

超高效液相色谱-串联质谱测定葫芦瓜中葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷

郑学殷^{1*}, 黄伟乾¹, 岑建斌¹, 赵一霖¹, 李瑞玲²

(1. 广州检验检测认证集团有限公司, 国家加工食品质量检验中心(广东), 广州 511447;

2. 通标标准技术服务有限公司广州分公司, 广州 510000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定葫芦瓜中葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷含量的方法。**方法** 样品以甲醇重复提取后, 旋转蒸发浓缩, 经 HLB 固相萃取柱净化。在优化后的仪器条件下, 采用电喷雾电离(electron spray ionization, ESI)负离子模式进行电离, 并通过多反应监测(multi-selected reaction monitoring, MRM)模式采集目标化合物的离子参数。**结果** 葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷在一定浓度范围内线性良好, 相关系数 r 分别为 0.9998 和 0.9995, 平均回收率范围为 80.4%~91.8%, 相对标准偏差为 3.98%~6.21%, 方法检出限(limit of detection, LOD)为 10.0 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 该方法操作简单便捷, 成本低, 回收率高, 灵敏度高, 重现性好, 适用于测定葫芦瓜中葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷的含量。

关键词: HLB 固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱; 葫芦瓜; 葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷

Determination of cucurbitacin E and cucurbitacin E-2-O-beta-D-glucoside in gourd melon by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHENG Xue-Yin^{1*}, HUANG Wei-Qian¹, CEN Jian-Bin¹, ZHAO Yi-Lin¹, LI Rui-Ling²

(1. Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Co., National Quality Testing Center for Processed Food (Guangdong), Guangzhou 511447, China; 2. SGS-CSTC Standards Technical Services Co., Ltd., Guangzhou 510000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of determination of cucurbitacin E and cucurbitacin E-2-O-beta-D-glucoside in gourd melon by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** After being extracted repeatedly by methanol, the supernatant was rotary evaporated and purified by HLB solid phase extraction column. The samples were determined by UPLC-MS/MS under the negative electrospray ionization mode of electron spray ionization (ESI) with the optimized conditions. The ion parameters were acquired by multi-selected reaction monitoring (MRM) scanning detection. **Results** The cucurbitacin E and cucurbitacin E-2-O-beta-D-glucoside showed a good linearity in a certain concentration range, with correlation coefficients of 0.9998 and 0.9995, respectively. The average recoveries ranged from 80.4% to 91.8% in the standard addition test, while the relative standard deviations (RSDs) were in the range from 3.98% to 6.21%.

*通讯作者: 郑学殷, 工程师, 主要研究方向为食品理化检测及仪器分析。E-mail: 378617191@qq.com

*Corresponding author: ZHENG Xue-Yin, Engineer, National Quality Testing Center for Processed Food, No.1-2, Zhujiang Road, Panyu District, Guangzhou 511447, China. E-mail: 378617191@qq.com

The limits of detection (LOD) of cucurbitacin E and cucurbitacin E-2-O-beta-D-glucoside were 10.0 and 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Conclusion The method is simple and convenient to operate, low in cost, high in recovery rate, high in sensitivity and good in reproducibility, which is suitable for determining the content of cucurbitacin E and cucurbitacin E-2-O-beta-D-glucoside in gourd melon.

KEY WORDS: HLB extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; gourd melon; cucurbitacin E and cucurbitacin E-2-O-beta-D-glucoside

1 引言

葫芦素是一类主要分布在葫芦科植物中的四环三萜类化合物,对细胞的免疫功能有一定的激发作用,同时对癌细胞和肝细胞的脂肪变性也有一定的抑制作用^[1-4]。由于其防癌、护肝、抗炎、抗菌及抗肿瘤等作用^[5],近年来也有大量的研究者对其临床功效进行了大量研究^[6-8],但同时,葫芦素也具有一定的毒性,若用量控制不当可能会出现食量减少,恶心等轻微胃肠道症状。目前,检测葫芦素的方法包括生物法^[9]、分光光度法^[10]、等离子共振技术^[11]、高效液相色谱法^[12-14]和液相色谱-串联质谱法^[15]。生物法需用小鼠作为实验对象,操作繁琐成本高,适用范围小。分光光度法操作简便,但由于检测波长较短,目标物易受杂质干扰。等离子共振技术则存在不适合于日常实验室批量检测的缺点。而目前应用较广的方法为高效液相色谱法,其方法具有处理简便,分离度好,检测限较低等优点。而液相色谱-串联质谱法,相比于高效液相色谱法能有更高的灵敏度,对于目标物的定性定量也更为准确,但目前的相关报道较少,且没有对具体的测定前处理条件进行详细的探究,也没有相应的方法学数据提供参考。

