

大豆斑驳粒总类黄酮 Zr^{4+} 络合物的 TLC 扫描分析^{*}

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斑驳粒微量“总黄酮”的分析方法。采用 Zr^{4+} 与黄酮类化合物生成有荧光的络合物,借薄层色谱扫描技术,测定滤纸荧光斑点的峰面积积分值,用于定量分析。 Zr^{4+} 在酸性条件下与黄酮类化合物的络合作用可使类黄酮化合物定性,并有利于区别于黄烷醇类化合物。该方法应用于大豆感染 SMV 产生斑驳的发生机理研究,有良好的效果。

关键词 大豆; Zr ; 类黄酮; TLC 扫描

前 言

为研究大豆种粒抗逆生理时多酚类物质的变化,我们曾采用了“总多酚”的分析。“总多酚”包括了类黄酮化合物和简单酚类化合物,而测定“总多酚”时有意侧重了多酚类中类黄酮的测定。由于类黄酮的种类很多,化学性质也不同,其中像黄烷醇类化合物与黄酮、黄酮醇、异黄酮化合物有许多理化性质上的不同,且不易被测定。而在大豆种粒斑驳发生机理的研究中,黄烷醇类与斑驳的形成有着密切的关系。总类黄酮的测定目的是想通过分析来区别“总多酚”中类黄酮化合物的同时区分黄酮化合物(黄酮、二氢黄酮、黄酮醇、二氢黄酮醇、异黄酮和二氢异黄酮)与黄烷醇类化合物。它们的主要区别在于 C_4 上的羰基。我们知道,上述黄酮类化合物在植物(大豆)组织中的存在形式较复杂,而且有可能因感染 SMV 而产生新的衍生物,这些黄酮类化合物有可能以苷和苷元(配基)的形式同时存在,这意味着 C_3 位可能不是游离的 $-OH$,而是由糖和苯酚基(异黄酮)取代。

许多黄酮类化合物可以和 Al^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Fe^{3+} 、 In^{3+} 、 Sc^{3+} 、 Zr^{4+} 等金属离子发生络合反应,并可借络合物的可见光光谱和荧光进行黄酮类化合物的含量测定。由于大豆种粒中的黄酮类化合物含量很低(只能采用荧光法测定)而且样品中的醇溶性蛋白质同样会干扰络合物的荧光分析。鉴于分析工作的必要性和存在的问题,我们成功地把荧光分析技术

^{*} 本课题得到国家自然科学基金资助

和 TLC扫描技术结合起来,创造了一个新的黄酮类化合物总量的测定方法,用于大豆种粒中微量黄酮类化合物的分析取得了良好的效果,现介绍如下。

1 方法与原理

Zr^{4+} 和黄酮类化合物的络合物有较强的黄色荧光,更重要的是 Zr^{4+} 可以在酸性条件下 (6M HCL)和黄酮化合物络合,这一特点也常被用来鉴定黄酮化合物的结构 (见图 1)

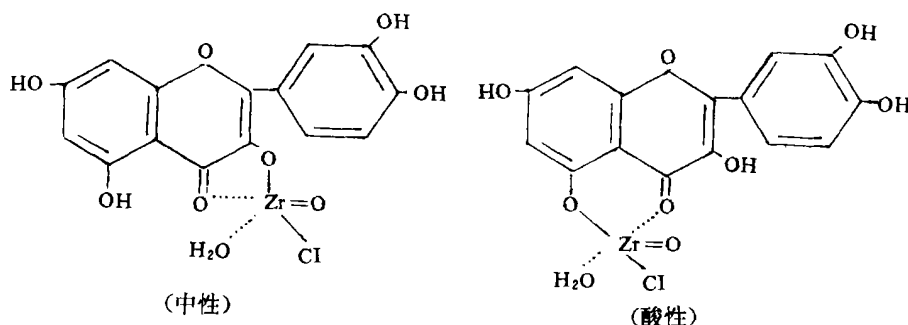


图 1 黄酮醇和 Zr^{4+} 的络合物

Fig. 1 Flavonol and Zr^{4+} complex compound

我们可以利用在酸性条件下 Zr^{4+} 和黄酮类化合物形成的络合物的荧光来区别于其它化合物与 Zr^{4+} 络合的荧光。黄烷醇类化合物也因此被区别。 Zr^{4+} 络合物在滤纸上的荧光“斑点”可以通过薄层色谱 (TLC)扫描技术测得其荧光强度后再与络合物质量进行定量和计算。

