

星点设计-效应面法优化大孔树脂纯化还原型萝卜硫苷工艺及体外抗氧化活性研究

张元元,王绍花,代孟孟,韩真真,朱立俏,盛华刚*

山东中医药大学药学院,济南 250355

摘要:为研究大孔树脂纯化还原型萝卜硫苷的最佳工艺及其抗氧化能力。实验以8种不同型号的大孔树脂对还原型萝卜硫苷的比吸附量、吸附率和洗脱率为指标筛选出最佳型号的大孔树脂,采用单因素考察和星点设计-效应面法优选出大孔树脂纯化还原型萝卜硫苷的工艺参数,通过测定纯化前后还原型萝卜硫苷提取物对DPPH自由基及 $ABTS^+ \cdot$ 自由基的清除能力来表征其抗氧化活性。结果表明,HPD-722型大孔树脂纯化还原型萝卜硫苷效果最好,最佳纯化工艺为:上样液pH 5.3,上样流速2.5 BV/h,上样液浓度0.53 mg/mL;洗脱液为70%乙醇溶液,洗脱液体积为2.5 BV,洗脱液流速为1.5 BV/h,还原型萝卜硫苷纯度由0.404%提高到17.903%,纯度提高了44.35倍,纯化后的还原型萝卜硫苷GRH提取物与萝卜提取液相比,清除DPPH自由基和 $ABTS^+ \cdot$ 自由基的能力分别提高了67.31和45.27倍。

关键词:星点设计-效应面法;大孔树脂;还原型萝卜硫苷;抗氧化

中图分类号:R284;TQ914.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)11-1992-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.11.020

Process study on macroporous resin for purification of glucoraphasatin by central composite design-response surface methodology and antioxidant activity of glucoraphasatin *in vitro*

ZHANG Yuan-yuan, WANG Shao-hua, DAI Meng-meng, HAN Zhen-zhen, ZHU Li-qiao, SHENG Hua-gang*

School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: This study was to investigate the optimal purification process for macroporous resins of glucoraphasatin and the antioxidant activity. The best type of macroporous resin was selected by 8 different types of macroporous resins for the specific adsorption amounts, adsorption and elution rates of reduced glucoraphasatin, the purification technology for glucoraphasatin was optimized by single factor investigation and central composite design-response surface methodology. And the antioxidant activity of glucoraphasatin extractive purification before and after was characterized by the scavenging capacity of DPPH and $ABTS^+ \cdot$ free radicals. The results show that HPD-722 macroporous resin has the best effect on purifying glucoraphasatin, the optimal condition was as follows as the sample solution pH is 5.3, flow rate is 2.5 BV/h, the concentration is 0.53 mg/mL, the eluent was 70% ethanol solution, the eluent volume was 2.5 BV and the flow rate was 1.5 BV/h. The purity increased by 44.35 times from 0.404% to 17.903%. Compared with the radish extract, the ability of the purified glucoraphasatin extractive to scavenge DPPH free radicals and $ABTS^+ \cdot$ free radicals increased by 67.31 and 45.27 times, respectively.

Key words: central composite design-response surface methodology; macroporous resin; glucoraphasatin; antioxidant

近年来,十字花科蔬菜因丰富的营养价值及药用价值备受国内外研究者关注,其富含硫代葡萄糖

苷(glucosinolates,简称硫苷)、脂肪酸、生物碱、酚性物质、黄酮醇、皂苷等多种活性成分^[1]。研究表明,常食用十字花科蔬菜可减少心血管疾病及癌症的发病率^[2]。硫苷是十字花科蔬菜中重要的一类次生代谢产物^[3],目前已有200多种硫苷被发现。其中从西兰花和西兰花籽中提取的萝卜硫苷(glucoraphanin,

收稿日期:2019-05-13 接受日期:2019-09-10

基金项目:国家自然科学基金(81503252);山东省自然科学基金(ZR2014HQ005)

*通信作者 E-mail:shenghuagang@sina.com

GRA), 在内源芥子酶的作用下能降解产生的一种异硫氰酸酯类化合物——萝卜硫素(sulforaphane)^[4], 对多种癌症均有预防和治疗方面的潜力^[5,6]。

萝卜苷(glucoraphenin, GRE) 是萝卜硫苷脱去一分子氢的氧化产物, 主要存在于萝卜根和种子中^[1,7], 它与还原型萝卜硫苷(4-甲硫基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷, glucoraphasatin, GRH, 结构见图1) 是一组氧化还原对, 二者差异只是侧链上硫的氧化程度不同, 而不同的氧化状态对 I 期致癌酶和 II 期解毒酶起不同的调控作用^[8]。研究发现, GRH 及其降解产物还原型萝卜硫素(raphasatin, RAS) 都是参与多环芳烃、杂环胺、霉菌毒素等化学致癌物解毒的大鼠肝脏 II 期酶的强有力诱导剂^[9,10], 并且对过氧化氢和自由基化合物有直接的抗氧化能力^[11], GRH 可通过调节果蝇体内的葡萄糖含量来调节能量代谢, 这些过程经常影响糖尿病等慢性病^[12], 因此 GRH 值得进一步研究。

