

氯化钡—分光光度法测定油菜籽 硫苷含量的研究*

黄继英 王绥璋 李素梅

(陕西省农业科学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要 利用生物统计方法对用于低硫苷油菜育种后代材料筛选、定量的氯化钡—分光光度法操作的可靠性及适用条件进行了分析, 结果表明: ①采用 1 次重复测定可对硫苷含量差值为 0.048 mg/g 的种子样品作出正确的分辨, 用于育种后代材料筛选; ②采用 2 次重复测定的平均值可对油菜一类种子的硫苷含量给出较准确的估计。

关键词 油菜, 硫苷分析, 氯化钡—分光光度法

中图分类号 Q946.839, S565.4

硫苷(原名硫代葡萄糖甙)是芸苔属植物种子中的有害物质。油菜种子破碎后, 在内源酶及自身水分和不同 pH 条件下, 能分解成毒性极强的腈、氰及恶唑烷硫酮等化合物。油菜籽中约含 3%~8% 的硫苷, 畜禽食后引起不同程度中毒。选育低硫苷品种是解决这一问题的有效途径。因此, 选择一种满足育种批量材料筛选及定性的快速、简易测定方法就成为一项关键技术。

由于育种的需要, 研究人员提出测定硫苷的方法很多, 包括直接测定硫苷, 测定解离产物葡萄糖、硫酸根及芥子油或其衍生物^[1~9, 11]。这些方法以不同测试条件满足不同研究要求均可得到相应效果。其中 W. Thies 提出并经中国农科院油料所引入、改进的氯化钡—分光光度法, 由于简易且适于批量育种材料测定, 已普遍用于国内油菜育种材料筛选^[1, 2, 4]。该方法基于氯化钡可与硫苷形成在酸性介质中较稳定的有色复合体, 然后在分光光度计 450 nm 波长处测出消光值, 最后根据复合体的消光值与硫苷含量的回归方程($y=12.22x-1.133$)或标准曲线图求出种子的硫苷含量。但是, 多年育种材料筛选测定发现, 由于操作过程中多种因素影响, 超常误差估计时有发生。如何对这一方法测定结果进行客观估计及保证在育种过程中应用, 未见报道, 本文将就此进行讨论。

1 材料和方法

将硫苷含量高(H)、低(L)不同的 2 个品种: ①分别以 100%(H)、90%(H)+10%(L)……10%(H)+90%(L)及 100%(L)的比例组成 11 个样品, 再用氯化钡—分光光度法分析其硫苷含量; ②以 2 个品种 100% 种子的 5 次重复分析平均值作为各自的理论值, 并以此计算其余 9 个样品的理论含量, 共得到 11 个样品的理论含量; ③将 11 个样品 5 次重复分析值再按 $C_5^1, C_5^2, C_5^3, C_5^4, C_5^5$ 可能组成的 5 组单次分析值, 10 组 2 次、10 组 3 次、5 组 4 次

收稿日期: 1994-12-10

* 陕西省“八五”攻关项目

及1组5次重复的平均值共31组,依次与理论组值进行成对 t 比较测验,计算出差数标准差($S_d = \sqrt{\frac{\epsilon d^2 - (\epsilon d)^2}{n(n-1)}}$)及 t 值($t = \sqrt{\frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S_d}}$)^[10]。当自由度 $D.F. = 11 - 1 = 10$ 时,以 $P = 0.05$, $t_{0.05} = 2.228$ 为标准,在测值 $t < 2.228$ 时,表示被测组与理论组硫苷含量一致,该方法分析的硫苷含量可靠、准确。

硫苷含量的测定是将定量烘干的样品于试管中,加入沸水并在 90°C 水浴中使种子内源酶钝化,同时提取硫苷,然后冷却、定容,过滤后加入氯化钡溶液,待充分形成有色复合体后,测定消光值和硫苷含量。

