

超声辅助低共熔溶剂提取莱菔子中萝卜硫素的工艺优化及其铜绿假单胞菌生物膜抑制活性研究

梁佩云, 黄钰景, 陈浩铭, 曹昊恒, 吴银冰, 陈婷婷, 陈楚汕, 范红霞, 郑俊霞*

广东工业大学生物医药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 采用超声辅助低共熔溶剂 (deep eutectic solvents, DESs) 提取莱菔子中的萝卜硫素, 并对其提取工艺、提取效率、溶剂回收利用率及其对铜绿假单胞菌生物膜抑制活性进行研究。 **方法** 采用响应面法 (response surface methodology, RSM) 实验优化莱菔子中萝卜硫素提取工艺, 并结合大孔树脂吸附法回收 DESs。 **结果** 由氯化胆碱和乳酸合成的 DESs 具有最高提取率, 经响应面实验优化后, 在乳酸与氯化胆碱物质的量比 3.16:1、含水量 40.82%、液料比 20.96:1、超声时间 39.94 min、超声温度 40 °C、超声功率 400 W 下, 萝卜硫素的提取率高达 22.20 mg/g, 回收实验表明, 回收后的 DESs 重复提取的萝卜硫素提取率达 20.92 mg/g, 回收利用率为 95.05%。此外, 铜绿假单胞菌生物膜抑制实验表明, 在 256 µg/mL 质量浓度下, 莱菔子 DESs 提取物的生物膜抑制率为 53.84%。 **结论** DESs 作为提取介质具有高效、绿色环保及可重复利用等优点, 可用于莱菔子中萝卜硫素的提取, 同时, DESs 作为提取介质应用于其他中药有效成分的提取提供了新思路。

关键词: 低共熔溶剂; 提取工艺; 响应面法; 莱菔子; 萝卜硫素; 铜绿假单胞菌; 生物膜抑制活性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)06-1960-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.06.018

Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvents extraction of sulforaphane from *Raphani Semen* and study on biofilm inhibition activity of *Pseudomonas aeruginosa*

LIANG Peiyun, HUANG Yujing, CHEN Haoming, CAO Haoheng, WU Yinbing, CHEN Tingting, CHEN Chushan, FAN Hongxia, ZHENG Junxia

School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective Ultrasonic-assisted deep eutectic solvents (DESs) was used to extract sulforaphane from *Raphani Semen*, and its extraction technology, extraction efficiency, solvent recovery and utilization rate and biofilm inhibition activity of *Pseudomonas aeruginosa* were studied. **Methods** Response surface methodology (RSM) was used to optimize the extraction process of sulforaphane from *Raphani Semen*, and DESs was recovered by macroporous resin adsorption. **Results** DESs synthesized from choline chloride and lactic acid has the highest extraction rate. After optimization by RSM, the extraction rate of sulforaphane is as high as 22.20 mg/g under the conditions of lactic acid to choline chloride molar ratio 3.16:1, water content 40.82%, liquid-solid ratio 20.96:1, ultrasonic time 39.94 min, ultrasonic temperature 40 °C, ultrasonic power 400 W, and the recovery experiment shows that the extraction rate of sulforaphane repeatedly extracted by DESs is 20.92 mg/g, and the recovery rate is 95.05%. In addition, the biofilm inhibition experiment of *Pseudomonas aeruginosa* shows that at the concentration of 256 µg/mL, the biofilm inhibition rate of *Raphani Semen* DESs extract is 53.84%. **Conclusion** DESs, as an extraction medium, has the advantages of high efficiency, environmental protection and reusability, and can be used to extract sulforaphane from *Raphani Semen*. At the same time, it is a new idea to apply DESs as an extraction medium to extract effective components from other traditional Chinese medicines.

Key words: deep eutectic solvents; extraction process; response surface methodology; *Raphani Semen*; sulforaphane; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm inhibition activity

收稿日期: 2023-08-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82073977); 广东省自然科学基金面上项目 (2023A1515011445)

作者简介: 梁佩云 (1998—), 女, 广东肇庆, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 192830634@qq.com

*通信作者: 郑俊霞 (1981—), 女, 山西绛县人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础研究。

E-mail: junxiazheng@gdut.edu.cn

莱菔子，别名“萝卜子”“菜子头”，为十字花科莱菔属植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子，归肺、脾、胃经，具有消食除胀、降气化痰等众多功效，其主要活性成分为异硫氰酸酯及硫代葡萄糖苷等，其中萝卜硫素是莱菔子中含量较大的异硫氰酸酯类化合物，因此，从莱菔子中提取萝卜硫素应用于药品和食品领域具有重大意义^[1-4]。目前，萝卜硫素的提取主要以溶剂萃取法、酶解法和现代提取技术为主。

溶剂萃取法常用的提取溶剂为二氯甲烷^[5-9]、醋酸乙酯^[10-15]、丙酮^[16]、热乙醇溶液^[17]等，然而，有机溶剂易挥发、有毒，对环境有害，此外，废液处理成本高。酶解法是目前人们从植物中获得天然萝卜硫素的主要方法^[18]，但酶的活性极易受到环境影响和酶的成本较高，且硫苷酶解后存在大量副产物，后续的纯化工作复杂。

现代提取技术主要包括超临界流体萃取^[19]、超声波辅助提取^[9]和微波辅助提取^[20]等仪器分析技术的应用，有效的缩短了萝卜硫素提取时间，提高了提取效率，但对仪器分析的准确度要求高，难以实现大范围推广。因此，寻找绿色溶剂用于莱菔子中萝卜硫素的提取倍受重视。

绿色溶剂的开发促进了现代绿色化学的发展，与传统有机试剂相比，低共熔溶剂（deep eutectic solvents, DESs）具有熔点低、绿色、无毒以及可提高中药化合物提取率等突出优点，是提取中药活性成分的理想试剂，具有广阔的开发前景和商业应用前景^[21-23]。低共熔溶剂是指由一定化学计量学比的氢键受体（hydrogen bond acceptor, HBA）和氢键供体（hydrogen bond donors, HBD）组合而成的低共熔混合物，其凝固点显著低于各个组分纯物质的熔点^[24-29]。针对 DESs 诸多优点，研究人员已将其运用于食品、药品等领域，作为一种绿色提取介质，用于酚酸类^[30]、生物碱类^[31]、多糖类^[32]等活性成分的提取，但 DESs 提取莱菔子中活性成分研究仍然有限，且国内报道不多。

