

# 应用 $^{13}\text{C}$ 核磁共振研究完整野生大豆种子脂肪酸组成

关剑秋 孝延文

(中国科学院长春应用化学研究所)

徐 豹

(吉林省农业科院大豆研究所)

## 摘 要

本文首次报导了用 $^{13}\text{C}$ 核磁共振测定完整野生大豆种子的脂肪酸组成,并对方法做了论证。肯定了其准确、快速、不破坏种子生活力的特点。发现高蛋白野生大豆(蛋白质含量 $>50\%$ )中有亚麻酸含量较低种子;发现吉林省不同进化类型大豆亚麻酸的含量为:野生 $>$ 半野生 $>$ 半栽培 $>$ 栽培大豆。认为核磁共振技术能有效地用于油份品质的遗传研究,加速育种进程。

$^{13}\text{C}$ 核磁共振(简称NMR)方法已经成功地用来直接观测完整油料种子的化学组成。由于它具有快速、准确、不破坏种子胚芽的优点,目前NMR方法已被公认为是测定种子脂肪酸的最新方法。早期工作是采用 $^1\text{H}$ -NMR方法<sup>[1]</sup>,但它很难克服由于种子的不均匀而产生的波动,随着付里叶变换技术在核磁中应用,大豆脂肪酸的NMR信息的获得才得以实现。Schaefer和shoolery的工作<sup>[2,3]</sup>是很有成效的。

我们未见到对完整野生大豆种子脂肪酸组成 $^{13}\text{C}$ -NMR测定的报导。本文简要介绍我们在选择实验条件上的方法论证,并着重介绍NMR在野生大豆脂肪酸测定中的应用。

## 材 料 和 方 法

### 1. 材料

本试验选用吉林省农科院大豆研究所提供的省内不同蛋白质含量的野生大豆14份,不同进化类型及我国不同纬度地区野生大豆11份。

### 2. 方法论证

我们在利用天然丰度 $^{13}\text{C}$ 核磁共振测定植物油中脂肪酸组成<sup>[4]</sup>的基础上,开展对完

本文于1985年7月4日收到

整大豆种子脂肪酸的定量测定工作。

大豆油脂是以甘油三酸酯 (Triglycerid) 为主要形式。在侧链上连结的不饱和 脂肪酸 (主要有亚麻酸、油酸、亚油酸) 及饱和脂肪酸 (主要有棕榈酸、硬脂酸) 的各基 团的碳原子所贡献的信号峰的化学位移 ( $\delta$ ) 及归属<sup>[4]</sup>列于表 1, 大豆 NMR 谱 (图 1)

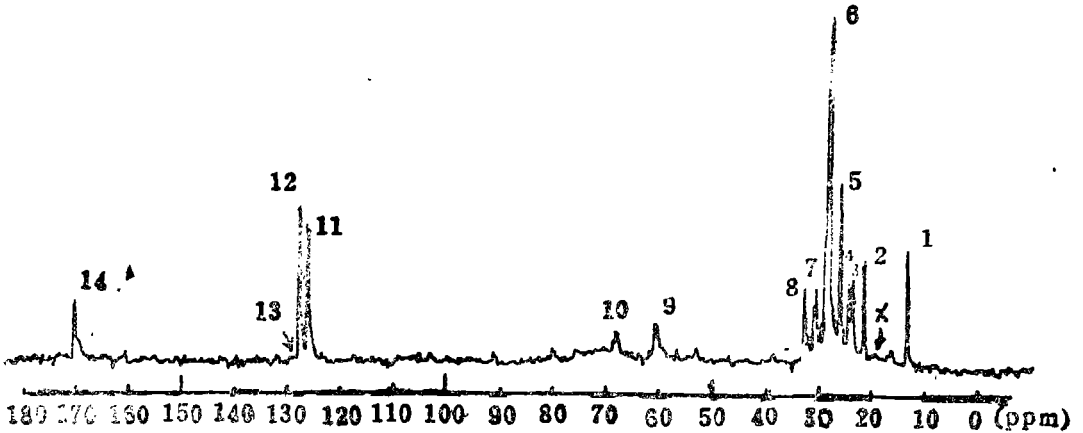


图 1. 野生大豆 (吉 13<sup>#</sup>(2)) <sup>13</sup>C—NMR 谱  
Fig 1. <sup>13</sup>C—NMR Spectrum of wild Soybean

