

HPLC 法测定花生根茎叶中白藜芦醇的含量

吴向阳¹, 王彩霞², 笪祖林¹, 仰榴青^{3,*}, 张蓉仙¹, 仰玲玲², 周叶³

(1. 江苏大学化学化工学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 目的: 测定花生根茎叶中白藜芦醇的含量。方法: 建立花生根、茎、叶一步硅胶柱预处理、HPLC 法测定其中白藜芦醇含量的方法。色谱柱为 Hypersil ODS-2(4.6mm × 250mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(45:55, V/V), 流速为 0.8ml/min, 柱温为 35℃, 紫外检测波长为 306nm。线性范围: 0.228~1.14 μg(其相关系数 $R=0.9999$), 检测限 4.3ng(3σ)。结果: 测得山东、江苏和河北产花生根茎叶混合物中白藜芦醇的含量分别为 903.69、116.21、88.69 μg/g; 山东产花生不同部位花生根、茎和叶中白藜芦醇的含量分别为 223.08、1211.19、429.79 μg/g; 平均回收率为 99.6%, RSD 为 3.09% ($n=5$)。结论: 该方法简便、快速、准确。

关键词: 白藜芦醇; 花生根茎叶; 硅胶柱色谱; 预处理; 高效液相色谱法(HPLC)

HPLC Determination of Resveratrol in Roots, Stems and Leaves of Peanut

WU Xiang-yang¹, WANG Cai-xia², DA Zu-lin¹, YANG Liu-qing^{3,*}, ZHANG Rong-xian¹, YANG Ling-ling², ZHOU Ye³

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

3. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Objective: To determine the contents of resveratrol in roots, stems and leaves of peanut. Methods: A HPLC determination combined with one-step pretreatment by silica gel column chromatography was established. The analysis was achieved by separation on an Hypersil ODS-2 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 35 °C using a methanol-water (45:55, V/V) mobile phase at a flow rate of 0.8 ml/min followed by UV detection at 306 nm. Results: The contents of resveratrol in the mixtures of roots, stems and leaves of peanuts from Shandong, Jiangsu and Hebei provinces were 903.69, 116.21 and 88.69 μg/g, respectively. The contents of resveratrol in roots, stems and leaves of peanut from Shandong province were 223.08, 1211.19 and 429.79 μg/g, respectively. The calibration curve was well linear over the concentration range from 0.228 to 1.14 μg ($R = 0.9999$), and the limit of detection was 4.3 ng (3 σ). The average recovery was 99.6% with a RSD of 3.09% ($n = 5$). Conclusions: This method is simple, fast and accurate.

Key words: resveratrol; roots, stems and leaves of peanut; silica gel column chromatography; pretreatment; HPLC
中图分类号: R151.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2009)16-0240-03

白藜芦醇(resveratrol)即 3,4',5'-三羟基二苯乙烯, 广泛存在于多种植物中, 如葡萄科、豆科、百合科、蓼科等, 它是植物体内用于抵抗病原感染的多酚物质, 具有多种生物活性^[1-7], 已成为食品、医药和化学等领域研究的热点之一。关于花生不同部位中白藜芦醇的含量测定已有文献报道^[8-9], 但都是提取后未经预处理直接进行 HPLC 测定的。因花生根、茎、叶提取物中杂质多, 尤其是脂溶性杂质对色谱柱污染大, 严重影响色谱柱的

使用寿命, 因此, 研究花生根、茎、叶提取物预处理方法很有必要。本研究以花生根、茎、叶为原料, 旨在建立一种花生根、茎、叶提取物简便的预处理方法, 准确、快速测定其中白藜芦醇的含量, 为花生副产品中白藜芦醇的测定提供方法参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2008-10-10

基金项目: 镇江市农业科技计划项目(NY2008044)

作者简介: 吴向阳(1965—), 男, 教授, 博士, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: wuxy@ujs.edu.cn

* 通讯作者: 仰榴青(1965—), 女, 教授, 博士, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: yangliuqing@ujs.edu.cn

花生根茎叶混合物,产地分别为山东、江苏和河北;花生根、茎、叶,产地为山东。所有原料洗净,晾干,50℃烘24h,粉碎,过40目筛,贮于干燥器中备用。

白藜芦醇标准品(批号200502) 中国药品生物制品检定所;柱层析用硅胶(200~300目) 青岛海洋化工厂分厂;GF254薄层层析硅胶 青岛海洋化工有限公司;甲醇为色谱纯;氯仿、丙酮、乙醇均为分析纯。

标准溶液:准确称取白藜芦醇标准品,用甲醇溶解、定容至25ml,分别从中吸取0.5、1、1.5、2和2.5ml于10ml容量瓶中,用50%甲醇定容,0.45μm滤膜过滤,得白藜芦醇标准溶液。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱、UV2450紫外可见分光光度计 日本岛津公司;R-200旋转蒸发器 瑞士Büchi公司;电子天平 北京赛利多斯仪器系统有限公司;HH-S型水浴锅 巩义市英峪予华仪器厂。

