

水稻类胡萝卜素含量的抽提与测定

都浩, 刘菊红, 熊立仲*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 都浩, 刘菊红, 熊立仲. (2018). 水稻类胡萝卜素含量的抽提与测定. *Bio-101* e1010152. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010152.

实验原理: 根据相似相容原理溶解抽提类胡萝卜素, 再用高效液相色谱法分离检测, 高效液相色谱是色谱法的一个重要部分, 以液体为流动相, 采用高压输液系统, 将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱, 在柱内各成分被分离后, 进入检测器进行检测, 从而实现了对试样的分离和分析。

实验目的: 可以检测水稻愈伤组织、叶片、种子等组织中类胡萝卜素含量, 包括 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素、紫黄质的含量。

关键词: 水稻, 类胡萝卜素, 高效液相色谱

材料与试剂

1. 50 ml 离心管, 10 ml 离心管
2. 各种型号的枪头
3. 1 ml 注射器 (上海治宇医疗器械有限公司)
4. 0.22 μ m 滤膜 (津腾尼龙 66)
5. 水稻组织样品
6. 液氮 (湖北省畜牧局制氧厂)
7. BHT (3,5-二叔丁基-4-羟基甲苯) (Sigma, USA, CAS: 128-37-0, HPLC)
注: 做为抗氧化剂保护类胡萝卜素成分也可作为内参做定量分析, 此试剂也可用维生素E代替。
8. MTBE (甲基叔丁基醚) (Sigma, USA, CAS: 1634-04-4, HPLC)
注: 做为类胡萝卜素溶解液。
9. TEA (三乙胺) (国药试剂, 分析纯)

10. 乙腈 (Fisher, USA, CAS: 75-05-8, HPLC)
11. 甲醇 (Fisher, USA, CAS: 67-56-1, HPLC)
12. 正己烷 (国药试剂, 分析纯)
13. 丙酮 (国药试剂, 分析纯)
14. 无水乙醇 (国药试剂, 分析纯)
15. α -胡萝卜素 (Sigma St Louis, MO, USA)
16. β -胡萝卜素 (Sigma St Louis, MO, USA)
17. 叶黄素 (Sigma St Louis, MO, USA)
18. 紫黄质 (Sigma St Louis, MO, USA)
19. 抽提 Buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 超低温冰箱
2. 天平
3. 低温干燥仪 (Heto Lyolab 3000, Denmark)
4. 超声波仪 (昆山市超声波仪器有限公司)
5. 真空旋转仪 (Eppendorf concentrator 5301, USA)
6. 离心机 (Backman, USA)
7. 液相色谱仪 (Agilent 1100 series, USA)
8. 玻璃上样瓶及塑料内插管 (Agilent, USA)
9. 液相色谱柱: reverse-phase YMC 5- μ m C30 column (250 x 4.6 mm)

实验步骤

1. 目的水稻组织取样后置于液氮中, 带回实验室后可长期存于超低温冰箱或直接用于下面实验。
2. 液氮研磨水稻组织至粉末状后置于 50 ml 离心管, 可存放或直接用于下面实验。
3. 置于低温干燥仪中低温(-20 °C 至-50 °C)干燥约 24 h 至粉末干燥, 确保粉末不是在冻融状态。
4. 每个编号的干燥粉末分成三份为三个技术重复, 每份精确称取干样 0.1 g 置于 10 ml

离心管 A 中，每管加入 4 ml 抽提 Buffer，超声波震荡抽提 20 min，5,000 x g 低温 4 °C 离心 15 min，吸取上清至新 10 ml 离心管 B 中，再加入 4 ml 抽提 Buffer 至管 A 中，再次超声波震荡抽提 20 min，5,000 x g 低温 4 °C 离心 15 min，吸取上清至新 10 ml 离心管 B 中合并。

5. 10 ml 离心管 B 移至真空旋转干燥仪中，直至液体剩余 0.5-1.5 ml 时，将其转移至 1.5 ml 新离心管中。继续真空旋转干燥至干燥。
6. 向 1.5 ml 离心管 B 中加入 150-200 μ l MTBE 溶解色素。12,000 x g 低温 4 °C 离心 30 min，将上清全部过滤(0.22 μ m)入上样瓶中，液相色谱仪检测。
7. HPLC 色谱条件：

流动相 A: 乙腈: 甲醇= 3:1 (含 0.01% BHT, 0.05% TEA)

流动相 B: MTBE (含 0.01% BHT)

流速: 1 ml/min

梯度洗脱: 0 min	A-B (95:5)
0-10 min	A-B (95:5)
10-19 min	A-B (86:14)
19-29 min	A-B (75:25)
29-54 min	A-B (50:50)
54-66 min	A-B (26:74)
67 min	A-B (95:5)

结果与分析

根据内参的加入量及内参色谱结果的峰面积按比例计算出类胡萝卜素浓度，再根据算出的类胡萝卜素浓度值计算出水稻样品中的类胡萝卜素浓度 (图 1)。

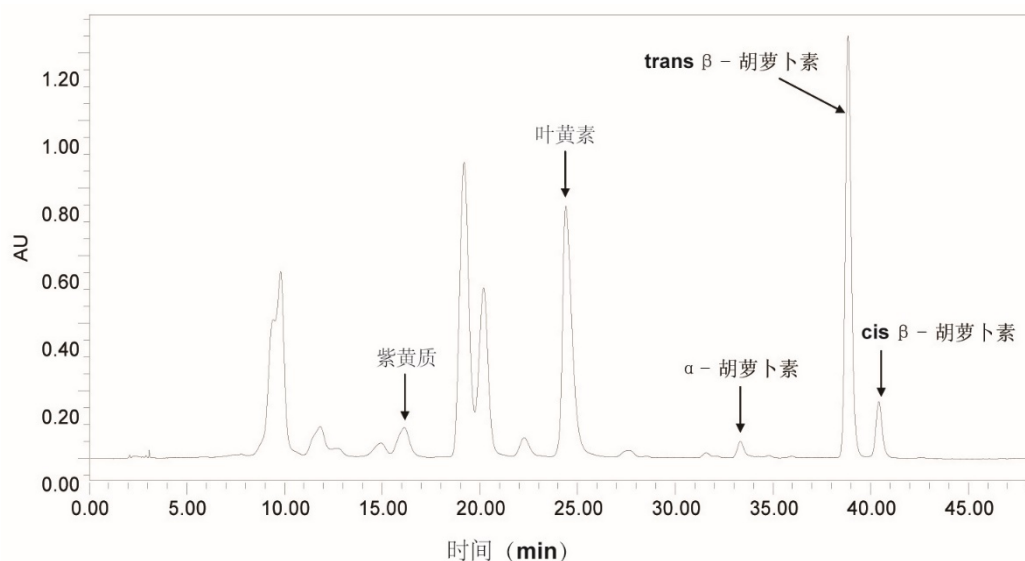


图 1. 色谱结果示意图

注意事项

1. 色谱级 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素、紫黄质等标准品购于 Sigma (St Louis, MO, USA)。标准品的目的是标识出目的物质的出峰位置，同一台仪器相同的条件下标样调试一次即可，以后可根据出峰时间估计出目的物质，有时出峰时间会出现飘移但偏差不会太大，此时可采用手动积分计算峰面积。
2. 以上有机试剂均是易燃、易爆、对皮肤和黏膜有刺激性，应在通风橱操作，避免火源。

溶液配方

1. 抽提 Buffer

正己烷:丙酮:无水乙醇=2:1:1 (含质量 0.01% BHT) (体积比)