

葫芦素 C 在黄瓜植株中的代谢分布及其稳定性研究

卿志星¹, 程 辟², 周 渊³, 刘秀斌², 曾建国^{1,2*}

1. 湖南中医药大学 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410208

2. 湖南农业大学 国家中药材生产(湖南)技术中心, 湖南 长沙 410128

3. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100086

摘要:目的 研究葫芦素 C 在黄瓜植株不同部位中的代谢分布;探讨不同的前处理方式对黄瓜叶中葫芦素 C 的影响。方法 建立葫芦素 C 的 HPLC-DAD 检测方法并测定黄瓜植株不同部位中葫芦素 C 的量;同时将鲜嫩黄瓜叶分别进行 100 °C 烘干、室温阴干 2 种不同的处理方式,检测葫芦素 C 量的变化;利用 HPLC-Q-TOF-MS 分析 100 °C 烘干、室温阴干 2 种条件下鲜嫩黄瓜叶中葫芦素 C 的转化。结果 鲜嫩黄瓜叶中葫芦素 C 的量最高,但随着叶变枯萎,葫芦素 C 的量降低;黄瓜藤中葫芦素 C 的量自上而下逐渐降低;黄瓜根、叶柄、雌花以及黄瓜中均未检测到葫芦素 C;无论是 100 °C 烘干还是室温阴干鲜嫩黄瓜叶,其葫芦素 C 的量均明显下降;在阴干的过程中,葫芦素 C 下降的原因可能是其转化成葫芦素苷,初步鉴定为 3-葡萄糖基-葫芦素 C。结论 葫芦素 C 在黄瓜植株中不能稳定存在,鲜嫩黄瓜叶是黄瓜植株获取葫芦素 C 最理想的部位。

关键词: 葫芦素 C; 黄瓜; HPLC-Q-TOF-MS; 代谢分布; 稳定性

中图分类号: R282.4 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)14-2080-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.023

Metabolic distribution and stability of cucurbitacin C in *Cucumis sativus*

QING Zhi-xing¹, CHENG Pi², ZHOU Yuan³, LIU Xiu-bin², ZENG Jian-guo^{1,2}

1. National Herbal Medicine Production Technology Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Co-Innovation Center for Utilization of Botanicals Functional Ingredients (Hunan), Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100086, China

Abstract: Objective To study the metabolic distribution of cucurbitacin C in different parts of cucumber plant and investigate the change of cucurbitacin C in the leaves of *Cucumis sativus*. with different treatments. **Methods** The content of cucurbitacin C in each part of the whole plant, as well as in the fresh leaves treated by drying at 100 °C and room temperature, was determined by an HPLC-DAD method established for the quantification of cucurbitacin C. And the transformation of cucurbitacin C was investigated by an HPLC-Q-TOF-MS method. **Results** The content of cucurbitacin C in the fresh leaves was found at the highest level, but decreased along with the leaves turned old. It also reduced gradually from the top to the base of the stems. Cucurbitacin C was not detected in the roots, leafstalks, female flowers, and fruits. The content level decreased significantly with drying at either 100 °C or room temperature. The possible reason was that cucurbitacin C transformed to cucurbitacin glycoside, tentatively identified as 3-glu-cucurbitacin C, when the fresh leaves drying in room temperature. **Conclusion** Cucurbitacin C is an unsteadiness substance in *C. sativus*. Fresh leaves are an ideal resource of obtaining this compound.

Key words: cucurbitacin C; *Cucumis sativus* L.; HPLC-Q-TOF-MS; metabolic distribution; stability

葫芦素 C (cucurbitacin C) 为葫芦烷型四环三萜类化合物,在自然界中很少被发现,目前仅在葫芦科甜瓜属植株黄瓜 *Cucumis sativus* L. 以及 *Cucumis prophetarum* L. 中被发现。葫芦素 C 是黄瓜植株中的苦味成分,同时也是评价黄瓜品质的指标之一。并

不是每一种黄瓜植株都具有苦味,只有含有葫芦素 C 的黄瓜植株才有苦味^[1-2]。葫芦素 C 具有杀灭二斑叶螨以及抑制 *Phytophthora cactorium* 生长的作用^[3-4]。葫芦素类化合物具有抗癌、抗炎等药理作用^[5],同时葫芦素 C 与葫芦素 B (cucurbitacin B) 具有