2 试剂和仪器

2.1 试剂

2.1.1 0.5% Zr^{4+} /2M H_2SO_4 溶液。0.5g $ZrOCl_2$ 加 45ml H_2O , 5ml 浓 H_2SO_4

2.1.2 甲醇 (AR)、 SiO_2 (AR)

2.1.3 定性滤纸 (杭州产双圈牌) 在 360nm 紫外光下无荧光者。

2.1.4 标准溶液配制: “总黄酮”是有代表性的。本试验的目的在于分析大豆种粒中的黄酮类、黄酮、异黄酮类化合物,并希望能与黄烷酮化合物相区别,所采用的黄酮类化合物的性质不同,比例不同也将影响到测定的浓度范围。所以本实验采用的是黄酮醇和黄酮醇苷化合物的混合物

称取芦丁 (Rutin) 11.9mg, 桑色素 (Morin) 13.4mg, 槲皮素 (Quercetin) 12.0mg 于 50ml 容量瓶中,加乙醇溶解后,定容至 50ml,摇匀。将此标准液用 2M H_2SO_4 溶液,溶液稀释 25 倍,配成含混合黄酮醇类化合物 $30\mu g/ml$ 的工作液

2.2 仪器

2.2.1 实验室常规玻璃仪器

2.2.2 点样器: Microapplicator, 瑞士 CAM AG

2.2.3 薄层扫描仪: CS-930 双波长薄层扫描仪, 日本岛津

3 标准曲线的制作

在 10× 20cm 玻璃板上用胶带纸固定一张直径 9cm 的滤纸 ,在定性滤纸上用铅笔画出如图 2所示的分隔线 ,用可调微量点样器按表 1中标准曲线配制的各标准液点样 ,每纵
横点同一浓度标准液 6点 ,每点点样 0. 50ul,每两点间隔约 5mm 点样完毕自然干燥 将
玻璃板固定于薄层扫描仪的样品台上 ,进行扫描测定 主要分析参数如下: 激发波长
366nm, 3# 滤光片 ,光束 (Slit)= 7× 2,线性扫描 将扫描所得的峰面积积分值的平均值与
每个斑点的浓度作一元线性回归方程 (见表 1)。

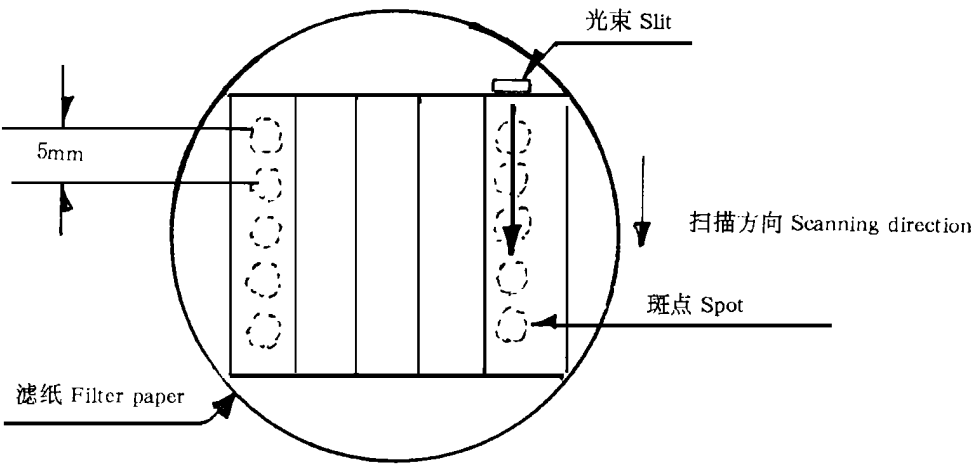


图 2 点样示意图

Fig. 2 Figure of dripping sample

表 1 标准曲线

Table 1 Data of standard curve

标准液浓度 (ng μl)	3	6	9	12	15	18	21
Concentration of standard solution(ng μl)							
每个斑点含量 (ng /0. 3μl)	1. 5	3. 0	4. 5	6. 0	7. 5	9. 0	10. 5
Content of each spot(ng /0. 3μl)							
标准液体积 (ml) (30μg μl)	0. 3	0. 6	0. 9	1. 2	1. 5	1. 8	2. 1
Valume of standard solution (ml) 30μg μl)							
H ₂ SO ₄ 2Mol /1L V (ml)	1. 7	1. 4	1. 1	0. 8	0. 5	0. 2	0
H ₂ SO ₄ 2Mol /1L V (ml)							
Zr ⁴⁺ 试剂 V (ml)	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	0. 9
Zr ⁴⁺ Reagent V (ml)							
峰面积积分值 (X)	*	982	1500	1989	2467	3157	3619
Peak area integral value(X)							

* 响应值已接近噪声信号的二倍 ,故舍去。
* The respond value is two times noise, give up this value.