本研究通过优化仪器及前处理条件,建立了超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定葫芦瓜中葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷含量的方法,同时,采用了方法学实验对方法的可行性和稳定性进行了分析,以期应用于日常的批量检测,为相关的分析测试工作者提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

4000Q 高效液相色谱-质谱/质谱联用仪,配有电喷雾电离源(electron spray ionization, ESI)和 MRM 模式(上海爱博才思分析仪器贸易有限公司); TG16B 离心机(湖南凯达科学仪器有限公司); 700VDB 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); IKA MS3 漩涡混合器(德国 IKA 公司); Biotage TurboVap II 水浴氮吹仪(北京华仪通泰科技有限公司); R-1005 旋转蒸发仪(郑州紫拓仪器设备有限公司); CNW HLB 固相萃取柱(200 mg, 6 mL, 上海安谱科学仪器有限公

司); Milli-Q 超纯水装置(美国 Millipore 公司)。

葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷标准品(上海安谱科学仪器有限公司,纯度均为 $\geq 95\%$); 甲醇、甲酸、乙腈(色谱级,赛默飞世尔公司); 实验用水为经 Milli-Q 净化系统过滤的超纯水(电阻率为 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

2.2 标准溶液的配制

标准储备溶液:称取适量标准品,用甲醇溶解并配成浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。

混合标准工作溶液:分别准确移取一定体积的每种标准储备液,用甲醇重新定容,逐级稀释成 10、20、50、100、200、500、1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准工作液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。

2.3 样品前处理

提取:取 200 g 葫芦瓜均质,称取 5.00 g (精确到 0.01 g)试样置于 50 mL 具塞离心管中,加入 15 mL 甲醇,涡旋混合 5 min,超声提取 15 min。以 10000 r/min 离心 5 min,萃取液倒入干净的旋转蒸发瓶,重复提取 1 次,萃取液倒入同一个的旋转蒸发瓶。旋转蒸发溶剂近干,用 2 mL 甲醇溶解,待净化。

净化:HLB 柱子先用 8 mL 甲醇和 8 mL 水活化,取所有浓缩样液过柱,10 mL 水淋洗,最后用 10 mL 甲醇洗脱。洗脱液在 45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,1 mL 甲醇定容,过 0.22 μm 微孔滤膜后供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

2.4 仪器条件

2.4.1 色谱条件

UPLC:色谱柱:Agilent poroshell EC C_{18} (150 mm \times 3.0 mm, 2.7 μm); 流动相 A(乙腈)-B(0.1%甲酸水溶液); 流速:0.4 mL/min; 进样量:10 μL ; 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$; 梯度洗脱程序:0~10 min: 5%~90% A, 10~13 min: 90%~100% A, 13~16 min: 100% A, 16~17 min: 100%~5% A, 17~20 min: 5% A。

2.4.2 质谱条件

MS/MS:电离方式:电喷雾电离源负模式(electron spray ionization, ESI-); 气帘气:25 psi; 电离电压:-4500 V; 离子源温度:500 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气:50 psi; 加热辅助气:50 psi; 碰撞气:medium; 采集模式:多反应监测(multi-selected reaction monitoring, MRM)模式。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的确定

葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷在 ESI 源正负离子模式均有响应, 正离子模式下准分子离子为 $[M+Na]^+$, 负离子模式下准分子离子为 $[M-H]^-$ 、 $[M+FA-H]^-$ 和 $[M+Cl]^-$, 4 种准分子离子的响应比较, $[M+FA-H]^-$ 和 $[M+Cl]^-$ 响应最好, 因此选取负离子模式进行测定。实验采取二次优化的方式对质谱参数进行了优化。实验前期首先用初始流动相比例的溶液配制 $1 \mu\text{g/mL}$ 的葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷混合标准溶液, 以流动注射的方式先初步优化质谱参数, 同时通过多反应监测 MRM 模式优化碎片离子的去簇电压(*declustering potential*, DP)和碰撞电压(*collision energy*, CE)等参数条件。在初步确定 2 种物质各自的出峰时间后, 再分别以其出峰时间的流动相比例, 以混合流动相结合流动注射的方式再次优化上述质谱参数。最终选择响应强度较高的 2 个碎片离子作为定性依据, 其中响应最高的碎片作为定量依据。具体的葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷二级质谱参数见表 1。葫芦素 E 定量离子对为 m/z 591.3/591.3, 定性离子对为 m/z 601.4/409.4。母离子 m/z 591.3 为葫芦素 E 分子加合一个 Cl 得到, 母离子 m/z 601.4 为葫芦素 E 分子加合一个甲酸分子, 然后丢失一个 H-得到。由于葫芦素 E 的二级碎片很少, 推测位葫芦素 E 的二级碎片多数为中性碎片, 所以选取母离子本身组成 MRM 定量离子对。葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷定量离子对为 m/z 753.3/717.4, 母离子 m/z 753.3 为葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷分子加合一个 Cl 得到。

