唐万,赖富丽,郝桂芳,等. 西兰花种子萝卜硫素提取物制备工艺优化及其免疫调节活性评价 [J]. 食品工业科技,2026,47(7):422−430. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030361

TANG Wan, LAI Fuli, HAO Guifang, et al. Optimization of the Extraction Process of Extract Containing Sulforaphane from Broccoli Seeds and Evaluation of Its Immunomodulatory Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(7): 422−430. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030361

·营养与保健·

西兰花种子萝卜硫素提取物制备工艺优化及其免疫调节活性评价

唐　万[1],赖富丽[1],郝桂芳[1],陈　阳[1],石万银[1],王素琴[2],王　喆[1],杨　强[1],徐　剑[1,*]

(1.劲牌有限公司,中药保健食品质量与安全湖北省重点实验室,湖北大冶 435100;
2.劲牌持正堂药业有限公司,湖北黄石 435000)

摘　要:为探究西兰花种子中萝卜硫素最佳提取工艺并对其免疫活性进行评价,以西兰花种子为原料,在探究料液比、乙醇浓度、提取时间、提取温度和提取次数对萝卜硫素提取得率影响的基础上,通过正交试验对提取工艺参数进行优化;采用斑马鱼免疫缺陷模型对含萝卜硫素提取物免疫调节活性进行评价。结果表明:在料液比1∶22(g∶mL),乙醇体积浓度10%,提取时间1 h,提取温度40 ℃,提取2次的工艺条件下萝卜硫素提取得率最高,为18.24 mg/g。免疫活性评价结果表明,提取物具有良好的免疫调节活性,含萝卜硫素西兰花种子提取物在高(200 μg/mL)、中(100 μg/mL)剂量组具有促进斑马鱼巨噬细胞吞噬功能,在中(100 μg/mL)、低(50 μg/mL)剂量组具有T细胞减少症改善功能,在高(200 μg/mL)、中(100 μg/mL)、低(50 μg/mL)剂量组具有中性粒细胞减少症改善的功效。通过对萝卜硫素的最佳提取工艺优化及免疫活性评价,为其更好地研究与应用提供了理论和实践基础。

关键词:西兰花种子,萝卜硫素,提取工艺优化,提取得率,斑马鱼模型,免疫活性评价
中图分类号:TS201.1　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1002−0306(2026)07−0422−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030361
本文网刊:

Optimization of the Extraction Process of Extract Containing Sulforaphane from Broccoli Seeds and Evaluation of Its Immunomodulatory Activity

TANG Wan[1], LAI Fuli[1], HAO Guifang[1], CHEN Yang[1], SHI Wanyin[1], WANG Suqin[2], WANG Zhe[1], YANG Qiang[1], XU Jian[1,*]

(1.Jing Brang Co., Ltd., Hubei Key Lab for Quality and Safety Control of Traditional Chinese Medicine and Healthcare Food, Daye 435100, China;
2.Jing Brand Chizhengtang Pharmaceutical Co., Ltd., Huangshi 435000, China)

Abstract: In order to investigate the optimal extraction process of sulforaphane from broccoli seeds and evaluate its immunomodulatory activity, broccoli seeds as the raw material, the effects of parameters including solid-liquid ratio, ethanol concentration, extraction time, extraction temperature and extraction times on the yield of sulforaphane were examined. The parameters were optimized by orthogonal experimental design. The immunomodulatory activity of its extract contains sulforaphane was explored based on the immunodeficiency zebrafish model. The results indicated that the highest yield of sulforaphane was 18.24 mg/g under the conditions of a 1∶22 g/mL solid-liquid ratio, ethanol concentration of 10%, 1 h of extraction time, 40 ℃ of extraction temperature and two extraction circles. The immunomodulatory activity tests showed that the extract contains sulforaphane had strong immunomodulatory activity and could significantly enhanced

收稿日期: 2025−03−28
作者简介: 唐万(1993−),男,硕士,工程师,研究方向:天然产物活性成分研究与开发,E-mail:tangwan312@163.com。
*** 通信作者:** 徐剑(1979−),男,博士,高级工程师,研究方向:中药材天然产物开发及其活性研究,E-mail:xujian@jingpai.com。

macrophage phagocytosis in zebrafish at high dosage (200 μg/mL) and medium dosage (100 μg/mL), improve T cell reduction at medium dosage (100 μg/mL) and low dosage (50 μg/mL), and improve neutropenia at high dosage (200 μg/mL), medium dosage (100 μg/mL) and low dosage (50 μg/mL). By optimizing the extraction process of sulforaphane from broccoli seeds and evaluating its immunomodulatory activity, the study provided a theoretical and practical basis for the research and application of the extract contains sulforaphane.

Key words: broccoli seeds; sulforaphane; extraction process optimization; extraction yield; zebrafish model; immune activity evaluation

西兰花是十字花科芸薹属植物甘蓝的一种变种，富含多种高价值营养成分，具有丰富的维生素、矿物质和硫代葡萄糖苷类物质[1]。硫代葡萄糖苷是一种存在于十字花科植物中的次生代谢产物，这些化合物天然稳定[2]，当植物组织受损时，其内源性黑芥子酶就会被释放，硫代葡萄糖苷被水解形成多种活性物质，萝卜硫素（1-异硫氰酸-4-甲磺酰基丁烷，Sulforaphane）是其中最主要的一种物质，该物质在西兰花中含量较多，尤其是其种子中含量最为丰富[3]。研究表明，萝卜硫素是迄今为止在蔬菜中发现的防癌抗癌效果最好、活性最强的天然产物之一[4]，具有抑制癌细胞增殖、诱导解毒酶、阻滞细胞周期和诱导凋亡的能力[5−6]，对包括肝癌、胰腺癌、肺癌、直肠癌等癌症均有较好的预防和抑制作用[7−8]，除防癌抗癌活性外，萝卜硫素在降低血压、保护心脏、缓解糖尿病、抑菌以及改善精神分裂症和阿尔茨海默病等方面也具有较好功效[9−12]。同时，有研究显示萝卜硫素也能明显激活 Nrf2 途径调节氧化应激反应从而间接提高机体抗氧化活性和免疫应答[13]，萝卜硫素通过激活 Nrf2 调节途径，释放更多 Nrf2 并且进入细胞核中，与小分子肌腱纤维瘤蛋白（maf）结合后识别 ARE（Antioxidant Response Element，抗氧化反应元件），然后启动（基因）下游抗氧化因子的表达，提高细胞的抗氧化能力，从而提高免疫[14]。因此绿色高效的萝卜硫素提取物制备方法和系统性的免疫活性评价具有重要研究价值和应用意义。

