据和方法思路, 也可为其他含柴胡复方制剂的评价方法提供参考。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医

药科技出版社, 2010: 51.

- [2] 李军, 姜华, 尹卫平. 柴胡及其煎剂中皂苷类成分的高效液相指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2205-2206.
- [3] 李军, 姜华, 张延萍, 等. 柴胡汤剂中次生柴胡皂苷结构研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3078-3082.
- [4] 李腾, 高展, 孙玉侠, 等. 柴胡及其制剂中皂苷类成分的研究[J]. 中成药, 2011, 33(11): 1840-1843.
- [5] 李军, 姜华, 张延萍, 等. 单味柴胡煎煮过程中皂苷煎出量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 155-158.
- [6] 姜华, 李军, 石任兵, 等. 炮制对柴胡药材中 4 种柴胡皂苷的影响[J]. 中国药理学杂志, 2009, 40(21): 618-621.
- [7] Liu C, Feng YJ, Gao F, et al. Characterization of HCoV-229E fusion core: implications for structure basis of coronavirus membrane fusion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(3): 1108.
- [8] 刘树强, 王术玲, 高晓玲, 等. 柴胡水煎过程中皂苷成分的变化规律[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(6): 602-606.
- [9] 李军, 姜华, 张延萍, 等. HPLC 测定柴黄片中柴胡皂苷 b_1 、 b_2 的含量[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(1): 61-63.

(编辑: 宋威)

不同益生菌对莱菔子水提取液的发酵研究

朱立俏¹, 周洪雷¹, 孙筱林²(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 济南三株医药生物研究所, 山东 济南 250100)

摘要: 目的 比较莱菔子水提取液经不同益生菌及发酵条件发酵前后的变化。方法 采用反相 HPLC 法, 比较莱菔子水提取液经短双歧杆菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、混合菌和是否加营养发酵前后芥子碱硫氰酸盐和芥子酸的含量变化及指纹图谱。结果 发酵可使芥子碱硫氰酸盐的含量降低, 使芥子酸的含量增加, 并建立了有 15 个共有峰的指纹图谱, 且相对峰面积变化较大。结论 莱菔子水提取液经发酵后, 在含量上会有较大的变化, 但并未出现新的化学成分。

关键词: 莱菔子; 益生菌发酵; 芥子碱硫氰酸盐; 芥子酸; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)03-0359-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.031

Fermentation of Semen Raphani Water Extract by Different Probiotics

ZHU Liqiao¹, ZHOU Honglei¹, SUN Xiaolin²(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 2. Jinan Sanzhu Biomedical Institute, Jinan 250100 Shandong, China)

Abstract: Objective To observe the changes of components of Semen Raphani water extract before and after fermentation by different probiotics and under various fermentation conditions. **Methods** By using reversed-phase HPLC, we compared the contents of sinapine thiocyanate and erucic acid, and observed the HPLC fingerprints of

收稿日期: 2013-11-22

作者简介: 朱立俏, 女, 讲师, 研究方向: 中药化学成分及质量控制研究。Email: zliqiao@163.com。通讯作者: 周洪雷, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药化学成分及质量控制。Email: zhouhonglei@163.com。

基金项目: 国家科技重大新药创制专项(2009ZX09301-013); 山东省自然科学基金项目(ZR2010HM017); 山东省教育厅科技计划项目(J105LL05); 山东省科技计划项目(2013GSF11903)。

Semen Raphani water extract fermented by *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, and mixed bacteria under the condition with or without nutrient added. **Results** The content of sinapine thiocyanate decreased and the content of erucic acid increased after the fermentation by probiotics. Fifteen common peaks were obtained and the relative area varied greatly in the HPLC fingerprints of Semen Raphani water extract. **Conclusion** Great changes have presented in the component contents of Semen Raphani water extract after fermentation, but there are no new chemical compositions occurring.