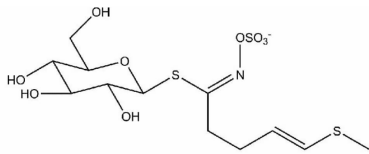


图1 GRH 的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of GRH

GRH 主要存在于萝卜根及芽中, 占萝卜中硫苷总量的 70% 以上^[7], Wang 等^[13] 从萝卜芽苗中纯化得到的 GRH 纯度可达 98%, 但工艺复杂, 成本较高, 不适宜大批量制备。大孔树脂因吸附性好、解吸容易并且机械强度好的特点被广泛应用于天然产物有效成分的分离纯化^[14]。考虑萝卜的产量和价格, 本研究以青萝卜为原料, 用 8 种不同型号的大孔树脂对萝卜提取液中的 GRH 进行吸附和解吸, 以吸附率和解吸率为指标筛选出较佳型号的大孔树脂, 采用单因素考察和星点设计-效应面法优选出大孔树脂纯化 GRH 的工艺参数, 并通过 GRH 对自由基 DPPH 及 ABTS⁺· 的清除能力考察其抗氧化活性, 为 GRH 的进一步开发和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

青萝卜(市售, 为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的栽培品种); 还原型萝卜硫苷标准品(GRH, 实验室自制, 纯度 > 98%); 大孔树脂 HPD100C, HPD-400, AB-8, HPD-500, DM130, NKA-

9, HPD-700, HPD-722(沧州宝恩吸附材料科技有限公司); 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 2, 2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基(2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radicals, ABTS⁺·), 维生素 C(V_C, 上海源叶生物科技有限公司); 乙腈(色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 水为娃娃哈哈纯净水, 其他试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

Agilent1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); 色谱柱 InertSustain AQ-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); Multiskan MK3 酶标仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司); KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); MS105DU 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); HI98100 微电脑酸度 pH 测定仪(深圳赛泽尔电子有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 高效液相色谱法测定 GRH 含量

1.3.1.1 色谱条件

InertSustain AQ-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B), 梯度洗脱(0 ~ 15 min, 14% ~ 20% A, 15 ~ 25 min, 20% ~ 100% A), 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温 27 °C, 检测波长为 225 nm。

1.3.1.2 标准曲线的建立

精密称取 GRH 标准品适量制成 0.76 mg/mL 的对照品溶液, 精密吸取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、1.2、2.5 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 按 1.3.1.1 项下色谱条件下操作, 以 GRH 浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 22\ 954X - 268.11$ ($r = 0.999\ 9$), 表明 GRH 在 0.03 ~ 0.38 mg/mL 范围内线性关系良好。

1.3.1.3 萝卜提取液的制备及 GRE 含量测定

青萝卜洗净后切片, 置笼屉内于 100 °C 沸水锅上隔水加热 10 min, 蒸透后取出; 取蒸制后的青萝卜适量, 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并煎液, 滤过, 水提液浓缩至相对密度为 1.05, 加入乙醇至乙醇浓度为 70%, 静置 24 h 后过滤, 滤液减压浓缩回收乙醇, 即得萝卜提取液。取萝卜提取液适量, 稀释, 经 0.22 μm 的微孔滤膜滤过后, 按照 1.3.1.1 项下的色谱条件, 测定萝卜中 GRH 的含量。根据生药量计算, 每 g 新鲜萝卜中 GRH 含量为 0.20 mg。

1.3.2 树脂预处理

分别取 8 种类型 (HPD-100C, HPD-400, AB-8, HPD-500, DM130, NKA-9, HPD-700, HPD-722) 大孔树脂, 用 95% 乙醇进行浸泡, 至大孔树脂不再膨胀, 将树脂转移到层析柱中, 用蒸馏水将其反复清洗到无醇味, 备用。

1.3.3 大孔树脂型号筛选

称取已处理好的 8 种大孔树脂各 1 g, 分别置于 100 mL 具塞锥形瓶内, 精密量取 10 mL 萝卜提取液, 室温条件下振荡 24 h, 充分吸附后滤过, 测定滤液中 GRH 质量浓度; 用 10 mL 蒸馏水洗涤滤过后的各型号树脂, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 各加 20 mL 50% 乙醇, 室温条件下振荡 24 h, 充分解吸后滤过, 测定滤液中 GRH 质量浓度, 利用公式 (1) ~ (4) 计算各型号树脂的饱和吸附量、吸附率、洗脱率和纯化效率。

$$Q/(mg/g) = \frac{(C_0 - C_1)V_0}{M} \quad (1)$$

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{洗脱率}(\%) = \frac{C_2 \times V_2}{M \times Q} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{纯化效率}(\%) = \frac{C_2 \times V_2}{C_0 \times V_0} \times 100 \quad (4)$$

