

文章编号: 1000-5471(2007)01-0097-05

甘蓝型油菜种皮黄酮类色素种类的研究^①

董翠月¹, 万华方², 梁颖²

1. 平原大学 应用生物系, 河南 新乡 453003; 2. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400716

摘要: 用纸色谱结合紫外光谱分析, 对甘蓝型油菜种皮中黄酮类色素进行了分离及种类鉴定, 发现甘蓝型黑、黄籽油菜种皮中均含有花色素、大量黄酮醇、少量的异黄酮苷及黄酮醇苷。不同之处在于, 黑籽中除含有上属成份外还含有大量黄酮, 而黄籽中含有大量异黄酮类色素。

关键词: 甘蓝型油菜; 纸色谱; 紫外光谱; 类黄酮

中图分类号: S643.3

文献标识码: A

作为三大油菜品系之一的甘蓝型油菜在我国长江流域具有广泛的种植面积。甘蓝型黄籽油菜与相同遗传背景的黑籽相比具有含油量高、蛋白质含量高、皮壳率低及油质清澈等优点, 同时种皮色素、多酚、木质素等含量低^[1,2]。但甘蓝型黄籽油菜遗传机制复杂, 粒色不稳定, 限制了其推广、种植^[3], 这种现象很早就引起了育种家们的注意。

植物初生代谢和次生代谢密切相关, 黄籽的优质性状与其种皮中色素含量低在代谢上一定存在必然联系, 与油菜品质紧密联系的蛋白质及脂肪等物质与色素存在着怎样的代谢关系, 前人曾进行了长期的探索^[4,5], 但这些研究大多集中于黑、黄籽之间这些物质质量上的差异, 而对这些物质的种类研究极少。黑、黄籽之间黄酮类色素在种类上有无差异, 它的合成与蛋白质形成、脂肪代谢的关系怎样, 至今尚未清楚。

本文以一对甘蓝型黑、黄籽油菜为材料, 对其种皮黄酮类色素进行了鉴定, 以期找出黑、黄籽间黄酮色素种类的差异, 了解与品质密切相关的蛋白质、脂肪等物质合成与黄酮类色素形成的关系, 为培育稳定遗传的甘蓝型黄籽油菜品种及制定相应的栽培措施提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

甘蓝型×芥菜型组合后代培育成的近等基因系 L1、L2(由重庆市油菜工程技术研究中心提供), 其中 L1 为甘蓝型黑籽油菜, L2 为相同遗传背景的甘蓝型黄籽油菜。待种子成熟后, 剥取种皮, 提取色素。

1.2 仪器设备及试剂

仪器设备: 层析缸、紫光灯、UV-Vis 紫外-可见分光光度计。

分析试剂: 分析纯化学试剂。

1.3 方法

1.3.1 黄酮类色素的提取

参照 K. R. Markham^[6]的方法: 分别取 L1、L2 油菜种子 5 g, 剥取种皮置试管中, 加入 10 mL 提取液(甲醇:水=9:1), 40℃水浴 7 h, 过滤收集滤液, 残渣再加入 10 mL 提取液(甲醇:水=9:1), 40℃水浴 7 h, 过滤收集滤液, 合并 2 次滤液即为黄酮类色素粗提液。用石油醚反复萃取粗提液, 以除去叶绿素等脂溶性色素, 后弃去石油醚, 于萃取液中加过量乙醇微热以沉淀蛋白质, 滤去沉淀, 所得滤液在 40℃水

① 收稿日期: 2006-09-11

作者简介: 董翠月(1974-), 女, 河南周口人, 硕士, 主要从事植物次生代谢研究。

浴蒸干,然后加甲醇至 1 mL,为黄酮类色素提取液,备用.

1.3.2 黄酮类色素的纸层析

用微量进样器取适量上述黄酮类色素提取液点于新华 1 号层析纸(36 cm×46 cm)上,于层析缸中展层,展开剂 BAW(正丁醇:醋酸:水=4:1:5),层析结束后,取出层析纸,遮光晾干.