萝卜硫素制备主要有化学合成法、酶法以及半合成法，其中化学合成法和半合成法因步骤繁琐、成本高且制备过程使用大量有机试剂而应用受限，目前多数研究仍采用酶法制备萝卜硫素[15]。陈明媚等[16]通过响应面试验优化提取参数，借助内源酶提取西兰花种子中萝卜硫素，最大得率为 6.41 mg/g，该方法虽然额外添加 V_C，但提取得率相对较低；孙义飞[17] 通过正己烷脱脂，并优化酶解条件，最后用乙酸乙酯萃取得到萝卜硫素最佳提取得率为 6.71 mg/g，该方法萝卜硫素提取得率并没有显著提高，并且正己烷和乙酸乙酯的引入也极大限制了萝卜硫素提取物的应用范围；孔玉雯[18] 以西兰花副产物为原料，通过引入外源酶并对酶解条件优化，80% 乙醇溶液提取，萝卜硫素提取最大值为 155.376±0.48 μg/g，该方法以西兰花副产物为原料，原料成本低，但萝卜硫素得率较低，实际应用受限。上述提取方法中大多存在提取过程含有机试剂、步骤相对繁琐、提取得率不高等不足之处，在实际工业生产过程中可能存在应用受限等问题。而同时兼具操作简单、绿色环保、产率相对较高的提取方法还鲜有报道。

斑马鱼具有与人类相似的免疫细胞类型和形态，都具有先天性防御系统及获得性防御系统，且与人类基因同源性高达 87%[19]。与传统实验动物模型相比，斑马鱼具有繁殖快、个体小、全身透明、易于培养和观察、实验周期短、成本低等优势[20]。长春瑞滨是一种半合成的生物碱，研究显示大剂量长春瑞滨骨髓抑制较为显著，导致红细胞和白细胞数量减少，吞噬细胞吞噬功能减弱，最终致使机体免疫力低下[21]。本研究采用一种简单高效、绿色安全、提取得率较高的提取方法制备萝卜硫素提取物，并首次借助多途径的斑马鱼免疫模型评价西兰花种子提取物（含萝卜硫素）免疫活性，从不同机理层面综合评价提取物免疫活性，为相关产品及药物研发提供一定参考价值。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

野生型 AB 品系斑马鱼、转基因 T 细胞红色荧光 Tg（rag2:DsRed）斑马鱼、转基因中性粒细胞绿色荧光 Tg（mpx:EGFP）斑马鱼　杭州环特生物科技股份有限公司提供；西兰花种子　浙江勿忘农种业股份有限公司；萝卜硫素　含量≥98%，成都乐美天医药；荧光微球　美国 Sigma-Aldrich 公司；甲酸、乙腈　色谱纯，美国 Fisher 公司；酒石酸长春瑞滨注射液　江苏豪森药业；灵芝孢子粉　劲牌持正堂药业有限公司；甲基纤维素　美国阿拉丁公司。

Ultimate-3000 高效液相色谱仪　美国赛默飞公司；XS105 分析天平　瑞士梅特勒-托利多公司；Axio Zoom V16 荧光体视显微镜、stemi 508 体视显微镜　德国蔡司公司；IM-400 显微注射仪、PC-100 拉针仪　日本 Narishige 公司；W-5-100SP 恒温水浴锅　上海申生科技有限公司；N1300 旋转蒸发仪　日本 EYELA 公司、SPX-250B-Z 型生化培养箱　上海博讯科技；斑马鱼养殖系统　北京爱生科技。

1.2　实验方法

1.2.1　西兰花种子萝卜硫素提取物制备工艺　本研究参考孙奕良等[22] 和吕城枝[23] 研究思路，结合实际应用情况，采用低浓度乙醇溶液为溶媒，借助西兰花种子自身含有的黑芥子酶将种子内硫代葡萄糖苷类化合物水解生成萝卜硫素和其他成分，生成的萝卜硫

素在一定温度下溶解于溶媒中，达到将酶解反应和提取过程同步进行的目的；初始提取条件为：准确称取粉碎后的西兰花种子粉末，按料液比 1∶15(g∶mL)添加 30% 体积分数乙醇溶液，在 40 ℃ 条件下水浴提取 1 h，提取 1 次，提取结束后过滤即得含萝卜硫素滤液。

1.2.2 单因素优化 西兰花种子粉碎作提取原料，提取结束后过滤并准确量取滤液体积。参照 1.2.1 中初始提取条件，在控制变量条件下分别考察料液比(1∶10、1∶14、1∶18、1∶22、1∶26、1∶30)、提取温度(30、35、40、45、50、55 ℃)、乙醇体积浓度(10%、20%、30%、40%、50%、60%)和提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h)对萝卜硫素提取得率影响，西兰花种子中萝卜硫素提取得率(Y)按公式(1)计算：

$$Y = \frac{(CV)/1000}{m} \quad 式（1）$$

式中：Y 为萝卜硫素提取得率(mg/g)；C 为根据标准曲线计算得到的滤液中萝卜硫素含量(g/L)；V 为每组实验中对应滤液体积(mL)；m 为西兰花种子粉末质量(g)。

1.2.3 正交试验 根据单因素实验结果，选取料液比、乙醇体积浓度、提取温度和提取时间为因素，以萝卜硫素提取得率为评价指标，按正交试验设计规则，设计 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$正交试验，因素水平表如表 1 所示。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factor-level of orthogonal experiment

水平	因素			
	料液比(g∶mL)	乙醇体积浓度(%)	提取温度(℃)	提取时间(h)
1	1∶18	10	40	0.5
2	1∶22	20	45	1.0
3	1∶26	30	50	1.5

1.2.4 工艺验证与提取次数优化 以正交试验最佳组合结果进行工艺验证和提取次数优化，分别提取 1、2、3、4 次，设置 3 组平行，测定滤液中萝卜硫素含量并计算萝卜硫素提取得率，结合实际确定最佳提取次数。在最终确定的最优提取工艺下提取得到含萝卜硫素西兰花种子提取物(简称提取物)。