式中: Q 为饱和吸附量/(mg/mL); C_0 为吸附前

GRH 质量浓度/(mg/mL); C_1 为吸附后滤液 GRH 质量浓度/(mg/mL); V_0 为加入的萝卜提取液体积/mL; M 为树脂质量/g; C_2 为解吸后滤液中 GRH 质量浓度/(mg/mL); V_2 为洗脱液体积/mL。

1.3.4 动态吸附泄露曲线的绘制

取已经处理好的 HPD-722 型树脂, 按径高比 1:8 湿法装柱上样 ($\Phi 1.5 \times 12$ cm), 萝卜提取液浓度为 0.22 mg/mL, 调上样液 pH 为 5, 控制上样液体积流量为 3 BV/h 上样。分段收集流出液, 每 10 mL 收集 1 试管流出液, 检测其中 GRH 的浓度, 以试管号为横坐标, 流出液中 GRH 的浓度为纵坐标, 绘制大孔树脂动态吸附泄露曲线。

1.3.5 单因素考察上柱工艺

按照 1.3.4 所述方法装柱上样, 以 1.3.1.3 制得的萝卜提取液为上样液。上样液 pH 分别调制为 3、4、5、6、7, 上样液质量浓度配制为 0.11、0.22、0.44 mg/mL, 上样液流速为 1.5、3、6 BV/h, 在此条件下, 考察各单因素对吸附能力的影响。

1.3.6 星点设计-响应面法考察上柱工艺

采用统计学软件 Design-Expert 中响应面 Central Composite 模型, 以上样液 pH、流速和上样液浓度三个因素为自变量, 以比吸附量为响应值, 根据星点设计原理, 采用三因素五水平响应面分析方法, 优化 GRH 的上柱工艺。试验因素与水平见表 1。

表 1 星点设计-效应面法实验因素水平

Table 1 Factors and levels in composite design-response surface methodology

| 水平 Level | 因素 Factors | | |
|-------------|-----------------------|---------------------------------------|--|
| | A 上样液 pH Sample pH | B 上样液流速 Sample flow rate (BV/h) | C 上样液浓度 Sample concentration (mg/mL) |
| $-\alpha$ | 2.5 | 1.5 | 0.22 |
| -1 | 3.4 | 2.1 | 0.31 |
| 0 | 4.5 | 3 | 0.44 |
| 1 | 5.7 | 3.9 | 0.57 |
| α | 6.5 | 4.5 | 0.66 |

1.3.7 单因素考察洗脱工艺

以优选出的最佳上柱工艺上样, 以 3 BV 的 70% 乙醇为洗脱液进行洗脱, 洗脱速度为 3 BV/h。洗脱液体积分数分别采用 30%、50%、70%、90%, 洗脱液体积分别为 2、2.5、3 BV, 以 1.5、3、4.5 BV/h 的体积流量分别进行洗脱, 测定洗脱液中 GRH 含量, 计算洗脱率, 探讨洗脱液体积分数、洗脱液体积

和洗脱液体积流量 3 个因素对洗脱能力的影响。

1.3.8 纯化前后 GRH 含量比较

按优化工艺纯化萝卜提取液, 得到 GRH 纯化液, 将萝卜提取液与纯化液冷冻干燥, 分别得到萝卜提取物和 GRH 提取物, 测定纯化前后 GRH 的含量。

1.3.9 体外抗氧化活性的测定

1.3.9.1 DPPH 自由基清除能力测定

根据参考文献^[15]中的试验方法,稍作改进。取不同浓度的萝卜提取物、GRH 纯化物及 GRH 标准品测试液 50 μL 于 96 孔板中,加入 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液 100 μL ,以 V_c 作为阳性对照。混匀后室温暗处反应 30 min,酶标仪 517 nm 处测定各孔的吸光度,按公式(5)计算 DPPH 的清除率。

$$\text{DPPH 的清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

式中: A_0 为反应体系中样品溶液用等体积的去离子水代替测定的吸光度值; A_1 为反应体系中样品溶液测定的吸光度值; A_2 为反应体系中 DPPH 溶液用等体积的去离子水代替测定的吸光度值。

1.3.9.2 ABTS⁺· 自由基清除能力测定

根据参考文献^[16]中的试验方法,稍作改进,制备 ABTS 工作液。取不同浓度的萝卜提取物、GRH 纯化物及 GRH 标准品测试液 50 μL 于 96 孔板中,加入 ABTS 工作液 150 μL ,以 V_c 作为阳性对照。混

匀后室温暗处反应 6 min,酶标仪 734 nm 处测定各孔的吸光度,按公式(6)计算 ABTS⁺· 的清除率。

$$\text{ABTS}^{+\cdot} \text{ 的清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (6)$$