因此，本实验采用超声辅助低共熔溶剂提取技术^[18,33]，研究不同低共熔溶剂对莱菔子中的萝卜硫素提取率的影响，并利用响应面对工艺进行优化；同时采用大孔吸附树脂法回收莱菔子中的萝卜硫素和 DESs 溶剂，评价该方法的可持续利用度，以期作为 DESs 提取该成分提供可靠的理论基础，具体流程如图 1 所示。



图 1 DESs 提取莱菔子中萝卜硫素的流程

Fig. 1 DESs extraction process of sulforaphane from *Raphani Semen*

1 仪器与材料

1.1 仪器

Forma 3111 型超纯水系统，深圳洪森环保科技有限公司；1260 Infinity II 型高效液相色谱仪，支元仪器有限公司；SW-CJ-2FD 型超净工作台，苏州安泰公司；YXQ-LS-70A 型高压灭菌锅、THZ-300 型恒温培养摇床，上海一恒医疗器械有限公司；DW-HL100 型-80℃超低温冰箱，美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 材料

莱菔子药材购于广州市场，经暨南大学生物医药研究院王一飞教授鉴定，为十字花科莱菔属植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子。D-101 大孔树脂、AB-8 大孔树脂、氯化胆碱、乙酸、乙二醇、丙三醇、乳酸、柠檬酸、尿素、乙酰胺等均购于广州化学试剂厂；萝卜硫素对照品，批号 CKA454，质量分数 99.0%，购于德国 Sigma 公司；水解酪蛋白（MH）肉汤和 MH 琼脂购于青岛海博生物技术有限公司；结晶紫、酸水解酪蛋白、二甲基亚砜（DMSO）等均购于广州市光华科技股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 试剂、缓冲液和培养基的配制

2.1.1 A10 溶液、BT 溶液的配制

（1）A10 溶液：由 4.785 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 、2.994 g KH_2PO_4 、2.992 g NaCl 、1.995 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 用超纯水溶解并定容至 100 mL，即得。

（2）BT 溶液：由 5.549 0 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （C）、4.760 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （M）、0.135 1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （F）先分别加入蒸馏水定容至 50 mL，再按 500 μL M、50 μL C、500 μL F、450 mL 蒸馏水混合，即得。

2.1.2 PBS 缓冲溶液 准确称取磷酸氢二钠 1.44 g，磷酸二氢钾 0.2 g，氯化钾 0.2 g，氯化钠 8.0 g 后加

入去离子水溶解,调节 pH 值至 7.4,用超纯水定容至 1 L,高温高压灭菌后,冷却,备用。

2.1.3 最简 (ABTGC) 培养基 (含有葡萄糖和酸水解酪蛋白) 配制 ABTGC 培养基由 A10 溶液、BT 溶液、20%葡萄糖溶液及 20%酸水解酪蛋白溶液混合配制而成。A10 和 BT 溶液分别用高压蒸汽灭菌,冷却至室温后,准确取 450 mL BT 溶液,加入 50 mL A10 溶液,并加入 5 mL 20%葡萄糖及 5 mL 20%酸水解酪蛋白 (20%葡萄糖及 20%酸水解酪蛋白用滤过除菌),混合均匀后置于 -4°C 冰箱,备用。

2.2 前处理

莱菔子样品用去离子水洗净,并在 40°C 干燥后,用中药粉碎机粉碎并过筛 (60 目),备用。根据文献报道,用加热搅拌法制备 DESs, HBD 和 HBA 按一定物质的量比在 80°C 左右下加热搅拌,直至形成均一、透明的液体。HBD 和 HBA 组合形成不同种类的 DESs,如表 1 所示。常见的 DESs 是由不同配体与氯化胆碱按照一定物质的量比形成的,主要由于氯化胆碱价格便宜、来源广泛、无毒且可生物降解。参考文献报道的方法处理新购买的大孔吸附树脂^[30],将其装入洁净的树脂柱内,以 95%乙醇洗至流出液加 3 倍量水后无白色混浊现象,改用蒸馏水冲洗至无醇味,备用^[34]。

表 1 不同种类的 DESs

Table 1 Different kinds of DESs

编号	HBD	HBA	物质的量比
DESs-1	乙酸	氯化胆碱	2 : 1
DESs-2	柠檬酸	氯化胆碱	2 : 1
DESs-3	乳酸	氯化胆碱	2 : 1
DESs-4	乙酰胺	氯化胆碱	2 : 1
DESs-5	尿素	氯化胆碱	2 : 1
DESs-6	丙三醇	氯化胆碱	2 : 1
DESs-7	乙二醇	氯化胆碱	2 : 1

2.3 对照品溶液的制备及线性关系考察

精密称取萝卜硫素对照品 5.0 mg,置于 5 mL 量瓶中,加入色谱级甲醇稀释至刻度,配制成 1.0 mg/mL 的萝卜硫素对照品溶液,然后用 1.0 mg/mL 对照品溶液分别配制成 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 的系列对照品溶液,进行 HPLC 分析。

色谱条件^[18,23]:色谱柱为 Cosmosil Cholesterol 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为水-乙腈;体流量 0.8 mL/min;柱温 30°C ;检测波长 201 nm;

进样量 10 μL ;洗脱梯度设置为 0~10 min, 10%~80%乙腈;10~15 min, 80%~100%乙腈。色谱图见图 2。

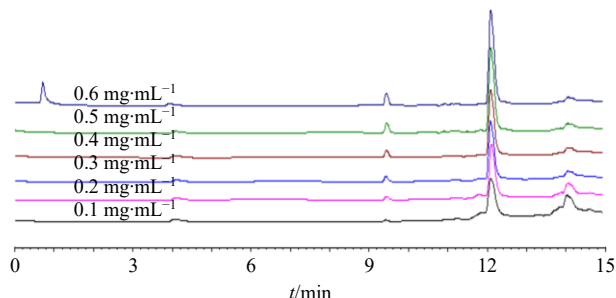


图 2 不同质量浓度的萝卜硫素对照品溶液在 201 nm 下的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC diagram of sulforaphane standard solution with different concentrations at 201 nm