1.2.5 免疫调节活性评价

1.2.5.1 最大耐受浓度(maximum tolerable concentration，MTC)实验 在进行功效评价前，考察不同模型斑马鱼对西兰花种子提取物的耐受情况。分别随机挑选 3dpf(受精后 3 d)野生型 AB 品系斑马鱼(野生 AB 斑马鱼)、3dpf 转基因中性粒细胞绿色荧光 Tg(mpx:EGFP)斑马鱼(Tg(mpx)斑马鱼)和 4dpf 转基因 T 细胞红色荧光 Tg(rag2:DsRed)斑马鱼(Tg(rag2)斑马鱼)为实验对象开展三种不同模型耐受实验，每个模型下均设置正常组和实验组，实验组中野生 AB 斑马鱼静脉注射混合液造模(混合液：20 μL/mL 荧光微球和 400 μg/mL 酒石酸长春瑞滨注射液按体积比 1∶1 配制混合液，溶液为生理盐水，造模体积为 10 nL)、Tg(rag2)和 Tg(mpx)斑马鱼仅注射长春瑞滨造模(200 μg/mL 酒石酸长春瑞滨注射液，溶液为生理盐水，造模体积为 10 nL)，按 30 尾/孔随机挑选造模后状态正常的斑马鱼置于 6 孔板中，用养鱼水配制提取物和萝卜硫素对照品溶液，使提取物终浓度分别为 1000、500、250、200、100、50 μg/mL，萝卜硫素对照品终浓度为 20、10、5 μg/mL，每孔添加 3 mL 提取物溶液或对照品溶液，加盖并用锡箔纸包裹避光；野生 AB 斑马鱼在 28 ℃ 条件下培养 48 h 后重新换液给样一次并继续培养 48 h，Tg(mpx)和 Tg(rag2)斑马鱼在 28 ℃ 条件下分别培养 48 h 和 24 h(中途不换液)。实验期间，每天观察记录死亡情况并移除死亡斑马鱼，以不致死的最大浓度确定为模型斑马鱼的最大耐受浓度。

1.2.5.2 促进巨噬细胞吞噬功效评价 随机挑选 3dpf 且发育良好的 AB 斑马鱼，其中实验组 AB 斑马鱼静脉注射酒石酸长春瑞滨和荧光微球混合液，建立免疫功能损伤模型同时以异物引发巨噬细胞吞噬行为[24]。按 30 尾/孔随机挑选造模后正常状态的斑马鱼置于 6 孔板中，设置高(200 μg/mL)、中(50 μg/mL)、低(25 μg/mL)剂量提取物组和 10 μg/mL 萝卜硫素对照品组，每孔中加 3 mL，并设置正常组、模型组和阳性对照组(灵芝孢子粉，250 μg/mL)。28 ℃ 条件下温育 96 h，其中温育 48 h 后用标准稀释水清洗 2 遍，重新给药一次，斑马鱼固定于甲基纤维素玻片上在荧光体视显微镜下采集红色荧光照片，然后用 ImageJ 图像分析软件统计斑马鱼体内剩余荧光微球数量。

1.2.5.3 中性粒细胞减少症改善功效评价 随机挑选 3dpf 且发育良好的 Tg(mpx)斑马鱼，其中实验组 Tg(mpx)斑马鱼静脉注射酒石酸长春瑞滨造模[25]，按 30 尾/孔随机挑选造模后正常状态的斑马鱼置于 6 孔板中，设置高(200 μg/mL)、中(50 μg/mL)、低(25 μg/mL)剂量提取物组和 10 μg/mL 萝卜硫素对照品组，每孔中加 3 mL，并设置正常组、模型组和阳性对照组。28 ℃ 条件下温育 48 h 后用标准稀释水清洗 2 遍，斑马鱼固定于甲基纤维素玻片上在荧光体视显微镜下采集绿色荧光照片，然后用 ImageJ 图像分析软件统计斑马鱼体内排泄处至尾端部分中性粒细胞数量。

1.2.5.4 T 细胞减少症改善功效评价 随机挑选 4dpf 且发育良好的 Tg(rag2)斑马鱼，其中实验组 Tg(rag2)斑马鱼静脉注射酒石酸长春瑞滨造模[26]，按 30 尾/孔随机挑选造模后正常状态的斑马鱼置于 6 孔板中，设置高(200 μg/mL)、中(50 μg/mL)、低(25 μg/mL)剂量提取物组和 10 μg/mL 萝卜硫素对

照品组，每孔中加 3 mL，并设置正常组、模型组和阳性对照组。28 ℃ 条件下温育 24 h 后用标准稀释水清洗 2 遍，斑马鱼固定于甲基纤维素玻片上在荧光体视显微镜下拍照，借助 ZEN 3.3（blue edition）软件自带分析功能，通过框选并固定 T 细胞红色荧光区域，软件自动统计该区域荧光强度（Intensity Mean Value），取该值作为 T 细胞荧光强度。

1.2.6　萝卜硫素含量检测与标准曲线制作

1.2.6.1　萝卜硫素含量检测　参照朱容均等[27]的方法，并做适当调整。采用 HPLC 测定萝卜硫素含量，具体条件为：色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-Aq C_{18} 色谱柱；流动相为乙腈-0.1% 甲酸（20:80）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；检测波长为 205 nm；柱温为 30 ℃；进样量为 10 μL。对照品用 20% 乙腈溶液超声溶解，置于棕色试剂瓶中保存，所有对照品和样品上样前过 0.45 μm 有机滤膜。

1.2.6.2　萝卜硫素标准曲线绘制　精密称取一定量萝卜硫素标准品于 25 mL 容量瓶中，用 20% 乙腈溶解并定容，作为对照品储备液。分别精密吸取萝卜硫素对照品储备液 1、2、3、4、5 和 10 mL 于 10 mL 容量瓶中，用 20% 乙腈稀释并定容至刻度，得到不同浓度的对照品溶液。按上述色谱条件检测分析得到各浓度萝卜硫素对照品色谱峰的峰面积，以对照品溶液浓度为横坐标，以相应峰面积为纵坐标建立标准曲线。萝卜硫素的标准曲线方程为：

$$A = 0.1562 \times C + 2.7311,\ R^2 = 0.9996$$

式中：A 表示萝卜硫素峰面积（mAU·min）；C 表示萝卜硫素浓度（mg/L）。

1.3　数据处理

单因素提取和正交试验数据采用 Origin 2022 分析与处理；免疫调节数据转换与处理采用 ImageJ 图像分析软件；免疫调节实验数据以 SPSS 26.0 进行数据统计，结果以平均值±标准偏差表示。P<0.05 表明差异具有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果与分析