收稿日期: 2014-03-16

基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAI29B04, SQ 2010BAJY1411)

作者简介: 卿志星 (1987—), 男, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 研究方向为中药化学与分析。

*通信作者 曾建国 (1965—), 男, 教授, 博士生导师。E-mail: ginkgo@world-way.net

相似的结构,葫芦素 B 具有抗肿瘤、增强免疫力、保肝作用^[1,6]。葫芦素 B 已经被开发成为抗肝癌药物——葫芦素片。因此,葫芦素 C 具有潜在的药用价值。但是葫芦素 C 的药理作用很少被研究,原因之一就是很难获得一定量的葫芦素 C 单体化合物。所以,对黄瓜植株中葫芦素 C 代谢分布及其在植物体内稳定性研究能够为大量葫芦素 C 单体化合物的获得提供依据。

1 仪器与试药

HPLC-Q-TOF-MS(美国 Agilent 公司); Milli-Q Advantage A10 系统(美国 MILLIPORE 公司); MJ33 快速水分测定仪(瑞士 Matter Toledo); ML204/02 型精密天平 [梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司]; KQ5200DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); DHG-9246A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 乙腈(德国 Merck 公司); 甲醇(分析纯,国药集团); 葫芦素 C 对照品(质量分数为 98.4%)由国家中药材生产(湖南)技术中心提取分离得到; 黄瓜植株采自湖南省农业科学研究院黄瓜种植基地。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱条件: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 乙腈(A)-水(B)为流动相,梯度洗脱(0~18 min, 5%~29% A, 18~34 min, 29%~39% A, 34~40 min, 39%~95% A); 柱温 30 °C; 检测波长 230 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

质谱条件: ESI 离子源,采用正离子检测模式; 干燥气温度: 300 °C; 干燥气体积流量: 8 L/min; 雾化气压力: 3.8×10⁶ Pa; 鞘气温度: 350 °C; 鞘气体积流量: 12 L/min; 毛细管电压: 3 500 V; 锥孔电压: 100 V; 扫描范围 *m/z* 120~1 200; 二级裂解电压为 30 eV。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取葫芦素 C 对照品 21 mg, 置 100 mL 避光量瓶中, 加甲醇溶液溶解并定容, 得到质量浓度为 0.21 mg/mL 的对照品溶液, 待用。

2.3 供试品溶液的制备

将黄瓜植株各部位分开并用粉碎机打碎, 精密称定黄瓜植株各部位的粉碎样品约 1.0 g 于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 60 min, 放冷, 再称定质量, 用甲

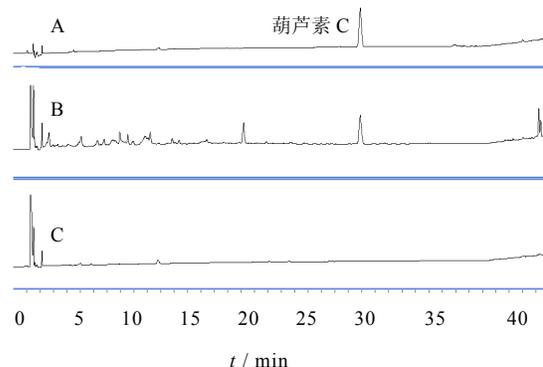


图1 葫芦素 C 对照品(A)、嫩黄瓜叶(B)和黄瓜(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of reference substance (A), fresh cucumber leaves (B), and fruits (C)

醇补足减失的质量, 摇匀, 取一定量提取液过 0.22 μm 微孔滤膜, 待用。

2.4 线性关系考察

精密量取 0.2、1、2、4、6、8、10、16 mL 的对照品溶液, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀。按照上述色谱条件, 分别进样 10 μL, 测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标(Y)、葫芦素 C 的质量浓度为横坐标(X) 绘制标准曲线, 计算得回归方程 $Y=5.4338X-0.4569$, $r=0.9999$ 。结果表明葫芦素 C 质量浓度在 0.42~33.6 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取黄瓜植株粉碎的鲜嫩叶, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并按照上述色谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 6 次峰面积的 RSD 值为 0.31%。

2.6 稳定性试验

取黄瓜植株粉碎的鲜嫩叶, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并按照上述色谱条件进行测定, 分别在 0、1、2、4、8、10、24 h 进样测定, 测得鲜嫩叶中葫芦素 C 峰面积积分值的 RSD 为 0.50%。结果表明其在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取黄瓜植株粉碎的鲜嫩叶制备供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下分别测定, 测得葫芦素 C 质量分数的 RSD 值为 0.55%。