式中: A_0 为反应体系中样品溶液用等体积的去离子水代替测定的吸光度值; A_1 为反应体系中样品溶液测定的吸光度值; A_2 为反应体系中 ABTS⁺· 溶液用等体积的去离子水代替测定的吸光度值。

1.3.9.3 统计学分析

以 SPSS 17.0 统计学软件对阳性药 V_c 、GRH 标准品、提取物及纯化物的 IC_{50} 值进行分析处理,计量结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示,对各组数据进行单因素方差分析,计量资料检验方差齐性, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 最佳树脂型号的筛选

表 2 不同型号大孔吸附树脂吸附率、洗脱率及纯化率考察

Table 2 Adsorption, elution and purification rates of different types of macroporous adsorbent resins

| 树脂型号 Resin type | 饱和吸附量 Saturation adsorption capacity (mg/g) | 吸附率 Adsorption ratio (%) | 洗脱率 Elution ratio (%) | 纯化效率 Purification efficiency (%) |
|--------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|--|
| HPD-100C | 1.44 | 65.74 | 67.62 | 44.45 |
| HPD-700 | 1.28 | 58.51 | 73.45 | 42.98 |
| HPD-500 | 1.20 | 55.00 | 61.75 | 33.96 |
| HPD-400 | 1.23 | 56.33 | 86.41 | 48.67 |
| HPD-722 | 1.42 | 65.20 | 77.85 | 50.76 |
| DMI130 | 0.63 | 28.74 | 62.12 | 17.86 |
| AB-8 | 1.29 | 59.12 | 82.48 | 48.76 |
| NKA-9 | 1.21 | 55.22 | 49.09 | 27.11 |

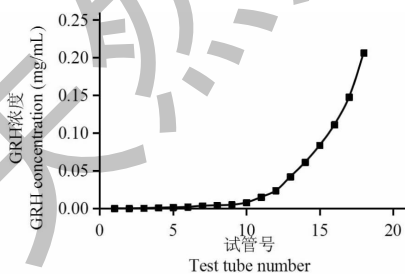


图 2 大孔树脂动态吸附泄露曲线

Fig. 2 Dynamic adsorption leakage curve of macroporous resin

由表 2 可知,HPD-100C 对 GRH 的吸附量最高,吸附率最好,其次是 HPD-722,二者差异不大,从洗脱率来看,HPD-400 和 AB-8 效果较好,其次是

HPD-722,综合大孔树脂对 GRH 的纯化效果,选择 HPD-722 作为纯化 GRH 的最佳树脂。

2.2 HPD-722 动态吸附泄露曲线

一般认为,当流出液浓度达到上样液浓度的 1/10 时为泄露点,即为上样终点。由图 2 可知,还原型萝卜苷在第 12 管到达泄露点,此时上样液体积为 120 mL,所以选择 120 mL 为最佳上样量。

2.3 单因素考察上柱工艺试验结果

2.3.1 上样液 pH 值对 GRH 比吸附量的影响

由图 3 可知,GRH 在不同 pH 值下有不同的比吸附量,当 pH 为 4 时,比吸附量最大,为 1.037 mg/mL,随 pH 值的增大,比吸附量有减小的趋势,故选择上样液 pH 为 4。