1.3 样品预处理

1.3.1 白藜芦醇的定性鉴定

白藜芦醇在波长365nm处显蓝紫色荧光。用薄层色谱法(TLC)检测,展开剂为氯仿-丙酮-乙醇-水(4:4:0.5:0.2, V/V),根据 R_f 值定性鉴定白藜芦醇(白藜芦醇标准品的 R_f 值为0.638),从而有效的控制预处理过程。

1.3.2 预处理样品

分别精密称取适量花生根茎叶混合物原料及花生根、茎、叶原料,以60%乙醇作为提取溶剂、液料比为25:1、提取温度为50℃、提取时间为1h、提取数次,至TLC检测不到白藜芦醇为止。分别将提取液浓缩至干,用氯仿-丙酮-乙醇-水(4:4:0.5:0.2, V/V)的溶剂溶解,置于10ml容量瓶中,定容得花生提取样品。准确吸取0.5ml的样品,加样于硅胶柱上(硅胶8.5g,硅胶柱为10mm×250mm的玻璃柱,湿法装柱)。用约35ml氯仿-丙酮-乙醇-水(4:4:0.5:0.2, V/V)洗脱,TLC法跟踪鉴定,收集白藜芦醇组分,浓缩至干。用50%甲醇溶解,于10ml容量瓶中定容,0.45μm滤膜过滤得预处理样品。

1.4 色谱分析条件

色谱柱: Hypersil ODS-2(4.6mm×250mm, 5μm);流动相-甲醇-水(45:55, V/V);流速:0.8ml/min;柱温:35℃;检测波长:306nm;色谱数据处理系统岛津Class-VP。

1.5 测定方法

在确定好的色谱条件下取一定量配制好的标准溶液进行测定,得到标准品的色谱图及回归曲线方程。对预处理样品进行HPLC分析,进样量为10μl,平行测定3次,求其峰面积的平均值,根据外标曲线计算样品

中白藜芦醇的含量。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

以甲醇作为空白,在220~400nm范围内,利用分光光度计对白藜芦醇标准品的甲醇溶液进行扫描,确定白藜芦醇的最大吸收波长为306nm(图1)。

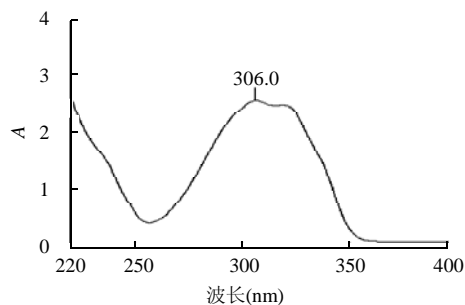


图1 白藜芦醇标准品紫外吸收光谱图

Fig.1 Ultraviolet (UV) spectrum of standard resveratrol

2.2 外标曲线的测定

分别精密吸取各白藜芦醇对照品溶液20μl进样,按1.4节色谱条件测定色谱峰面积(白藜芦醇标准品的HPLC图(图2a)),以对照品进样量(μg) X 对峰面积积分值 Y 进行线性回归。结果表明,白藜芦醇进样量在0.228~1.14μg范围内线性关系良好,其线性方程为 $Y=9 \times 10^6 X - 340693$, $R=0.9999$ 。按三倍基线噪音计算得检测限为4.3ng。

2.3 精密度实验

取某一浓度的标准品溶液连续进样5次,每次20μl,测定峰面积,其RSD值为0.55%($n=5$)。

2.4 重现性实验

分别对花生根、茎、叶样品按1.3.2节步骤重复,各样品分别平行处理5份。测定峰面积,花生根、茎、叶RSD分别为3.24%、4.95%、2.65%($n=5$)。本实验方法的精密度高、重现性好。因此,本方法用于测定花生根茎叶中白藜芦醇的含量,简单、快速、可靠。