各质量浓度的标准溶液经色谱分析后,以标准溶液的质量浓度为横坐标 (X),对照品溶液的峰面积为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,得到线性回归方程 $Y=1\times 10^7 X+5\times 10^6$, $r^2=0.9995$,结果表明萝卜硫素在 0.1~0.6 mg/mL 呈现良好的线性关系。

2.4 莱菔子中萝卜硫素提取率的计算

精密移取莱菔子提取液 0.5 mL,加入色谱级的甲醇溶液 0.5 mL,摇匀,在 201 nm 下测定溶液中的萝卜硫素的峰面积。将峰面积代入标准曲线求得相应的萝卜硫素质量浓度,再利用如下公式计算莱菔子中萝卜硫素的提取率。

$$\text{提取率} = CVD/M$$

C 为据标准曲线计算求得的萝卜硫素质量浓度, V 为上清液的体积, D 为稀释倍数, M 为样品质量

2.5 莱菔子中萝卜硫素的提取

精密称量莱菔子粉末 5.00 g 置于锥形瓶中,按照液料比 10 : 1 加入 DESs 50.0 mL (含水量为 30%),混合均匀,静置 2 h 后,放入超声仪中,在 35°C 、350 W 下超声提取 30 min,冷却至室温,溶液转移至离心管内,8 000 r/min 离心 15 min (离心半径 10 cm),弃沉淀,量取并记录上清液的体积。同时,选取文献报道^[2-3]的莱菔子常用的提取方法 (95%乙醇超声提取法),在同等条件下,与本研究的低共熔溶剂提取法进行比较。

2.6 DESs 种类的选择

称取 5.0 g 莱菔子粉末 8 份于提取器中,分别按照液料比 10 : 1 加入 95%乙醇和物质的量比 2 : 1 的 DESs (DESs-1、DESs-2、DESs-3、DESs-4、DESs-5、DESs-6、DESs-7),其含水量均为 30% (含

水量指水与溶剂的体积比), 超声温度 30 ℃、超声时间 30 min、超声功率 350 W 进行 DESs 的选择, 实验重复 3 次。结果见图 3 和表 2, 各种低共熔溶剂的提取率均高于有机试剂 95%乙醇对莱菔子中萝卜硫素的提取率, 且 7 种低共熔溶剂中 DESs-3 (乳酸-氯化胆碱) 的提取率较其他低共熔溶剂高, 故本实验选取 DESs-3 (乳酸-氯化胆碱) 作为提取溶剂。

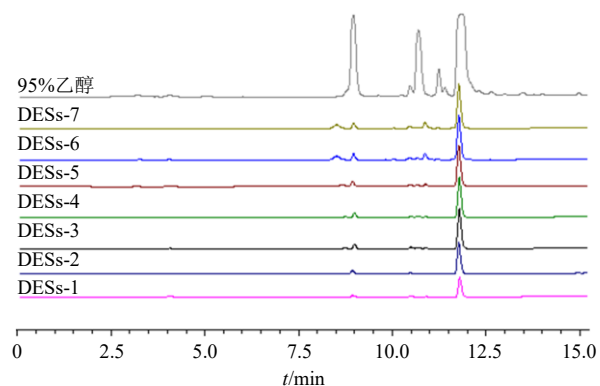


图 3 95%乙醇提取液和 DESs 提取液在 201 nm 下的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC images of 95% ethanol extracting solution and DESs extracting solution at 201 nm

表 2 提取溶剂对萝卜硫素提取率的影响

Table 2 Effects of extractants on the extraction rate of sulforaphane

提取溶剂	提取率/(mg·g ⁻¹)	提取溶剂	提取率/(mg·g ⁻¹)
95%乙醇	4.273 9	DESs-4	4.893 6
DESs-1	7.561 6	DESs-5	4.541 1
DESs-2	7.572 8	DESs-6	5.703 5
DESs-3	9.662 7	DESs-7	6.341 2

2.7 单因素试验考察各影响因素对萝卜硫素提取率的影响

在确定最佳 DESs 的种类的基础上, 按照“2.5”项下提取方法, 精密称量莱菔子粉末 5.00 g 置于锥形瓶中, 按照液料比 10 : 1 加入 DESs (乳酸与氯化胆碱物质的量比 2 : 1) 50.0 mL (含水量为 30%), 混合均匀, 静置 2 h 后, 放入超声仪中, 在 35 ℃、350 W 下超声提取 30 min, 冷却至室温, 溶液转移至离心管内, 8 000 r/min 离心 15 min (离心半径 10 cm), 弃沉淀, 量取并记录上清液的体积。依次考察乳酸与氯化胆碱物质的量比、含水量、液料比、超声时间、超声温度、超声功率对萝卜硫素提取率的影响。分析上述 6 个单因素对莱菔子中萝卜硫素提取的影响程度, 并选择其中对莱菔子中萝卜硫素提

取率影响程度最大的 4 个因素的各自最佳水平进行后续 Box-Behnken 设计(Box-Behnken design, BBD)实验。

2.7.1 乳酸与氯化胆碱物质的量比对萝卜硫素提取率的影响 不同乳酸与氯化胆碱物质的量比 1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1 时, 莱菔子中萝卜硫素的提取率分别为 7.273 3、9.863 2、15.504 9、15.068 9、8.411 4、4.103 7 mg/g。随着乳酸比例的增加, 提取液中萝卜硫素含量快速上升, 当乳酸与氯化胆碱的比例为 3 : 1 时, 提取率达到最大值, 继续增加乳酸量, 萝卜硫素提取率又下降。其原因可能是, 在常温下 DESs 的黏度很大, 增加乳酸的量可降低 DESs 的黏度和表面张力, 从而增加目标组分的扩散和质量转移能力, 使得萝卜硫素的提取率升高; 但随着乳酸含量的增多, 氯化胆碱含量逐渐降低, 又会导致目标组分与 DESs 的相互作用减弱, 从而使得提取率下降。因此, 选择乳酸与氯化胆碱的物质的量比为 3 : 1, 作为物质的量比因素的最佳水平。

