

高效液相色谱法测定转基因番茄果实中的白藜芦醇

王明月, 吕岱竹, 尹桂豪, 贺利民

(中国热带农业科学院分析测试中心, 海南 儋州 571737)

摘要 采用高效液相色谱梯度洗脱法测定转基因番茄果实中白藜芦醇的含量。使用 μ -Bondapak C18 柱, 以甲醇-水为流动相, 采用紫外检测器在 306 nm 处对样品中的白藜芦醇进行测定, 外标法进行定性定量分析。测定结果表明, 白藜芦醇在 1~50 mg/L 时其峰面积与相应的质量浓度有良好的线性关系, 其线性相关系数为 0.999 8。2 个样品测定 ($n=6$) 的相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.51% 和 2.38%。平均回收率为 98.5%。最小检测量为 0.01 mg/kg。测定结果显示, 该方法灵敏可靠, 具有简便、重现性好的特点。

关键词 高效液相色谱法; 白藜芦醇; 转基因番茄

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2003)03-0258-02

Determination of Resveratrol in the Transgenic Tomatoes by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

WANG Mingyue, LÜ Daizhu, YIN Guihao, HE Limin

(Analysis and Test Center of Chinese Academy of Tropic Agriculture Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: A method with gradient elution for the separation and determination of resveratrol in transgenic tomatoes by reversed-phase high performance liquid chromatography was developed. A μ -Bondapak C18 column (300 mm \times 3.9 mm i. d., 5 μ m) was used with 0.6 mL/min methanol-water as mobile phase. Detection was performed with UV detector at 306 nm. The quantitative analysis and qualitative analysis were carried out with external standard. Good linearity of the calibration curve between the peak area and the mass concentration of resveratrol was obtained in the range from 1 to 50 mg/L ($r=0.9998$). The relative standard deviations of two samples were 1.51% and 2.38% ($n=6$), respectively. The average recovery rate of resveratrol was 98.5% and the detectable limit was 0.01 mg/kg. The results show that this method is simple, sensitive, accurate and reproducible.

Key words: high performance liquid chromatography; resveratrol; transgenic tomato

白藜芦醇 (resveratrol) 是一种活性物质, 在葡萄科、百合科、豆科等植物中存在。白藜芦醇具有抗菌、抗炎、抗癌、抗血栓、抗高血脂症、抗脂质过氧化等多方面的活性, 对癌变过程中细胞和组织变异起抑制作用^[1]。中国热带农业科学院生物工程国家重点实验室的谭林等人已成功地将合成白藜芦醇的芪合酶基因导入番茄植株中。由于白藜芦醇具有重要的生理活性, 因此合理食用富含白藜芦醇的食品有益于人类的健康。对于白藜芦醇的检测国内少见报道。而国外对样品中的白藜芦醇的分析主要采用液相色谱法, 以乙腈为流动相, 等度洗脱^[2-5], 分离时间长, 试剂用量大且价格昂贵。我们采用甲醇为提取溶剂, 以无水硫酸钠去除水分, 缩短了前处理时间。以甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 在 7 min 左右即将白藜芦醇分离出来。方法简便、灵敏、准确

度高。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, 配 490E 紫外检测器、510 泵、717⁺ 自动进样器、WDL-95 色谱工作站, KD 浓缩器。

甲醇、石油醚、无水硫酸钠及乙酸乙酯均为分析纯试剂 (广州化学试剂厂产品), 高效液相色谱中使用的甲醇 (上海生化化工助剂厂产品) 为色谱纯, 水为超纯水, 反式白藜芦醇 (Sigma 公司) 为对照品。转基因番茄样品由中国热带农业科学院生物工程国家重点实验室提供。

1.2 色谱条件

色谱柱: μ -Bondapak C18 柱 (300 mm \times 3.9 mm

i.d.)。流动相 A:甲醇-水(体积比为 10:90);流动相 B:甲醇-水(体积比为 90:10),用前经 Millipore 溶剂过滤系统(0.45 μm 滤膜)过滤。9 min 内流动相 A 从 100% 变化到 44%,流动相 B 从 0% 变化到 56%。流速:0.6 mL/min;检测波长:306 nm;灵敏度 0.5 AUFS;柱温:室温;进样量:10 μL 。

1.3 标准溶液的配制

准确称取白藜芦醇对照品 0.050 0 g 置于 50 mL 容量瓶中,用 50%(体积分数)甲醇溶解并定容至刻度,该储备液的质量浓度为 1.000 0 g/L。再逐级稀释储备液后配成质量浓度为 1,3,5,10,30,50 mg/L 的白藜芦醇标准工作溶液系列。