信号峰标记是: 1 峰是 —CH<sub>3</sub> 碳 贡 献 峰, 是 五 种 脂 肪 酸 末 端 甲 基 碳; 2 — 8 峰 是 链 上 —CH<sub>2</sub>— 饱 和 碳 原 子 所 贡 献 峰; 9, 10 是 甘 油 三 酸 脂 侧 链 —CH<sub>2</sub>— 及 —CH— 贡 献 峰; 11, 12, 13 峰 是 不 饱 和 脂 肪 酸 双 键  $\text{>C=C<}$  基 团 贡 献 峰, 因 为, 9, 10 峰 不 作 计 算, 在 表 1 中 不 列 入。标 记 X 是 亚 麻 酸 —CH<sub>2</sub>— 单 碳 峰, 一 般 不 易 观 测。

关于完整大豆种子油脂肪酸定量测定不同于植物油的方法。植物油中可以加入弛豫试剂缩短自旋—晶格弛豫时间 ( $T_1$  值), 利用反转门控去偶方式, 选择最佳参数条件可以从指定峰积分值计算脂肪酸百分含量。从混合标样测试结果分析, 标准统计偏差为  $\pm 0.004$ , 相对误差  $\sim 0.7\%$ 。因为大豆粒无法加入弛豫试剂缩短  $T_1$  值, 上述方法是不能采用的。我们是采用快脉冲扫描, 质子噪声去偶的方式, 但该方法要考虑 NOE 效应导致的谱线增强, 即峰面积的积分值与碳原子的数目不成正比, 为实现定量计算, 采用了气相色谱法对大豆相应油 (乙醚浸取) 准确测出脂肪酸含量, 依此数据对 NMR 各峰进行校正。从两种方法平行数据分析的结果, 方法是准确可行的, 而且重现性好。

实验条件: 利用 JEOL—FX100 NMR 谱 仪, 在 25.05MHz 频 率 下,  $\Phi 5\text{mm}$  样 品 管 (栽培大豆用  $\Phi 10\text{mm}$  样 品 管) 种 子 经 D<sub>2</sub>O 浸 泡, DSS 为 内 标, 0.5 秒 快 脉 冲 扫 描, 噪 声 去 偶, 无 脉 冲 延 迟, 8k 数 据 点, 倾 倒 角 45°, 谱 宽 5000Hz, 经 3000 次 累 加, 20—30 分 钟 可 以 获 得 清 晰 大 豆 谱。

表 1

大豆谱指定峰归属

Table 1

Carbon-13 NMR spectrum of soybean oil. (See FIG 1)

峰号	δ (ppm)	碳 原 子 归 属	简 式
1	14.13	C <sub>18</sub> <sup>A</sup>	a+b+c+d
2	22.67	C <sub>17</sub> <sup>b+c+d</sup>	b+c+d
3	25.05	C <sub>8</sub> <sup>A</sup>	a+b+c+d
4	25.71	C <sub>11,14</sub> <sup>a</sup> , C <sub>11</sub> <sup>b</sup>	2a+b
5	27.79	C <sub>8</sub> <sup>a</sup> , C <sub>8,14</sub> <sup>b</sup> , C <sub>8,11</sub> <sup>c</sup>	a+2b+2c
6	29.24	C <sub>4-7</sub> <sup>a</sup> , C <sub>4-7,15</sub> <sup>b</sup> , C <sub>4-7,12-15</sub> <sup>c</sup>	4a+5b+8c+12d
7	31.67	C <sub>10</sub> <sup>b</sup> , C <sub>10</sub> <sup>c+d</sup>	b+c+d
8	33.72	C <sub>2</sub> <sup>A</sup>	a+b+c+d
11	128.12	C <sub>10,12</sub> <sup>b</sup> , C <sub>10,12,13,15</sub> <sup>a</sup>	4a+2b
12	129.73	C <sub>9,10</sub> <sup>c</sup> , C <sub>9,13</sub> <sup>b</sup> , C <sub>9</sub> <sup>a</sup>	a+2b+2c
13	131.56	C <sub>16</sub> <sup>A</sup>	a
14	171.05	C <sub>1</sub> <sup>A*</sup>	