1.3.3 结果观察

将层析纸置于紫外灯(365 nm)下观察,用铅笔勾画出显色斑点的轮廓;后用氨气熏蒸层析纸,随后重置于紫光灯下观察,用铅笔勾画出斑点轮廓,并用相机记录观察到的结果.

1.3.4 黄酮类色素的紫外光谱测定

用上述方法层析供试材料种皮内黄酮类色素提取液若干次,取 15 张重复性最强的层析纸,剪下层析纸上相同位置的斑点置于三角瓶中用甲醇洗脱,所得洗脱液即为较纯的黄酮类色素,用 UV-ViS 分光光度计于 200~600 nm 波长进行扫描,对照为甲醇洗脱空白层析滤纸的洗脱液.

2 结果与分析

2.1 层析结果图

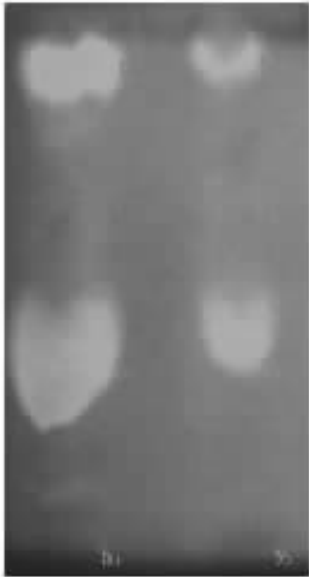


图 1 类黄酮紫光灯下斑点



图 2 类黄酮氨气薰后紫光灯下斑点

Fig.1 The Flavonoid Spot in UV Light Fig.2 The Flavonoid Spot in UV Light After Ammonia Fuming
由纸层析结果可知,黑籽和黄籽氨气薰前共得到 3 个斑点,从上到下黑籽和黄籽斑点依次称为 b_1 、 b_2 、 b_3 , y_1 、 y_2 、 y_3 . 氨气薰后共得到 4 个斑点,从上到下黑籽和黄籽斑点依次为 b'_1 、 b'_2 、 b'_3 、 b'_4 , y'_1 、 y'_2 、 y'_3 、 y'_4 . 观察结果见表 1

表 1 类黄酮纸层析斑点特征

Table 1 The character of flavonoids spots after paper chromatography

斑 点	日光灯下	R_f 值	紫光灯下(365 nm)	氨气薰后紫光灯下观察
y'_1	淡 黄	0.95	淡蓝色荧光	淡蓝色荧光
b'_1	淡黄色	0.96	淡蓝色荧光	淡黄绿色荧光
y'_2	不可见	0.69	不可见	淡黄色绿荧光
b'_2	不可见	0.69	不可见	淡黄绿色荧光
y'_3	微 黄	0.59	淡蓝色荧光	明亮黄绿色荧光
b'_3	微 黄	0.58	淡蓝色荧光	明亮黄绿色荧光
y'_4	不可见	0.29	深紫色	明亮黄绿色荧光
b'_4	不可见	0.30	深紫色	明亮黄绿色荧光