Keywords: Semen Raphani; Fermentation by probiotics; Sinapine thiocyanate; Erucic acid; HPLC fingerprints

莱菔子为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus*. L. 的干燥成熟种子。本品性辛，味甘，平，归肺、脾、胃经，具有消食除胀、降气化痰之功效。用于饮食停滞，脘腹胀痛，大便秘结，积滞泻痢，痰壅喘咳^[1]。研究表明^[2-4]，莱菔子具有明显的抗高血压作用，其有效成分为水溶性生物碱。本实验以莱菔子水提取液的不同益生菌发酵液中芥子碱硫氰酸盐和芥子酸含量为指标，结合 HPLC 指纹图谱，以不同益生菌对莱菔子水提取液发酵前后的化学成分变化进行研究，以期对益生菌发酵在中药中的应用提供思路。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪，二极管阵列检测器，美国安捷伦科技有限公司；QC225 型超声波清洗器，上海超声波仪器厂；ES-J120 型电子天平、旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂。

芥子碱硫氰酸盐、芥子酸(自制，纯度>98%)，甲醇，乙腈(色谱纯，天津科密欧试剂有限公司)，莱菔子药材购于济南建联中药店，经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus*. L. 的干燥成熟种子，药材样品保存于本实验室。

2 方法与结果

2.1 莱菔子提取液的制备^[5] 莱菔子粉碎成粗粉，加 10 倍量水提取 3 次，每次 1.5 h，合并提取液，浓缩，加水定容至质量浓度为每 mL 含生药量 0.5 g。

2.2 莱菔子发酵液的制备

2.2.1 莱菔子不加营养发酵液的制备 取 2.1 项下莱菔子提取液 500 mL，调整 pH 值为 6.5~7.0 左右，115 ℃、40 min 灭菌，作为发酵培养底物，同法制备 5 份。当发酵培养底物液温度降至 39 ℃左右时，将培养好的短双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌种子液接入到 3 份样品中，每株菌接种量均 2.0 %。另

外一份样品接入以上 3 株菌的混合液，总菌量为 2.0 %。一份不接种作为对照。38 ℃培养 24 h 后，添加无菌葡萄糖与酵母膏，添加量均为液体体积的 1.0 %。继续发酵 48 h，再添加无菌葡萄糖 1.0 %。共发酵 144 h，作为未加营养发酵液。

2.2.2 莱菔子加营养发酵液的制备 将葡萄糖 5.0 g、酵母粉 0.5 g、酵母膏 1.0 g、蛋白胨 2.0 g、硫酸亚铁·7H₂O 10.0 mg、硫酸锌·7H₂O 44 mg、亚硒酸钠·5H₂O 0.24 mg、硫酸镁·7H₂O 700 mg、硫酸锰·H₂O 5.0 mg、磷酸二氢钾 1.0 g 和磷酸氢二钾·3H₂O 1.0 g 加入到 500 mL 莱菔子提取液中，加热溶解后，调整 pH 值为 6.5~7.0 左右，同法制备 5 份，方法同 2.2.1 项下制备加营养的发酵液。

2.3 芥子碱硫氰酸盐和芥子酸 HPLC 方法学考察

2.3.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)；流动相为乙腈(A)-0.1 %磷酸(B)，梯度洗脱程序：0~15 min, 5 %A-10 %A；15~17 min, 10 %A-12.5 %A；17~27 min, 12.5 %A-14 %A；27~55 min, 14 %A-25 %A；55~70 min, 25 %A-100 %A，检测波长 225 nm，柱温 30 ℃，流速 1.0 mL·min⁻¹，进样量 20 μL，记录时间 58 min。

2.3.2 对照品溶液的配制 分别精密称量芥子碱硫氰酸盐对照品 8.91 mg、芥子酸对照品 5.34 mg(置五氧化二磷减压干燥器中干燥 12 h)，各置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3.3 线性关系的考察 精密吸取芥子碱硫氰酸盐对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.0 mL，置 2 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，按 2.3.1 项下色谱条件测定，进样量为 20 μL，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果表明芥子碱硫氰酸盐在 0.04455 ~0.891 mg·mL⁻¹ 呈较好的线性关系，线性回归方程为 $Y=21810X-592.75$ ， $r=0.9998$ 。

精密吸取芥子酸对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mL，置于 2 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇

