

文章编号:1673-1689(2009)05-0647-05

芸苔属植物种子中萝卜硫素的提取工艺研究

吴元锋^{1,2}, 沈莲清^{*3}, 毛建卫^{1,2}, 黄光荣^{1,2}, 袁海娜^{1,2}

(1. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 浙江杭州 310023; 3. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江杭州 310035)

摘要: 由于萝卜硫素(1-异硫氰酸-4-甲磺酰基丁烷)具有一定的抗癌作用, 该化合物越来越引起人们的重视。作者对芸苔属植物种子为原料的萝卜硫素提取工艺进行了研究, 通过比较原料预处理方式、溶剂、预先酶解时间、萃取时间、金属离子等对提取的影响, 得到萝卜硫素的提取工艺条件。GC-MS表明, 提取的物质为萝卜硫素。

关键词: 萝卜硫素; 提取工艺; 品种

中图分类号: O 623. 8

文献标识码: A

Study on Extraction of Sulforaphane from Broccoli

WU Yuan-feng^{1,2}, SHEN Lian-qing^{*3}, MAO Jian-wei^{1,2},
HUANG Guang-rong^{1,2}, YUAN Hai-na^{1,2}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou, 310023, China; 2. Key Laboratory of Agricultural Products Chemical and Biological Processing Technology of Zhejiang Province, Hangzhou 310023, China; 3. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: Natural Sulforaphane (4-methylsulfinyl-3-butenyl isothiocyanate) is an interesting research area for anti-cancer effect in nutrimental and pharmaceutical application. In this work, the extraction of sulforaphane from broccoli seed meal using solvent extraction was investigated. In order to achieve a high extraction rate, the optimum extraction process parameters, including pre-treatment technique, solvent concentration, pre-reaction time, extraction time and metal ions were carefully investigated and achieved. Furthermore, the isolated substrate was proven to be sulforaphane by GC-MS analysis.

Key words: sulforaphane, extraction rate, cultivar

许多学者认为, 多吃十字花科蔬菜, 如西兰花, 花椰菜, 甘蓝等能减少癌症的发病率^[1-3]。十字花

科植物具有抗癌作用是因为含有硫代葡萄糖苷(简称硫苷, Glucosinolate)。当植物被磨碎或咀嚼时,

收稿日期: 2008-11-25

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2005C12017, 2004C12005)。

作者简介: 吴元锋(1976-), 男, 浙江临安人, 工学硕士, 讲师, 主要从事生化与分子生物学研究。

Email: wythz@126.com

* 通讯作者: 沈莲清(1946-), 女, 江苏苏州人, 理学硕士, 教授, 博士生导师, 主要从事物理化学和食品保鲜的教学与科研。Email: lqshen@mail.zjgsu.edu.cn

硫苷就会被硫代葡萄糖苷酶水解,在不同 pH 值、盐浓度等影响下,变成异硫氰酸酯、氰酸酯、腈类或恶唑烷-2-硫酮等各种化合物,其中异硫氰酸酯是最重要的一类化合物。异硫氰酸酯是植物抵抗昆虫的一类防御性物质,对动物有抗营养作用,因此在菜籽加工动物饲料前需用微生物降解等方法将其除去^[4]。但是近年来发现异硫氰酸酯类化合物(如萝卜硫素、异硫氰酸苯乙酯等)表现出很强的抗癌活性。萝卜硫素(sulforaphane, 1-异硫氰酸-4-甲磺酰基丁烷,分子结构式见图1)是葡萄糖莱菔子苷(硫苷的一种)经酶解后产生的,它具有抑制 I 型酶和诱导 II 型酶的作用,从而可以在体内中和致癌化学物质。另外萝卜硫素还可以抑制癌细胞繁殖,诱导细胞凋亡,保护 DNA 免收损伤,抗癌细胞转移等作用^[5-6]。因此,萝卜硫素被认为是迄今为止蔬菜中发现的最强的抗癌成分之一。动物实验表明经常食用富含萝卜硫素的蔬菜可以提高抗癌能力^[7, 8]。



图1 萝卜硫素分子式

Fig. 1 Molecule formula of sulforaphane

随着对萝卜硫素研究的深入,人们迫切需要一种萝卜硫素的提取路线。但是目前国内对于萝卜硫素等异硫氰酸酯的报道主要是分析检测方面^[9, 10],有关萝卜硫素的提取方法以及不同种植物萝卜硫素的含量比较还很少有文献报道。作者以芸苔属植物种子为原料,对萝卜硫素的提取工艺进行了研究,并且对一些常见的芸苔属植物中萝卜硫素的含量进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