2.5 稳定性实验

精密吸取同一花生根样品溶液,于0、1、2、3、4、5、6、7、16、24h分别进样测定峰面积,其RSD为0.6%($n=10$),可见样品在24h内稳定。

2.6 回收率实验

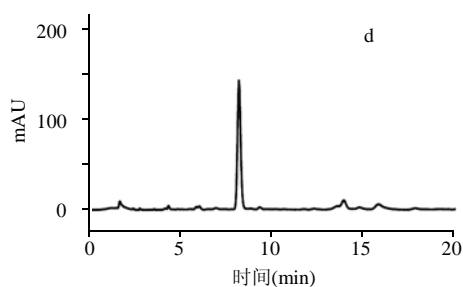
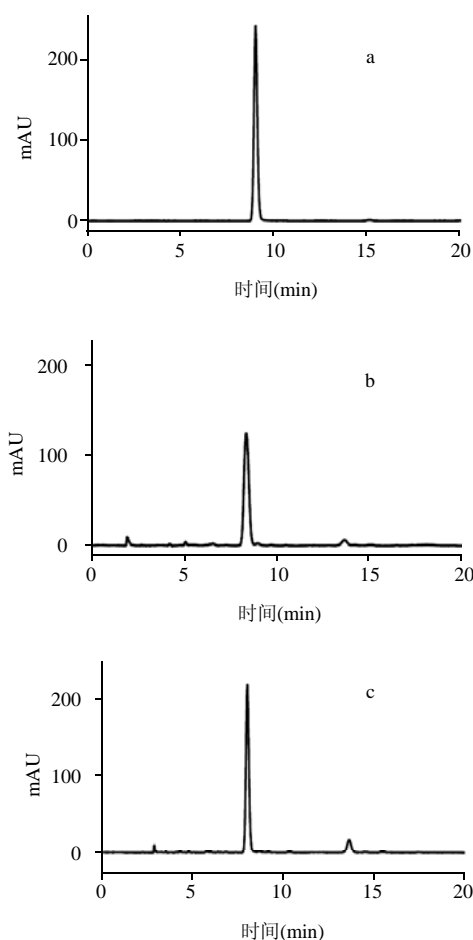
加一定量已知含量的样品(自制)于花生叶样品中进行提取,余下步骤同1.3.2节。平行处理5个样品。按确定的色谱条件进行分析,每个样品平行测定3次,测定峰面积,计算其平均值,根据外标曲线计算加样回收率,结果见表1。由表1可知,本法测定的白藜芦醇的平均回收率为99.6%,其RSD为3.09%($n=5$)。

表1 白藜芦醇加样回收率的测定
Table 1 Recoveries for resveratrol spiked at 0.099 mg

实验号	加入量(mg)	测定值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%, n=5)
1	0.099	0.095	95.96		
2	0.099	0.099	100.00		
3	0.099	0.101	102.02	99.6	3.09
4	0.099	0.102	103.03		
5	0.099	0.096	96.97		

2.7 花生根茎叶中白藜芦醇的含量测定

花生根、茎、叶提取物预处理样品的 HPLC 图谱 (分别见图 2b、2c、2d), 可见经过一步硅胶柱预处理, HPLC 色谱图中除了白藜芦醇峰外, 杂质峰很少, 预处理净化效果好。根据 1.5 节测定方法平行测定 3 次, 测定结果为山东、江苏和河北产的花生根茎叶混合样品中白藜芦醇的含量分别为 903.69、116.21、88.69 $\mu\text{g/g}$, 以山东产含量为最高。对山东产花生不同部位花生根、茎、叶中白藜芦醇的含量测定表明: 茎中含量最高为 1211.19 $\mu\text{g/g}$, 其次为叶 429.79 $\mu\text{g/g}$, 根中含量最低为 223.08 $\mu\text{g/g}$ 。



a. 白藜芦醇标准品; b. 花生根预处理样品;
c. 花生茎预处理样品; d. 花生叶预处理样品。

图2 白藜芦醇标准品和花生不同部位样品高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms: a. standard resveratrol; b. resveratrol from peanut roots; c. resveratrol from peanut stems; and d. resveratrol from peanut leaves

3 结论

本实验建立了花生根、茎、叶提取物一步硅胶柱预处理、HPLC 法测定其中白藜芦醇含量的方法。测得山东、江苏和河北产的花生根茎叶混合物中白藜芦醇的含量分别为 903.69、116.21、88.69 $\mu\text{g/g}$, 以山东产含量为最高。山东产花生不同部位花生根、茎、叶中白藜芦醇的含量分别为 223.08、1211.19、429.79 $\mu\text{g/g}$, 以茎中含量为最高。该方法简便、快速、准确。

参考文献:

- [1] JANG M, CAI L, UDEANI G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275(5297): 218-220.
- [2] GEHM B D, MCANDREWAS J M, CHIEN P Y, et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wines, is agonist for the estrogen receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(25): 14138-14143.
- [3] AHAMD N, ADHAMI V M, AFAQ F, et al. Mukhtar H. Resveratrol cause WAF-1/p21-mediated G (1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(5): 1466-1473.
- [4] HOLIAN O, WALTER R J. Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes *in vitro*[J]. J Cell Biochem, 2001, 81(S36): 55-62.
- [5] CADENAS S, BARJA G. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃[J]. Free Rasic Biol Med, 1999, 26(11/12): 1531-1537.
- [6] SGAMBATO A, ARDITO R, FARAGLIA B, et al. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage[J]. Mutat Res, 2001, 496(1/2): 171-180.
- [7] BURKITT M J, DUNCAN J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action[J]. Arch Biochem Biophy, 2000, 381(2): 253-263.
- [8] 张恒, 胡君萍, 韩玫, 等. HPLC 法测定花生不同部位中白藜芦醇的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(5): 440-441.
- [9] 黄纪念, 尚遂存, 方杰, 等. 花生中白藜芦醇研究开发现状与趋势[J]. 中国食物与营养, 2006(2): 19-23.