匀,在上述色谱条件下,注入高效液相色谱仪,进样量为 20 μL,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明芥子酸在 0.0267 ~ 0.4272 mg·mL⁻¹呈较好的线性关系,线性回归方程为 $Y=17524X+83.64$, $r=0.9999$ 。

2.3.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μL,重复进样 5 次,测定芥子碱硫氰酸盐和芥子酸峰面积,RSD 分别为 0.3 %和 0.4 %($n=5$)。

2.3.5 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 20 μL,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,测定芥子碱硫氰酸盐和芥子酸峰面积,RSD 分别为 0.7 %和 0.6 %($n=6$)。

2.3.6 加样回收率试验 取同一已知含量的供试品 6 份,各精密加入芥子碱硫氰酸盐对照品和芥子酸对照品适量,按照供试品制备方法制备,进样测定芥子碱硫氰酸盐和芥子酸峰面积。测得平均回收率分别为 103 %和 99.84 %,RSD 分别为 2.60 %和 2.10 %,说明该方法回收率高,见表 1。

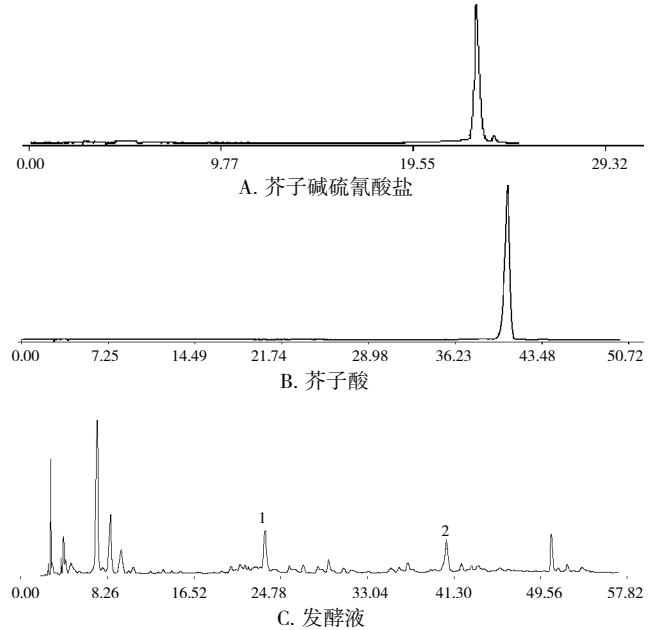
表 1 芥子碱硫氰酸盐和芥子酸加样回收率结果

Table 1 Results of recovery test of sinapine thiocyanate and erucic acid

成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芥子碱硫 氰酸盐	0.2235	0.2673	0.5119	104.30	103.00	2.60
	0.224	0.2673	0.4800	97.70		
	0.2219	0.2673	0.5110	104.46		
	0.2231	0.2673	0.5071	103.41		
	0.2228	0.2673	0.5144	104.96		
芥子酸	0.222	0.2673	0.5049	103.19	99.84	2.10
	0.2469	0.2136	0.4718	102.45		
	0.2452	0.2136	0.4567	99.54		
	0.2477	0.2136	0.4624	100.24		
	0.2462	0.2136	0.4651	101.15		
	0.2459	0.2136	0.4568	99.41		
	0.2466	0.2136	0.4429	96.24		

2.4 不同益生菌发酵前后芥子碱硫氰酸盐和芥子酸的含量测定 精密吸取各菜菔子发酵液 5 mL,蒸干,残渣加 80 %甲醇溶液转移至 10 mL 量瓶中,加 80 %甲醇至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪,按照 2.3.1 项下色谱条件,测定芥子碱硫氰酸盐和芥子酸的含量,色谱图见图 1,其中,1 号峰为芥子碱硫氰酸盐,2 号峰为芥子酸,结果见表 2。

由表 2 可知,不同益生菌及不同发酵条件会使芥子碱硫氰酸盐的含量较未加营养,未发酵的菜菔子提取液降低,而使芥子酸的含量升高,同时加营养,未发酵的样品液中芥子碱硫氰酸盐的含量也有



1. 芥子碱硫氰酸盐; 2. 芥子酸

图 1 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC graphs

表 2 发酵前后芥子碱硫氰酸盐和芥子酸的含量

Table 2 The content of sinapine thiocyanate and erucic acid before and after fermentation