2.8 加样回收率试验

取葫芦素 C 量已测定的黄瓜植株鲜嫩叶 6 份, 每份约 1.0 g, 精密称定于具塞 100 mL 锥形瓶中,

于每份中加入对照品溶液 3.5 mL, 再加入甲醇 46.5 mL, 称质量, 密封, 超声提取 60 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取一定量溶液过 0.22 μm 微孔滤膜, 在上述色谱条件下测定, 平均加样回收率为 94.92%, RSD 值为 0.45%。

2.9 样品测定

2.9.1 黄瓜植株不同部位中水分的测定 分别取黄瓜植株鲜嫩叶, 室温阴干 2、4、6、8 d 的叶、枯萎叶、叶柄、1/3 藤(上)、1/3 藤(中)、1/3 藤(下)、茎须、瓜、根、雌花的粉碎样品各 2 份, 每份约 2.0 g, 在梅特勒-托利多 MJ33 快速水分测定仪上测定各部位的水分。

2.9.2 黄瓜植株不同部位中葫芦素 C 量的测定 分别取同一黄瓜植株的鲜嫩叶、枯萎叶、叶柄、1/3 藤(上)、1/3 藤(中)、1/3 藤(下)、茎须、瓜、根、雌花等部位的粉碎样品各 2 份, 每份约 1.0 g, 按照“2.3”项下方法, 并按照上述色谱条件进行测定, 结合不同部位的水分数据, 分别计算不同部位黄瓜植株中葫芦素 C 的折干量, 结果表明, 新鲜叶、枯萎叶、1/3 藤(上)、1/3 藤(中)、1/3 藤(下)、茎须的折干葫芦素 C 的量分别为 795.8、145.7、320.5、89.2、55.0、103.4 $\mu\text{g/g}$; 其他部位未检出。

2.9.3 黄瓜鲜嫩叶烘干过程中葫芦素 C 量的变化 将同株黄瓜鲜嫩叶摘下, 混合均匀, 取一定量的叶粉碎, 精密称取约 1.0 g 的粉碎样品 6 份, 放于 100 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中, 分别于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、4 h 时从烘箱中取出一份。按照“2.3”项制备供试品溶液, 并按照上述色谱条件进行测定, 结合鲜嫩黄瓜叶的水分数据, 分别计算 100 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 h 后黄瓜叶中葫芦素 C 的折干量, 结果见图 2。

2.9.4 黄瓜鲜嫩叶阴干过程中葫芦素 C 的量变化 将同株黄瓜鲜嫩叶摘下, 混合均匀, 摊开放于室温下。分别于 0、2、4、6、8 d 取一定量的黄瓜叶, 打碎, 精密称取约 1.0 g。按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并按照上述色谱条件进行测定, 结合鲜嫩黄瓜叶的水分数据, 分别计算室温下阴干 0、2、4、6、8 d 后黄瓜叶中葫芦素 C 的折干量, 结果见图 3。

2.9.5 黄瓜叶阴干过程中葫芦素 C 的转化 鲜嫩黄瓜叶在室温阴干的过程中, 葫芦素 C 的量不断的下降, 造成这种现象的原因可能是葫芦素在酶或者微生物的作用下转变成其他物质。利用 HPLC-Q-TOF-MS 来分析葫芦素 C 的转化。鲜嫩黄瓜叶及不同的

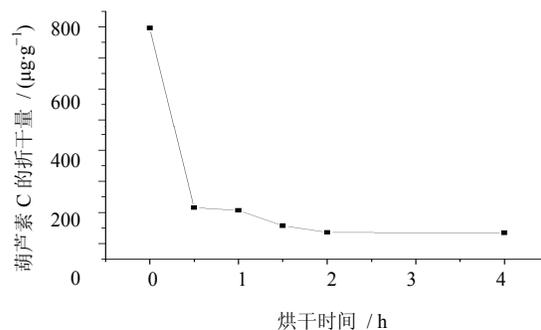


图 2 不同的烘干时间下鲜嫩黄瓜叶中葫芦素 C 的量变化

Fig. 2 Content variation of cucurbitacin C in fresh cucumber leaves dried with various hours