表 1 2 种目标化合物的二级质谱数据
Table 1 MS/MS parameters of two analytes

分析物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 DP/V	碰撞电压 CE/eV
葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷	753.3	717.4*	-66.1	-27.0
		657.3	-66.1	-31.1
葫芦素 E	591.3	591.3*	-60.0	-5.0
	601.4	409.4	-60.0	-26.2

注: “*” 表示该离子为定量离子。

3.2 提取溶剂的选择

由于葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷分子结构上含有羟基较多, 因此具有一定的极性, 所以选用甲醇和乙腈作为对比, 结果发现, 2 种溶剂对目标物的回收率差异不明显, 但考虑到, 甲醇毒性较低, 且沸点较低, 浓缩时间较短, 更适合应用于日常实际的批量检测, 所以最终选取甲醇作为提取溶剂。

3.3 提取溶液用量对回收率的影响

在实验初期, 经初步探究, 提取 2 次, 每次超声 15 min 或以上时, 回收率达到分析测定的要求, 提取 3 次时, 葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷的回收率均达到 95% 以上, 但考虑到旋转蒸发过程的耗时, 以及提取溶剂的消耗, 最终确定提取 2 次。在此条件下, 进一步探究了单次不同用量提取溶液对葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷回收率的影响。结果表明, 在提取体积为 15 mL 时, 当提取溶液用量在 10 mL 时, 提取不充分导致回收率较低, 而当用量为 15 mL 以上时, 回收率达到 80% 以上, 综合考虑, 最终选取 15 mL 为提取溶剂的最佳用量, 详细结果见图 1。

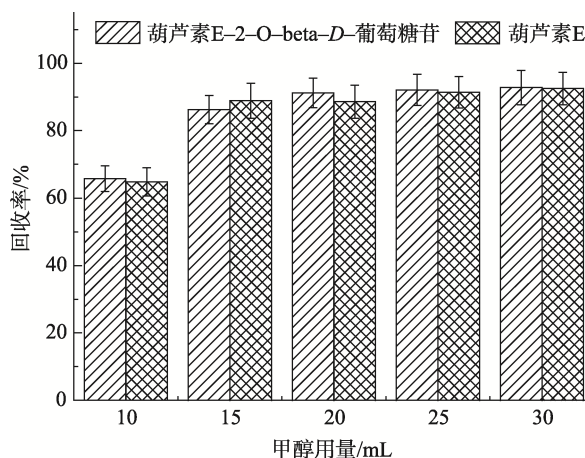


图 1 提取溶剂用量对回收率的影响($n=6$)
Fig.1 Effect of extraction solvent on recover ($n=6$)

3.4 洗脱液用量对回收率的影响

实验采用了 HLB 固相萃取柱对提取液进行净化, 因此对洗脱液甲醇用量优化。若洗脱时甲醇用量较少, 目标物未被洗脱, 会导致回收率降低, 而甲醇用量过多, 则会导致其他极性更小的杂质被洗脱, 同时也会使氮吹时间过长, 同样导致回收率降低。优化结果发现, 当甲醇用量为 5 mL 时, 由于洗脱液较少, 部分目标物洗脱不充分, 因此回收率只有 60%, 当洗脱液为 10 mL 时, 葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷的回收率符合测定要求。而随着洗脱液用量的增加, 回收率没有明显变化, 但当用量为 20 mL 时, 回收率开始下降。因此, 最终选取甲醇洗脱用量为 10 mL。

3.5 基质效应

由于提取过程简单, 因此提取液中含有较多的杂质, 通过 HLB 固相萃取柱净化后, 能有效的除杂。但样品在仪器分析的过程中仍有可能受基质效应的影响, 因此, 进一步对基质效应进行了探究。结果发现, 用空白样品配制的等浓度基质曲线, 其斜率与纯溶剂曲线斜率之比为 0.97,

在 0.90~1.10 之间, 说明葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷受基质影响不明显, 因此选用溶剂曲线进行定量分析。

