

基于 Box-Behnken 响应面法优化莱菔子炒制工艺及对离体十二指肠运动的影响

庞荔丹, 魏娇娇, 苗 壮, 王安君, 吴家劲, 薛明真, 朱立俏*
(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 优选炒药机炒制莱菔子的最佳炒制工艺, 并观察其对大鼠离体十二指肠运动的影响。**方法** 以萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐的含量和 RS01 相对含量为指标, 在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法考察炒制温度、炒制时间和炒药机转速对莱菔子炒制工艺的影响, 优选出最佳工艺参数。采用 MP160 多导生理记录仪, 观察炒莱菔子对大鼠离体十二指肠运动的影响。**结果** 莱菔子最佳炒制工艺为炒制温度 217.14 ℃, 炒制时间 3.05 min, 炒制转速 29.73 r/min。考虑到实际生产中的可行性, 对炒制工艺调整为炒制温度 220 ℃, 炒制时间 3 min, 炒制转速 30 r/min。炒莱菔子水提液可增大大鼠离体十二指肠收缩的张力和振幅。**结论** 优选的莱菔子炒制工艺简单可行, 更适合工业化生产的要求。莱菔子具有促进胃肠动力的作用。

关键词: 莱菔子; 炒制工艺; 响应面法; 萝卜苷; 离体十二指肠

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2021)04-0959-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.04.024

Box-Behnken response surface method-based stir-frying process optimization and effects on *in vitro* duodenal movement for *Raphanus sativus*

PANG Li-dan, WEI Jiao-jiao, MIAO Zhuang, WANG An-jun, WU Jia-jin, XUE Ming-zhen, ZHU Li-qiao*
(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the stir-frying process of *Raphanus sativus* L., and to observe its effect on rat duodenal movement *in vitro*. **METHODS** Using the contents of glucoraphenin, sinapinethiocyanate and relative content of RS01 as indexes, and the stir-frying temperature and time, and the rotation speed of herbal medicine roaster as assessment factors, the stir-frying process of *R. sativus* were investigated by Box-Behnken response surface method based on single factor study. The effect on duodenal contractile activity *in vitro* was detected by MP160 multi-channel physiological recorder. **RESULTS** The ideal stir-frying process for *R. sativus* was 3.05 min, exposure to 217.14 ℃ stir-frying at 29.73 r/min. Considering the feasibility in practical application, the technology was adjusted to be 3 min stir-frying at 220 ℃ at a rotation speed of 30 r/min. The water extract of *R. sativus* achieved under the optimal processing conditions increased the duodenal tension and amplitude of rats *in vitro*. **CONCLUSION** The optimal stir-frying process of *R. sativus* is simple and feasible for the industrial production of *R. sativus* ensuring a promoted gastrointestinal motility.

KEY WORDS: *Raphanus sativus* L.; stir-frying process; response surface analysis; glucoraphenin; *in vitro* duodenum

收稿日期: 2020-05-13
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81503252); 山东省自然科学基金项目 (ZR2020MH373); 山东省本科 SRT 项目资助 (201910441004)
作者简介: 庞荔丹 (1998—), 女, 从事中药药效物质基础及炮制原理研究。Tel: 17860507004, E-mail: 2384577691@qq.com
* 通信作者: 朱立俏 (1981—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及炮制原理研究。Tel: (0531) 89628081, E-mail: zliqiao@163.com

莱菔子为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子。具有消食除胀、降气化痰之功效，常用于治疗饮食停滞、脘腹胀满、大便秘结、痰壅喘咳等症^[1]。传统中药炮制理论认为莱菔子炮制具有“生熟异治，生升熟降”的药性变化特点，生品主升，长于涌入风痰，炒品主降，长于消食除胀、降气化痰^[2]。目前临床均以炒莱菔子入药。现代研究表明，莱菔子可用于治疗高血压^[3]、癌症^[4]、消化不良^[5]、降血脂^[6]、降血糖^[7]等疾病，主要含有硫苷类^[8-9]、芥子酸及其寡糖酯^[10-11]、芥子碱硫氰酸盐^[12]等成分，其中硫苷类成分为其炮制前后的特征性成分，萝卜苷（glucoraphenin，GRE）是其含量最高的硫苷类成分^[13]，通过前期研究发现还含有另一硫苷类成分，暂定名为 RS01。而炮制前后芥子碱硫氰酸盐（sinapine thiocyanate，ST）的含量未发生明显变化^[14]。目前莱菔子均以 ST 为指标成分进行提取、炮制及质量控制研究，指标成分缺乏专属性。另外莱菔子炮制工艺参数多适用于小量锅炒的规模^[15]，与炒药机工业化炒制的参数偏差较大。基于此，本实验以优化莱菔子炒药机炒制工艺为目标，采用 Box-Behnken 响应面法，以 GRE、RS01 和 ST 多指标量化莱菔子的最佳炒制工艺，以期为规范莱菔子的炮制工艺和工业化大生产提供科学依据，保证临床用药的安全性和有效性。

