

# 大豆种粒中总多酚含量的分析方法<sup>\*</sup>

滕 冰 吴宗璞

(东北农业大学 哈尔滨 150030)

## 摘 要

本文报导了一个新的大豆种粒中“总多酚”的分析方法,采用固兰 B 试剂与以类黄酮化合物为代表的多酚类发生重氮化反应而显红色,在 508nm 进行色测定。该方法具有简单、快速、灵敏的特点,可用于抗病生理研究。

**关键词** 大豆;总多酚;类黄酮;固兰 B 盐

## 前 言

多酚类物质包括简单的酚类衍生物和类黄酮化合物。这些化合物对于植物的生理学和病理学、次级代谢物质的研究都有重要意义。我们在大豆种粒斑驳发生机理研究中针对大豆感染 SMV 后类黄酮化合物异常积累的现象通过对大豆种粒中以类黄酮化合物为代表的总多酚进行分析,取得了良好的效果。

由于大豆种粒样品(种皮和子叶)的特殊性,即样品量少,蛋白质含量高,而多酚类物质含量相对较低,因而要求分析方法有较高灵敏度,并且对种粒中所含有的类黄酮化合物及简单酚类都要有正反应,样品量过少给样品制备和纯化过程带来不便并给分析结果带来影响。多酚类化合物的稳定性差,类黄酮化合物的溶解性质都需要分析方法有良好的适用性。从灵敏度的角度考虑我们采用了重氮化比色法,常用的对氨基苯甲酸重氮化比色法和对氨基苯磺酸重氮化比色法存在两个主要的问题:一是使用强碱性试剂使样品不稳定而且对甲醇、乙醇、丙酮等提取用溶剂有正反应;二是样品提取后不能直接进行测定,原因是脂溶性蛋白的沉淀使溶液浑浊影响比色;预先的净化和提供大量样品都有困难。为此,我们通过反复的试验成功地创造了“固兰 B 盐总多酚比色测定法”。该法结合“类黄酮分析法”在大豆种粒斑驳发生机理的研究中取得了良好的应用效果。固兰 B 盐比色法还可以用于分析植物抗逆生理中的多酚类物质的变化。故将该方法介绍如下。

### 1 方法和原理

固兰 B 盐是一个具有“双端重氮化基团”的试剂,可以和芳香族多酚和黄酮类化合物

<sup>\*</sup> 本课题得到国家自然科学基金资助。

收稿日期 1998-05-14

Received on May 14, 1998

发生重氮化反应,反应产物在 508– 510nm 有最大吸收,可在无水条件下进行比色测定,样品提取液不经净化可直接测定,用 1cm 比色杯,每毫升 5 微克的混合黄酮化合物在 508nm 处吸光度为 0.3,可见灵敏度是比较高的

2 仪器和试剂

2.1 实验室常规玻璃仪器、分光光度计

2.2 试剂

2.2.1 甲醇 (AR), SiO<sub>2</sub>(AR)

2.2.2 固兰 B 试剂:称取 100mg 固兰 B 盐,加入甲醇 60ml 溶解,直至剩余残渣为白色,过滤后备用。一般临用前现配,久置颜色变深

2.2.3 “总多酚”标准液的配制

类黄酮化合物种类很多,按基本结构分类尚可分成查耳酮、黄酮、异黄酮、黄酮醇、黄烷醇、花色素以及相应的二氢化合物和苷。所采用的黄酮化合物的性质不同,比例不同(包括苷和配基)也将影响到测定的浓度范围。本实验的目的在于分析大豆种粒中的以类黄酮化合物为主的多酚类物质,采用较易购得的黄酮类化合物,并模拟大豆种中黄酮类化合物苷和配基的比例,配制参照标准。所以本实验采用的是黄酮类化合物和黄酮醇苷混合物。

称取芦丁 (Rutinum,槲皮素 – 3- 芸香糖苷) 11.9mg,桑色素 (Morin, 3, 5, 7, 2', 4' 五羟基黄酮) 13.4mg,槲皮素 (Quercetin, 3, 5, 7, 3', 4' 五羟基黄酮) 12.0mg 于 50ml 容量瓶中,加乙醇溶解后,定容至 50ml 摇匀。将此标准液稀释 50 倍,配制 15 $\mu$ g/ml 的工作液

3 标准曲线的制作

取试管若干支分别加入 15 $\mu$ g/ml 的标准液 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0ml,每个浓度平行两管,各加入甲醇使总体积为 3.0ml,再加入固兰 B 盐、甲醇试剂 0.5ml,摇匀。放置 10 分钟后于分光光度计在 508nm 下测定消光值,同时以甲醇加显色剂的样品管作为空白对照,调节光密度为零。测定过程 and 一元回归方程的计算结果如表 1 所示。

表 1 标准曲线的制作

Table 1 Making standard curve						
标准液体积 (ml)	0.0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
Standard volume (ml)						
标准液浓度 ( $\mu$ g /3.5ml)						
Standard concentration	0	6	12	18	24	30
( $\mu$ g /3.5ml)						
甲醇体积 (ml)	3.0	2.6	2.2	1.8	2.4	1.0
Methyl alcohol volume (ml)						
固兰 B 试剂 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Fast blue B reagent (ml)						
总体积 (ml)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Total volume (ml)						
O. D 508 (X)	0	0.3485	0.6247	0.8558	1.0675	1.2018
Y= a+ bX	a= 0.17484		b= 0.03582		r= 0.993	