原材料:蔬菜种子为西兰花、甘蓝、芥蓝、羽衣甘蓝、球茎甘蓝、大白菜、花菜等,共28个品种。其中翠绿青花菜80 d(西兰花)购于温州首指种业有限公司,其余种子均购于杭州勿忘农种子公司。

主要试剂:萝卜硫素标样:购于Sigma公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

主要仪器:高效液相色谱仪:Waters公司产品,配备有1525型泵和2996检测器;TRACE 2000 DSQ GC/MS气质联用仪:美国热电公司产品,配有NIST V2.0谱库;DFT-100中药粉碎机:温州市大德中药机械有限公司产品;ZFQ 85A旋转蒸发器:

上海医械专机厂产品;有机通风柜:浙江三和科教仪器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 以脱脂种子为原料的提取流程 15.0 g 种子磨碎→加入过量正己烷脱脂→加入25 mL的0.05 mol/mL的磷酸缓冲液(pH 7.0)混合,酶解→分别加入40 mL的有机溶剂萃取3次→真空浓缩除去有机溶剂→甲醇定容到50 mL→0.22 μm微滤膜过滤→HPLC测定萝卜硫素含量。以青花菜种子为原料,分别研究原料预处理方式、溶剂、酶解时间、萃取时间、金属离子等对萝卜硫素提取率的影响,得出最佳提取工艺。

1.2.2 以未脱脂种子为原料的提取流程 15.0 g 种子磨碎→加入25 mL的0.05 mol/mL的磷酸缓冲液(pH 7.0)混合,酶解→分别加入40 mL的二氯甲烷萃取3次→真空浓缩除去二氯甲烷→残留物用体积分数10%乙醇溶液溶解→正己烷萃取3次以除去油脂→体积分数10%乙醇相用二氯甲烷萃取3次→旋转蒸发除去二氯甲烷→甲醇定容到50 mL→0.22 μm微滤膜过滤→HPLC测定萝卜硫素含量。

1.2.3 HPLC分析条件 色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, D 4.6 mm×150 mm,粒径:5 μm;流量:1 mL/min;温度为30 ℃;检测波长:241 nm;进样量:10 μL;流动相为从体积分数10%甲醇、90%水,45 min内线性变化到90%甲醇、10%水。定量方法:以一系列浓度的萝卜硫素标样溶液做标准曲线,得 $Y=3 \times 10^8 X + 109\ 682$, $R^2=0.999\ 9$,在1.0~60.0 μg/mL范围内都与峰面积呈良好的线性关系。

1.2.4 GC-MS分析条件 色谱柱:HP-5弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),气化室温度300 ℃,恒流流量(高纯氮气):1.0 mL/min,柱程序升温:50 ℃保持2 min,以10 ℃/min升到190 ℃,再以20 ℃/min升到300 ℃,保持5 min。接口温度280 ℃,EI+源:70 eV,200 ℃,检测器电压350 V,扫描频率2次/s,质量范围:35~500。

2 结果与分析

2.1 萝卜硫素的鉴定

对青花菜种子提取液做了GC-MS分析,总离子流图见图2,图中保留时间为14.78 min的质谱图见图3,荷质比与文献[11]相近。紫外扫描图谱(图4)和液相保留时间(15.160 min,图5)也和萝卜硫素标样一致,因此可知水解液中液相分析保留时

间为 15.160 min 左右的物质为萝卜硫素。

从图中可以看出,二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯作为萃取剂时,萃取液中萝卜硫素含量比较高。二氯甲烷提取率最高,而且容易挥发,在旋转蒸发时很容易除去,因此二氯甲烷最适合作为萃取剂。但是因二氯甲烷具有较大的毒性,当提取的萝卜硫素用作食品或药品时,乙酸乙酯适宜作为萃取剂。石油醚作为萃取剂时,萃取液中未检测到萝卜硫素。

2.2 不同溶剂对提取率的影响

以翠绿青花菜种子为原料,比较了二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯和石油醚作为萃取剂对萝卜硫素萃取率的影响结果如图 6 所示。