1 材料

Agilent1260 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；MK-30 型炒药机（江阴市祝塘明科机械厂）；EX225ZH/AD 型电子分析天平（十万分之一，常州奥豪斯仪器有限公司）；KQ5200 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；MP160 多道生理记录仪（美国 Biopac 公司）；HW200s 恒温平滑肌实验系统（成都泰盟软件有限公司）；FLBP-200 型万能高速粉碎机（上海菲力博食品机械有限公司）；GFL-230 电热鼓风干燥箱（天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司）。萝卜苷对照品（纯度 $\geq 98\%$ ，美国 Cayman 公司，批号 0453522-24）；芥子碱硫氰酸盐对照品（纯度 $\geq 98\%$ ，成都德思特生物技术有限公司，批号 DST160910-021）。乙腈、甲醇（色谱纯，美国 TEDIA 公司）；水为娃哈哈饮用纯净水；其余试剂为分析纯。

生莱菔子饮片（生产批号 181101），购于山东百味堂中药饮片有限公司，经山东中医药大学药学院张芳副教授鉴定为十字花科植物萝卜 *Raphanus*

sativus L. 的干燥成熟种子。

雄性健康 SD 大鼠，体质量（200~220）g，购自济南朋悦实验动物繁育有限公司，合格证号 SCXK（鲁）20140007。

2 方法与结果

2.1 萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐、RS01 含量测定

2.1.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 色谱柱（4.6 mm $\times$ 250 mm，5 μ m）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0~15 min，5%~10% A；15~17 min，10%~12.5% A；17~27 min，12.5%~14% A；27~55 min，14%~25% A；55~57 min，25%~70% A；57~70 min，70%~100% A；70~80 min，100% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 $^{\circ}$ C；检测波长 225、326 nm；进样量 10 μ L。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒定质量的萝卜苷对照品 12.70 mg、芥子碱硫氰酸盐对照品 10.75 mg，分别置于 25 mL 量瓶中，用纯净水将萝卜苷溶解后定容至刻度，制成 0.508 mg/mL 对照品溶液，备用；用 50% 甲醇将芥子碱硫氰酸盐溶解后定容至刻度，制成 0.43 mg/mL 对照品溶液，备用。

2.1.3 供试品溶液制备 取炒莱菔子适量，粉碎，过 40 目筛，精密称取粉末约 2 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入蒸馏水 25 mL 浸泡 30 min 后，再精密加入甲醇 25 mL，称定质量，超声 30 min，静置，冷却至室温，补足减失质量，滤过，取续滤液，0.22 μ m 微孔滤膜过滤，即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下萝卜苷对照品溶液 1、2、5、10、20、50、80 μ L，芥子碱硫氰酸盐对照品溶液 1、2、5、8、10、15 μ L，在“2.1.1”项色谱条件下进样 10 μ L。以峰面积为纵坐标（Y），进样量为横坐标（X）进行回归，得萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐回归方程分别为 $Y=679.1X+36.36$ （ $r=0.999\ 8$ ）、 $Y=2\ 826X+38.83$ （ $r=0.999\ 8$ ），分别在 0.508~40.64、0.43~6.45 μ g 范围内线性关系良好。

2.1.5 系统适应性和专属性试验 精密吸取对照品、供试品溶液各 10 μ L，在“2.1.1”项色谱条件下进样。结果，萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐的保留时间分别为 5.331、26.027 min，RS01 保留时间为 49.093 min，分离度良好。色谱图见图 1。

2.1.6 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样 6 次，测得萝卜苷峰面积 RSD 为 0.63%，芥子碱硫氰酸盐峰面