2.7.2 含水量对萝卜硫素提取率的影响 不同含水量 10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、60% 时, 莱菔子中萝卜硫素的提取率分别为 2.272 8、3.685 0、10.016 0、11.117 5、15.209 1、14.409 2、12.460 4、6.433 2 mg/g。当含水量为 40%时, 萝卜硫素提取率最大。含水量是影响 DESs 提取效率的重要参数, 具有调节 DESs 的黏度和极性作用。增大含水量会降低 DESs 的黏度, 同时也会影响 DESs 的极性, 黏度的降低可增加溶剂与莱菔子的接触, 进而增加莱菔子中萝卜硫素的提取率; 然而含水量过高会使 DESs 中的氢键被破坏, 削弱了 DESs 与莱菔子间的相互作用。故选择 40%为含水量因素的最佳水平。

2.7.3 液料比对萝卜硫素提取率的影响 不同液料比为 10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1 时, 莱菔子中萝卜硫素的提取率分别为 9.140 1、16.459 1、17.165 0、13.475 6、5.258 4、4.253 3、2.236 3 mg/g。随着液料比的降低, 萝卜硫素提取率呈现先增加后降低的趋势, 其可能是因为 DESs 的体积决定了莱菔子粉末是否能充分浸润、目标化合物能否有效溶出。随着液料比的降低, 莱菔子粉末充分浸润, 萝卜硫素提取率不断增加, 当液料比达到 20 : 1 时, 萝卜硫素提取率达到最大值; 此时再降低液料比, 增加溶液量, 会使得超声破坏

莱菔子细胞壁的效果变差，导致部分萝卜硫素无法溶解到溶液中，从而使得其提取率下降。因此，选择 20：1 作为液料比因素的最佳水平。

2.7.4 超声时间对萝卜硫素提取率的影响 不同超声时间 10、20、30、35、40、45、50、60 min 时，莱菔子中萝卜硫素的提取率分别为 5.154 3、9.068 1、13.026 4、16.382 6、17.709 4、16.802 2、13.795 3、9.028 2 mg/g。在 10~40 min 时间段内提取率随着超声时间的增加而上升，原因是超声时间越长，超声对于莱菔子细胞壁的破坏程度越大，萝卜硫素溶解增多，提取率上升；在 40~60 min 的时间段内提取率下降，可能是因为随着超声时间的增加，萝卜硫素的溶解率逐渐接近饱和，而其他化合物溶出增多；也可能是超声时间过长对萝卜硫素的稳定性有一定影响，故提取率下降。因此，选择 40 min 作为超声时间因素的最佳水平。

2.7.5 超声温度对萝卜硫素提取率的影响 不同超声温度 25、30、35、40、45、50、60 ℃ 时，莱菔子中萝卜硫素的提取率分别为 2.575 0、3.013 1、8.647 2、13.785 3、14.539 1、13.407 7、11.936 8 mg/g。随着超声温度的升高，萝卜硫素的提取率先升后降，这是因为随着超声温度的升高，会进一步增加莱菔子细胞壁的破坏程度，加大溶剂与莱菔子中萝卜硫素的传质能力；但随着超声温度再升高，反而会使化合物降解，故提取率下降。因此，选择 40 ℃ 作为超声温度因素的最佳水平。

2.7.6 超声功率对萝卜硫素提取率的影响 不同超声功率 200、250、300、350、400、450、500 W 时，莱菔子中萝卜硫素的提取率分别为 3.962 8、5.056 2、

5.209 5、6.182 4、10.356 4、9.753 1、7.624 3 mg/g。随着超声功率的升高，莱菔子中萝卜硫素的提取率呈现先上升后下降的趋势。原因可能是随着超声功率的升高，高密度涡流和大气泡的产生增加，介质的物理和化学作用增强，提取率提高；但当功率超过一定值时，提取率开始降低，这是因为当功率过高时，产生的高密度涡流和大气泡将使得目标组分结构发生变化，从而导致提取率下降。因此，选择 400 W 作为超声功率因素的最佳水平。

结合单因素实验的结果，以莱菔子中萝卜硫素提取率为响应值比较可知，各因素对莱菔子中萝卜硫素提取的影响程度：超声时间>液料比>物质的量比>含水量>超声温度>超声功率。

2.8 BBD 实验优化提取工艺

2.8.1 BBD 实验设计 采取 3 水平 4 因素 BBD 实验优化莱菔子中萝卜硫素的提取条件。在单因素实验的基础上，以萝卜硫素提取率为响应值，选取乳酸（HBD）与氯化胆碱（HBA）物质的量比（ X_1 ）、含水量（ X_2 ）、液料比（ X_3 ）和超声时间（ X_4 ）因素中影响最大的 3 水平，分别以 -1、0、+1 编码，因素与水平设计见表 3，且超声温度和超声功率分别为 40 ℃ 和 400 W。利用 Design-Expert 软件对各种因素进行回归拟合，优化莱菔子中的萝卜硫素的提取条件。

2.8.2 响应面（RSM）优化提取条件结果分析 采用 BBD 实验涉及到 3 个水平、4 个因素，具有 5 个重复数据用于评价模型变异性和稳定性。BBD 实验表格设计及其实验数据如表 3 所示，实验结果如表 4 和图 4 所示，在数据分析软件中，根据实验数据，