1.4 样品处理

称取转基因番茄果匀浆 10 g 左右,用 50 mL 甲

醇浸提(在超声波浴中)10 min,在漏斗中加入无水硫酸钠过滤,滤液用 20 mL 石油醚分 2 次洗涤去除脂类,用 KD 浓缩器在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下浓缩至干。往残渣中加入 20 mL 乙酸乙酯和 20 mL 水(白藜芦醇将存在于乙酸乙酯相中),萃取分层后将乙酸乙酯层减压浓缩至干,再将残渣溶于 2 mL 甲醇-水(体积比为 50:50)溶液,经 0.45 μm 滤膜过滤,待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱峰的鉴定

白藜芦醇对照品和转基因番茄样品的色谱分析结果见图 1,根据对照品洗脱峰的保留时间确定番茄样品中的白藜芦醇峰。

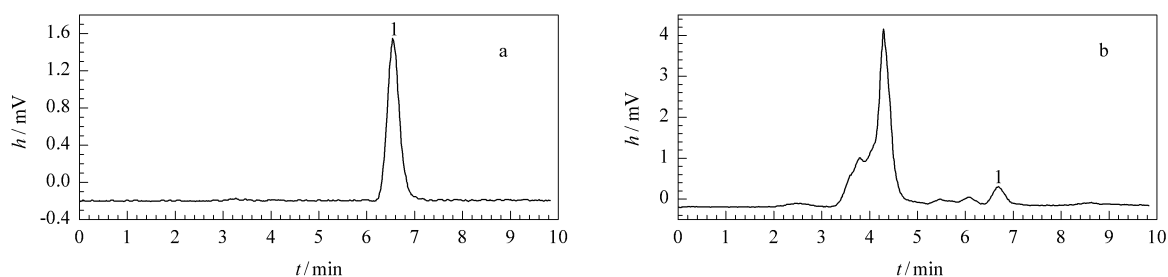


图 1 白藜芦醇对照品(a)和转基因番茄样品(b)的色谱图

Fig.1 Chromatograms of resveratrol in a standard solution (a) and in a tomato sample (b)

Column: μ -Bondapak C18 column (300 mm \times 3.9 mm i.d., 5 μm); mobile phase: A (methanol-water, 10/90, v/v) and B (methanol-water, 90/10, v/v); gradient: 0% B to 56% B in 9 min; flow rate: 0.6 mL/min; detection: UV at 306 nm; injection: 10 μL .

Peak: 1. resveratrol.

2.2 线性试验

取一系列不同质量浓度的白藜芦醇标准工作溶液,按上述色谱条件每种质量浓度进样 10 μL 。以峰面积 Y 对标准工作溶液的质量浓度 X (mg/L) 进行线性回归分析,得回归方程 $Y = 2.693 \times 10^4 X + 68210.312$,相关系数 $r = 0.9998$ ($n = 5$),在 1~50 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好。最小检测量为 0.01 mg/kg。

2.3 回收率试验

分别称取同一样品约 10 g,精密加入所述白藜芦醇储备液 10.00,15.00,20.00 μL ,按“1.4”节所述方法操作后进行回收率测定,结果见表 1。

表 1 回收率试验 ($n = 6$)

Table 1 Results of recovery ($n = 6$)

Added/ μg	Found/ μg	Recovery/%	Average recovery/%
10.00	10.50	105.0	
15.00	14.35	95.67	98.5
20.00	18.97	94.83	

2.4 样品分析结果

在“1.2”节所述色谱条件下,准确吸取“1.4”节

中已制备好的样品溶液 10 μL ,注入高效液相色谱仪中,用外标法定量,样品的测定结果及方法的精密度见表 2。

表 2 精密度试验结果 ($n = 6$)

Table 2 Precision of determination ($n = 6$)

Sample No.	Mean \pm SD/(mg/kg)	RSD/%
02-148	1.92 \pm 0.029	1.51
02-149	1.12 \pm 0.027	2.38

参考文献:

- [1] Zhang Kangjian, Dong Juane. Medicinal Secondary Metabolism. Xi'an: Northwest University Press, 2001. 82
张康健,董娟娥. 药用次生代谢. 西安:西北大学出版社, 2001. 82
- [2] Ribeiro de Lima M T, Waffo-Teguo P, Teissedre P L, Pujolas A. J Agric Food Chem, 1999, 47(7): 2666
- [3] Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte L S. J Chromatogr A, 1996, 730(1+2): 47
- [4] Romero-Perez A I, Ibern-Gomez M, Lamuela-Raventos R M, de la Torre-Boronat M C. J Agric Food Chem, 1999, 47(4): 1533
- [5] Palomino O, Gomez-Serranillos M P, Slowing K, Carretero E, Villar A. J Chromatogr A, 2000, 870(1+2): 449