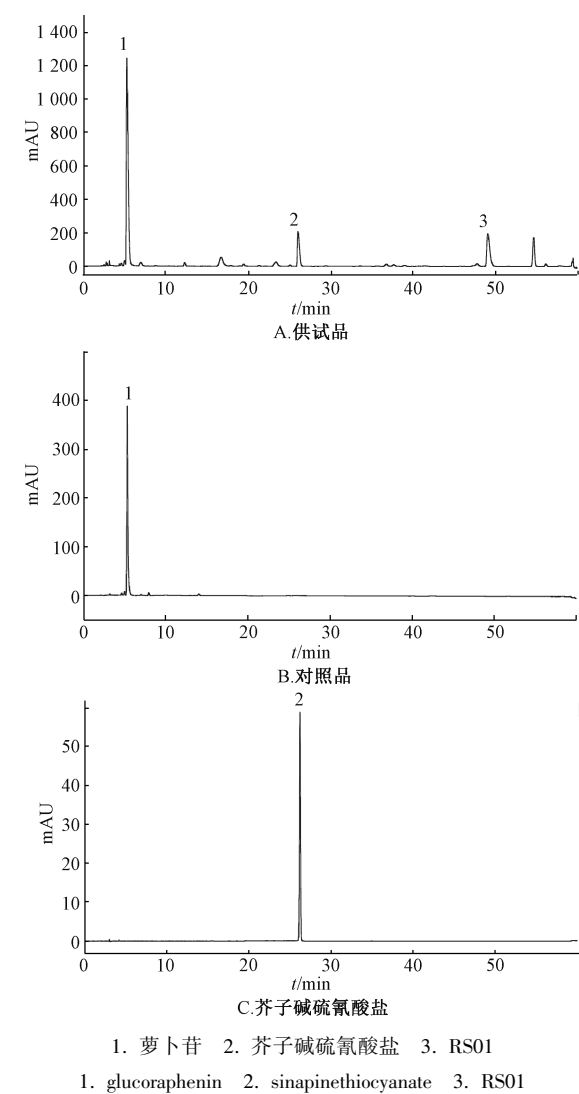


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

积 RSD 为 0.84%，RS01 峰面积 RSD 为 0.74%，表明仪器精密度较好。

2.1.7 重复性试验 取同一炮制条件下的炒莱菔子粉末，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下分别进样 10 μL，测得萝卜苷峰面积 RSD 为 1.53%，芥子碱硫氰酸盐峰面积 RSD 为 1.84%，RS01 峰面积 RSD 为 1.69%，表明该方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液，于 0、2、4、6、8、10、12 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样，测得萝卜苷峰面积 RSD 为 0.89%，芥子碱硫氰酸盐峰面积 RSD 为 1.29%，RS01 峰面积 RSD 为 1.56%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密量取“2.1.3”项下供试品溶液 6 份，精密加入萝卜苷、芥子碱硫氰

酸盐对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定，测得萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐平均加样回收率分别为 98.92%、99.44%，RSD 分别为 0.92%、2.35%。

2.1.10 RS01 含量变化表示 RS01 在炮制条件改变后，根据 HPLC 数据分析可知其含量会发生明显的变化，是具有显著性的评价指标，但由于缺乏对照品，无法采用标准曲线法进行含量测定。因此，本实验以 RS01 峰面积与所对应饮片质量的比值表示其相对含量。

2.1.11 综合得分评价指标 参考文献 [16]，以萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐和 RS01 为指标成分，采用 Box-Behnken 响应面法进行多指标综合评价，综合得分 (Z) = 萝卜苷得分×40% + 芥子碱硫氰酸盐得分×40% + RS01 得分×20%、指标成分得分 (S) = 该指标成分含量/该指标成分所在组中含量的最高值。本实验单因素考察和响应面分析均以综合评分为主，各指标得分为辅进行分析。

2.2 单因素试验

2.2.1 炒制温度 将炒药机转速设置为 30 r/min，预热 30 min，取生莱菔子饮片约 100 g，置于炒药机中，分别于 180、200、220、240、260 ℃ 炒制 3 min，取出放凉，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项条件下进样，按“2.1.11”项下方法进行指标得分和综合得分的计算。结果见表 1。

表 1 不同炒制温度下指标成分的指标得分和综合评分 (n=3)

Tab. 1 Index scores and comprehensive scores of index components at different processing temperatures (n=3)

温度/℃	GRE 指标 得分	ST 指标 得分	RS01 指标 得分	综合评 分
180	0.879 8	0.960 3	0.510 4	0.838 1
200	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
220	0.934 1	0.901 3	0.856 8	0.905 5
240	0.851 7	0.831 0	0.748 5	0.822 8
260	0.659 3	0.847 6	0.628 3	0.728 4

由表 1 可知，3 种指标成分均在炮制温度 200 ℃ 时出现最高值，但芥子碱硫氰酸盐含量在各温度下差别不大，同时以综合评分也在 200 ℃ 时得分最高。因此，选取 180、200、220 ℃ 3 个水平进行响应面优化。