2.2 各层析斑点的紫外光谱图

纸层析结果观察现象得出: 黄籽的第 1 个斑点 R_f 值为 0.95, 在紫光灯下显淡蓝色荧光, 氨气熏后还是显淡蓝色荧光, 根据这种现象就可以初步判定它为无自由 5-OH 的异黄酮类物质. 黑籽的第 1 个斑点 R_f 值为 0.96, 且在紫光灯下显淡蓝色荧光, 氨气熏后紫光灯下呈黄绿色荧光, 根据此种现象可初步判定它为黄酮类或黄酮醇类. 紫外吸收光谱常用来判定黄酮类物质的类别, 因为黄酮, 黄酮醇等大多数黄酮类化合物, 分子中存在桂皮酰基及苯甲酰基组成的共轭交叉体系, 故其甲醇溶液在 200~400 nm 的区域内存在 2 个主要的吸收带, 称为峰带 I (300~400 nm) 和峰带 II (220~280 nm). 黄籽的第 1 个斑点的紫外吸收光谱(图 3)峰带 I 很弱, 在 310 nm, 峰带 II 在 250 nm, 这种特征吸收正符合异黄酮的紫外吸收特征, 由此推断黄籽第 1 个斑点为异黄酮类物质. 黑籽第 1 个斑点的紫外吸收光谱(图 3)峰带 I 在 325 nm, 峰带 II 在 255 nm. 又知只有黄酮类紫外吸收光谱峰带 I 在 304~350 nm 有强的吸收峰, 在峰带 II 240~280 nm 有吸收, 且常以肩峰形式出现. 而黄酮醇类峰带 I 在 328~385 nm, 所以黑籽第 1 个斑点为黄酮类物质而非黄酮醇类物质.

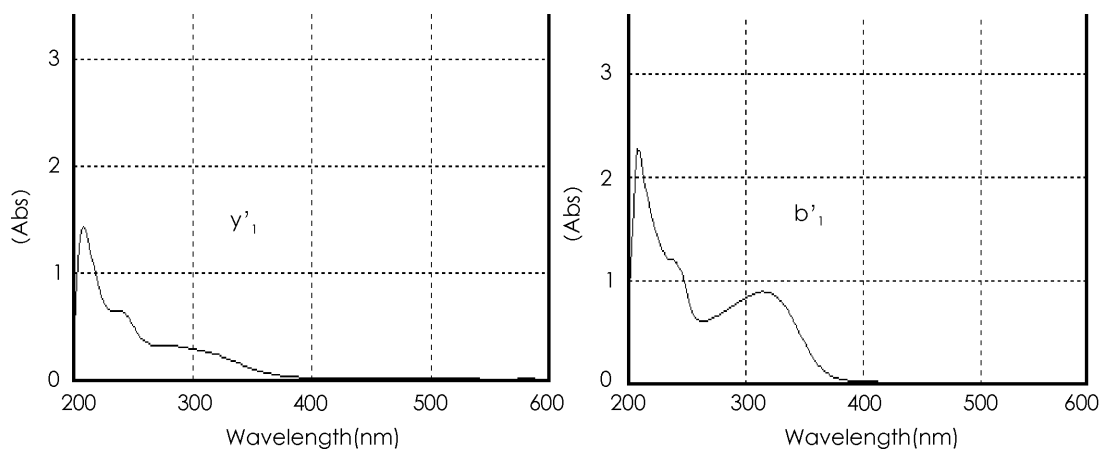


图 3 甘蓝型油菜种皮类黄酮化合物层析斑点 1(y'_1 、 b'_1)紫外光谱图

Fig. 3 The UV-Spectrum of the First Flavonoid Spot after Paper Chromatography

从纸层析结果可知, 黄籽和黑籽第 2 个斑点 R_f 值为 0.69, 在紫光灯下都不可见, 氨气熏后两者都呈淡黄绿色荧光, 由此可知两者为同一类物质. 并且根据此种现象初步判定它们也为异黄酮类物质, 又知其紫外吸收光谱(图 4)峰带 I 很弱, 在 305 nm, 峰带 II 在 245 nm. 又知黄酮类化合物带上糖苷后会使其比移率 (R_f 值)降低, 紫外光谱向短波移动^[4]. 由此得出黄籽和黑籽的第 2 个斑点都为异黄酮苷类物质.