序号	样品	芥子碱硫氰酸盐含量/mg·mL ⁻¹	芥子酸含量/mg·mL ⁻¹
1	未加营养,未发酵	0.657	0.033
2	未加营养,短双歧杆菌	0.210	0.201
3	未加营养,植物乳杆菌	0.128	0.186
4	未加营养,嗜酸乳杆菌	0.118	0.251
5	未加营养,混合菌株	0.216	0.245
6	加营养,未发酵	0.151	0.380
7	加营养,短双歧杆菌	0.149	0.282
8	加营养,植物乳杆菌	0.194	0.238
9	加营养,嗜酸乳杆菌	0.234	0.243
10	加营养,混合菌株	0.223	0.246

降低,说明不同益生菌及营养成分都会使芥子碱硫氰酸盐水解,生成芥子酸,但是,不同益生菌对菜菔子提取液中芥子碱硫氰酸盐和芥子酸含量的影响规律性较差。

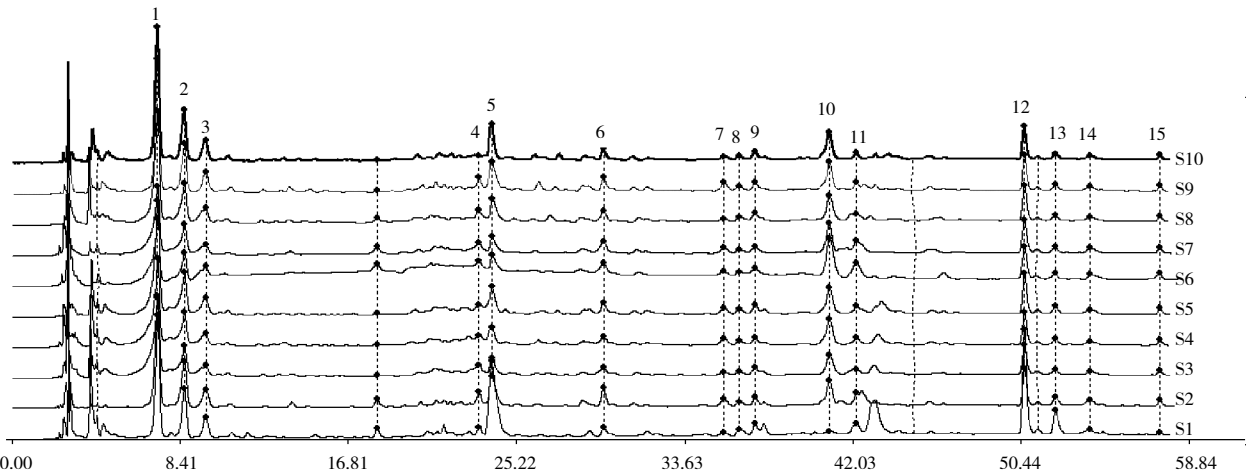
2.5 不同益生菌发酵前后菜菔子提取液指纹图谱的建立 按照 2.3.1 项下方法,对不同益生菌发酵前后的供试品溶液进行 HPLC 测定,记录 58 min 色谱图,建立其指纹图谱,结果见图 2。5 号峰为芥子碱硫氰酸盐,10 号峰为芥子酸。

采用中国药典委员会推荐的计算机辅助相似性评价系统(《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》)对 HPLC 的指纹图谱进行综合评价,得出 HPLC

表 2 不同益生菌发酵前后莱菔子水提取液 HPLC 指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 2 The relative area of total peak in the HPLC fingerprints of water extract of Semen Raphani before and after probiotics' fermentation