2.2.2 炒制时间 将炒药机转速设置为 30 r/min，预热 30 min，称取生莱菔子饮片 100 g，置于炒药

机中，于 200 ℃ 下分别炒制 1、3、5、7 min，取出放凉，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，进行 HPLC 含量测定和指标得分、综合得分的计算。结果见表 2。

表 2 不同炒制时间下指标成分的指标得分和综合评分
Tab.2 Index scores and comprehensive scores of index components under different processing time

时间/min	GRE 指标 得分	ST 指标 得分	RSO1 指标 得分	综合评分
1	0.217 6	0.971 7	1.000 0	0.675 7
3	1.000 0	1.000 0	0.958 6	0.991 7
5	0.925 3	0.871 5	0.904 1	0.873 7
7	0.915 6	0.957 9	0.775 1	0.930 2

由表 2 可知，萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐硫氰酸盐含量均在炒制时间为 3 min 时出现最高值，RSO1 含量在1 min 时出现了最高值，但 3 min 时与最高值十分接近。根据指标得分为辅，综合得分为主的分析，选取 2、3、4 min 3 个水平进行响应面优化。
2.2.3 炒药机转速 将炒药机温度设置为 200 ℃，预热 30 min，称取生菜菔子饮片 100 g，置于炒药机中，分别于转速 20、30、40 r/min 下炒制 3 min，取出放冷，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，进行 HPLC 测定和得分计算。结果见表 3。

表 4 莱菔子炒制工艺的响应面优化结果

Tab.4 Results of response surface optimization for stir-frying process of *R. sativus*

编号	A/℃	B/min	C/(r·min ⁻¹)	GRE 得分	ST 得分	RSO1 得分	综合评分
1	180(-1)	3(0)	40(1)	0.556 4	0.890 4	0.770 2	0.699 4
2	200(0)	3(0)	30(0)	0.962 7	0.954 9	0.868 1	0.941 4
3	220(1)	3(0)	40(1)	0.978 0	1.000 0	0.901 3	0.969 3
4	180(-1)	2(-1)	30(0)	0.216 4	0.870 8	0.791 8	0.527 8
5	200(0)	2(-1)	40(1)	0.359 4	0.992 5	0.954 9	0.668 4
6	200(0)	4(1)	40(1)	0.952 3	0.963 4	0.913 2	0.947 8
7	180(-1)	3(0)	20(-1)	0.797 5	0.886 3	0.840 3	0.832 7
8	180(-1)	4(1)	30(0)	0.769 7	0.889 5	0.827 1	0.817 1
9	220(1)	2(-1)	30(0)	0.999 4	0.980 0	0.960 0	0.985 7
10	220(1)	4(1)	30(0)	0.977 6	0.959 1	0.900 6	0.956 6
11	200(0)	3(0)	30(0)	1.000 0	0.999 8	1.000 0	0.999 9
12	200(0)	3(0)	30(0)	0.950 7	0.940 0	0.904 2	0.938 2
13	200(0)	2(-1)	20(-1)	0.805 9	0.933 6	0.875 8	0.858 2
14	220(1)	3(0)	20(-1)	0.950 0	0.969 3	0.934 3	0.952 7
15	200(0)	3(0)	30(0)	0.942 8	0.956 8	0.910 5	0.940 5
16	200(0)	4(1)	20(-1)	0.964 8	0.966 8	0.921 7	0.956 8
17	200(0)	3(0)	30(0)	0.979 6	0.987 0	0.966 3	0.979 1

2.3.2 方差分析 应用 Design-Expert. V8.0.6 软件进行分析，得到多元二次回归模拟方程为 $Z = -7.805\ 18 + 0.071\ 495\ A + 0.980\ 42\ B - 0.028\ 88\ C - 3.310\ 53 \times 10^{-3}\ AB + 1.571\ 15 \times 10^{-4}\ AC + 3.278\ 48 \times 10^{-3}\ BC - 1.521\ 31 \times 10^{-4}\ A^2 - 0.058\ 818\ B^2 - 2.393\ 56 \times$

表 3 炒药机不同转速下指标成分的指标得分和综合评分
Tab.3 Index scores and comprehensive scores of index components at different processing speed

转速/ (r·min ⁻¹)	GRE 指标 得分	ST 指标 得分	RSO1 指标 得分	综合评分
20	0.937 9	0.986 1	1.000 0	0.969 6
30	1.000 0	1.000 0	0.932 3	0.986 5
40	0.999 4	0.964 9	0.924 3	0.970 6