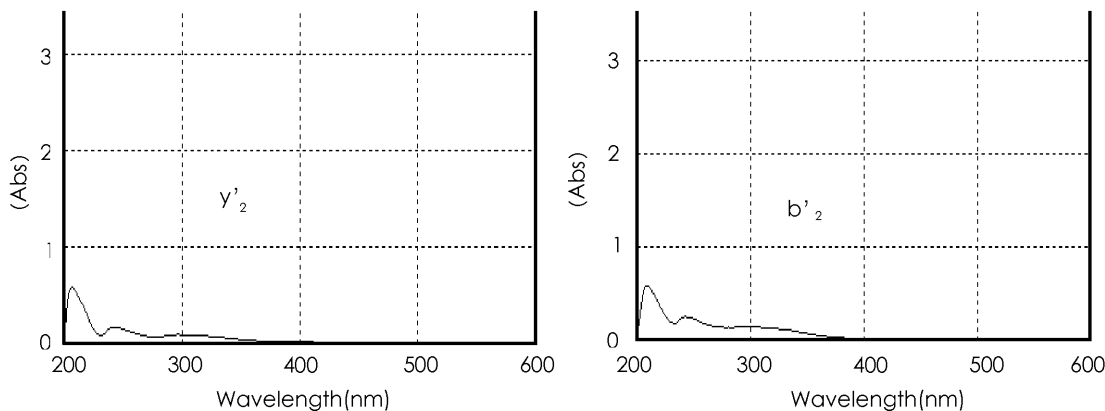


图 4 甘蓝型油菜种皮类黄酮化合物层析斑点 2(y'_2 、 b'_2)紫外光谱图

Fig. 4 UV-Spectrum of the Second Flavonoid Spot after Paper Chromatography

从纸层析结果得出, 黄籽第 3 个斑点和黑籽第 3 个斑点在紫光灯下显淡蓝色荧光, 氨气熏后紫光灯下观察呈明亮黄绿色荧光, 根据这种现象可初步判定两者为黄酮或黄酮醇类物质. 再根据两者紫外吸收光谱

(图 5)黄籽第 3 个斑点峰带 I 在 340 nm, 黑籽在 335 nm. 黄籽第 3 个斑点峰带 II 在 260 nm, 黑籽第 3 个斑点峰带在 255 nm. 与第 1 个斑点黄酮类相比有红移现象, 所以黑籽和黄籽第 3 个斑点都是黄酮醇类物质而非黄酮类物质, 其 R_f 值稍有差异可能是它们所带-OH 数目不同或取代位置不同所致.