注：碳原子归属下角标为碳的位置，上角标为组份，其中 a—亚麻酸，b—亚油酸，c—油酸，d—棕榈酸及硬脂酸含量，A—五种脂肪酸含量。

● 酯基峰中游离脂肪酸羧基碳峰在此重叠。

结 果 和 讨 论

1. 野生大豆油脂脂肪酸组成

高蛋白含量 (>50%) 的野生大豆一般含油量在 6%~10%，样品取 0.1—0.2 克进行测量，对有价值的样品取 2 粒也可以分析，测完后的种子立即用滤纸吸水晾干回收，不影响种子发芽。从部分高蛋白的野生大豆测定结果分析，有的样品亚麻酸接近栽培大豆。图 1 是吉 13\*(2) NMR 谱，亚麻酸含量 9.04%，表 2 中列出部分样品结果。

对于不同纬度野生大豆脂肪酸组成列于表 3。野生大豆亚麻酸和油酸含量呈负相关，与庄无忌 (1984)<sup>[5]</sup>报导趋势一致。核磁方法可以直接用于微量种子基因型的筛选，由于不破坏种子的生活力，在提高油份质量的遗传研究上有特殊意义，可提高育种效率。

由于大豆谱峰面积重叠，我们是采用计算机自编程序分峰处理计算面积积分值，所计算脂肪酸相对百分含量标准偏差为 ±0.24 (一份样品六次测量计算结果)。

表 2 部份高蛋白野生大豆脂肪酸组成  
Table 2 The fatty acid composition of some high-protein wild soybean

样 品	脂肪酸 %	亚 麻 酸 %	亚 油 酸 %	油 酸 %	饱和 脂肪酸 %
吉 1*		12.14	53.70	15.69	18.47
吉 2*		11.23	55.53	16.09	17.15
吉 3*		10.38	55.63	16.90	17.09
吉 4*		12.83	54.01	14.92	18.24
吉 5*		14.71	54.20	15.14	15.95
吉 6*		14.63	52.30	15.36	17.71
吉 7*		13.62	55.07	15.70	15.61
吉 8*		13.06	55.18	15.50	16.26
吉 13 <sup>*</sup> (1)		10.24	56.21	17.16	16.39
吉 13 <sup>*</sup> (2)		9.04	55.36	18.24	17.36
平 均 数		12.19±1.82	54.72±1.10	16.07±0.97	17.02±0.91
C·V %		15.00	2.01	6.03	5.36

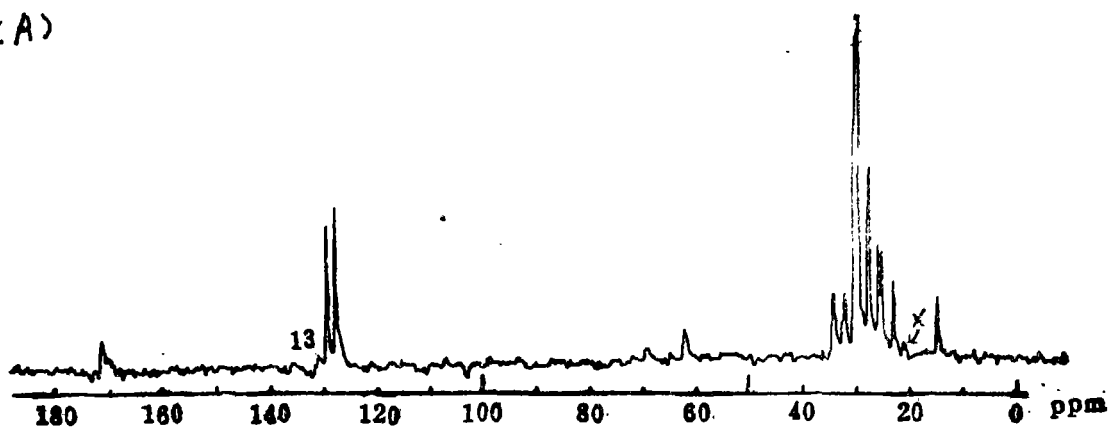
表 3 不同纬度地区野生大豆的脂肪酸组成  
Table 3 The fatty acid composition of wild soybean at different latitudes