由表 3 可知，萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐含量均在 30 r/min 出现最高值，RSO1 含量在 20 r/min 出现最高值，综合评分以炒制 30 r/min 得分最高。因此，选取 20、30、40 r/min 3 个水平进行响应面优化。

2.3 响应面优化实验

2.3.1 响应面法实验设计及结果 在单因素试验的基础上，以炒制温度（A）、炒制时间（B）和炒药机转速（C）作为考察因素，萝卜苷、芥子碱硫氰酸盐、RSO1 的指标得分（S）和综合得分（Z）作为响应值，设计 3 因素 3 水平方案，采用 Box-Behnken 中心组合设计原理，经 Design-Expert V8.0.6 软件处理，得到 3 因素 3 水平共 17 组试验，结果见表 4。

$10^{-4}\ C^2$ ，方差分析见表 5。方程决定系数 $R^2 = 0.960\ 0$ ，校正决定系数 $R^2_{adj} = 0.908\ 6$ ，表明该模型的拟合程度较好； $F = 18.67$ ， $P = 0.000\ 4 < 0.01$ ，表明回归方程具有统计学差异；变异系数（CV%）为 3.82%，方程的离散程度较小，且 $F_{失拟} = 2.04$ ，

$P=0.250\ 5>0.05$ ，表明方程的失拟程度不具有统计学差异，可用于优选莱菔子炒制工艺。另外，一次项 A 、 B 、 C 、二次项 A^2 、 B^2 和两两交互项 AB

对于回归模型具有显著性影响，而 3 个单因素指标对于响应面回归模型的影响程度依次为 $A>B>C$ 。

表 5 方差分析
Tab. 5 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模拟	0.20	9	0.022	18.67	0.000 4	A^2	0.016	1	0.016	13.41	0.008 1
A	0.094	1	0.094	80.98	<0.000 1	B^2	0.015	1	0.015	12.53	0.009 5
B	0.033	1	0.033	27.97	0.001 1	C^2	2.412×10^{-3}	1	2.412×10^{-3}	2.07	0.193 0
C	7.156×10^{-3}	1	7.156×10^{-3}	6.15	0.042 2	残差	8.139×10^{-3}	7	1.163×10^{-3}	—	—
AB	0.018	1	0.018	15.08	0.006 0	失拟项	4.925×10^{-3}	3	1.642×10^{-3}	2.04	0.250 5
AC	3.950×10^{-3}	1	0.950×10^{-3}	3.40	0.107 9	净误差	3.214×10^{-3}	4	8.034×10^{-4}	—	—
BC	4.299×10^{-3}	1	4.299×10^{-3}	3.70	0.095 9	总误差	0.20	16	—	—	—

2.3.3 响应面 3D 图分析 按“2.3.2”项下得到的回归方程，利用 Design-Expert. V8.0.6 软件进行莱菔子炒制条件的优选，响应面分析见图 2。根据所得的 3D 图，可通过观察响应曲面的倾斜度来确定 2 个指标对于响应值 Z 的影响程度，倾斜度越大，则影响程度越高，同时 3D 图的颜色变化和等高线形状也可作为判断曲面倾斜度大小的指标，颜色越深则提取出的含量越多，坡度越大，对响应值的影响越显著，等高线最小椭圆的中心点即为响应

值最高点，椭圆形则表示两因素交互作用明显，而圆形则反之。因此，可以得出 A 与 B 、 C 的相互作用明显， A 对于 Z 的影响程度最大的结论。
以综合评分作为响应值并结合单因素考察方法，优选出的莱菔子炒制条件为炒制温度 217.09℃，炒制时间 3.05 min，炒制转速 29.73 r/min。考虑到实际应用中的可行性，最终确定为炒制温度 220℃，炒制时间 3 min，炒制转速 30 r/min。