峰号	保留时间	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	7.273	4.514	2.476	3.731	3.105	2.478	1.132	2.495	4.163	2.541	2.157	35.221
2	8.622	2.062	1.185	1.307	1.059	0.958	0.616	1.193	1.581	1.061	0.985	32.678
3	9.686	1.230	0.603	0.327	0.578	0.596	0.525	0.265	0.460	0.646	0.571	44.803
4	23.321	0.588	0.423	0.537	0.265	0.356	0.778	0.667	0.681	0.396	0.101	43.700
5	23.970	5.167	0.954	0.599	0.426	0.778	0.897	0.563	1.007	0.870	0.876	115.477
6	29.566	0.842	0.476	0.426	0.391	0.336	0.983	0.448	0.397	0.395	0.299	45.268
7	35.582	0.554	0.382	0.303	0.291	0.314	0.446	0.264	0.132	0.381	0.305	33.567
8	36.364	0.814	0.272	0.255	0.200	0.272	0.329	0.183	0.182	0.302	0.242	60.749
9	37.137	0.777	0.369	0.378	0.267	0.307	0.637	0.339	0.296	0.518	0.306	40.510
10	40.858	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
11	42.203	1.227	0.392	0.539	0.391	0.495	0.604	0.638	0.289	0.314	0.371	51.937
12	50.603	4.114	0.855	0.961	0.761	0.731	0.515	0.708	0.888	0.730	0.626	98.319
13	52.145	1.449	0.424	0.425	0.290	0.364	0.496	0.204	0.280	0.322	0.316	78.489
14	53.881	1.063	0.440	0.476	0.326	0.438	0.520	0.242	0.378	0.346	0.310	50.638
15	57.373	0.749	0.365	0.322	0.207	0.355	0.322	0.132	0.243	0.232	0.220	53.860



S1. 未加营养, 未发酵; S2. 未加营养, 短双歧杆菌; S3. 未加营养, 植物乳杆菌; S4. 未加营养, 嗜酸乳杆菌; S5. 未加营养, 混合菌株; S6. 加营养, 未发酵; S7. 加营养, 短双歧杆菌; S8. 加营养, 植物乳杆菌; S9. 加营养, 嗜酸乳杆菌; S10. 加营养, 混合菌株

图 2 不同益生菌发酵莱菔子水提取液 HPLC 指纹图谱叠加图

Figure 2 HPLC fingerprint of water extract of Semen Raphani by different probiotics' fermentation

表 3 不同益生菌对莱菔子水提取液发酵前后 HPLC 指纹图谱共有峰的相似度

Table 3 The similarity of common peaks in the HPLC fingerprints of water extract of Semen Raphani before and after probiotics' fermentation

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1	0.783	0.716	0.707	0.743	0.619	0.682	0.677	0.759	0.751
S2	0.783	1	0.862	0.876	0.893	0.713	0.893	0.86	0.943	0.894
S3	0.716	0.862	1	0.926	0.875	0.605	0.927	0.916	0.84	0.827
S4	0.707	0.876	0.926	1	0.915	0.627	0.902	0.906	0.868	0.853
S5	0.743	0.893	0.875	0.915	1	0.667	0.89	0.863	0.883	0.899
S6	0.619	0.713	0.605	0.627	0.667	1	0.685	0.629	0.69	0.675
S7	0.682	0.893	0.927	0.902	0.89	0.685	1	0.923	0.869	0.86
S8	0.677	0.86	0.916	0.906	0.863	0.629	0.923	1	0.841	0.829
S9	0.759	0.943	0.84	0.868	0.883	0.69	0.869	0.841	1	0.891
S10	0.751	0.894	0.827	0.853	0.899	0.675	0.86	0.829	0.891	1

的指纹图谱共有模式及其相似度。其共有峰相对峰面积结果见表 2, 相似度评价见表 3。

由图 2 可见, 不同益生菌对莱菔子水提取液发酵前后的 HPLC 色谱图均主要有 15 个共有峰, 其中, 5 号色谱峰为芥子碱硫氰酸盐, 10 号色谱峰为芥子酸, 不同益生菌对莱菔子水提取液的发酵, 对莱菔子中化学成分的种类影响较小, 未发现新的色谱峰。从表 2 结果可知, 莱菔子水提取液不同益生菌发酵液中化学成分的含量相差较大, 推断不同菌种对莱菔子中化学成分含量的影响较大, 从表 3 相似度结果来说, 与未加营养, 未发酵的相比, 相似度差别较大(相似度 < 0.8), 不同菌种及不同发酵条件之间比

(下转第 372 页)