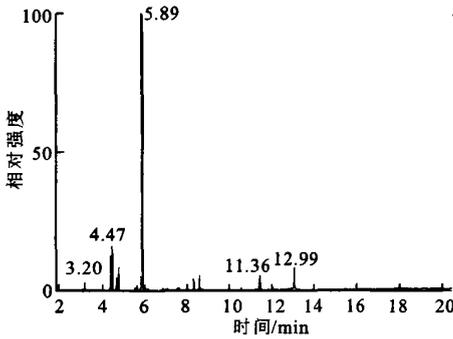


图 2 西兰花种子水解液总离子流图

Fig. 2 Total ion current chromatograms of hydrolysis of the broccoli seed meal

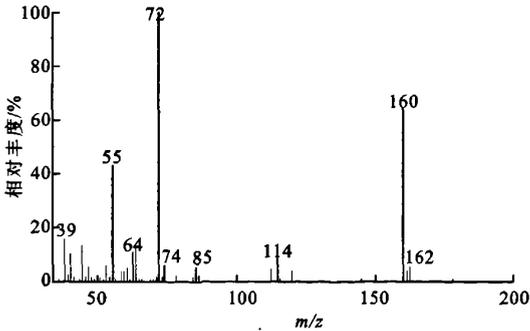


图 3 保留时间为 14.78 min 峰的质谱图

Fig. 3 Mass spectrum of the peaks with t_R 14.78 min

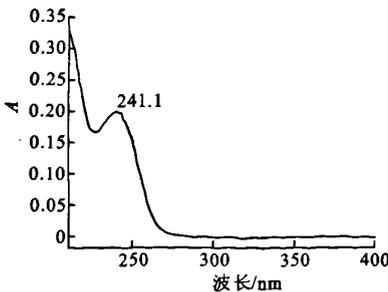


图 4 萝卜硫素的紫外扫描图谱

Fig. 4 Ultraviolet spectrum of sulforaphane

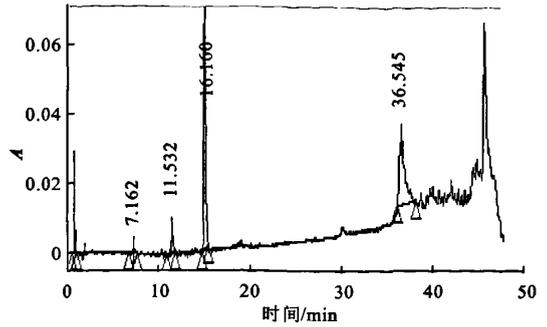


图 5 青花菜种子水解液液相图

Fig. 5 HPLC chromatograph of crude sulforaphane extract from broccoli seed meal

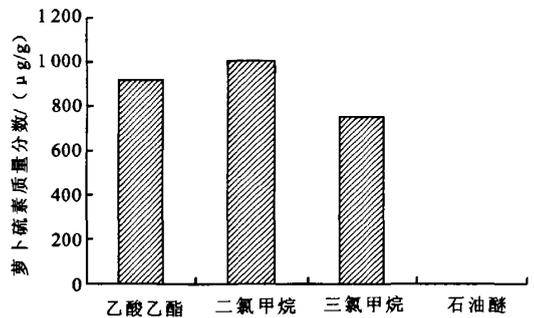


图 6 不同的有机溶剂对提取率的影响

Fig. 6 Effect of different solvent on the yield of sulforaphane

2.3 原料脱脂对提取率的影响

正己烷脱脂可能会使芥子酶失活而减少异硫氰酸盐的形成,因此有些文献采用新鲜种子直接水解后提取萝卜硫素。为了比较这两种方法的提取率,作者做了两组对比实验。分别称取 15 g 青花菜种子,按方法 1.2.1 和方法 1.2.2 提取萝卜硫素,HPLC 测定提取率。两种方法得到的提取率如图 7 所示。

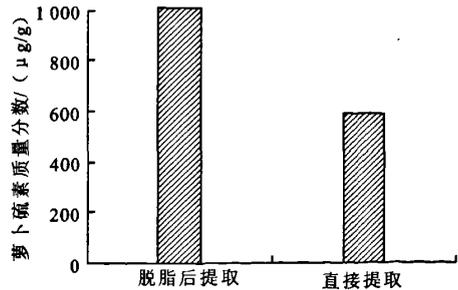


图 7 原料脱脂对提取率的影响

Fig. 7 Effect of de-fat of seed meal on the yield of sulforaphane

由图可见,尽管正己烷可能会影响芥子酶的酶活,但还是先脱脂后提取工艺的提取率高。这可能

是由于种子中含有大量油脂,阻碍了芥子酶和硫苷的接触,而且由于新鲜种子和缓冲液混合后黏度很大,萃取时传质和过滤都比较困难,导致部分萝卜硫素留在滤渣中没被二氯甲烷洗下来,损失比较多。因此在以后的实验中,均采用先脱脂然后再提取的工艺。