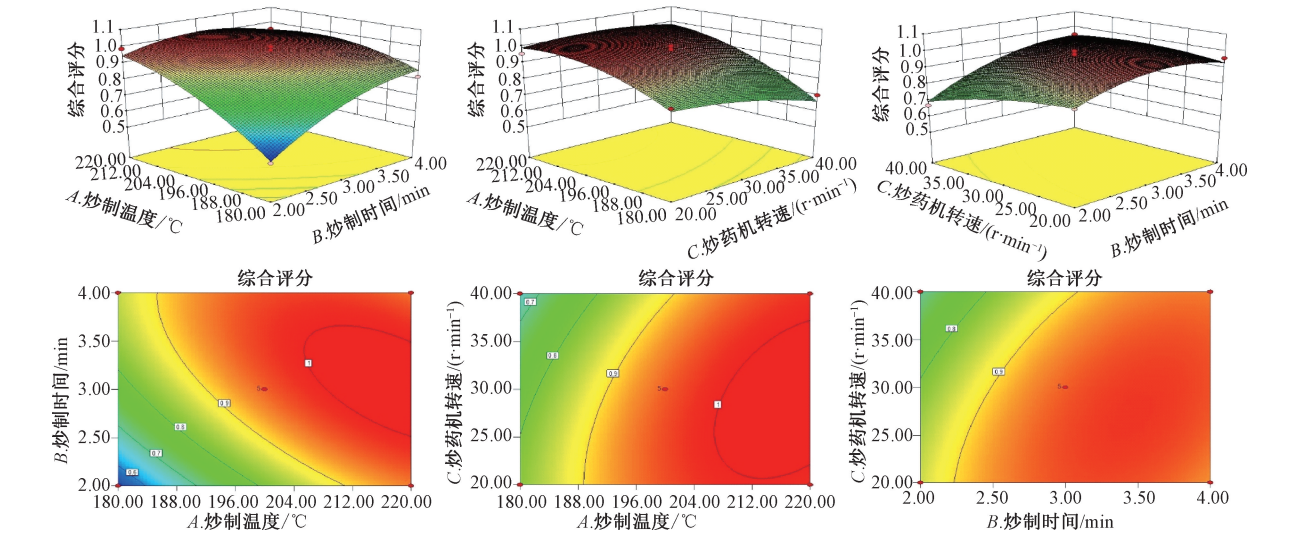


图 2 炒制温度、炒制时间和炒药机转速间的交互作用

Fig. 2 Interactions among stir-frying temperature, stir-frying time and rotation speed of herbal medicine roaster

2.3.4 验证试验 取 1 kg 生莱菔子饮片，共 10 份，按照响应面法优选出的炮制工艺，在 200℃、2 min、40 r/min，200℃、3 min、30 r/min，220℃、3 min、30 r/min，220℃、3 min、20 r/min，240℃、3 min、30 r/min 5 种炮制条件下制备炒莱菔子饮片，每个条件平行制备 2 份，结果见表 6。由此可知，响应面优选的最佳炮制工艺的平均综合得分为 0.990 75，与回归方程的拟合值 1.038 342 761 接近，相对误差均小于 5%，2 组平行样品的 RSD<3%，表明精密度较好；与相近几组炮制工艺的数据相比，响应面优化出的炮制工艺 3 个指标的得分和综合得分均最好，表明响应面模型和回归方程具有良好的预测性，所优选出的莱菔子炮制工艺可行性高，对相关后续研究具有指导意义。

表 6 验证试验结果
Tab. 6 Results of verification tests

炒制温度/℃	炒制时间/min	炒药机转速/(r·min ⁻¹)	GRE 得分	ST 得分	RS01 得分	综合得分
200	2	40	0.570 3	0.848 6	0.724 9	0.712 5
200	3	30	0.802 6	0.938 1	0.886 2	0.873 5
220	3	30	0.992 5	0.985 0	0.998 8	0.990 8
220	3	20	0.966 5	0.927 3	0.861 6	0.929 8
240	3	30	0.868 3	0.874 5	0.763 1	0.849 8

2.4 炒莱菔子水提液对大鼠离体十二指肠运动的影响

2.4.1 炒莱菔子水提液制备 取莱菔子饮片适量，置于炒药机中，设置炒制温度 220 ℃，炒药机转速 30 r/min，炒制时间 3 min，粉碎，加 10 倍量水提取 2 次，每次 0.5 h，滤过，合并提取液，浓缩至质量浓度为 1 g/mL，备用。

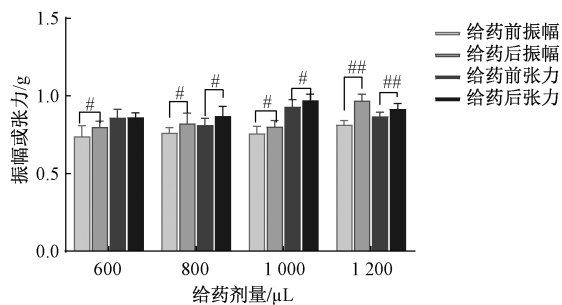
2.4.2 Kreb’s 营养液制备 称取 NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、MgSO₄ 0.15 g、NaH₂PO₄ 0.21 g、NaHCO₃ 1.37 g、CaCl₂ 11.1 g、葡萄糖 1.8 g，加蒸馏水至 1 L，现配现用。