萝卜硫素提取条件与提取得率关系如图 1 所示。如图 1（A）所示，随着溶剂倍数的增加，萝卜硫素提取得率逐步增加，料液比为 1:26 时提取得率达到最高，随着料液比的继续增加萝卜硫素得率趋于平缓，考虑成本问题，选择料液比 1:18、1:22 和 1:26 试验范围；图 1（B）所示，萝卜硫素提取得率随着温度的升高呈现先上升后下降的趋势，在 45 ℃ 达到最高值，相关研究显示低纯度萝卜硫素热稳定性较差[28]，同时温度超过 50 ℃ 对黑芥子酶活性影响较大[29]，故选择 40、45 和 50 ℃ 作为正交试验范围；图 1（C）所示，乙醇体积浓度对萝卜硫素提取得率影响较大，提取得率随着乙醇浓度升高呈逐步下降趋势，当乙醇浓度超过 40% 时，提取得率呈现急速下降趋势，分析可能

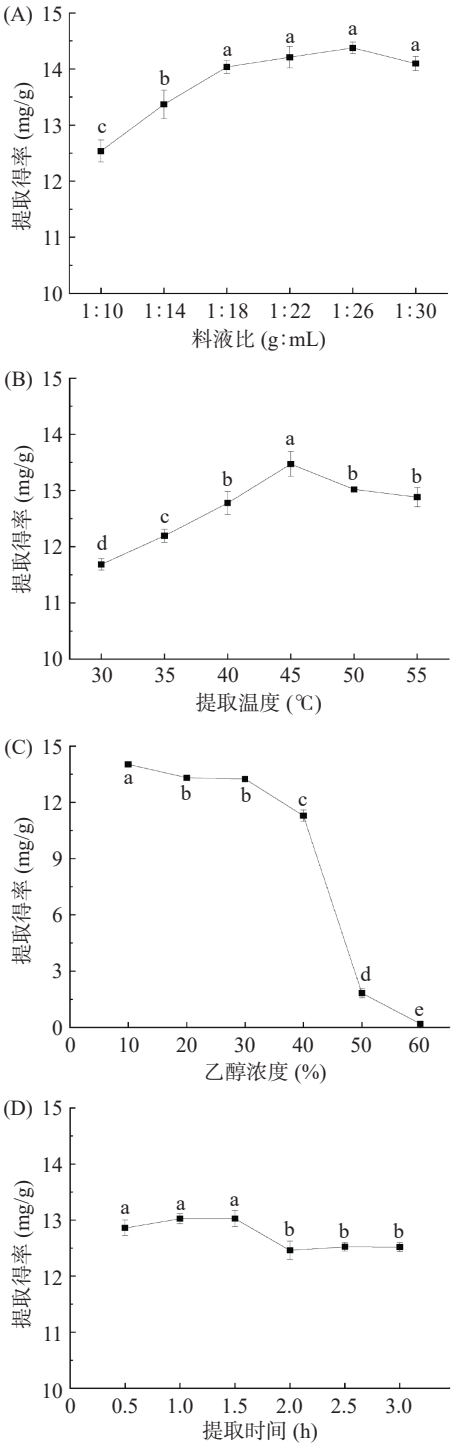


图 1　溶剂倍数（A）、提取温度（B）、乙醇浓度（C）和提取时间（D）对萝卜硫素提取得率的影响

Fig.1　Effect of liquid to material ratio (A), extraction temperature (B), ethanol concentration (C), extraction time (D) on yield of extraction rate of sulforaphane

注：不同小写字母表示在不同条件下萝卜硫素提取得率存在显著差异（P<0.05），图 2~图 3 同。

是高浓度乙醇溶液对黑芥子酶活性影响较大，从而抑制萝卜硫素生成与提取，选择乙醇浓度范围为 10%、20% 和 30%；图 1（D）所示，提取时间对萝卜硫素提取得率影响相对较小，1.5 h 内提取得率相差不大，提取时间达到 2 h 后提取得率略有下降，分析推测随着提取时间增加萝卜硫素存在降解或转换从而影

响提取得率, 选择提取时间范围为 0.5、1.0 和 1.5 h。

2.2 正交实验结果与分析

根据单因素实验结果, 分别选取最佳实验范围设计 4 因素 3 水平正交试验, 结果如表 2 所示。

表 2 正交试验设计与结果分析

Table 2 Orthogonal experiment design and result analysis

试验组	A 料液比 (g:mL)	B 乙醇体积浓度 (%)	C 提取温度 (℃)	D 提取时间 (h)	得率 (mg/g)
1	1:18	10	40	0.5	15.63
2	1:18	20	45	1.0	14.49
3	1:18	30	50	1.5	13.35
4	1:22	10	50	1.0	15.50
5	1:22	20	40	1.5	13.69
6	1:22	30	45	0.5	13.45
7	1:26	10	45	1.5	14.88
8	1:26	20	50	0.5	14.77
9	1:26	30	40	1.0	14.06
均值1	14.45	15.29	14.82	14.67	
均值2	14.72	14.72	14.37	14.68	
均值3	14.57	13.72	14.54	14.38	
极差	0.27	1.57	0.45	0.30	

从表 2 试验结果可以看出, 各因素的影响作用依次为: 乙醇浓度>提取温度>提取时间>料液比, 通过均值分析结果表明 $A_2B_1C_1D_2$ 为最佳提取条件组合, 初步确定西兰花种子中萝卜硫素最佳提取条件为: 料液比 1:22、乙醇体积浓度 10%、提取温度 40 ℃、提取时间 1 h。

2.3 工艺验证与提取次数优化

按上述最佳工艺条件进行提取验证, 取 3 次平行, 西兰花种子中萝卜硫素平均提取得率为 15.06±0.17 mg/g(提取 1 次), 低于实验组 1 和 4, 基于此结果对最佳组合、实验组 1、实验组 4 提取条件进行重复验证, 各条件均称取 10、20、30 g 西兰花种子粉末, 每个重量称取 3 份, 每个条件下共 9 组实验同时进行提取, 萝卜硫素提取得率结果如图 2 所示, 最佳工艺条件下提取得率为 15.37±0.11 mg/g, 高于实验组 1 (15.10±0.10 mg/g)和实验组 4(15.03±0.13 mg/g), 并且处于一个较高水平, 表明该工艺合理可行。在最佳工艺条件下进行提取次数优化, 结果如图 3 所示,