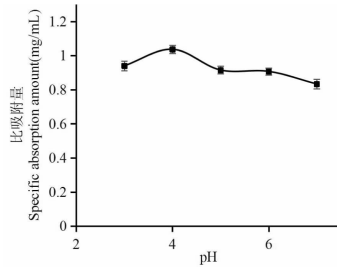


图3 pH值对GRH比吸附量的影响

Fig. 3 Effect of pH on specific adsorption amount of GRH

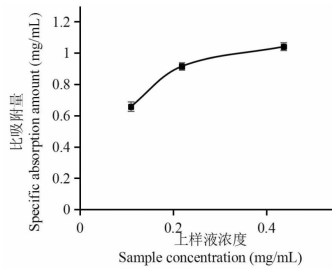


图4 上样液质量浓度对GRH比吸附量的影响

Fig. 4 Effect of sample concentration on specific adsorption amount of GRH

2.3.2 上样液质量浓度对GRH比吸附量的影响

由图4可知,当上样液质量浓度为0.44 mg/mL

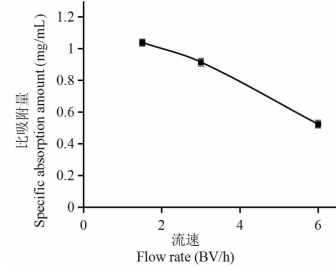


图5 上样液流速对GRH比吸附量的影响

Fig. 5 Effect of sample flow rate on specific adsorption amount of GRH

时,比吸附量最大,为1.041 mg/mL,故选择上样液质量浓度为0.44 mg/mL。

2.3.3 上样液流速对GRH比吸附量的影响

由图5可知,当上样液流速为1.5 BV/h时,比吸附量最大,为1.038 mg/mL,表明最佳上样液流速为1.5 BV/h,故采用流速为1.5 BV/h。

2.4 星点设计-响应面法试验结果与分析

2.4.1 星点试验设计与结果

综合单因素试验的结果,采用星点设计-效应面法设计20组试验组合,试验结果如表3所示。

表3 星点试验设计及结果

Table 3 Central composite experiment design and results

| 序号 No. | A | B | C | Y 比吸附量 Specific adsorption amount (mg/mL) |
|-----------|----|----|----|---|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 0.854 3 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 0.937 3 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 0.835 2 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 0.930 0 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 1.046 5 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 1.133 2 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 0.984 4 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1.097 5 |
| 9 | -α | 0 | 0 | 1.024 1 |
| 10 | α | 0 | 0 | 1.073 7 |
| 11 | 0 | -α | 0 | 1.130 6 |
| 12 | 0 | α | 0 | 0.933 1 |
| 13 | 0 | 0 | -α | 0.790 6 |
| 14 | 0 | 0 | α | 1.066 6 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 1.093 3 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 1.088 7 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 1.125 7 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 1.097 1 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 1.102 3 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 1.148 5 |

2.4.2 二次回归模型拟合及方差分析

以 A、B、C 为自变量,以吸附量为因变量 Y,利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 3 中的试验数据进行二项式拟合,并对模型进行方差分析,结果二项式

拟合为 $Y = 1.11 + 0.0344A - 0.033B + 0.086C + 4.775E-003AB + 2.750E-003AC - 8.925E-003BC - 0.025A^2 - 0.031B^2 - 0.068C^2$ 。方差分析结果见表 4。

表 4 方差分析表

Table 4 Anova table

| 来源 Source | 平方和 Sum of squares | 自由度 df | 均方 Mean square | F 值 F value | P 值 P value | 显著性 Significance |
|-----------------|-----------------------|-----------|-------------------|----------------|----------------|---------------------|
| 模型 | 0.21 | 9 | 0.023 | 17.12 | < 0.000 1 | ** |
| A | 0.016 | 1 | 0.016 | 11.36 | 0.007 1 | ** |
| B | 0.015 | 1 | 0.015 | 11.13 | 0.007 5 | ** |
| C | 0.10 | 1 | 0.10 | 73.02 | < 0.000 1 | ** |
| AB | 1.824E-004 | 1 | 1.824E-004 | 0.13 | 0.722 8 | ○ |
| AC | 6.050E-005 | 1 | 6.050E-005 | 0.044 | 0.837 8 | ○ |
| BC | 6.372E-004 | 1 | 6.372E-004 | 0.47 | 0.510 8 | ○ |
| A ² | 9.321E-003 | 1 | 9.321E-003 | 6.80 | 0.026 1 | * |
| B ² | 0.014 | 1 | 0.014 | 10.41 | 0.009 1 | ** |
| C ² | 0.067 | 1 | 0.067 | 48.58 | < 0.000 1 | ** |
| 残差 Residual | 0.014 | 10 | 1.370E-003 | - | - | - |
| 失拟项 Lack of Fit | 0.011 | 5 | 2.204E-003 | 4.11 | 0.073 6 | ○ |
| 纯误差 Pure Error | 2.684E-003 | 5 | 5.368E-004 | - | - | - |
| 总回归 Cor Total | 0.22 | 19 | - | - | - | - |

拟合度 $R^2 = 0.939 1$ 校正拟合度 $Adj R^2 = 0.884 2$

注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ○ 表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Note: **, * indicate extremely significant difference, significant difference, respectively, ○ represents not significant.

从二次多项式拟合结果来看,模型 $P < 0.000 1$,表明该拟合模型具有显著性,拟合度 $R^2 = 0.939 1$,失拟项 $P > 0.05$,说明二次多项式方程模型对数据拟合度很高,误差小,模型可靠。一次项 A(上样液 pH)、B(流速)、C(上样液浓度)极显著,二次项 A^2 显著, B^2 、 C^2 极显著,交互项 AB、AC、BC 均不显著,由此可知,各影响因素与比吸附量之间并不是简单

的线性关系,各因素影响的大小顺序为: C(上样液浓度) > A(上样液 pH) > B(流速)。

交互作用对 GRH 比吸附量影响的结果如图 6 所示。响应面图中的响应面坡度越陡峭响应值越敏感,从图中可以看出上样液浓度与 pH 及流速的曲线均较陡峭,说明上样液浓度对 GRH 比吸附量的影响最为显著。

