

# 番木瓜中异硫氰酸苄酯及其前体物质苄基硫代葡萄糖苷的含量分析\*

李泽友<sup>1,2</sup>, 沈文涛<sup>1</sup>, 言普<sup>1</sup>, 周鹏<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101; 2. 海南医学院药理学系, 海口 571101)

**摘要** 目的: 建立番木瓜中抗癌活性物质异硫氰酸苄酯及其前体物质苄基硫代葡萄糖苷的含量测定方法, 并测定它们在番木瓜各部位中的含量。方法: 苄基硫代葡萄糖苷采用 HPLC 法, 以依利特 Hypersil BDS - C<sub>18</sub> (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 用含 0.1% 三氟乙酸的乙腈 - 水梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 214 nm。异硫氰酸苄酯采用 GC 法, 色谱柱为 SPB1701 石英毛细管柱 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), 程序升温, 载气为氮气。FID 检测器温度 280 °C, 进样口温度 250 °C。结果: 苄基硫代葡萄糖苷在 0.91 ~ 36.4 μg 范围内线性关系良好 (r = 0.9992), 异硫氰酸苄酯在 0.0174 ~ 0.556 μg 范围内线性关系良好 (r = 0.9992)。除成熟果肉外, 苄基硫代葡萄糖苷在其他部位均能检测到, 且以种子中含量最高为 4.74 mg · g<sup>-1</sup>; 而异硫氰酸苄酯只在花和种子中检测到, 以种子中含量较高为 0.605 mg · g<sup>-1</sup>。结论: 所建方法可用于番木瓜中苄基硫代葡萄糖苷和异硫氰酸苄酯的含量测定。

**关键词:** 番木瓜; 异硫氰酸苄酯; 苄基硫代葡萄糖苷; 高效液相色谱法; 气相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2011)04 - 0678 - 04

## Analysis of benzyl isothiocyanate and its precursor - benzyl glucosinolate in *Carica papaya* L. \*

LI Ze - you<sup>1,2</sup>, SHEN Wen - tao<sup>1</sup>, YAN Pu<sup>1</sup>, ZHOU Peng<sup>1\*\*</sup>

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China;

2 Hainan Medical College, Haikou 571101, China)

**Abstract Objective:** To establish methods for determination of the content of anticancer active material, benzyl isothiocyanate (BITC) and its precursor - benzyl glucosinolate (BG), and to determine them in different parts of *Carica papaya*. **Methods:** HPLC was performed to detect the BG on Hypersil BDS - C<sub>18</sub> column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution of acetonitrile and water containing 0.1% trifluoroacetic acid at the flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 214 nm. The BITC was detected by GC chromatography with SPB1701 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) programmed temperature, the nitrogen as carrier gas. The FID detector temperature was 280 °C, injector temperature was 250 °C. **Results:** The BG and BITC had good linearity in the range of 0.91 - 36.4 μg (r = 0.9992), 0.0174 - 0.556 μg (r = 0.9992), respectively. BG could be detected in *Carica papaya* organ except mature pulp. The highest content was 4.74 mg · g<sup>-1</sup> in its seed. While BITC could be detected in flower and seed, higher content was 0.605 mg · g<sup>-1</sup> in seed. **Conclusion:** This methods can be applied for the determination of the content of BG and BITC in *Carica papaya*.

**Key words:** *Carica papaya* L.; benzyl isothiocyanate (BITC); benzyl glucosinolate (BG); HPLC; GC

番木瓜 (*Carica papaya* L.), 又名万寿果, 属于番木瓜科番木瓜属, 药食两用。《本草纲目拾遗》称之为“番蒜”, 《现代实用中药》和《中华本草》称之为“番木瓜”, 具有极高的营养保健和药用价值。

文献报道, 异硫氰酸酯类 (ITCs) 是十字花科植

物如西兰花中重要的次生代谢产物, 对预防多种癌症具有很好的作用<sup>[1]</sup>。番木瓜中含有学术界公认的防癌抗癌成分—异硫氰酸苄酯 (benzyl isothiocyanate, BITC)<sup>[2]</sup>。番木瓜遍布全世界热带亚热带地区, 品种众多, 海南是中国的主产区, 以日升 (sun-

\* 海南省自然科学基金资助项目 (批准号: 309042)

\*\* 通讯作者 Tel: (0898) 66890687; E - mail: zhp6301@126.com

rise) 品种为主。对日升中的 BITC 及其前体物质苜基硫代葡萄糖苷( benzyl glucosinolate ,BG) 含量进行研究 ,为进一步开发此活性成分奠定基础。