表 3 BBD 实验设计与结果

Table 3 Experiment design and results of BBD

编号	X_1	$X_2/\%$	X_3	X_4/min	提取率/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	编号	X_1	$X_2/\%$	X_3	X_4/min	提取率/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	编号	X_1	$X_2/\%$	X_3	X_4/min	提取率/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	4 (+1)	40 (0)	20 (0)	35 (-1)	16.97	11	3	45	25	40	18.38	21	3	45	20	35	16.27
2	2 (-1)	40	25 (+1)	40 (0)	13.89	12	4	40	15	40	14.42	22	3	40	20	40	22.25
3	3 (0)	40	25	35	14.35	13	2	45	20	40	10.65	23	3	40	25	45	17.77
4	4	35 (-1)	20	40	9.85	14	3	35	15	40	15.19	24	3	35	25	40	15.79
5	3	40	15 (-1)	35	16.92	15	3	35	20	45	15.80	25	3	45	20	45	13.89
6	2	40	15	40	11.97	16	2	40	20	35	10.49	26	4	40	20	45	13.13
7	3	45 (+1)	15	40	14.53	17	3	40	20	40	21.37	27	3	35	20	35	13.71
8	4	40	25	40	17.22	18	4	45	20	40	17.63	28	3	40	20	40	21.52
9	3	40	15	45 (+1)	14.53	19	2	40	20	45	15.82	29	3	40	20	40	22.25
10	3	40	20	40	22.46	20	2	35	20	40	12.48						

表 4 响应面回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis for response surface regression mode

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	341.24	14	24.37	32.07	<0.000 1	X_1^2	166.87	1	166.87	219.53	<0.000 1
X_1	16.15	1	16.15	21.24	0.000 4	X_2	96.94	1	96.94	127.53	<0.000 1
X_2	6.06	1	6.06	7.98	0.013 5	X_3	41.10	1	41.10	54.06	<0.000 1
X_3	8.07	1	8.07	10.62	0.005 7	X_4	65.63	1	65.63	86.34	<0.000 1
X_4	0.41	1	0.41	0.55	0.472 5	残差	10.64	14	0.76		
X_1X_2	23.09	1	23.09	30.37	<0.000 1	失拟项	9.68	10	0.97	4.04	0.095 4
X_1X_3	0.19	1	0.19	0.25	0.621 6	纯误差	0.96	4	0.24		
X_1X_4	21.02	1	21.02	27.66	0.000 1	总和	351.89	28			
X_2X_3	2.64	1	2.64	3.47	0.083 5	R^2	0.969 8				
X_2X_4	5.00	1	5.00	6.57	0.022 5	R_{adj}^2	0.939 5				
X_3X_4	8.44	1	8.44	11.10	0.004 9						

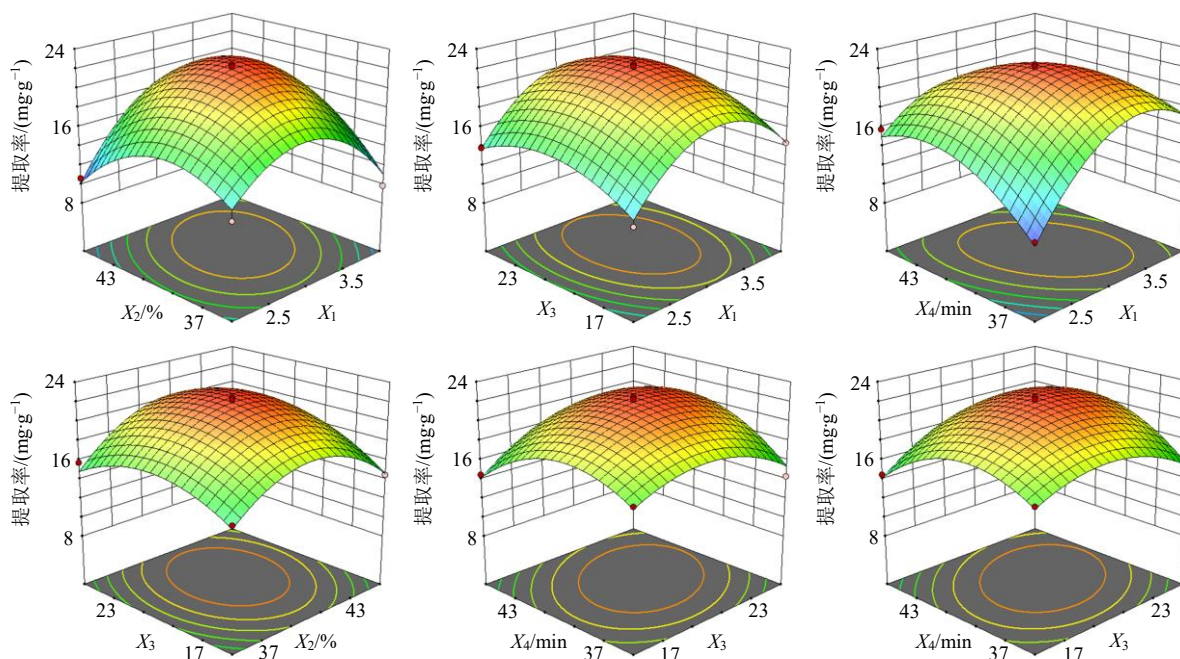


图 4 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 交互作用对莱菔子中萝卜硫素提取率影响的响应面

Fig. 4 Response surfaces (3D) of effects of interaction of X_1 , X_2 , X_3 and X_4 on extraction rate of sulforaphane from *Raphani Semen*

采用多元回归拟合分析,以提取率 Y 为响应值。就能够获得如下的 2 次多项回归方程 $Y=21.97+1.16 X_1+0.71 X_2+0.82 X_3+0.19 X_4+2.40 X_1X_2+0.22 X_1X_3-2.29 X_1X_4+0.81 X_2X_3-1.12 X_2X_4+1.45 X_3X_4-5.07 X_1^2-3.87 X_2^2-2.52 X_3^2-3.18 X_4^2$ 。根据提取率方程的方差分析的结果(表 4)可以看出,该回归模型显著 ($P<0.000 1$),失拟项不显著 ($P>0.05$),表明模型拟合程度好,模型回归系数 $R^2=0.969 8$,调整后 $R^2=0.939 5$,表明该模型与实际提取过程的拟合度良好,方程的可靠性较高。通过对方差数据