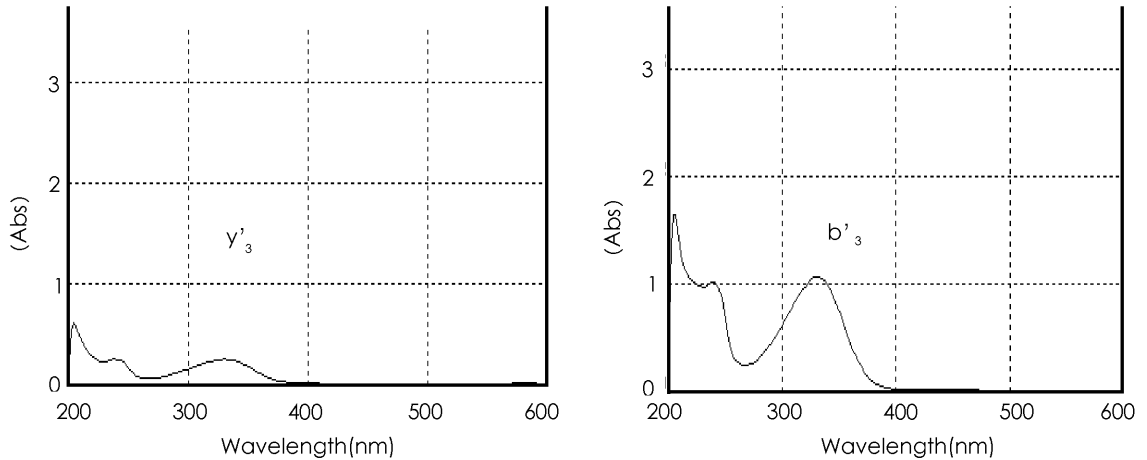


图 5 甘蓝型油菜种皮类黄酮化合物层析斑点 3(y'_3 、 b'_3)紫外光谱图

Fig. 5 The UV-Spectrum of the Third Flavonoid Spot after Paper Chromatography

从纸层析结果可得出, 黄籽第 4 个斑点和黑籽第 4 个斑点在紫光灯下都显深紫色, 氨气薰后都呈明亮黄绿色荧光, 又由资料知黄酮醇类和黄酮类化合物的糖苷在紫外光下呈深紫色, 经氨气处理后转为黄绿色^[7]. 由此可初步判定它们为黄酮或黄酮醇的苷类物质. 再看它们的紫外光谱(图 6)两者极相似, 纸层析观察结果相同, 说明两者是同一类物质, R_f 值稍有差异可能是由于所带糖苷数目或种类不同. 从紫外光谱可得斑点 4 的紫外光谱与黄酮紫外光谱相比有明显的红移现象, 所以它们是黄酮醇苷类而非黄酮苷类物质.

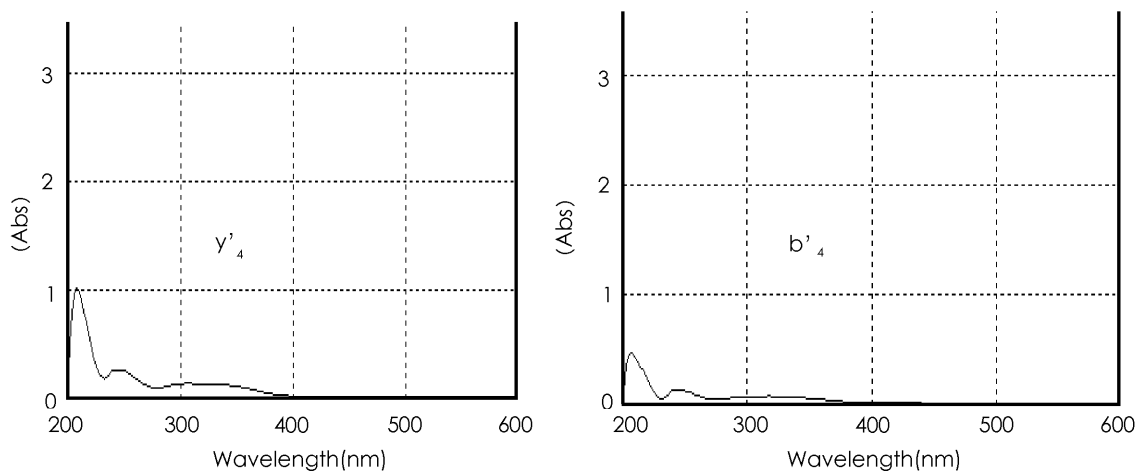


图 6 甘蓝型油菜种皮类黄酮化合物层析斑点 4(y'_4 、 b'_4)紫外光谱图

Fig. 6 The UV-Spectrum of the Forth Flavonoid Spot after Paper Chromatography

从以上纸层析观察, 紫外光谱分析, 总的来说黑籽和黄籽类黄酮类色素大种类上没有差异, 除含有花色素外, 还都含异黄酮, 黄酮醇类物质, 不同的是黄籽中含有大量异黄酮类物质, 而没有黄酮类物质, 而黑籽含有大量黄酮类物质, 两者都含有较多黄酮醇类物质, 这些物质都属于花黄色素, 这可能是使黄籽种皮呈黄色的原因, 而黑籽中虽然含有花黄色素, 但由于种皮中含有大量黑色素掩盖了黄色的表达, 所以我们看到的不是黄色, 而是黑色或褐色种皮.