°N	亚 麻 酸	亚 油 酸	油 酸	棕榈酸+硬脂酸
50°	12.22	54.42	15.02	14.65
46°	15.68	53.46	14.02	18.77
45°	15.32	55.21	14.82	19.97
43°	12.57	54.26	15.40	18.34
42°	12.73	53.07	14.32	16.84
35°	13.34	53.44	14.94	18.28
30°	11.28	55.32	16.25	17.15
29°	9.59	55.86	16.07	18.48
29°	11.64	56.08	16.23	16.05
27°	12.59	52.80	15.98	16.06
27°	13.21	54.21	14.90	18.63
26°	12.60	54.92	16.42	17.68

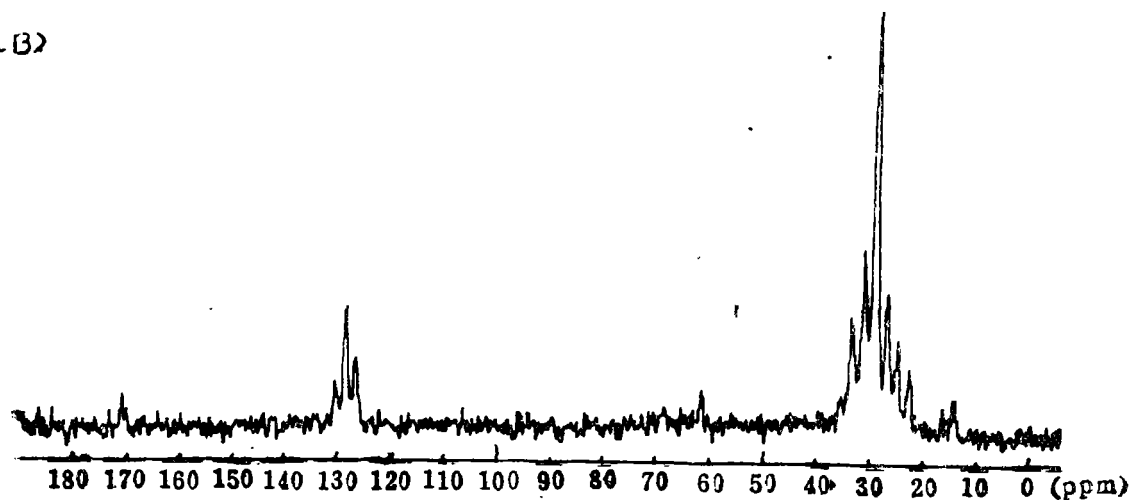
2. 不同进化类型的野生、半野生、半栽培、栽培大豆 NMR 分析

这里介绍四种材料的 NMR 扫描谱, 用估量的方法解析谱图。图 2 展示出野生大豆 (A) 从亚麻酸单碳贡献峰标记 X 及 13 可以明显观察其含量较高。半野生大豆一般谱为 (C), 从单碳贡献的烯碳峰 13 比 (A) 的对应峰弱, 值得提出的是为了相对比较, 样品量及参数设置条件是相同的。我们在半野生大豆的群体中发现特殊变异材料, 图 2 (B) 谱中烯碳峰 13 与 12, 11 峰面积比为 1.0 : 2.6 : 1.5, 显然 13 峰有其它不饱和脂肪酸的烯碳峰重叠, 由于样品太少未做 GC—MC 方法探查。(D) 谱为半栽培大豆, 同一群体的样品中亚麻酸含量高者接近半野生大豆, 低者接近栽培大豆, (E) 谱为栽培大豆的 NMR 谱, 单碳贡献峰几乎难以观察。中间谱峰 (61.10—104.4ppm) 是五种糖