2.4.3 大鼠离体十二指肠肠管制备 大鼠禁食不禁水 24 h，脱颈椎处死后剖开腹部，剪取近幽门端十二指肠肠管 10 cm，置于预冷的 Kreb’s 液中，小心分离肠外周结缔组织，用预冷的 Kreb’s 液冲洗肠内容物，剪成 3 cm 长的肠段备用。将肠段置于盛有 20 mL Kreb’s 液的恒温 37 ℃ 浴槽中，持续通入 5% CO₂ 和 95% O₂ 混合气体（1~2 个气泡/s），每隔 15 min 换 1 次 Kreb’s 液，前负荷 1 g，平衡 1 h，待肠管收缩稳定后进行实验^[18]。分别缓慢向盛有 Kreb’s 液的恒温 37 ℃ 浴槽中加入不同剂量的炒莱菔子水提液，记录给药前后的十二指肠肠段收缩的振幅和张力，37 ℃ Kreb’s 液冲洗肠段 3 次，待大鼠肠段恢复正常收缩频率后，滴加下一个剂量的炒莱菔子水提液，重复上述步骤。

2.4.4 不同剂量炒莱菔子水提液对大鼠离体十二指肠运动的影响

精密吸取“2.4.1”项下炒莱菔子水提液 600 μL，缓慢加入肠管已平衡好的 37 ℃ 恒温浴槽中，记录加药前后肠管变化，按“2.4.3”项下方法依次加入 800、1 000、1 200 μL 水提液，观察离体十二指肠肠管收缩振幅和张力变化。

采用 SPSS 17.0 软件对不同莱菔子样品给药前后数据结果进行单因素方差分析，Graphpad Prism 8.0.1 软件将数据处理成柱状图的形式，结果见图 3。



注：组内比较，#*P*<0.05，##*P*<0.01。

图 3 炒莱菔子水提液对大鼠离体十二指肠张力和振幅的影响

Fig.3 Effect of aqueous extract of stir-fried *R. sativus* on the tension and amplitude of rats’ isolated duodenum

由此可知，炒莱菔子水提取液在质量浓度为 0.03~0.06 mg/mL 时可增大肠收缩的振幅（*P*<0.05，*P*<0.01），在质量浓度为 0.04~0.06 mg/mL 时可使肠运动振幅增大（*P*<0.05，*P*<0.01），表明炒莱菔子水提液具有促进离体十二指肠运动的作用。

3 讨论

中药炮制直接影响临床疗效，明代《本草蒙筌》中讲到“凡药制造，贵在适中，不及则功效难求，太过则气味反失^[17]”。由单因素考察结果表明，炒制温度对莱菔子中萝卜苷和 RS01 含量影响较大，生莱菔子中萝卜苷会发生酶解反应^[13]，莱菔子炒制太过检测不到萝卜苷^[18]，但炒制温度对 RS01 的报道尚未发现。由此可见萝卜苷和 RS01 含量的高低是反映炒莱菔子质量的重要专属性指标。因此采用专属性的多指标评价方法优化莱菔子的炒制工艺，可更全面专属的反映莱菔子炒制程度对其质量的影响，确定莱菔子炒制中的“火候”要求。

传统炮制理论认为莱菔子炒制具有“生熟异治、生升熟降”的药性变化特点，莱菔子炒制性转沉降，具有消食除胀、降气化痰之功效，在临床中作为常用消食药。但其消食除胀的物质基础和药理作用机制并不明确，因此基于上述实验推测萝卜