4 样品的提取和测定

称取各个时期采集的种皮和子叶样品 0.5g 在醋钵内加 2.5g 左右 SiO<sub>2</sub>粉研成糊状,加入甲醇约 5– 8ml,研磨提取,通过甲醇润湿的滤纸过滤于 25ml 容量瓶中;继续用甲醇

洗涤研磨样品,合并过滤液,用甲醇定容至 25ml 摇匀。吸取样品提取液 1.0ml,平行两份于试管中,各加入 2ml 甲醇和 0.5ml 固兰 B 试剂,放置 10 分钟。同时取固兰 B 试剂 0.5ml,加甲醇 3.0ml 做空白对照。样品在分光光度计 508nm 比色,读取消光值代入前述标准曲线求得的回归方程,求出样品中“总多酚”含量。见表 2

5 测定注意事项和说明

5.1 丙酮能与固兰 B 试剂形成紫色的重氮化物,故不宜用丙酮做溶剂从大豆样品中提取“总多酚”。

5.2 二甲基甲酰胺 (DMF) 可以做固兰 B 反应的溶剂。并可从在 535nm 比色测定,无论是二甲基甲酰胺还是甲醇做溶剂放置以后可能出现沉淀而使样品溶液浑浊。浑浊的原因与样品中含水过高有关。

表 2 部分种皮样品感染 SMV 前后的“总多酚”的变化

Table 2 The changes of total polyphenol before of after part seedcoat inoculated by SMV							
样品 Sample	第I 期 Period I		第II 期 Period II		第III期 Period III		
	mg /g	%	mg /g	%	mg /g	%	
丰收 12对照 CK	0.297	-	0.231	-	0.131	-	
D. S 12 (CK)							
丰收 12接 SMV Ⅱ	0.378	27.27	80.284	22.94	0.102	-22.14	
F. S 12 inoculation SMV 92-17							
丰收 12接 SMV Ⅲ	0.522	75.76	0.390	68.83	0.240	83.21	
F. S 12 inoculation SMV 87-44							
东农 81-43对照 CK	0.279	-	0.174	-	0.218	-	
D. N 81-43 (CK)							
东农 81-43接 SMV Ⅱ	0.325	16.49	0.198	13.79	0.206	-5.50	
D. N 81-43 inoculation SMV 92-17							
东农 81-43接 SMV Ⅲ	0.429	53.76	0.198	13.79	-0.008	-103.67	
D. N 81-43- inoculation SMV 87-44							

5.3 二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇、水依次对显色有促进作用,水的作用最突出。甲醇的促进作用较小,故用来做提取和分析溶剂,该重氮化分析法可在不加强碱的情况下进行。

5.4 样品中的醇溶性蛋白和叶绿素不影响分析,故不必预先去除

6 讨论

大豆种粒中的多酚类物质-黄酮类化合物是大豆感染 SMV 后形成种粒斑驳的物质。在众多黄酮类化合物中,由于化学结构、性质的不同,往往不能用一种方法同时进行分析测定:如黄烷醇类化合物的分析至今没有良好的分析方法。又如各种黄酮类化合物的配基和苷之间性质亦相差很多,这些化合物都属于多酚类化合物,并且化学性质不稳定,尤其在含量较低的情况下,若采用复杂的提取手段将导致某些类黄酮的损失。同时测定大豆种粒中各种黄酮类化合物和其它简单分类的方法尚未见报道。为使有关大豆种粒斑驳的研究能够顺利进行,对以类黄酮为主的总多酚分析方法进行了反复研究。

本文所采用的固兰 B 盐比色法测定大豆子叶和种皮中的“总多酚”具有简单、快速、准确的特点,从上述分析结果可以看出,采用不同类黄酮化合物做标准参照物可以改变被测定总多酚浓度范围,所以可以根据实际需要改变类黄酮配基和苷以及其种类之间的比例,以使其接近实际样品。减少固兰 B 试剂或改变标准参照物的浓度可以测定更低含量

的“总多酚”。表 2 中的三个时期分别为“鼓半粒期”、“鼓满粒期”和“鼓满粒后期”,可以看到感种粒斑驳的丰收 12 大豆种皮在接种两个株系 SMV 后总多酚的变化% 明显的大于抗种粒斑驳的东农 81-43 大豆。

## 参 考 文 献

- [1] 肖崇厚等编, 1987, 中药化学, 上海科技出版社
- [2] 张宝深等译, 1990, 黄酮类化合物结构鉴定技术, 科学出版社
- [3] 洪筱坤等译, 1981, 层析理论与应用, 上海科技出版社
- [4] 夏锦尧编译, 1989, 有机化合物及药物的比色法、荧光法分析, 中国人民公安大学出版社
- [5] 曾云鹗等编, 现代化学试剂手册第四分册, 化学工业出版社

## ANALYSIS METHOD OF TOTAL POLYPHENOL CONTENT IN SOYBEAN SEED

Tehg Bing Wu Zhongpu

(Northeast Agricultural University Harbin 150030)

### Abstract

A new method of analysing total polyphenol in the soybean seed is introduced in this paper. We used poliphenol as the compound of fast blue B reagent and flavonoids to take diazo reaction and it showed red color, then to take colorimetric analysing is 508 nm. The method shows many peculiarities such as simplicity, fastness and sensitivity. It can be used in the study of disease-resistant physiology.

**Key words** Soybean; Total polyphenol; Flavonods; Fast blue B