3 讨论

类黄酮除了红色系的花色素外, 大部分为花黄色素的黄酮、黄酮醇和异黄酮. 花黄类色素是指黄酮

(醇)、异黄酮(醇)、二氢黄酮(醇)、查耳酮及二氢查耳酮和双苯吡酮类及其衍生物。胡晓君对花色素研究得比较清楚,甘蓝型油菜黑籽种皮中花色素主要包括矢车菊、锦葵素和飞燕草素^[8]。本研究对花黄色素系进行了纸层析分离及紫外光谱鉴定,结果表明:黑、黄籽种皮中都含有较多的黄酮醇,不同的是黄籽中含有较多的异黄酮,而不含有黄酮,而黑籽中含有较多的黄酮和较少的异黄酮,这说明甘蓝型黑、黄籽油菜种皮中类黄酮色素在大的代谢途径上没有差异。黑、黄籽间黄酮类色素种类上的差异可能是由于其种皮中所含色素形成酶的不同造成的。

以上这些色素都属花黄色素,黄籽种皮之所以呈现黄色是由于含有这些花黄色素的原因,而黑籽种皮虽然也含有较多的花黄色素,但由于其种皮含有大量的黑色素、多酚等深色物质,掩盖了花黄色素的颜色,使我们看到的不是黄色种皮而是黑色或褐色种皮。

所以甘蓝型油菜种皮中除含有花色素外,黑籽中还含有大量黄酮、黄酮醇,少量的异黄酮苷及黄酮醇苷。黄籽中含有大量的异黄酮、黄酮醇,少量的异黄酮苷和黄酮醇苷。黑、黄籽之间的差异是黄籽中不含黄酮而黑籽中含有大量黄酮,黑籽中仅含少量异黄酮苷而黄籽中含有大量异黄酮。

参考文献:

- [1] 陈玉萍,刘后利.甘蓝型油菜种籽发育进程中种皮色素含量动态变化[J].中国油料,1994,16(4):13-16.
- [2] 王汉中,刘后利.油菜皮壳中多酚氧化酶活性组织化学鉴定及其与粒色关系[J].中国油料,1991,1:30-32.
- [3] 李加纳,张学昆,谌利,等.不同遗传背景的甘蓝型油菜粒色遗传初步研究[J].中国油料作物学报,1988,20(3):16-19.
- [4] 叶小利,李加纳,唐章林,等.甘蓝型黑籽与黄籽油菜种皮发育过程中种皮色泽差异研究[J].中国油料作物学报,1991,23(3):38-45.
- [5] 梁艳丽.甘蓝型黄籽油菜种皮特性形成机理研究(硕士论文)[D].重庆:西南大学图书馆,2002:41.
- [6] KR.Markham. Techniques of flavonoid identification[M]. New York: Academic press, 1982.
- [7] 陈业高.植物化学成分[M].北京:化学工业出版社,2004:236.
- [8] 胡晓君.不同类型油菜品种种皮色素含量的关系研究(硕士论文)[D].武汉:华中农业大学图书馆,1988:31.

Isolation and Identification of Flavones in the Seedcoat of Rape (*Brassica Napus*)

DONG Cui-yue¹, WAN Hua-fang², LIANG Ying²

1. Pingyuan University, Xinxiang, Henan 453003, China;

2. Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: The flavones in *Brassica napus* testa were isolated and identified with paper chromatography and UV spectrophotometry, using yellow-and black-seeded oilseed rape varieties as the experimental materials. The results showed that anthocyanin, flavonol, isoflavone glycoside and flavonol glycoside were present as pigment components in the testa of both types of varieties. However, besides the pigments mentioned above, the black-seeded testa contained much more flavone than the yellow-seeded testa, and the yellow-seeded testa contained much more isoflavone than the black-seeded testa.

Key words: *Brassica napus*; paper chromatography; UV spectrophotometry; flavones