苷和 RS01 可能为莱菔子炒制“生熟异治”的物质基础。炒制得当的炒莱菔子可具有促进大鼠离体十二指肠运动。

根据各指标响应值的回归模型进行分析，萝卜苷 $=-13.131\ 33+0.109\ 51\ A+2.101\ 44\ B-0.073\ 168\ C-7.188\ 75\times10^{-3}\ AB+3.363\ 75\times10^{-4}\ AC+0.010\ 850\ BC-2.206\ 37\times10^{-4}\ A^2-0.138\ 13\ B^2-5.843\ 00\times10^{-4}\ C^2$ ， $F=17.79$ ， $P=0.000\ 5<0.05$ ，模型回归显著。模型决定系数 $R^2=0.958\ 1$ ， $R_{\text{adj}}^2=0.904\ 2$ ， $CV=8.78\%$ ，表明方程拟合度好，而 $F_{\text{失拟}}=22.25$ ， $P=0.005\ 9<0.05$ ，失拟性显著，表明仅以萝卜苷作为指标，不适合进行响应面设计；芥子碱硫氰酸盐 $=-3.322\ 67+0.038\ 021A+0.191\ 79B-3.256\ 25\times10^{-3}\ C-4.950\ 00\times10^{-4}\ AB+3.325\ 00\times10^{-5}\ AC-1.557\ 50\times10^{-3}\ BC-8.803\ 12\times10^{-5}\ A^2-7.637\ 50\times10^{-3}\ B^2+4.012\ 50\times10^{-5}\ C^2$ ， $F=7.80$ ， $P=0.006\ 5<0.05$ ，表明二次多元回归方程的模型显著，模型决定系数 $R^2=0.909\ 3$ ， $Radj^2=0.792\ 7$ ， $CV=2.00\%$ ，表明方程的拟合度较好；RS01 $=+0.332\ 64+2.917\ 50\times10^{-3}\ A-2.487\ 50\times10^{-3}\ B-4.062\ 50\times10^{-4}\ C$ ，模型决定系数 $R^2=0.443\ 8$ ， $R_{\text{adj}}^2=0.315\ 5$ ， $CV=5.74\%$ ，表明方程的拟合度较差， $F=3.46$ ， $P=0.048\ 2>0.05$ ，表明回归模型不显著，而且不是多元二次方程，为一次多元方程，没有交叉项的影响存在。综上所述，以评价指标的综合得分进行莱菔子炮制工艺的响应面优化具有必要的意义。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020.

[2] 吕文海，谭 鹏，姜虹玉. 莱菔子炮制历史沿革探析[J]. 中药材，2004，27(12)：953-955.

[3] Li Y L, Jiang Y H, Yang C H, *et al.* Enhanced protective effect of the combination of uncaria and semen raphani on vascular endothelium in spontaneously hypertensive rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 358352.

[4] Kntayya S B, Ibrahim M D, Mohd A N, *et al.* Induction of apoptosis and cytotoxicity by isothiocyanate sulforaphene in human hepatocarcinoma HepG2 cells[J]. *Nutrients*, 2018, 10(6)：718-732.

[5] 唐健元，张 磊，彭 成，等. 莱菔子行气消食的机制研究[J]. 中国中西医结合消化杂志，2003，11(5)：287-289.

[6] Chen J, Bao C, Kim J T, *et al.* Sulforaphene inhibition of adipogenesis *via* hedgehog signaling in 3T3-L1 adipocytes[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(45)：11926-11934.

[7] Banihani S A. Radish (*Raphanus sativus*) and diabetes[J]. *Nutrients*, 2017, 9(9)：1014-1022.

[8] Kim K H, Moon E, Kim S Y, *et al.* 4-Methylthio-butanyl derivatives from the seeds of *Raphanus sativus* and their biological evaluation on anti-inflammatory and antitumor activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1)：503-508.

[9] 朱立俏，于绍华，张 茜，等. 炒莱菔子水提液中萝卜苷在人工胃肠液中的稳定性研究[J]. 中华中医药学刊，2019，37(1)：32-35.

[10] 金洪光，李玉全，凌 云，等. 莱菔子化学成分的分离与鉴定[J]. 食品科学，2018，39(6)：200-206.

[11] 朱立俏，盛华刚，郑 德，等. HPLC-TOF/MS 对莱菔子中化学成分的快速鉴定[J]. 辽宁中医杂志，2018，45(2)：358-360.

[12] 朱立俏，盛华刚，周洪雷. 莱菔子水提液中芥子碱硫氰酸盐在大鼠小肠的吸收特性研究[J]. 中药新药与临床药理，2014，25(4)：459-462.

[13] 朱立俏，于绍华，张 茜，等. 基于 HPLC-DAD 特征图谱分析莱菔子饮片酶解过程中化学成分的变化[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(4)：140-145.

[14] 朱立俏，张元元，于绍华，等. 莱菔子炮制前后 HPLC 指纹图谱及主要成分含量变化研究[J]. 中药新药与临床药理，2018，29(5)：614-621.

[15] 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)：1159-1162.

[16] 王 勃，张晓燕，吕辰子，等. 多指标-响应曲面法优选酒炖熟地黄最佳炮制工艺[J]. 中草药，2019，50(9)：2065-2073.

[17] 邹 利，邱炳勋，刘 珂，等. 党参米炒前后党参多糖与 5-羟甲基糠醛的变化及其对胃肠平滑肌运动的影响[J]. 中草药，2017，48(1)：149-154.

[18] 吕文海，任 涛，孟祥红，等. 莱菔子饮片中萝卜苷测定方法的研究[J]. 中成药，2011，33(9)：1563-1565.