1 仪器、试药与材料

1.1 材料 所选番木瓜为日升品种 种植于中国热带农业科学院热带生物技术研究试验基地(海口) ,采集幼嫩的根、茎 ,以及同一棵树上的叶、花和成熟果实(含种子)。

1.2 仪器与试药

WATERS 515 高效液相色谱仪 ,配 2996 PAD 检测器 ,717plus 自动进样器 ,Empower 工作站; 岛津 GC-14C 气相色谱仪 ,FID 检测器 ,N2000 工作站; 乙腈为色谱纯 ,水为重蒸水 ,三氟乙酸( TFA) 、正己烷为分析纯。

BG 对照品与 BITC 对照品均购于 Sigma 公司 ,纯度均大于 98%。

2 HPLC 测定前体物质 BG

2.1 对照品溶液的制备 精密称取 BG 对照品适量 ,加水制成  $4.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液作为对照品储备液 精密吸取对照品储备液 1 mL 稀释至 5 mL(浓度  $0.91 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 作为 BG 对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备<sup>[3]</sup> 取样品约 5 g ,置于研钵 ,加水 20 mL ,用保鲜膜覆盖 ,置微波炉中加热 3 min 取出 ,研匀 ,10000 g 离心 3 min ,取上清液 ,置 25 mL 量瓶中 ,以水定容至刻度 ,过  $0.45 \mu\text{m}$  的微孔滤膜 ,即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: 依利特 Hypersil BDS -  $\text{C}_{18}$  (200 mm  $\times$  4.6 mm  $5 \mu\text{m}$ ) ; 流动相: A 为含 0.1% TFA 的水溶液 ,B 为含 0.1% TFA 的乙腈溶液 梯度洗脱(0 ~ 20 min ,A 从 100% 到 90% ,B 从 0 到 10%; 20 ~ 30 min ,A 从 90% 到 0 ,B 从 10% 到 100%; 保持到 35 min; 35 ~ 45 min ,A 从 0 到 100% ,B 从 100% 到 0; 保持到 50 min) ; 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ; 检测波长: 214 nm; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$  ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。

2.4 线性关系考察 取 BG 对照品溶液(  $0.91 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ) ,分别自动进样 1 ,3 ,5 ,10 ,20 ,40  $\mu\text{L}$  ,记录其峰面积 ,以含量( X) 对峰面积( Y) 进行回归 ,绘制 BG 的标准曲线 ,得回归方程为:

$$Y = 7.759 \times 10^5 X - 1.159 \times 10^5 \quad r = 0.9992$$

说明 BG 进样量在  $0.91 \sim 36.4 \mu\text{g}$  范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取同 1 份对照品溶液 ,连续进样 6 次 ,测定 BG 的峰面积 ,计算日内精密度。RSD(  $n = 6$  ) 为 0.75% ,表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同 1 批样品 6 份 ,精密称定 ,按“2.2”项下方法制备供试品溶液 ,进样 ,测定 BG 的峰面积 ,计算 BG 的平均含量(  $n = 6$  ) 为 0.41% ,RSD 为 1.8% ,表明重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液 ,在 0 ,4 ,8 ,12 ,24 h 进样 ,测得 BG 峰面积的 RSD 为 1.6% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 6 份 ,每份约 2.5 g ,分别精密加入 BG 对照品溶液(  $4.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ) 250  $\mu\text{L}$  ,按“2.2”项下方法制备供试溶液 ,进样。测定 BG 的量 ,计算其加样回收率。结果 BG 的平均回收率为 97.1% ,RSD 为 1.9% ,表明准确度良好。

2.9 样品测定 分别精密吸取 BG 对照品溶液和供试品溶液 各 10  $\mu\text{L}$  ,注入高效液相色谱仪 ,记录峰面积并计算 BG 含量。结果见表 1 ,色谱图见图 1。

表 1 番木瓜 6 个部位 BG 含量( % )  
Tab 1 Contents of BG in six organ in papaya

样品名 ( sample)	批次		
	1	2	3
根( roots)	2.01	1.98	2.11
茎( stems)	2.09	2.05	1.99
叶( leaves)	1.55	1.48	1.51
花( flowers)	1.49	1.52	1.39
果肉( pulps)	-	-	-
种子( seeds)	4.82	4.68	4.71