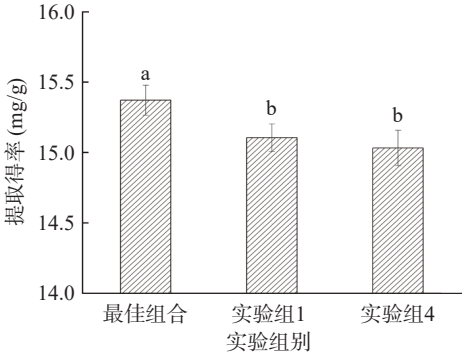


图 2 提取条件重复验证实验

Fig.2 Extract experiments of conditional repeated verification

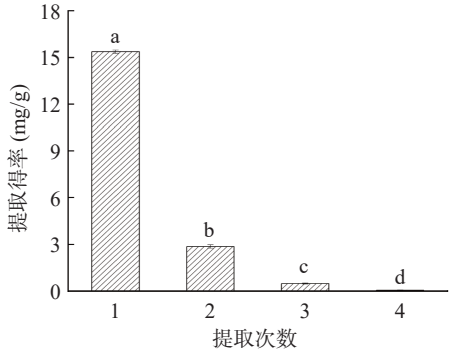


图 3 不同提取次数对提取得率影响

Fig.3 Effect of different extraction times on the extraction yield

提取 4 次的平均得率分别为: 15.37、2.87、0.48、0.05 mg/g, 综合相对提取得率和实际生产制备效率与成本, 选定提取 2 次较为合宜, 此时萝卜硫素总提取得率为 18.24 mg/g。

将本研究结果与近几年相关研究成果进行比对, 结果如表 3 所示。吴华彰等[30] 研究中萝卜硫素提取得率高于本研究中得率, 分析原因可能是其提取方法中通过复配催化缓冲液体系进行酶解, 并且在缓冲液体系中添加新鲜的萝卜汁, 极大提高了萝卜硫素的酶解转化生成率, 这可能是该研究中提取得率超过本实验结果的原因, 但其更高得率是通过额外添加新鲜制备的高活性黑芥子酶获得的; 其余研究中萝卜硫素得率均明显低于本研究, 这一结果也进一步表明本研究中提取方法更简单, 萝卜硫素得率相对更高, 并且采用的工艺和试剂更加安全环保。

表 3 本研究与相关研究成果对比

Table 3 Comparison of this result with relevant research achievements

序号	原料	主要提取操作与步骤	萝卜硫素提取得率
1	西兰花种子	种子粉碎, 10%乙醇溶液, 料液比1:22, 40 ℃热回流提取1 h	15.37±0.11 mg/g(本研究)
2	西兰花种子	西兰花种子研磨后石油醚脱脂, 去离子水30 ℃酶解4 h, 乙醇超声提取	3.1 mg/g[1]
3	西兰花种子	水解温度39 ℃, 时间为5.8 h, V_C添加量为0.07 mg/g, 料液比1:35	6.41 mg/g[16]
4	西兰花种子	酶解12 h, 酶解pH为7, 酶解料液比为1:4, 酶解温度30 ℃	6.71 mg/g[17]
5	西兰花副产物	添加外源酶, pH为5, 酶解时间68 min, 超声酶解温度36 ℃	155.376±0.48 μg/g[18]
6	西兰花种子	按1:2添加催化缓冲液(pH5.0、Zn^{2+}浓度为0.1 mol/L、V_C浓度为0.5 mg/mL、0.1 mol/L醋酸-醋酸钠萝卜汁缓冲体系), 25 ℃酶解8 h, 无水硫酸钠脱水, 甲醇室温搅拌提取	17.066 mg/g[30]
7	西兰花芽	通过蒸与硫酸锌浸泡联合处理西兰花芽, 增加黑芥子酶活性, 提高转化得率	6.72 mg/g[31]
8	西兰花种子	酶解时间8 h, 酶解料液比1:2, 酶解 pH7.0	6.682 mg/g[32]

2.4　斑马鱼免疫调节功能评价

2.4.1　西兰花种子提取物对模型斑马鱼的 MTC 考察　参照一般中药提取物对斑马鱼实验 MTC 浓度设置上限为 2000 μg/mL[33]，参考前期预实验结果，最大浓度从 1000 μg/mL 向下逐级取值。不同浓度提取物对各模型斑马鱼存活影响情况如表 4 所示。结果显示西兰花种子提取物在 1000 μg/mL 时出现大量死亡，各模型下提取物最大 MTC 浓度均为 200 μg/mL，萝卜硫素对照品最大 MTC 浓度为 10 μg/mL。

2.4.2　促进巨噬细胞吞噬功效评价　注射酒石酸长春瑞滨和荧光微球混合液构造斑马鱼免疫低下模型，以荧光微球作为外来异物，巨噬细胞发挥免疫功能吞噬荧光微球。斑马鱼体内剩余荧光微球数量与巨噬细胞吞噬功能成反比[21]；巨噬细胞作为吞噬细胞的一种，是天然免疫系统中重要组成部分，作为免疫应答的第一线，巨噬细胞通过识别清除病原体、杀伤靶细胞、加工和提呈抗原、清除凋亡细胞、参与组织的修复与再生等功能维持机体的免疫稳态[34−35]。如图 4 和图 5 所示，与正常组相比，模型组体内荧光微球数量明显增多，说明长春瑞滨对巨噬细胞吞噬功能造成了影响，导致斑马鱼免疫损伤，模型构建成功（P<0.05）；与模型组相比，200、100 μg/mL 提取物处理斑马鱼 96 h 后，斑马鱼体内剩余荧光微球数量少于模型对照组（P<0.05），表明西兰花种子提取物能促进斑马鱼巨噬细胞吞噬作用。阳性组和萝卜硫素对照品组与模型组均有显著性差异（P<0.05）。

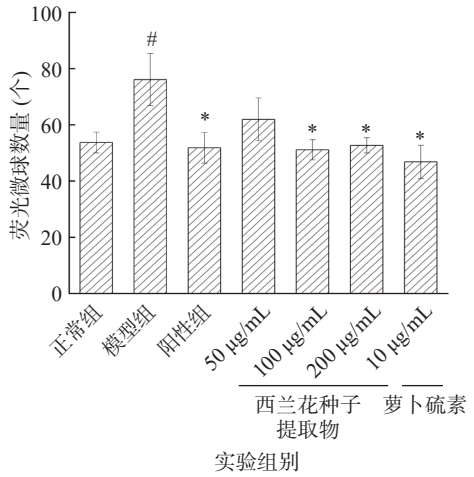


图 4　西兰花种子提取物对巨噬细胞吞噬功能的影响

Fig.4　Effect of broccoli seed extract on the phagocytic function of macrophages

注：*表示实验组与模型组差异显著（P<0.05），**表示实验组与模型组差异极显著（P<0.01）；#表示模型组与正常组差异显著（P<0.05），图 6、图 8 同。