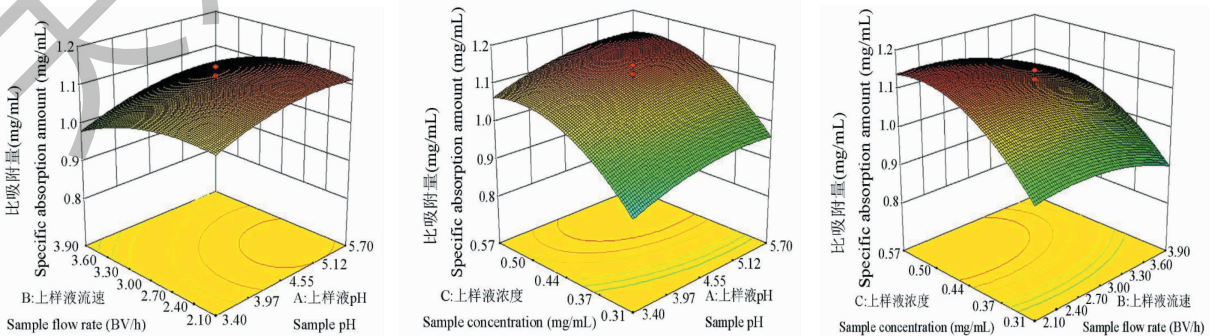


图 6 各交互作用对 GRH 比吸附量的影响

Fig. 6 Effect of interaction of the factors on specific adsorption amount of GRH

2.4.3 上柱工艺预测与验证

优化后得出最佳上样条件:上样液 pH 5.3,上样液体积流速 2.5 BV/h,上样液浓度 0.53 mg/mL,预测最大比吸附量为 1.159 mg/mL。按此条件重复三次实验验证,GRH 的比吸附量为 1.131 ± 0.013 mg/mL,与通过二次多项回归方程得到的预测值 (1.159 mg/mL) 相比,偏差为 2.42%,表明该模型有很好的预测性,所选的上柱工艺有良好的重现性。

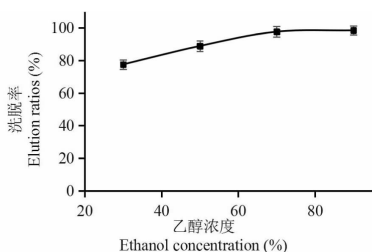


图7 洗脱液体积分数对 GRH 洗脱率的影响

Fig. 7 Effect of eluent concentration on elution ratios of GRH

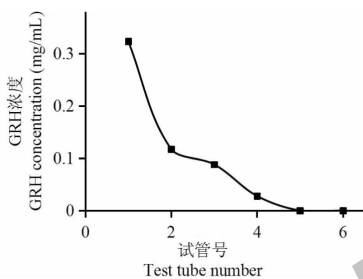


图8 大孔树脂动态洗脱曲线

Fig. 8 Dynamic elution curve of macroporous resin

2.5 单因素考察洗脱工艺试验结果

2.5.1 洗脱液体积分数对 GRH 洗脱率的影响

如图7所示,洗脱效果随乙醇体积分数的增大而提高,70%乙醇洗脱率为 97.62%,90%乙醇洗脱率为 98.44%,但与70%乙醇差别很小,考虑成本问题,采用70%乙醇作为洗脱溶剂。

2.5.2 HPD-722 大孔树脂动态洗脱曲线

由图8可知,到第5管时 GRH 浓度为 0,此时洗脱液体积为 50 mL (2.5 BV),所以选择 2.5 BV 为最佳洗脱液体积。

2.5.3 洗脱液体积流量对 GRH 洗脱率的影响

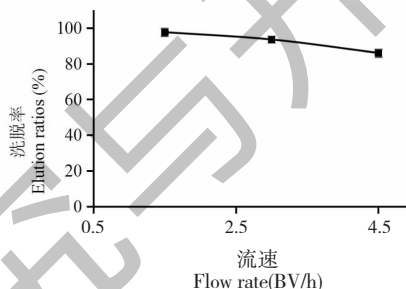


图9 洗脱体积流量对 GRH 洗脱率的影响

Fig. 9 Effect of eluent flow rate on elution ratios of GRH

如图9所示,流速越慢,GRH 的洗脱效果越好,以 1.5BV/h 的体积流量洗脱率最大,为 97.59%,故采用 1.5BV/h 的体积流量进行洗脱。

2.6 纯化前后 GRH 纯度的测定

表5 GRH 纯化前后比较

Table 5 Comparison before and after purification of GRH

| 序号 No. | 纯化前 Before purification (mg/g) | 纯化后 After purification (mg/g) | 平均值 Average (mg/g) | RSD (%) |
|-----------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------|
| 1 | 4.041 | 179.351 | 179.028 | 0.227 |
| 2 | - | 178.571 | - | - |
| 3 | - | 179.163 | - | - |

由表中5可知,GRH 含量由纯化前的 0.404%,提高至纯化后的 17.903%,纯度提高 44.35 倍,表明采用该方法优化得到的 GRH 纯化参数准确可靠。

2.7 抗氧化能力测定结果

GRH 纯化前后对 DPPH、ABTS⁺· 自由基的清除能力如表6所示,以半抑制浓度 IC₅₀ 值来评价抗氧化活性的大小,越小表示抗氧化剂清除自由基的能力越强^[15]。由表6可知,自由基的清除率与提取物、纯化物及标准品浓度均呈良好的线性关系,提取