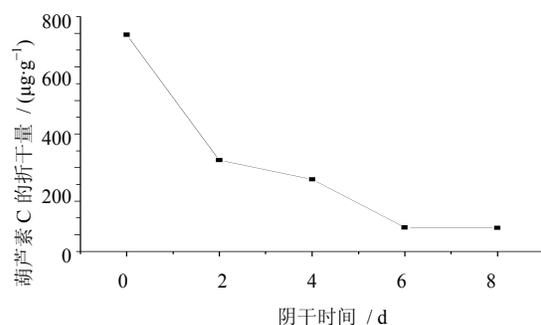


图 3 不同的阴干时间下鲜嫩黄瓜叶中葫芦素 C 的量变化

Fig. 3 Content variation of cucurbitacin C in fresh cucumber leaves dried with different days in room temperature

阴干时间数黄瓜叶的总离子流图见图 4。随着黄瓜叶阴干天数的增加, 其水分不断减少。从而使不同阴干时间相同质量黄瓜叶的总离子流图不具有可比性。所以, 为了使总离子流图的峰面积具有可比性, 将样品总离子流图的峰面积全部折算成 1.0 g 干质量黄瓜叶的峰面积进行比较。比较发现化合物 1 (图 4-E) 的峰面积不断上升, 化合物 1 的一级质谱数据分别为 723.385 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 740.418 3 $[\text{M}+\text{NH}_3]^+$, 745.374 6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 葫芦素 C 的一级质谱数据分别为 561.339 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 578.368 3 $[\text{M}+\text{NH}_3]^+$, 583.321 9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。葫芦素 C 的相对分子质量为 560, 因此可以得出化合物 1 的相对分子质量为 722, 化合物 1 的相对分子质量比葫芦素 C 多 162。化合物 1 与葫芦素 C 的碎片离子几乎一致, 说明化合物 1 是在葫芦素 C 的骨架上链接了一个葡萄糖分子。由于在二级质谱中, 糖苷键极易断裂而使化合物 1 失去一分子葡萄糖而转化成葫芦素 C, 但是利用质谱无法推断葡萄糖与葫芦素 C 糖基化的位

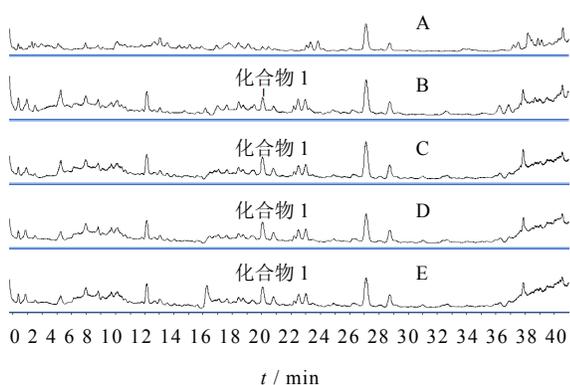


图4 阴干0(A)、2(B)、4(C)、6(D)、8(E) d 黄瓜叶的总离子流图

Fig. 4 TICs of cucumber leaves dried in room temperature for 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D), and 8 (E) d

置。根据文献报道^[1], 葫芦素 C 3 位羟基最容易糖基化, 因此将化合物 1 初步鉴定为 3-葡萄糖基-葫芦素 C。

3-葡萄糖基-葫芦素 C 很容易失去一分子葡萄糖而形成葫芦素 C 的碎片, 葫芦素 C 的碎片因 25 位存在乙酸基团, 因此容易失去一分子乙酸而形成 m/z 为 501 的碎片峰。3-葡萄糖基-葫芦素 C 分子中存在多个羟基, 在质谱裂解中很容易失去一分子或者多分子 H_2O 而形成 m/z 为 645, 483, 465, 447 的碎片峰。因 11 位存在羰基, 很容易发生麦氏重排反应, 从而失去 CH_2O 基团而形成 m/z 为 471, 453 的碎片峰。在质谱裂解的过程中, 17 位与 22 位的化学键容易断裂从而使 3-葡萄糖基-葫芦素 C 容易失去侧链而形成 m/z 为 139, 67 的碎片峰, m/z 为 139 的碎片峰发生分子内重排, 即 20 位上的甲基以及羟基上的氢重排到 22 位的羰基上从而使 20 位形成羰基, 20 位的羰基发生 α 裂解而失去一分子 CO 而形成 m/z 为 111 的碎片^[7-8]。