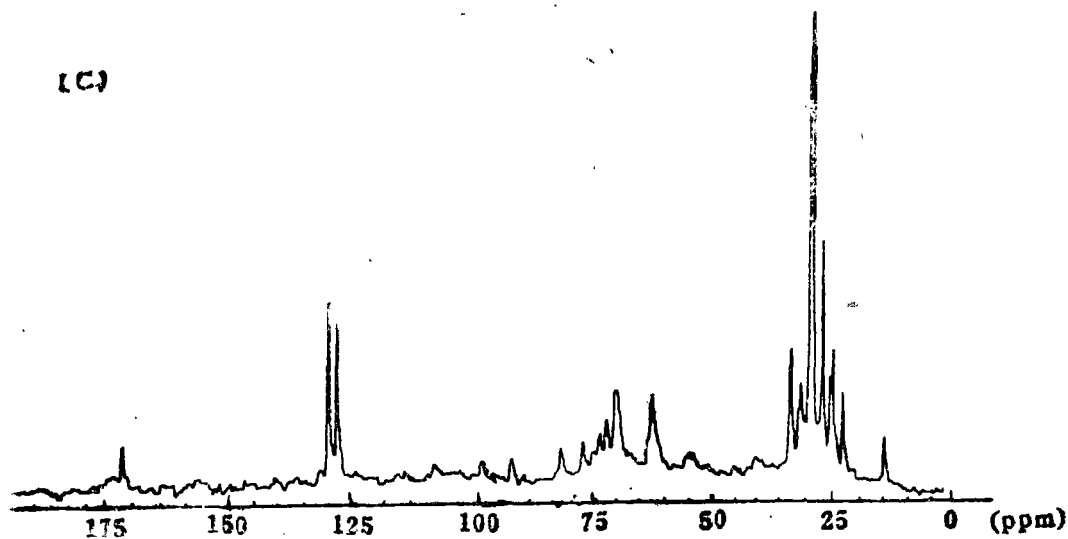
(A)



(B)



(C)



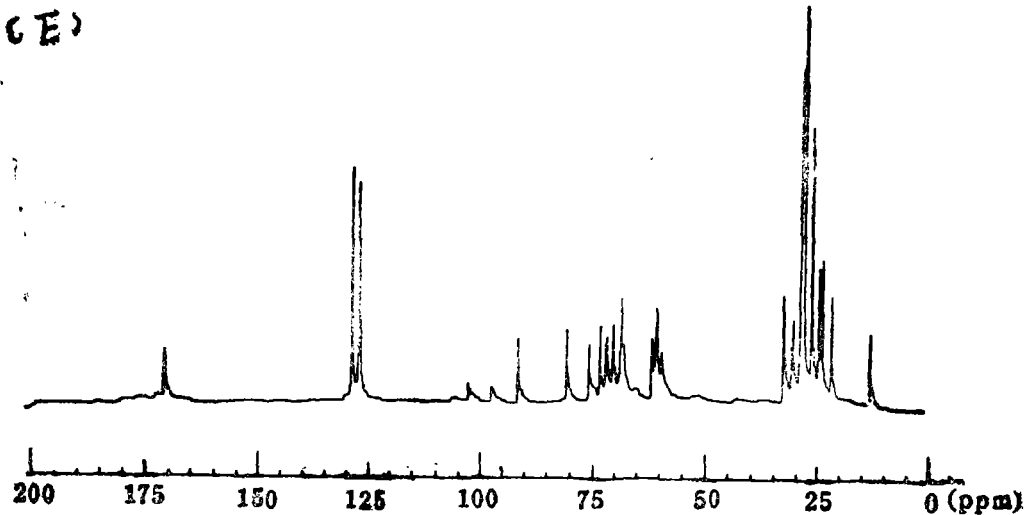
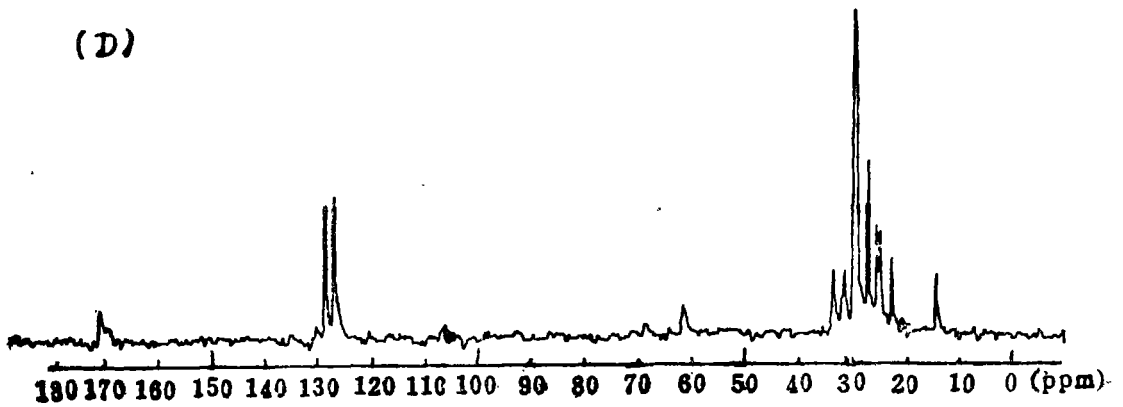