进行分析,可以得出,在物质的量比(X_1)、含水量(X_2)、液料比(X_3)以及提取时间(X_4)4 个 1 次项中,物质的量比和液料比对提取率具有极显著影响 ($P<0.01$),含水量对提取率具有显著影响 ($P<0.05$),分析各个因素的主效应关系为 $X_1>X_3>X_2>X_4$ 。2 次项交互作用 X_1X_2 、 X_1X_4 对提取率具有极显著的影响 ($P<0.01$), X_3X_4 、 X_2X_4 对提取率具有显著影响 ($P<0.05$), X_1X_3 、 X_2X_3 对提取率的影响不显著 ($P>0.05$)。各个交互因素对提取率影响的显著性顺序排列为 $X_1X_2>X_1X_4>X_3X_4>X_2X_4>X_2X_3>$

X_1X_3 。根据回归模型的方程,得到的最优提取工艺条件为乳酸与氯化胆碱物质的量比为 3.16:1、含水量为 40.82%、液料比为 20.96:1、超声时间为 39.94 min、超声温度 40 °C、超声功率 400 W;最佳提取率为 22.20 mg/g。

2.9 最优提取条件的验证及 DESs 重复利用实验

2.9.1 最优提取条件的验证 在 DESs 最佳提取条件下提取 5.00 g 莱菔子,然后测定莱菔子中萝卜硫素的提取率,并与预测值相比较,从而评价该模型模拟的准确度。在最佳提取条件下进行多次实验可得莱菔子中萝卜硫素的提取率为 22.01 mg/g,实验值与预测值(22.20 mg/g)接近,说明该模型模拟结果准确可靠,为莱菔子中萝卜硫素的进一步开发利用提供了一定的理论依据。

响应面分析以及最佳工艺的测定是该研究中决定性的步骤,也是对整个研究的总结,其准确度直接影响了研究的结果。在该步骤中,通过对软件的熟练应用,对响应面实验结果进行了处理,得到了 2 次多项回归方程、直观的响应面图、并且完成了本研究的最终目的得到提取莱菔子中萝卜硫素的最佳工艺条件。为超声辅助低共熔溶剂提取莱菔子中的萝卜硫素求出了一种绿色、环保、高效的萝卜硫素提取工艺。

2.9.2 DESs 重复利用实验 取已处理好的 3 种不同型号的大孔树脂(D-101、AB-8、HPD600)进行莱菔子中萝卜硫素回收实验。在 DESs 最佳提取条件下,精密移取 DESs 提取液 10 mL,分别加入不同型号的大孔树脂 3.0 g 和 6.0 g,混合均匀后,在室温下于摇床振摇 12 h (150 r/min),至大孔树脂充分吸附溶液后,取上清液用于测定莱菔子中萝卜硫素的吸附率;对吸附饱和的大孔树脂进行滤过,大孔树脂中加入与 DESs 提取液等量 95%乙醇,振摇 6 h (150 r/min),滤过大孔树脂,得 95%乙醇解吸附溶液;DESs 溶剂回收利用,用于下一次莱菔子中萝卜硫素的提取,测定其重复利用的萝卜硫素提取率。

绿色化学的发展在很大程度上得利于溶剂的回收。DESs 作为合成溶剂,其蒸气压较低,常规减压浓缩不适合回收溶剂。因此,寻找合适的回收方法对 DESs 的进一步发展至关重要。目前报道的文献中,DESs 可用超临界 CO_2 、固相萃取等方法进行回收,但其存在价格昂贵或操作复杂的劣势^[35-36]。相比于前者,大孔树脂吸附法具有操作简单、成本低廉等优势,已被用于回收 DESs^[37]。

本研究考察 3 种不同型号的大孔树脂(AB-8、D-101、HPD600)对莱菔子中萝卜硫素吸附率的影响,结果表明(表 5),3 种树脂具有一定的吸附率,随着树脂的增加,吸附率明显增加且效果较好,其中,AB-8 吸附率最高达 97.49%。当树脂用量均为 3.0 g 时,检验结果表明 AB-8 吸附效果显著优于 D-101 和 AB-8。同时,采用 95%乙醇对吸附饱和后的 AB-8 解吸附,解吸附率达 82.63%。因此,采用大孔树脂回收 NADESs 简单、有效。

表 5 不同大孔树脂对莱菔子中萝卜硫素吸附率比较 ($n=3$)
Table 5 Comparison of adsorption rates of sulforaphane in *Raphani Semen* by different macroporous resins ($n=3$)

大孔吸附树脂类型	用量/g	吸附率/%
AB-8	3.0	93.34
	6.0	97.49
D-101	3.0	84.25
	6.0	94.55
HPD 600	3.0	70.85
	6.0	83.81

萝卜硫素经大孔树脂吸附后,DESs 溶液可被回收利用,用于下一循环继续提取。扣除残留于 DESs 中的萝卜硫素影响,本实验回收后的 DESs 第 2 次用于提取莱菔子中的萝卜硫素,其提取率达 20.92 mg/g ($n=3$),回收利用率为 95.05%。由此说明,DESs 经大孔树脂吸附后,溶剂完整性较好,可再次回收利用。

2.10 铜绿假单胞菌生物膜抑制实验

2.10.1 铜绿假单胞菌最低抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 实验 称取适量样品,用分子生物学级 DMSO 溶解,配制 256 mg/mL 的母液(萝卜硫素质量分数为 22.01 mg/g),并用 MH 肉汤培养基稀释至一定质量浓度备用(最终培养基中 DMSO 不超过 0.2%);将过夜培养的菌液,用 MH 肉汤培养基稀释至在 600nm 波长处的吸光度(A_{600})值为 0.01,备用。

细菌 MIC 的测定:复苏 PA 菌株,统一采用 CLSI 推荐的微量肉汤稀释法检测 DESs 提取物和抗菌药物(阿奇霉素)的 MIC,质控菌株为铜绿假单胞菌^[38]。准确移取 100 μ L 含样品的培养基加入到 96 孔板中,并二倍稀释至一系列质量浓度,接种 100 μ L 稀释后的菌液,同时设置空白组(只加培养基)、对照组(含 0.02% DMSO 菌液)、阳性对照组

(阿奇霉素), 置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后, 观察各质量浓度对应孔的浑浊程度, 出现澄清现象时即为细菌的 MIC。