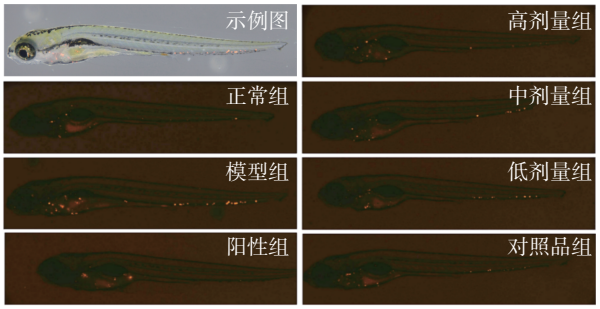


图 5　西兰花种子提取物处理后斑马鱼体内剩余荧光微球数量典型图

Fig.5　Residual fluorescent microspheres in zebrafish treated with broccoli seed extract

2.4.3　中性粒细胞减少症改善功效评价　与正常对照组相比，模型组斑马鱼尾部中性粒细胞数目明显减少，说明长春瑞滨对斑马鱼幼鱼的中性粒细胞造成了影响（P<0.05），导致斑马鱼免疫损伤[36]；中性粒细胞是白细胞的一种，属于机体先天免疫系统的核心组成部分，主要通过病原体清除、启动炎症反应及连接先天免疫与调控适应性免疫，在宿主防御中发挥关键作用。相关研究显示中性粒细胞功能失调可能导致感染易感性增加或自身免疫性疾病[37]，通过分泌抗炎因子（如 IL-10）抑制过度炎症反应，防止组织损伤[38]。如图 6 和图 7 所示，与模型组相比，100、50 μg/mL 西兰花种子提取物均呈现出改善斑马鱼尾部中性粒细胞减少的能力（P<0.05），表明提取物能够一定程度上增加免疫低下的斑马鱼的中性粒细胞数目，虽然最大 MTC 为 200 μg/mL，但在高剂量组未呈现出活

表 4　西兰花种子提取物对三种模型斑马鱼 MTC 考察

Table 4　Investigation of the MTC of broccoli seed extract in three zebrafish models

组别	浓度（μg/mL）	野生AB模型		转基因mpx模型		转基因rag2模型	
		死亡数量（尾）	死亡比例（%）	死亡数量（尾）	死亡比例（%）	死亡数量（尾）	死亡比例（%）
正常组	−	0	0	0	0	0	0
模型组	−	0	0	0	0	0	0
标品对照（萝卜硫素）	20	28	93	30	100	30	100
	10	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0
西兰花种子提取物	1000	22	73	25	83	24	73
	500	8	27	12	40	13	27
	250	6	20	4	13	3	10
	200	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0

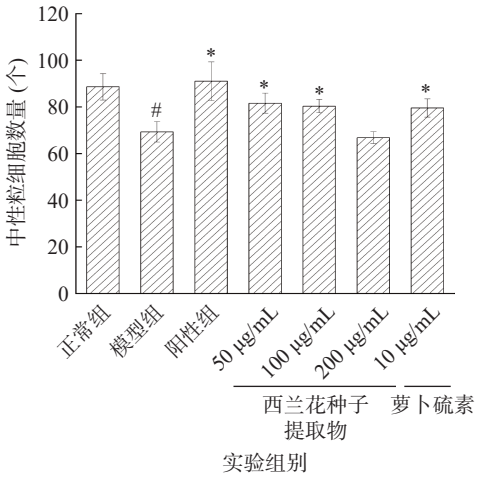


图 6 西兰花种子提取物改善中性粒细胞减少功能评价结果

Fig.6 Evaluation of the improvement effect of broccoli seed extract on neutropenia

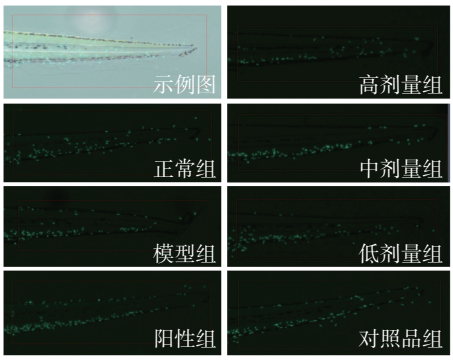


图 7 西兰花种子提取物处理后斑马鱼体内中性粒细胞数量典型图

Fig.7 Fluorescence intensity of T cells in zebrafish treated with broccoli seed extract

性，相关研究表明生物体免疫系统中存在复杂的负反馈调节机制[39]，分析原因可能是高剂量西兰花种子提取物过度激活或抑制了调节通路，从而引发免疫系统的负反馈调节，抑制了免疫反应的进一步增强，使得对中性粒细胞减少症的改善作用被削弱或抑制，从而未呈现出活性。

2.4.4 T 细胞减少症改善功效评价 与正常对照组比较，模型组 T 细胞荧光强度显著降低（P<0.05），表明免疫功能损伤的 T 细胞数量减少模型建立成功。T 细胞即 T 淋巴细胞，是由来源于骨髓的淋巴干细胞，在胸腺中分化、发育成熟后，通过淋巴和血液循环而分布到全身的免疫器官和组织中发挥免疫功能，T 细胞通过细胞表面受体，特异性识别并攻击特定的抗原分子，也可以通过释放细胞因子强化免疫效应[40]，机体 T 细胞活性与数量的改变是诱导自身免疫性疾病的关键因素。如图 8 和图 9 所示，与模型对照组比较，200、100 和 50 μg/mL 提取物均能显著提高低免疫力斑马鱼 T 细胞荧光强度（P<0.01），对 T 细胞数量减少症显示出显著的保护作用。

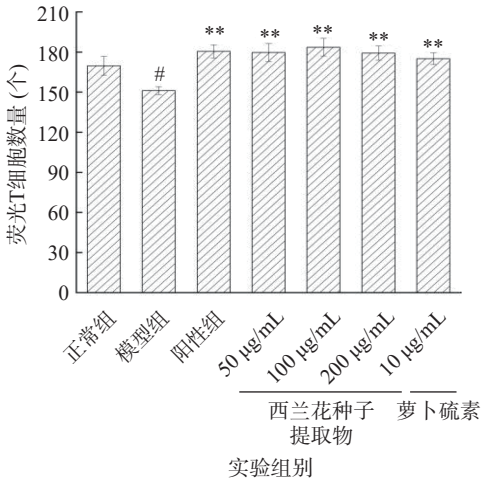


图 8 西兰花种子提取物改善 T 细胞减少功功能价结果

Fig.8 Evaluation of the improvement effect of broccoli seed extract on T cell cytopenia