图 2. (A) 野生大豆 (B) 半野生大豆 (C) 半野生大豆  
 Fig 2 (wild) (semi-wild) (semiwild)  
 (D) 半栽培大豆 (E) 栽培大豆  
 (semi-cultivated) (cultivated)

信号峰, 甘油三酸酯侧链两个酯基峰埋在其中。

随着野生一半野生一半栽培一栽培的进化, 大豆的百粒重逐步增大, 从以上图谱看, 亚麻酸的含量随进化而减少, 这与我们 1984 年的报导<sup>[6]</sup>是一致的。

从核磁方法对部分野生大豆的分析表明, 它是测定种子脂肪酸的有效方法。从文献报导及我们的测试分析认为, 气相色谱法, 近红外反射光谱比 NMR 方法结果高些。

## 参 考 文 献

- [1] L. F. Johnson et al., Anal.chem. 34, 9 (1136) 1962.
- [2] Jacob Schaefer and E. O. Stejskal., JAOCS 51: 210 (1974).
- [3] J. N. Soolery., Prog. in NMR spectra. 11. 79—93 (1977)
- [4] 关剑秋、李延文、张杰. 分析化学 vol. 12, No. 6, 1984
- [5] 庄无忌等. 大豆科学 vol. 3, No. 3, 1984.
- [6] 徐豹等. 吉林农业科学 No. 2, 1984.
- [7] F. I. Collins., D. E. Alexander et al., JAOCS 44. 12 (708) 1967.
- [8] P. N. Tiwari., P. N. Gambhir et al., JAOCS 51 (3) 1974

STUDY ON FATTY-ACIDS COMPOSITION OF INTACT WILD SOYBEAN  
SEED BY CARBON- $^{13}\text{C}$  NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

Guan Jianqiu      Xiao Yenwen

(Changchun Institute of Applied Chemistry Academia Sinica)

Xu Bao

(Soybean Institute Jilin Academy of Agricultural Sciences)

## Abstract

The fatty acid composition of some high-protein wild soybean and a series of wild, semiwild, semicultivated and cultivated soybean intact seeds were determined by  $^{13}\text{C}$  NMR. All spectra were obtained with NMR spectrometer operating at 25.05 MHz, completely proton decoupling, a choice of 0.5 sec acquisition time and tip angle of around  $45^\circ$ . A given amount of intact seeds were immersed in  $\text{D}_2\text{O}$  and all well resolved spectra achieved with accumulation for 3000 times (about 30 min.) The quantification of oil components was checked by the data of GC analysis and given a series of correlation coefficient.

It had been found that (1) content of linolenic acid was lower in some high-protein (50%) wild soybean germplasm; (2) order of the linolenic acid content was: wild  $\rightarrow$  semiwild  $\rightarrow$  semi-cultivated  $\rightarrow$  cultivated soybean.  $^{13}\text{C}$ -NMR would be a powerful technique for study on genetics and breeding of soybean oil composition.