2.4 预先水解时间对提取率的影响

以翠绿青花菜种子为原料,提取时间均为 6 h 的情况下,比较了预先水解时间分别为 0 h(即二氯甲烷和缓冲液同时加入到种子中)、2、4、6 h 后萃取的萝卜硫素得率,结果见图 8。

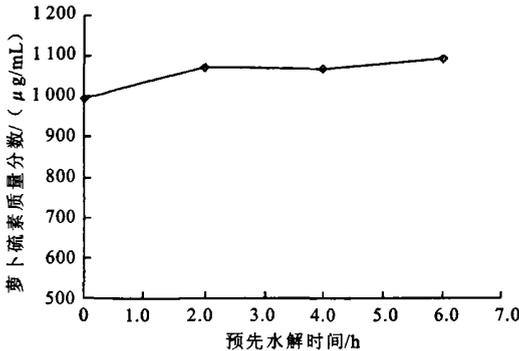


图 8 预先水解时间对提取率的影响

Fig. 8 Effect of pre-reaction time on the yield of sulforaphane

从图中可以看出,预先水解时间对提取率影响不大,即酶水解同时加二氯甲烷对提取率影响不大,由此可推测二氯甲烷对硫苷酶的活性没有影响。但是当预先水解时间为 0 h(即一边水解一边萃取)时,总的提取时间最短,因此在以后的实验中采用预先水解时间为 0 h 的提取方式。

2.5 萃取时间对提取率的影响

以翠绿青花菜种子为原料,预先水解时间为 0 h 时,研究了萃取时间为 2、4、6、8、10 h 时萃取液中萝卜硫素的含量,结果如图 9 所示。可以看出萃取时间为 8 h 后萃取率达到最高,因此萃取时间应为 8 h。

2.6 不同离子对提取率的影响

萝卜硫素是由芥子酶催化葡萄糖莱菔子苷水解而来的,金属离子的存在可能对芥子酶的酶活有促进或抑制作用。以翠绿青花菜种子为原料,在水解时加入 FeCl₂、MgCl₂、ZnCl₂ 和 CaCl₂ 等(浓度均为 5 mmol/L),研究这些金属离子对萝卜硫素产量的影响,结果如图 10。

从图中可以推断 Fe²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 等金属离子对酶活有抑制作用,因而造成萝卜硫素提取率降低。Zn²⁺ 离子则对萝卜硫素的提取率没有影响,因此综合考虑,提取液中不加金属离子。

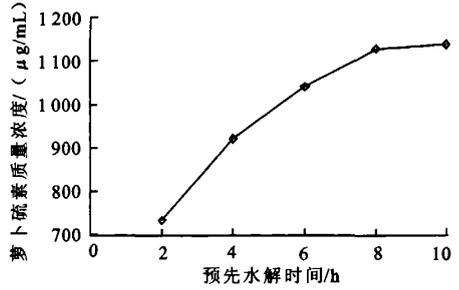


图 9 萃取时间对提取率的影响

Fig. 9 Effect of extraction time on the yield of sulforaphane

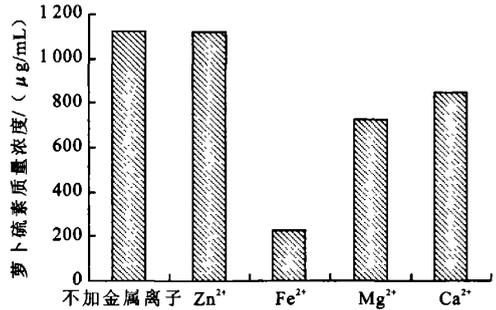


图 10 金属离子对萝卜硫素产量的影响

Fig. 10 Effect of different metal ions on the yield of sulforaphane

2.7 各种种子中萝卜硫素含量的分析

文献报道西兰花、甘蓝、芥蓝、羽衣甘蓝、球茎甘蓝、大白菜、花菜等芸苔属蔬菜都含有萝卜硫素。为了寻找最佳的提取原料,比较了这 7 个种类蔬菜共 28 个品种的种子的萝卜硫素提取率,结果发现芥蓝、大白菜、花菜和羽衣甘蓝中并没有发现有萝卜硫素,西兰花、甘蓝和球茎甘蓝的各个品种水解液都得到了萝卜硫素。