图 9 西兰花种子提取物处理后斑马鱼体内 T 细胞荧光强度典型图

Fig.9 Fluorescence intensity of T cells in zebrafish treated with broccoli seed extract

3 结论

本文通过单因素分析和正交试验优化确定萝卜硫素提取制备最佳条件为：10% 乙醇体积浓度、料液比（g∶mL）1∶22、40 ℃ 条件下提取时间 1 h，共提取 2 次，在此条件下萝卜硫素提取得率为 18.24 mg/g。基于斑马鱼免疫调节功能评价模型综合评价西兰花种子提取物免疫调节活性，西兰花种子提取物（含萝卜硫素）在高（200 μg/mL）、中（100 μg/mL）剂量组具有促进巨噬细胞吞噬作用（P<0.05）；在中（100 μg/mL）、低（50 μg/mL）剂量组具有改善中性粒细胞减少症作用（P<0.05）；在高（200 μg/mL）、中（100 μg/mL）、低（50 μg/mL）剂量组具有改善 T 细胞减少症作用（P<0.01），结果表明含萝卜硫素西兰花种子提取物具有促进巨噬细胞吞噬、中性粒细胞减少症改善和 T 细胞减少症改善的作用，该研究结果从不同作用机理角度证实了西兰花种子提取物的免疫条件活性。本研究只对提取物的整体活性进行了评价，对提取物的成分和活性-成分关联性有待于进一步研究。本文研究成果为西兰花种子提取物（含萝卜硫素）的后续深入研究与开发应用提供理论依据和技术支持。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

［1］ 李欢, 陈雄, 康慧枝, 等. 西兰花种子中分离纯化萝卜硫素及残留溶剂的方法学验证[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(8): 1078−1084. ［LI Huan, CHEN Xiong, KANG Huizhi, et al. Isolation and purification methodology of sulforaphane from crude extract of broccoli seeds[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2023, 40(8): 1078−1084.］

［2］ PONGMALAI P, DEVAHASTIN S, CHIEWCHAN N, et al. Enhancing the recovery of cabbage glucoraphanin through the monitoring of sulforaphane content and myrosinase activity during extraction by different methods[J]. Separation and Purification Technology, 2017, 174: 338−344.

［3］ SUN Ruobin, HUANG Heou, WANG Ziyue, et al. Computer-driven evolution of myrosinase from the cabbage aphid for efficient production of (R)-sulforaphane[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(23): 13217−13227.

［4］ SHI Qing, LIU Yajuan, YANG Wanqi, et al. The covalent modification of STAT1 cysteines by sulforaphane promotes antitumor immunity *via* blocking IFN-*γ*-induced PD-L1 expression[J]. Redox Biology, 2025, 81: 103543.

［5］ GU Haofeng, MAO Xueying, DU Min. Metabolism, absorption, and anti-cancer effects of sulforaphane: An update[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(13): 3437−3452.

［6］ ELKASHTY O A, TRAN S D. Sulforaphane as a promising natural molecule for cancer prevention and treatment[J]. Current Medical Science, 2021, 41(2): 250−269.

［7］ KAISER A E, BANIASADI M, GIANSIRACUSA D, et al. Sulforaphane: A broccoli bioactive phytocompound with cancer preventive potential[J]. Cancers, 2021, 13(19): 4796.

［8］ HUANG B, LEI S, WANG D, et al. Sulforaphane exerts anti cancer effects on human liver cancer cells via induction of apoptosis and inhibition of migration and invasion by targeting MAPK7 signalling pathway[J]. Journal of B U ON: Official Journal of the Balkan Union of Oncology, 2020, 25(2): 959−964.

［9］ PATEL B, MANN G E, CHAPPLE S J. Concerted redox modulation by sulforaphane alleviates diabetes and cardiometabolic syndrome[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 122: 150−160.

［10］ SHIINA A, KANAHARA N, SASAKI T, et al. An open study of sulforaphane-rich broccoli sprout extract in patients with schizophrenia[J]. Clinical Psychopharmacology and Neuroscience, 2015, 13(1): 62−67.

［11］ NADEEM A, AHMAD S F, AL-HARBI N O, et al. Nrf2 activator, sulforaphane ameliorates autism-like symptoms through suppression of Th17 related signaling and rectification of oxidant-antioxidant imbalance in periphery and brain of BTBR T+tf/J mice[J]. Behavioural Brain Research, 2019, 364: 213−224.

［12］ DERAMAUDT T B, ALI M, VINIT S, et al. Sulforaphane reduces intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages through inhibition of JNK and p38 MAPK-induced inflammation[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2020, 45(6): 1927−1941.

［13］ CAI Yousheng, XU Jian, CHEN Mosi, et al. Compound analysis of Jing liqueur and nrf2 activation by Jing liqueur: One of the most popular beverages in China[J]. Beverages, 2019, 6(1): 1.

［14］ 吕斌, 凌圣惠, 黎高文, 等. 萝卜硫素基于 Nrf2/ARE 通路改善肾病综合征幼鼠的肾功能[J]. 西北药学杂志, 2023, 38(1): 44−48. ［LÜ Bin, LING Shenghui, LI Gaowen, et al. The sulforaphane is based on the Nrf2/ARE pathway to improve renal function in nephrotic syndrome young rats[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2023, 38(1): 44−48.］

［15］ 张璇, 田明硕, 王健, 等. 萝卜硫素提取纯化及其抗癌功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(17): 424−434. ［ZHANG Xuan, TIAN Mingshuo, WANG Jian, et al. Research progress in extraction, purification and anticancer function of sulforaphane[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(17): 424−434.］

［16］ 陈明媚, 李俊杰, 李晓丹, 等. 响应面法优化西兰花种子酶解生成萝卜硫素的条件[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2021, 38(2): 113−118,125. ［CHEN Mingmei, LI Junjie, LI Xiaodan, et al. Optimization enzymatic hydrolysis conditions of sulforaphane formation from broccoli seeds with response surface method[J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2021, 38(2): 113−118,125.］

［17］ 孙义飞. 西兰花中萝卜硫素的含量调控及其对肠道微生物影响的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2023. ［SUN Yifei. Study on the regulation of sulforaphane contene in broccoli and its effect on intestinal microorganisms[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023.］

［18］ 孔玉雯. 西兰花副产物中萝卜硫素的提取及其护肝活性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2024. ［KONG Yuwen. Extraction of sulforaphane from broccoli by-products and their hepatoprotective activities[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2024.］

［19］ HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013, 496(7446): 498−503.