3 讨论

黄瓜植株中鲜嫩叶葫芦素 C 的量最高, 但是随着叶变枯萎葫芦素 C 的量下降。黄瓜叶是由黄瓜的子叶发育而来, 在子叶发育的第 6 天葫芦素 C 的量达到最大值, 而随后其量开始下降。所以黄瓜植株鲜嫩叶中葫芦素 C 的量最高, 随着叶变老其量下降。出现这种现象有 2 种可能的原因: 其一, 可能是随着黄瓜植株的生长, 葫芦素 C 由黄瓜叶中转移到其他部位储存起来; 其二, 葫芦素 C 本身不能稳定存在于黄瓜植株中, 可能在各种酶的作用下转变成为更为稳定的化合物; 将黄瓜藤按长度平均分成 3 截, 对每一截进行分析得知, 最上面 1/3 黄瓜藤中葫芦素 C 量最高, 中间的 1/3 其次, 最下面 1/3 黄瓜藤量最低。黄瓜藤

自上而下葫芦素 C 的量不断下降, 根部检测不到葫芦素 C。黄瓜叶柄, 雌花以及黄瓜中均未检测到葫芦素 C。从以上分析可知: 黄瓜植株中葫芦素 C 主要分布在鲜嫩的叶与鲜嫩的藤中。

从图 2 可以看出鲜嫩黄瓜叶在 100 °C 的烘箱中 0.5 h 后, 葫芦素 C 的量下降了 73.0%, 4 h 后下降了 83.1%。从图 3 中可以看出, 鲜嫩黄瓜叶在室温下放置 2 d 后, 葫芦素 C 的量下降了 46.9%, 放置 8 d 后, 葫芦素 C 的量下降了 72.2%。因此, 在黄瓜植株中鲜嫩黄瓜叶是获取葫芦素 C 最好的原料, 阴干或者烘干均会造成葫芦素 C 的大量损失。

无论是室温下阴干还是在 100 °C 的烘箱中烘干, 鲜嫩黄瓜叶中葫芦素 C 的量均明显下降。但是在实验中发现葫芦素 C 单体化合物在室温或者甲醇溶液中均能稳定存在, 说明因采摘而被强行终止代谢的鲜嫩黄瓜叶, 因酶或者微生物而使葫芦素 C 不能稳定存在。HPLC-Q-TOF-MS 分析结果表明, 在阴干的过程中葫芦素 C 可能转化成为葫芦素苷, 初步鉴定为 3-葡萄糖基-葫芦素 C。而烘干过程中葫芦素 C 的转化有待进一步研究。

参考文献

- [1] Chen J C, Chu M H, Nie R L, *et al.* Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities[†] [J]. *Nat Prod Rep*, 2005, 22: 386-399.
- [2] 黄哲甦, 张莉, 李海生. RP-HPLC 法测定葫芦素滴丸中葫芦素 B 的含量 [J]. *中草药*, 2003, 34(5): 421-422.
- [3] Hideki H, Hidekazu I, Katsunari I, *et al.* Cucurbitacin C—bitter principle in cucumber plants [J]. *JARQ*, 2007, 41(1): 65-68.
- [4] Rao M G, Row L R. Isolation of cucurbitacin C from *Cucumis prophetarum* Linn [J]. *Curr Sci*, 1986, 13: 361-363.
- [5] Balkema-Boomstra A G, Zijlstra S, Verstappen F W A, *et al.* Role of cucurbitacin C in resistance to spider mite (*Tetranychus urticae*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *J Chem Ecol*, 2003, 29(1): 225-235.
- [6] Bolleddula J, Navindra P S, Muraleedharan G N. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana* [J]. *Cancer Lett*, 2003, 189: 11-16.
- [7] Gianni B, Otto C, France V, *et al.* The transformation of 10 α -cucurbita-5, 24-dien-3 β -ol into cucurbitacin C by seedlings of *Cucumis sativus* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(4): 909-913.
- [8] Kupchan S M, Smith R M, Aynehchi Y, *et al.* Tumor Inhibitors. LVI. ^{la} Cucurbitacins O, P, and Q, the cytotoxic principles of *Brandegea bigeZovii*^{lb} [J]. *J Org Chem*, 1970, 35: 2891-2894.