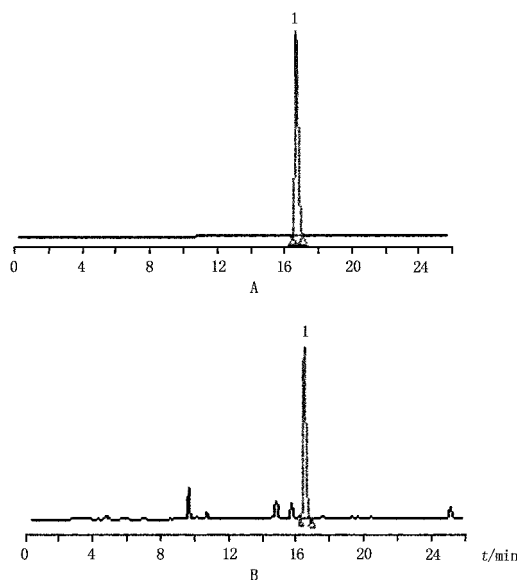


图 1 对照品( A) 和番木瓜种子( B) 的 HPLC 色谱图  
Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance( A) and papaya seed( B)  
1. BG

### 3 GC 测定酶解产物 BITC

3.1 对照品溶液的制备 精密称取 BITC 对照品适量,用正己烷制成  $0.556 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,作为对照品溶液。

3.2 供试品溶液的制备<sup>[3]</sup> 取样品约 5 g,置于研钵,加少量水研匀(根茎叶及未成熟果肉宜剪成小块便于研匀),再加水适量使淹没,室温放置 10 min,加正己烷 20 mL 研匀,5000 g 离心 5 min,分取正己烷层置 25 mL 量瓶中,用正己烷定容至刻度,即得。

3.3 色谱条件 岛津 GC-14C 气相色谱仪,氢火焰离子化(FID)检测器,色谱柱为 SPB1701(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 开口石英毛细管柱;程序升温(起始温度 100 °C,保持 5 min,然后以  $10 \text{ °C} \cdot \text{min}^{-1}$  升到 180 °C,保持 5 min,再以  $20 \text{ °C} \cdot \text{min}^{-1}$  升到 250 °C,保持 2 min);载气为氮气,检测器温度 280 °C,气化室温度 260 °C;进样量 1 μL。

3.4 线性关系考察 取 BITC 对照品溶液( $0.556 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 作为对照液 1,精密量取 500 μL 对照液 1,置 1 mL 量瓶中,正己烷稀释至刻度,作为对照液 2( $0.278 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );精密量取 500 μL 对照液 2,置 1 mL 量瓶中,正己烷稀释至刻度,作为对照液 3( $0.139 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );精密量取 500 μL 对照液 3,置 1 mL 量瓶中,正己烷稀释至刻度,作为对照液 4( $0.0695 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );精密量取 500 μL 对照液 4,置 1 mL 的量瓶中,正己烷稀释至刻度,作为对照液 5( $0.0348 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );精密量取 500 μL 对照液 5,置 1 mL 的量瓶中,正己烷稀释至刻度,作为对照液 6( $0.0174 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。取对照液 1~6 分别进样 1 μL,测定其峰面积,以含量(X)对峰面积(Y)进行回归,绘制 BITC 的标准曲线,得回归方程为:

$$Y = 2.261 \times 10^5 X - 2.749 \times 10^4 \quad r = 0.9992$$

说明 BITC 进样量在 0.0174~0.556 μg 范围内线性关系良好。

3.5 精密度试验 精密吸取同 1 份对照品溶液,连续进样 6 次,测定 BITC 的峰面积,计算日内精密度。RSD(n=6) 为 1.6%,表明精密度良好。

3.6 重复性试验 取同 1 批样品 6 份,精密称定,按“3.2”项下方法制备供试品溶液,进样,测定 BITC 的峰面积,计算 BITC 的平均含量(n=6) 为 0.63%,RSD 为 1.9%,表明重复性良好。

3.7 稳定性试验 取同 1 份供试品溶液,在 0, 8, 12, 24 h 进样,记录 BITC 峰面积,计算 RSD 为 1.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 6 份,每份约 2.5 g,分别精密加入 BITC 对照品( $0.556 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 溶液 3.0 mL,按“3.2”项下方法制备供试溶液,进样;测定 BITC 的含量,计算其加样回收率。结果 BITC 的平均回收率为 97.6%,RSD 为 1.1%,表明准确度良好。

3.9 样品测定 分别精密吸取 BITC 对照品溶液和 6 个不同部位的供试品溶液各 1 μL,注入气相色谱仪,记录峰面积并计算 BITC 含量。结果见表 2 和图 2。