［20］ 祁美娟, 石美智, 韩永龙. 斑马鱼在药学领域的应用研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(7): 903−906. ［QI Meijuan, SHI Meizhi, HAN Yonglong. Application of zebrafish in field of pharmacy[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(7): 903−906.］

［21］ 史珅, 李昊虬, 王龙, 等. 3 种乳制品对低免疫力模型斑马鱼免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(11): 113−120. ［SHI Shen, LI Haoqiu, WANG Long, et al. Protective effects of three types of dairy products on immune vulnerability in vinorelbine-treated zebrafish[J]. Food Science, 2022, 43(11): 113−120.］

［22］ 孙奕良, 李海燕, 洪汉君, 等. 十字花科植物萝卜硫素生理功能及其产品应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2024(2): 364−372. ［SUN Yiliang, LI Haiyan, HONG Hanjun, et al. Research progress on the physiological function and product application of sulforaphane in cruciferous plants[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024(2): 364−372.］

［23］ 吕城枝. 萝卜硫素提取及其对 B16 细胞氧化损伤的保护作用研究[D]. 杭州: 浙江科技学院, 2021. ［LÜ Chengzhi. Study on extraction of sulforaphane and its protective effect on oxidative damage in B16 cells[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Science & Technology, 2021.］

［24］ LI Zhenhao, SHI Yingqiu, ZHANG Xiaohui, et al. Screening immunoactive compounds of *Ganoderma lucidum* spores by mass spectrometry molecular networking combined with *in vivo* zebrafish assays[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 287.

［25］ 徐懿乔, 宋娟娟, 周彬, 等. 基于斑马鱼模型的藿香紫苏饮免疫调节功能研究[J]. 食品与发酵科技, 2024, 60(1): 88−92. ［XU Yiqiao, SONG Juanjuan, ZHOU Bin, et al. Study on immune regulation function of zebrafish treated with *Pogostemon Perilla* tea[J].

Food and Fermentation Science & Technology, 2024, 60(1): 88−92.]
[26] 董思颖, 陈亮, 张璐, 等. 基于斑马鱼实验模型评价人参玫瑰膏改善气血健康作用[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(9): 2295−2298. [DONG Siying, CHEN Liang, ZHANG Lu, et al. Evaluation of the effect of ginseng rose ointment on improving qi and blood health based on zebrafish experimental model[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2021, 32(9): 2295−2298.]
[27] 朱容均, 房耀维, 叶沁文, 等. 产黑芥子酶鞘氨醇杆菌属菌株 RJ35 的筛选、鉴定及酶学性质[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 214−219. [ZHU Rongjun, FANG Yaowei, YE Qinwen, et al. Screening, identification and enzymatic properties of myrosinase-producing *Sphingobacterium* RJ35[J]. Food Science, 2023, 44(6): 214−219.]
[28] 李奉钢, 刘艳冰, 钟泽雨, 等. 西兰花种子中萝卜硫素的纯化及其稳定性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(5): 275−282. [LI Fenggang, LIU Yanbing, ZHONG Zeyu, et al. Purification and stability of sulforaphane from broccoli seeds[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(5): 275−282.]
[29] 阮思煜, 敬璞, 董英. 红心萝卜黑芥子酶的性质及热变性动力学研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 149−152. [RUAN Siyu, JING Pu, DONG Ying. Study on properties and thermodynamics of myrosinase from red radish[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(4): 149−152.]
[30] 吴华彰, 赵云利. 西兰花种子提取萝卜硫素的酶解体系[J]. 光谱实验室, 2012, 29(1): 431−434. [WU Huazhang, ZHAO Yunli. Enzymatic degradation system for sulforaphane extraction from broccoli seeds[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2012, 29(1): 431−434.]
[31] 张瑾. 西兰花芽萝卜硫素的富集调控及芽粉品质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2024. [ZHANG Jin. Study on enrichment of sulforaphane in broccoli sprouts and the quality of sprout powder [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024.]
[32] 谢述琼, 何珺, 舒华. 西兰花种子中萝卜硫素酶解浸提工艺研究[J]. 广州化工, 2016, 44(8): 73−75,99. [XIE Shuqiong, HE Jun, SHU Hua. Leaching process research of sulforaphane with broccoli seeds[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2016, 44(8): 73−75,99.]
[33] 王涛, 戴明珠, 李延川, 等. 复方中药提取物增强免疫力作用及初步机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 198−207. [WANG Tao, DAI Mingzhu, LI Yanchuan, et al. Study of the immunity-enhancing effect and mechanism of Chinese herbal compound extract[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2022, 30(2): 198−207.]
[34] BAI Lin, XIN Yuejiao, DUAN Dingyu, et al. Advances in macrophage function and its anti-inflammatory and proresolving activity and role in periodontitis development[J]. Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi, 2017, 35(4): 427−432.
[35] 卢嘉怡, 吕翼. 巨噬细胞功能及其在疾病治疗中的应用研究[J]. 生物学教学, 2025, 50(1): 10−14. [LU Jiayi, LÜ Yi. Studies on macrophage function and its application in the treatment of diseases[J]. Biology Teaching, 2025, 50(1): 10−14.]
[36] 孙萌, 王文地, 丽妍, 等. 基于斑马鱼模型的防风多糖调节免疫作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(7): 1916−1926. [SUN Meng, WANG Wendi, LI Yan, et al. Immune regulation mechanism of Saposhnikoviae *Radix* polysaccharide based on zebrafish model[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(7): 1916−1926.]
[37] KWOK A J, ALLCOCK A, FERREIRA R C, et al. Neutrophils and emergency granulopoiesis drive immune suppression and an extreme response endotype during sepsis[J]. Nature Immunology, 2023, 24(5): 767−779.
[38] 姚娜, 李树德, 王文林. IL-6, IL-10 在实验性肺部炎症中的研究进展[J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(3): 161−163. [YAO Na, LI Shude, WANG Wenlin. Advanced on IL-6 and IL-10 in experimental pneumonia[J]. Journal of Kunming Medical University, 2014, 35(3): 161−163.]
[39] KONG Xianghui, LU Xinliang, WANG Shibo, et al. Type I interferon/STAT1 signaling regulates UBE2M-mediated antiviral innate immunity in a negative feedback manner[J]. Cell Reports, 2023, 42(1): 112002.
[40] SVAHN A J, GRAEBER M B, ELLETT F, et al. Development of ramified microglia from early macrophages in the zebrafish optic tectum[J]. Developmental Neurobiology, 2013, 73(1): 60−71.