对西兰花各个品种种子的萝卜硫素得率进行了分析(表 1),可以看出西兰花种子的萝卜硫素得率比其它种子要高很多,因此西兰花种子是提取萝卜硫素的最好原料。虽然西兰花种子都含有萝卜硫素,但是不同品种的总异硫氰酸酯和萝卜硫素的得率很不一样。绿龙 I 号、绿龙 II 号、翠绿青花菜的萝卜硫素得率很高,而蓝海、蓝帝、蓝带的得率很低。这个不同可能是由于不同品种的芥子酶活性不同造成的。Matusheski 研究认为,在有些品种中,4-甲基亚磺酰丁基芥子油苷(glucoraphanin)的酶解产物主要是腈类物质 sulforaphane nitrile,但如果通过添加外源的芥子酶,则会主要水解为萝卜硫素^[11]。在今后的研究中,将添加不同的外源芥子酶,观察这些品种的萝卜硫素产量。在所有的种子中,绿龙 1 号的萝卜硫素得率最高。翠绿青花菜种

表 1 13 种芸苔属植物种子中萝卜硫素提取率*

Tab.1 Yield of sulforaphane from seeds of 13 varieties of *Brassica*

种类	品种	萝卜硫素质量分数/(mg/kg)
西兰花	蓝海	119.6
	蓝带	101.7
	蓝帝	62.4
	绿龙 1 号	1 575.5
	绿龙 2 号	1 391.0
	冠军 F1	958.7
	翠绿青花菜 80d	588.3
甘蓝	新丰甘蓝	64.8
	夏冠	68.7
	冬春宝	114.5
	春奇甘蓝	146.3
	翠绿青花菜	1 126.9
	春秋青胚蓝	55.9

*注:其余 15 种芸苔属种子中未检出萝卜硫素,没有列在该表中。

子的萝卜硫素得率虽然比绿龙系列的要低,但是其价格比绿龙要低很多(绿龙 I 号种子的市场价是翠绿青花菜的 12 倍),因此翠绿青花菜、绿龙 I 号和绿

参考文献(References):

- [1] Cohen J H, Kristal A R, Stanford J L. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(1): 61-68.
- [2] Vermeulen M, Van den Berg R, Freidig A P, et al. Association between consumption of cruciferous vegetables and condiments and excretion in urine of isothiocyanate mercapturic acids[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(15): 5350-5358.
- [3] 吕静, 陶文沂, 程景才, 等. 十字花科蔬菜提取物抗肿瘤作用的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(4): 105-109. LU Jing, TAO Wen-yi, CHEN Jin-cai, et al. Antitumor effects of extract from cruciferous vegetables[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(4): 105-109. (in Chinese)
- [4] 吴谋成, 邵锦华, 周海涛. 双低油菜饼粕中植酸的脱除技术研究[J]. *中国粮油学报*, 2002, 17(3): 1-3. WU Mou-cheng, SHAO Jin-hua, ZHOU Hai-tao. A removal technology of phytic acid from rapeseed meal[J]. *Chinese Cereals and Oils Association*, 2002, 17(3): 1-3. (in Chinese)
- [5] Higdon J V, Delage B, Williams D E, et al. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis[J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(3): 224-236.
- [6] Fimognari C, Hrelia P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer[J]. *Mutat Res*, 2007, 635 (2-3): 90-104.
- [7] Hwang E S, Jeffery E H. Effects of different processing methods on induction of quinone reductase by dietary broccoli in rats[J]. *J Med Food*, 2004, 7(1): 95-99.
- [8] Chung F L, Conaway C C, Rao C V, et al. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(12): 2287-2291.
- [9] 陈新娟, 朱祝军, 杨静, 等. 芥蓝叶和薹的硫代葡萄糖苷组分及含量[J]. *园艺学报*, 2006, 33(4): 741-744. CHEN Xin-juan, ZHU Zhu-jun, YANG Jing, et al. Composition and content of glucosinolates in leaves and bolting stems of Chinese kale quantified by HPLC[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(4): 741-744. (in Chinese)
- [10] 何洪巨, 唐晓伟, 刘玲, 等. HPLC-ESI/MS 鉴定十字花科植物中完整硫代葡萄糖甙[J]. *质谱学报*, 2003, 24(3): 385-388. HE Hong-ju, TANG Xiao-wei, LIU Lin, et al. Qualitative analysis of intact glucosinolates by high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2003, 24(3): 385-388. (in Chinese)
- [11] 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.
- [12] Tookey H L, Daxenbichler M E, VanEtten C H, et al. Cabbage glucosinolates: correspondence of patterns in seeds and leafy heads[J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 1980, 105: 714-717.

(责任编辑:朱明)