物 DPPH、ABTS⁺· 自由基的 IC₅₀ 分别为 358.468 和 75.788 mg/mL,纯化物的 IC₅₀ 值分别为 5.326 和 1.674 mg/mL,GRH 经纯化后清除 DPPH 自由基的能力相对提高了 67.31 倍,清除 ABTS⁺· 自由基的能力提高了 45.27 倍。统计学结果显示,纯化物对 DPPH 自由基和 ABTS⁺· 的清除能力与提取物相比具有极显著差异 ($P < 0.01$),并且从 ABTS⁺· 自由基清除效果来看,纯化物与阳性药 Vc 和标准品相比无显著性差异 ($P > 0.05$),抗氧化效果明显。

表6 纯化前后 GRH 对 DPPH 和 ABTS⁺· 自由基的清除能力Table 6 Scavenging ability of before and after purified GRH to DPPH and ABTS⁺· free radicals

| 组别 Group | 纯度 Purity (%) | 拟合曲线 Curve fitting | R ² | IC ₅₀ (mg/mL) | |
|------------------------|------------------|------------------------|----------------|-------------------------------------|---|
| | | | | DPPH 自由基清除率 DPPH scavenging rate | ABTS ⁺ · 自由基清除率 ABTS ⁺ · scavenging rate |
| Vc | 99.9 | $Y = 1751.5X + 9.0155$ | 0.9929 | 0.0234 ± 0.0012 | - |
| 标准品 Standard substance | 98 | $Y = 62.382X - 2.3016$ | 0.9989 | 0.838 ± 0.027 | - |
| 提取物 Extrative | 0.41 | $Y = 0.1261X + 4.7972$ | 0.9996 | 358.468 ± 3.254 ^{***} | - |
| 纯化物 Purified substance | 17.90 | $Y = 9.4743X - 0.4606$ | 0.9989 | 5.326 ± 0.218 ^{**Δ} | - |
| Vc | - | $Y = 6600.1X + 2.3355$ | 0.9939 | - | 0.007 ± 0.0005 |
| 标准品 Standard substance | - | $Y = 157.28X - 5.175$ | 0.9973 | - | 0.351 ± 0.022 |
| 提取物 Extrative | - | $Y = 0.3333X + 24.74$ | 0.9900 | - | 75.788 ± 2.183 ^{***} |
| 纯化物 Purified substance | - | $Y = 22.254X + 12.747$ | 0.9920 | - | 1.674 ± 0.123 ^Δ |

注:与阳性药 Vc 比较, * P < 0.01; 与标准品比较, # P < 0.05, ### P < 0.01; 与提取物比较, Δ P < 0.01。

Note: Compared with the positive drug Vc, * P < 0.01; Compared with standard substance, # P < 0.05, ### P < 0.01; Compared with extractive, Δ P < 0.01.

3 结论

预试验中用萝卜水提液直接上样经过大孔树脂纯化,纯化后 GRH 纯度只能达到 8.55%, 而将水提液醇沉后 GRH 纯化效果明显提高,故采用醇沉后的萝卜提取液为上样药液。

本研究采用 8 种不同型号的大孔树脂对青萝卜中 GRH 进行纯化,从单因素考察和星点设计-效应面法试验结果来看,HPD-722 型大孔树脂富集纯化 GRH 的效果最好。药物浓度是影响 GRH 比吸附量的主要因素,适宜的上样浓度有助于提高 GRH 的纯化效果;90% 乙醇洗脱液虽然能提高 GRH 的洗脱率,但与 70% 乙醇相比提高的幅度不大,而过多的杂质直接影响 GRH 的纯度。研究表明星点设计-效应面法用于优化大孔树脂纯化 GRH 工艺二次回归模型预测性好,纯化工艺参数准确可靠。最佳纯化工艺为:上样液 pH5.3、上样流速 2.5 BV/h、上样药物浓度 0.53 mg/mL、洗脱剂乙醇体积分数 70%、洗脱液体积 2.5 BV,洗脱流速 1.5 BV/h,在此工艺条件下除去了萝卜提取物中的糖类、蛋白质等成分,GRH 含量由 4.041 mg/g 增加到 179.028 mg/g,提高了 44.35 倍。

体外抗氧化活性研究表明,GRH 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺· 自由基都有较好的清除效果,对比提取物、纯化物和纯品的 IC₅₀ 值,GRH 的抗氧化活性明显,并且 ABTS⁺· 自由基的清除效果要优于 DPPH 自由基,这为进一步开发利用萝卜中的 GRH 提供了基础。此外 HPD-722 大孔树脂经过多次吸附-解吸,其纯化效果依然良好,说明大孔树脂纯化