3.6 线性范围、检出限和定量限

在本方法所确定的实验条件下, 用基质空白将混合标准溶液稀释至 10、20、50、100、200、500、1000 $\mu\text{g/L}$ 进行测定, 以峰面积(Y轴)对相应的浓度(X轴)作图, 结果表明, 待测化合物浓度与对应的峰面积呈现良好的线性关系。以仪器信噪比的 3 倍 $S/N=3$, 确定方法的检出限, 结果表明, 该方法灵敏度较高, 适用于日常分析测定。详细结果见表 2。

表 2 线性方程、相关系数(r)和方法检出限
Table 2 The linear equation, correlation coefficient and detection limits of the method

化合物	浓度范围/ $(\mu\text{g/L})$	线性方程	相关系数 r	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$
葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷	10~1000	$Y=4.11\times 10^6 X+5.52\times 10^4$	0.9995	2.0
葫芦素 E	20~1000	$Y=1.06\times 10^6 X+1.04\times 10^4$	0.9998	10.0

表 3 葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷的回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Recoveries and RSDs of cucurbitacin E and cucurbitacin E-2-O-beta-D-glucoside ($n=6$)

化合物	本底值/ $(\mu\text{g/kg})$	添加水平/ $(\mu\text{g/kg})$	测得值/ $(\mu\text{g/kg})$	回收率/%	RSD/%
葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷	ND	10.0	8.04	80.4	5.42
	ND	20.0	17.0	85.1	4.95
	ND	100	87.9	87.9	6.21
葫芦素 E	ND	10.0	8.67	86.7	3.98
	ND	20.0	17.8	89.0	5.66
	ND	100	91.8	91.8	5.75

3.8 实际样品测定

对市面上的葫芦瓜随机选取 30 个作为样品, 按照本方法进行测定, 其中一般葫芦瓜 15 个, 苦味葫芦瓜 15 个, 测定结果为一般葫芦瓜样品中, 2 种目标物均没有检出, 而苦味葫芦瓜检出值为 0.35~1.02 mg/kg (葫芦素 E), 0.46~1.23 mg/kg (葫芦素 E-葡萄糖苷)。实际样品的葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷提取离子流色谱图见图 2。

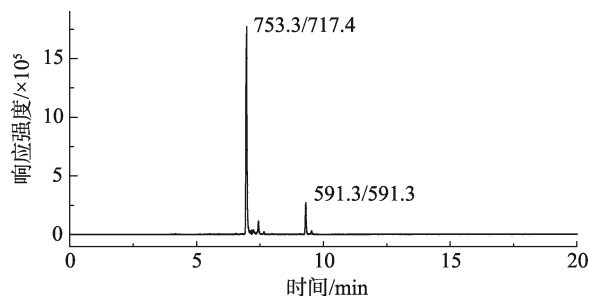


图 2 样品中葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷的 MRM 色谱图

Fig.2 MRM chromatograms of cucurbitacin E and cucurbitacin E-2-O-beta-D-glucoside in samples

3.7 精密度、回收率及重复性

按 2.3 对样品进行前处理, 选取葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷均没有检出的葫芦瓜作为加标回收试验的样品。以葫芦素 E 的方法检出限为基准, 对样品进行 1 倍、2 倍和 10 倍 3 个水平的加标。同时对每个水平日内平均测定 6 次, 葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷 3 个添加水平的平均回收率范围在 80.4%~91.8%之间, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 在 3.98%~6.21%之间。方法学结果表明, 该方法回收率及精密度能达到分析测定的要求。具体结果见表 3。

4 结论

本研究建立了同时测定葫芦瓜中葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷含量的 UPLC-MS/MS 法。以甲醇对样品进行重复超声提取, 提取过程高效快速, 旋转蒸发浓缩后, 采用 HLB 固相萃取柱进行净化, 一定程度上降低了基质效应的影响。利用流动注射方式结合多反应监测模式对葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷的不同母离子形态进行扫描, 确定了响应最高且较稳定的母离子, 并优化了质谱参数, 使方法的灵敏度达到分析测定的要求。同时, 优化的色谱条件使葫芦素 E 和葫芦素 E-2-O-beta-D-葡萄糖苷均在 9 min 内完全出峰, 且峰型良好。另外, 回收率, 相对标准偏差等方法学数据表明, 该方法适合于实际检测应用, 为葫芦素的后续相关研究提供了可参考的分析依据。