检测提取物与阳性对照 (阿奇霉素) 的 MIC, 探究提取物对细菌的正常生长是否存在影响, 是为了确保其对铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用不是通过抑制细菌生长活性实现的, 而是基于其他机制的调控达到抑制效果。实验结果表明, 与阳性对照组 (阿奇霉素) 相比, 莱菔子的提取物对铜绿假单胞菌具有抑制活性, 其 MIC 值为 256 μg/mL。在远大于 MIC 的浓度下研究对细菌的调控, 很大程度上避免了对细菌耐药性产生的诱导, 可作为群体感应活性抑制剂的初步筛选。

2.10.2 铜绿假单胞菌生物膜抑制实验 采用结晶紫法测定莱菔子提取物对铜绿假单胞菌生物膜的抑制活性^[38-39]。将含莱菔子提取物的母液用 ABTGC 培养基稀释至一定质量浓度, 备用 (最终培养基中 DMSO 含量不超过 0.2%); 将过夜培养的菌液用 ABTGC 培养基稀释至 $A_{600}=0.01$, 备用。

准确移取 100 μL 含药培养基于 96 孔板中, 并接种 100 μL 稀释后的菌液, 同时设置空白组 (只加培养基)、对照组 (含 0.02% DMSO 菌液), 阳性对照组 (阿奇霉素), 96 孔板外周用 200 μL 空白培养基封边, 每组数据设置 6 个复孔; 用封口膜包裹 96 孔板周边, 防止培养基挥发, 并置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h; 24 h 后, 弃去孔板中菌液, 并用 PBS 溶液洗净多余浮菌后晾干; 向 96 孔板中加入 120 μL 甲醇, 室温固定 20 min; 弃去甲醇, 晾干后加入 120 μL 0.1% 结晶紫染料, 染色 15 min; 弃去结晶紫染料, 并用 PBS 溶液洗涤至无多余紫色染料溶出; 烘干后, 向孔板中加入 120 μL 33% 冰醋酸溶液, 置于摇床上振荡摇匀后, 测定 A_{570} , 计算生物膜的抑制率。

$$\text{生物膜的抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药敏}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

采用结晶紫染色法, 检测莱菔子 DESs 提取物对铜绿假单胞菌生物膜的抑制活性, 实验结果如表 6 所示, 4~256 μg/mL 质量浓度下提取物均能抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成, 且呈良好的量效关系, 在最高质量浓度 256 μg/mL 下, 莱菔子提取物的生物膜抑制率达到 53.84%, 表明其具有开发为新型群体感应抑制剂的潜力。

3 讨论

本实验考察了超声辅助绿色提取溶剂 DESs 用

表 6 莱菔子提取物对铜绿假单胞菌生物膜的抑制率

Table 6 Biofilm inhibition rate of extracts from *Raphani* Semen against *P. aeruginosa*

组别	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	抑制率/%
阿奇霉素	32	72.68
DESs 提取物	256	53.84
	128	40.02
	64	18.92
	32	10.82
	16	7.98
	8	5.36
	4	4.23

于莱菔子中的萝卜硫素的提取, 发现由氯化胆碱和乳酸合成的溶剂为最佳溶剂。经单因素实验和响应面法优化得到超声辅助提取莱菔子中萝卜硫素的最佳条件: 物质的量比为 3.16:1、含水量为 40.818%、液料比为 20.962:1、超声时间为 39.937 min、超声温度 40 ℃、超声功率 400 W; 且最佳提取率为 22.199 mg/g。同时, 在最佳实验条件下验证, 莱菔子中的萝卜硫素的提取率达 22.013 mg/g, 与预测值 (22.199 mg/g) 接近, 说明该模型模拟结果准确可靠。此外, DESs 经大孔树脂吸附后, 溶剂完整性较好, 可再次回收利用, 说明 DESs 提取法具有重复使用、高效、绿色环保等优点。

本研究对 DESs 提取液采用群体感应抑制活性实验表明, 莱菔子提取液对铜绿假单胞菌生物膜具有一定的抑制活性。生物膜的形成已成为铜绿假单胞菌耐药性增加的主要原因之一, 避开传统抗生素的作用靶点, 研究特异性针对生物膜的新型抗菌药物已成为研究热点。群体感应系统是细菌间进行交流的“语言系统”, 调控生物膜的形成和分散过程。当细菌相互聚集且数量达到一定阈值时, 可分泌大量的高丝氨酸内酯类自诱导信号分子, 这些信号分子可与菌体相应的双组分调控受体相结合, 并通过信号传导调控生物膜的形成^[40-41]。因群体感应系统在生物膜形成中起决定性作用, 群体感应抑制剂的研发已成为研究的热点, 而本实验结果表明, 莱菔子 DESs 提取物能抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成, 是一种潜在的群体感应抑制剂。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 马东. 中药莱菔子的化学成分及药理作用研究进展