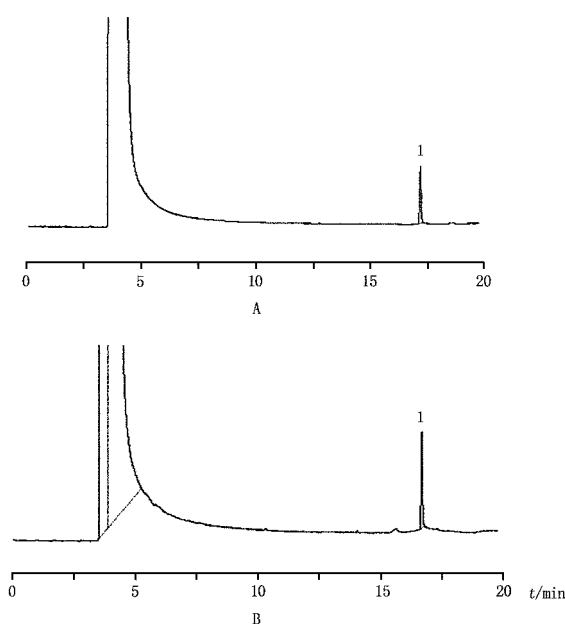


图 2 对照品(A)和番木瓜种子(B)的GC色谱图  
Fig 2 GC chromatograms of reference substance(A) and papaya seed (B)  
1. BITC

表 2 番木瓜 6 个部位 BITC 含量(%)  
Tab 2 Contents of BITC in six organ in papaya

样品名 (sample)	批次		
	1	2	3
根(roots)	-	-	-
茎(stems)	-	-	-
叶(leaves)	-	-	-
花(flowers)	0.130	0.098	0.104
果肉(pulps)	-	-	-
种子(seeds)	0.559	0.614	0.642

### 4 讨论

4.1 BG 是植物的次生代谢产物,其在植物体内和它的水解酶—芥子酶存在于不同的细胞中。当组织遭到损伤时,BG 和酶接触,便可水解产生 BITC 等物质。故在制备 BG 供试品溶液时,先在微波炉中

加热 3 min 以破坏酶的活性 然后再研碎避免 BG 水解;而在制备 BITC 供试品溶液时,先研碎放置 10 min 使 BG 充分接触到芥子酶进行水解,再加入正己烷萃取出水解产生的 BITC。

**4.2** 番木瓜各部位的测定结果表明,BG 在其他部位均存在,以种子的含量为最高,但成熟的果肉中却几乎没有。人们食用的是番木瓜果肉,种子等通常是废弃物。因此,对番木瓜种子中 BG 等活性物质进行研究开发,是变废为宝、提升番木瓜产业的一种途径。

**4.3** 番木瓜的 BG 在成熟果肉中几乎不存在的原因引起我们的关注。我们通过对不同生长时期番木瓜果肉中 BG 的含量进行研究发现,在番木瓜成熟以前果肉中存在 BG,随着生长有逐渐增加再逐渐减少的趋势。可能是成熟时某个或某几个生物合成途径相关酶活性低或失去活性。另外,根茎叶中均测到 BG,却没有测到 BITC,可能是它们中不含芥子酶或活性低。具体原因有待进一步研究。

**4.4** 文献报道,BG 的水解产物 BITC 具有很好的防癌抗癌作用,但含 ITCs 的花椰菜等在烹饪后含量也几乎检测不到<sup>[3]</sup>。故若能通过生物技术的手段,使番木瓜在成熟果肉中仍含有 BG 供人们直接食用,则能为人类防癌抗癌提供一条很好的途径。

#### 参考文献

- 1 Rossetto MR, Oliveira do Nascimento JR, Purgatto E *et al.* Benzylglucosinolate, benzylisothiocyanate, and myrosinase activity in papaya fruit during development and ripening. *J Agric Food Chem* 2008, 56 (20): 9592
- 2 McNaughton SA, Marks GC. Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *Br J Nutr* 2003, 90 (3): 687
- 3 Nakamura Y, Yoshimoto M, Murata Y *et al.* Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(11): 4407

(本文于 2010 年 2 月 25 日收到)

---

## 《药物分析杂志》编辑部电话变更通知

尊敬的作者/读者:

您好!

因《药物分析杂志》编辑部业务发展需要,本编辑部将联络电话和传真进行了调整,编辑部电话总机为 010-67058427/010-67012819。如您需要与负责稿件的编辑联系,请拨分机号:

办公室拨 1,栗晓黎副主任拨 2,于宝珠拨 3,陈唯真拨 5,赵慧芳拨 6,陈立亚拨 7,刘小帅拨 8。

广告业务拨 3; 传真拨 4

如需咨询缴费等财务事宜,请拨 8 咨询刘小帅。

查询稿件进度请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 自行查询。

特此通告,感谢您对我们工作一如既往的支持。

《药物分析杂志》编辑部