参考文献

- [1] 何佳怡, 卫旭东, 何健, 等. 葫芦素 E 对人喉癌干细胞生理活动的影响及分子机制探究[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(9): 232-234.
He JY, Wei XD, He J, et al. Investigation of effects of cucurbitacin E on physiological activities of human laryngeal cancer stem cells and its

- molecular mechanisms [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2019, 13(9): 232–234.
- [2] 黄邀, 吴惠兰, 肖铭澍. 葫芦素片对大鼠非酒精性脂肪肝病的预防作用[J]. *浙江医学*, 2019, 41(8): 739–742, 729.
Huang Y, Wu HL, Xiao MS. Preventive effects of cucurbitacin tablet on non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. *Zhejiang Med J*, 2019, 41(8): 739–742, 729.
- [3] 周毅彬, 王永昌, 高鹏, 等. 葫芦素 E 通过诱导自噬抑制人膀胱癌细胞 T24 的增殖[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(4): 562–566.
Zhou YB, Wang YC, Gao P, *et al.* Proliferation of human bladder cancer cell line T24 inhibited by *Cucurbitacin E* through autophagy induction [J]. *J Pract Med*, 2019, 35(4): 562–566.
- [4] 张延祯. 葫芦素 D 抑制胃癌细胞存活的作用及其机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
Zhang YZ. The effect and mechanism of *Cucurbitacin D* on gastric cancer cell survival [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018.
- [5] Yasuda S, Yogosawa S, Izutani Y, *et al.* Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(4): 559–565.
- [6] Agil A, Miro M, Jimenez J, *et al.* Isolation of anti-hepatotoxic principle from the juice of *Ecballium elaterium* [J]. *Planta Med*, 1999, 65(7): 673–675.
- [7] Chen JC, Chiu MH, Nie RL, *et al.* Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: Structures and biological activities [J]. *Nat Prod Rep*, 2005, 22(3): 386–399.
- [8] Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita* and reana [J]. *Cancer Lett*, 2003, 189(1): 11–16.
- [9] 蒋龙城. 用生物法检测葫芦素[J]. *黑龙江科技信息*, 2016, (17): 39–40.
Jiang LC. Determination of cucurbitacin by biological method [J]. *Heilongjiang Sci Technol Inf*, 2016, (17): 39–40.
- [10] 肖娅, 赵强. 紫外分光光度法测定葫芦素 B 固体分散体的含量[J]. *亚太传统医药*, 2018, 14(1): 25–26.
Xiao Y, Zhao Q. Determination of cucurbitacin B solid dispersion by ultraviolet spectrophotometry [J]. *Asia-Pac Trad Med*, 2018, 14(1): 25–26.
- [11] 彭水华. 基于细胞增强的表面等离子共振技术检测葫芦素 E 浓度[D]. 广州: 暨南大学, 2016.
Peng SH. Detection of cucurbitacin E concentration based on cell amplified surface plasmon resonance technology [D]. Guangzhou: Jinan University, 2016.
- [12] 张雅男, 高明洁, 祝文博, 等. HPLC-UV 法同时测定葫芦素片中葫芦素 B 和葫芦素 E 的含量[J]. *化学工程师*, 2018, 32(3): 18–20.
Zhang YN, Gao MJ, Zhu WB, *et al.* Simultaneous determination of cucurbitacin B and cucurbitacin E in cucurbitacin tablets by HPLC-UV [J]. *Chem Eng*, 2018, 32(3): 18–20.
- [13] 贾莉, 陈文, 赵辉. HPLC 法测定葫芦素胶束药物含量测定[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2013, 34(15): 2270–2271.
Jia L, Chen W, Zhao H. Determination on contents of cucurbitacin micelle by HPLC [J]. *J Qiqihar Med Coll*, 2013, 34(15): 2270–2271.
- [14] 李晓峰, 刘克非, 邓意辉. HPLC 法同时测定葫芦素原料中葫芦素 B 和葫芦素 E 的含量[J]. *沈阳药科大学学报*, 2010, 27(2): 123–125, 130.
Li XF, Liu KF, Deng YH. Determination of the contents of cucurbitacin B and curbitacin E in cucurbitacin raw material by HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2010, 27(2): 123–125, 130.
- [15] 毛艳, 贺金华, 顾政一, 等. 药西瓜中三萜类成分的 LC-MS/MS 分析研究[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(7): 1192–1196.
Mao Y, He JH, Gu ZY, *et al.* Study on triterpene compounds in *Fructus colocynthis* by LC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(7): 1192–1196.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



郑学殷, 工程师, 主要研究方向为食品理化检测及仪器分析。
E-mail: 378617191@qq.com