- [J]. 中国社区医师, 2014, 30(20): 5-6.
- [2] 赵振华, 李媛, 季冬青, 等. 莱菔子化学成分与药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2017, 19(2): 147-151.
- [3] 张茜, 周洪雷, 朱立俏, 等. 莱菔子化学成分研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(4): 137-140.
- [4] Gao L, Li H, Li B Q, *et al.* Traditional uses, phytochemistry, transformation of ingredients and pharmacology of the dried seeds of *Raphanus sativus* L. (*Raphani Semen*), A comprehensive review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 294: 115387.
- [5] 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.
- [6] Pocasap P, Weerapreeyakul N, Barusrux S. Cancer preventive effect of Thai rat-tailed radish (*Raphanus sativus* L. var. *caudatus* Alef) [J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(3): 1372-1381.
- [7] Lim S, Han S W, Kim J. Sulforaphane identified from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds possesses antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Funct Foods*, 2016, 24: 131-141.
- [8] Campas-Baypoli O N, Sánchez-Machado D I, Bueno-Solano C, *et al.* HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(4): 387-392.
- [9] Ares A M, Bernal J, Martín M T, *et al.* Optimized formation, extraction, and determination of sulforaphane in broccoli by liquid chromatography with diode array detection [J]. *Food Anal Meth*, 2014, 7(3): 730-740.
- [10] García-Saldaña J S, Campas-Baypoli O N, Sánchez-Machado D I, *et al.* Separation and purification of sulforaphane (1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl) butane) from broccoli seeds by consecutive steps of adsorption-desorption-bleaching [J]. *J Food Eng*, 2018, 237: 162-170.
- [11] Xing J J, Cheng Y L, Chen P, *et al.* Effect of high-pressure homogenization on the extraction of sulforaphane from broccoli (*Brassica oleracea*) seeds [J]. *Powder Technol*, 2019, 358: 103-109.
- [12] Liu Y B, Zhang D, Li X D, *et al.* Enhancement of ultrasound-assisted extraction of sulforaphane from broccoli seeds via the application of microwave pretreatment [J]. *Ultrason Sonochem*, 2022, 87: 106061.
- [13] Liang H, Li C F, Yuan Q P, *et al.* Separation and purification of sulforaphane from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high-performance liquid chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(20): 8047-8053.
- [14] 孔凡华, 杨春雪, 方从容, 等. 高效液相色谱法测定十字花科蔬菜中萝卜硫素的含量 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 218-223.
- [15] Zhang Y, Lv C Z, Sun J, *et al.* Protective effects of broccoli extracts and sulforaphane against hydrogen peroxide induced oxidative stress in B16 cells [J]. *J Funct Foods*, 2021, 87: 104833.
- [16] 沈莲清, 苏光耀, 王奎武. 西兰花种子中硫苷酶解产物萝卜硫素的提纯与抗肿瘤的体外试验研究 [J]. 中国食品学报, 2008, 8(5): 15-21.
- [17] 冯俊杰, 蒋海强, 董梅月, 等. 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱法分析莱菔子化学成分 [J]. 化学分析计量, 2021, 30(11): 14-22.
- [18] 张静. 西蓝花中萝卜硫素的提取工艺优化及其活性功能研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2021.
- [19] Dal Prá V, Dolwitsch C B, da Silveira G D, *et al.* Supercritical CO₂ extraction, chemical characterisation and antioxidant potential of *Brassica oleracea* var *capitata* against HO·, O₂⁻ and ROO· [J]. *Food Chem*, 2013, 141(4): 3954-3959.
- [20] Tanongkankit Y, Sablani S S, Chiewchan N, *et al.* Microwave-assisted extraction of sulforaphane from white cabbages: Effects of extraction condition, solvent and sample pretreatment [J]. *J Food Eng*, 2013, 117(1): 151-157.
- [21] Abbott A P, Capper G, Davies D L, *et al.* Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. *Chem Commun*, 2003(1): 70-71.
- [22] Wei Z F, Wang X Q, Peng X, *et al.* Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae* [J]. *Ind Crops Prod*, 2015, 63: 175-181.
- [23] 张荣清, 刘云云, 陈海峰, 等. 低共熔溶剂体系提取中药渣中肉桂醛 [J]. 化学工程, 2023, 51(4): 22-27.
- [24] Abbott A P, Boothby D, Capper G, *et al.* Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(29): 9142-9147.
- [25] Dai Y T, Witkamp G J, Verpoorte R, *et al.* Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications [J]. *Food Chem*, 2015, 187: 14-19.
- [26] Qin H, Hu X T, Wang J W, *et al.* Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications [J]. *Green Energy Environ*, 2020, 5(1): 8-21.
- [27] 王帅, 宋海英, 张楠, 等. 低共熔溶剂性质及其应用研究进展 [J]. 应用化工, 2019, 48(12): 3017-3021.

- [28] Wei Z F, Wang X Q, Peng X, *et al.* Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae* [J]. *Ind Crops Prod*, 2015, 63: 175-181.
- [29] Bajkacz S, Adamek J. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples [J]. *Food Anal Meth*, 2018, 11(5): 1330-1344.
- [30] Peng X, Duan M H, Yao X H, *et al.* Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae Japonicae Flos* with deep eutectic solvent [J]. *Sep Purif Technol*, 2016, 157: 249-257.
- [31] Tan T, Zhang M L, Wan Y Q, *et al.* Utilization of deep eutectic solvents as novel mobile phase additives for improving the separation of bioactive quaternary alkaloids [J]. *Talanta*, 2016, 149: 85-90.
- [32] Zhang L J, Wang M S. Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb. [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 675-681.
- [33] 赵金荣, 李宝鑫, 薛晓霞, 等. 新型绿色溶剂在中药提取中的应用概述 [J]. *药学研究*, 2023, 42(2): 130-135.
- [34] 何春喜, 余泽义, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷的大孔吸附树脂纯化与离子交换树脂脱色工艺研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(6): 1146-1152.
- [35] Nam M W, Zhao J, Lee M S, *et al.* Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos Sophorae* [J]. *Green Chem*, 2015, 17(3): 1718-1727.
- [36] Jeong K M, Lee M S, Nam M W, *et al.* Tailoring and recycling of deep eutectic solvents as sustainable and efficient extraction media [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1424: 10-17.
- [37] Dai Y T, Rozema E, Verpoorte R, *et al.* Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1434: 50-56.
- [38] 徐荣, 王乃群, 谭为, 等. 亚抑菌浓度抗菌药物联合对铜绿假单胞菌生物膜的体外作用 [J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(12): 1809-1811.
- [39] 赖晓静, 李颜伶, 吴珺, 等. 左氧氟沙星联合芪归银方对铜绿假单胞菌生物膜和绿脓菌素的影响 [J]. *中南药学*, 2023, 21(10): 2647-2653.
- [40] 余鹏飞, 周林颖, 李诗佳, 等. 1,3-丙二胺通过群体密度感应系统对铜绿假单胞菌生物膜形成的抑制作用 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2021, 46(9): 942-948.
- [41] 陈兴英, 张能华, 袁春妹, 等. 黄芩苷联合妥布霉素对耐碳青霉烯铜绿假单胞菌的生物膜抑制作用分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33(9): 1071-1074.

[责任编辑 郑礼胜]