$Y= a+ bX$ $a= - 110. 133$ $b= 354. 93$ $r= 0. 9986$

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,在研钵内加 2. 5g左右 SiO₂粉研成糊状 ,
加入甲醇约 5- 8ml研磨提取 ,过滤于 25ml容量瓶中 ,继续用甲醇研磨洗涤样品 合并滤

液,用甲醇定容。取 20ml提取液置于 100ml圆底烧瓶中,于水浴上减压蒸干,冷却后加入 1.0ml Zr⁴⁺ /H₂SO₄试剂,洗涤瓶壁残留物后移于 1.5ml离心管中,将此样品如标准曲线制作方法点样,每点 0.5 μ l,平行 5– 6点。自然干燥后进行扫描测定。将峰面积积分值的平行值代入回归方程并计算每克样品中总黄酮类化合物的含量(见表 2)。

表 2 不同种粒抗性大豆品种种皮感 SMV 前后的“总黄酮”的变化

Table 2 Change of total flavonoids content in seed coat of soybean with different resistance to seed coat mottling after inoculation with SMV

时间	Period	第 1期	Period 1	第 2期	Period 2	第 3期	Period 3
含量 (%)	Content (%)	μ g/g	%	μ g/g	%	μ g/g	%
丰收 12对照区	F. S 12 soybean healthy plant	3.4	—	8.04	—	19.32	—
丰收 12接 # SMV	F. S 12 soybean after inoculation with SMV	34.92	646.55	18.09	125.07	24.53	26.96
92– 17							
丰收 12接 3# SMV	F. S 12 soybean after inoculation with SMV	34.72	940.30	69.48	764.30	36.55	89.21
87– 44							
东农 81– 43对照 CK	D. N 81– 43 soybean healthy plant	13.27	—	24.29	—	15.76	—
东农 81– 43接 # SMV	D. N 81– 43 soybean after inoculation with	14.42	8.73	86.84	10.49	13.71	— 13.00
SMV 92– 17							
东农 81– 43接 3# SMV	D. N 81– 43 soybean after inoculation with	23.94	80.46	9.61	— 60.11	12.76	— 19.02
SMV 87– 44							

表 2中“丰收 12”为感种粒斑驳的大豆品种,“东农 81– 43”为抗种粒斑驳的大豆品种。两个品种感染 SMV 前后,不同时期的“总黄酮”变化是非常显著的,说明本实验所用的分析方法是可行的。表 2中的三个时期依次为:“鼓半粒期”,“鼓满粒期”,“鼓满粒后期”。

5 讨论

采用 Zr⁴⁺ 络合物荧光 TLC扫描法测定大豆种粒中的“总黄酮”,具有灵敏、快速、准确的特点,解决了样品中醇溶性蛋白引起样品溶液浑浊不能进行荧光测定的问题。Zr⁴⁺ 在酸性条件下与黄酮类化合物反应的定性作用有利于区别黄烷醇化合物。标准参照物的成分和比例应接近实际样品中的存在比例。本文的分析方法还可以用于其它植物种子中抗逆生理过程变化的研究。

参 考 文 献

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

**TLC SCANNING ANALYSIS ON COMPLEX COMPOUND OF TOTAL
FLAVONOIDS AND Zr^{4+} ON MOTTILING SOYBEAN SEEDS**

Teng Bing Wu Zongpu

(*Northeast Agricultural University, Harbin 150030*)

Abstract

This peper presants the studied results of a new analysis method of trace total flavonoids in soybean seeds. Zr^{4+} and flavonoids produced the fluorescet complex compound, and determined peak area integral value of fluorescent sports on filier paper by means of TLC scanning technology. The method can be applied as a quantitative analysis to differentiate flavonoids compound from flavonol. This method maybe applied effectively to study the formaion mechanism of seed coat mottling of soybeans infected by SMV.

Key words Soybean; Zr^{4+} ; Flavonoids; TLC scanning