GRH 方法简单可靠,成本低,有利于工业化生产。本研究可为从萝卜中大量提取 GRH 提供依据,更高纯度的 GRH 的纯化工艺还有待进一步研究。

参考文献

- Hanlon PR. Phytochemical composition and biological activity of 8 varieties of radish (*Raphanus sativus* L) sprouts and mature taproots [J]. J Food Sci, 2011, 76: 185-192.
- Higdon J, Delage B, Williams D, et al. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis [J]. Pharmacol Res, 2007, 55: 224-236.
- Fahey JW, Zalcman AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants [J]. Phytochem, 2001, 56: 5-51.
- Carlson D G, Daxenbichler M E, Vanetten C H, et al. Glucosinolates in crucifer vegetables: broccoli, brussels sprouts, cauliflower, collards, kale, mustard greens, and kohlrabi [J]. J Am Soc Hortic Sci, 1987, 112: 173-178.
- Zhang C, Su ZY, Khor TO, et al. Sulforaphane enhances Nrf2 expression in prostate cancer TRAMP C1 cells through epigenetic regulation [J]. Bio Pharm, 2013, 85: 1398-1404.
- Cao S, Wang L, Zhang Z, et al. Sulforaphane-induced metabolomic responses with epigenetic changes in estrogen receptor positive breast cancer cells [J]. FEBS Open Bio, 2018, 8: 2022-2034.
- Kuang P, Hao L, Yuan Q. Isolation and purification of glucoraphenin from radish seeds by low-pressure column chromatography and nanofiltration [J]. Sep Sci Technol, 2011, 46: 179-184.
- Barillari J, Iori R, Broccoli M, et al. Glucoraphasatin and glucoraphenin, a redox pair of glucosinolates of brassicaceae,

- differently affect metabolizing enzymes in rats [J]. J Agr Food Chem, 2007, 55: 5505-5511.
- 9 Abdull Razis AF, De Nicola GR, Pagnotta E, et al. 4-Methylsulfanyl-3-butenyl isothiocyanate derived from glucoraphasatin is a potent inducer of rat hepatic phase II enzymes and a potential chemopreventive agent [J]. Arch Toxicol, 2012, 86: 183-194.
- 10 Scholl C, Eshelman BD, Barnes DM, et al. Raphasatin is a more potent inducer of the detoxification enzymes than its degradation products [J]. J Food Sci, 2011, 7: 504-511.
- 11 Barillari J, Cervellati R, Paolini M, et al. Isolation of 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate from *Raphanus sativus* Sprouts (Kaiware Daikon) and its redox properties [J]. J Agr Food Chem, 2005, 53: 9890-9896.
- 12 Nieves B, Stefanie P, Anke S, et al. Metabolic activity of radish sprouts derived isothiocyanates in *Drosophila melanogaster* [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17: 251-261.
- 13 Wang ZL, Feng SC, Kuang PQ, et al. Extraction, purification and identification of glucoraphasatin from radish sprouts [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2017, 42: 204-209.
- 14 Liu D, Wu YH, Li WH, et al. Application of macroporous adsorptive resins in separation and purification of natural products [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 2764-2770.
- 15 Lu KK, Zheng SJ, Wu SR, et al. Optimization of purification process of polyphenol from *Morchella angusticeps* Peck and antioxidant activity of the extracted polyphenol [J]. Food Sci (食品科学), 2015, 36: 13-20.
- 16 Zhang Y, Ji M, Sun LR. Separation, purification and antioxidant activity of salvianolic acid A from *Salvia miltiorrhiza* var. *alba* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 862-866.
-
- (上接第 1953 页)
- 14 Habegger R, Schnitzler W H. Aroma compounds in the essential oil of perilla red (*Perilla frutescens* L. Britt.) [J]. J Appl Bot Food Qual, 2004, 78: 141-143.
- 15 Tan YF, Lai BS, Yan XL, et al. Analysis of fatty acids in *Perilla frutescens* seed oil [J]. Chin Pharmacol J (中国药学杂志), 1998, 33: 400-402.
- 16 De Koning S, Van der Meer B, Alkema G, et al. Automated determination of fatty acid methyl ester and cis/trans methyl ester composition of fats and oils [J]. J Chromatogr A, 2001, 922: 391-397.
- 17 Menezes IAC, Barreto CMN, Antonioli AR, et al. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils [J]. Z Naturforsch C, 2010, 65: 562-566.
- 18 Sun J. D-limonene: safety and clinical applications [J]. Altern Med Rev, 2007, 12: 259-264.
- 19 Touvay C, Vilain B, Carré C, et al. Effect of limonene and sordarol on monocrotaline-induced lung alterations and pulmonary hypertension [J]. Int Arch Allergy Imm, 1995, 107: 272-274.
- 20 Peana AT, Rubattu P, Piga GG, et al. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception [J]. Life Sci, 2006, 78: 2471-2474.
- 21 Höferl M, Krist S, Buchbauer G. Chirality influences the effects of linalool on physiological parameters of stress [J]. Planta Med, 2006, 72: 1188-1192.