2 结果与分析

对31组氯化钡一分光光度法测定结果的统计分析可以看出(附表)。

1)5组单次测定结果的统计分析中,1组(I)的 $t_{0.05} = 2.5402$,大于2.228的界限,说明根据1次重复测定结果判断样品的硫苷含量,出现错误的机会为20%。但作为分辨差值为0.048 mg/g的11份样品的硫苷含的高、低趋势是完全正确的。

2)10组2次重复及10组3次重复测定的平均结果统计分析, $t_{0.05} = 1.4405 - 2.2022$,均小于误差界限2.228,也说明,根据2次重复测定结果的平均值估计所测样品的硫苷含量是可靠的。无疑,5组4次及1组5次重复的平均值更接近于理论含量(统计资料略)。

3 讨论

1)本文是在已往研究者对氯化钡一分光光度法作出肯定结论前提条件下,讨论消除误差、防止错误的操作技术。本研究设计的11份样品相邻硫苷含量值为0.048 mg/g,极差为0.48 mg/g,基本上符合低硫育种材料变异范围。

2)在熟练的操作技术条件下,利用氯化钡一分光光度法1次重复测定结果完全可以满足育种后代大量材料的筛选要求。对于少量高代材料硫苷含量估测可采用2次或3次重复的平均值得到可靠的结果。

3)为保证该方法定量的可靠性,应注意样品的前处理每一操作环节及电子仪器工作时的状态,内源酶的钝化,硫苷提取时间,称量及定容的准确性,并随时用标准样品校正仪器的稳定性等。

附表 样品的硫苷含量及 t 值

样品构成	硫苷含量 (ng/g)											Sd	t
	H ₁₀ +L ₀	H ₉ +L ₁	H ₈ +L ₂	H ₇ +L ₃	H ₆ +L ₄	H ₅ +L ₅	H ₄ +L ₆	H ₃ +L ₇	H ₂ +L ₈	H ₁ +L ₉	H ₀ +L ₁₀		
理论含量	0.756	0.708	0.660	0.612	0.564	0.516	0.468	0.420	0.372	0.324	0.276		
I	0.75	0.69	0.62	0.59	0.55	0.53	0.49	0.44	0.34	0.29	0.27	0.006545	1.6807
I	0.75	0.68	0.62	0.58	0.56	0.51	0.47	0.43	0.35	0.32	0.27	0.004724	2.5402
II	0.75	0.65	0.62	0.59	0.58	0.54	0.46	0.42	0.36	0.29	0.28	0.007394	1.6770
IV	0.76	0.66	0.63	0.60	0.58	0.53	0.47	0.43	0.35	0.29	0.27	0.006449	1.5506
V	0.77	0.66	0.63	0.59	0.57	0.52	0.47	0.43	0.35	0.30	0.29	0.006366	1.4138
I+I	0.750	0.685	0.620	0.585	0.555	0.520	0.480	0.435	0.345	0.305	0.270	0.005259	2.0917
I+II	0.750	0.670	0.620	0.590	0.565	0.535	0.475	0.430	0.350	0.240	0.275	0.006232	1.7651
I+IV	0.755	0.675	0.625	0.595	0.565	0.530	0.480	0.435	0.345	0.290	0.270	0.006023	0.9924
I+V	0.760	0.675	0.625	0.590	0.560	0.525	0.480	0.435	0.345	0.295	0.280	0.005423	1.8441
II+II	0.750	0.665	0.620	0.585	0.570	0.525	0.465	0.425	0.355	0.305	0.275	0.005506	2.1794
II+IV	0.755	0.670	0.625	0.590	0.570	0.520	0.470	0.430	0.350	0.305	0.270	0.005099	2.1573
II+V	0.760	0.670	0.625	0.585	0.565	0.515	0.476	0.430	0.350	0.310	0.280	0.005539	1.9859
III+IV	0.755	0.655	0.625	0.595	0.580	0.535	0.465	0.425	0.355	0.240	0.275	0.006491	1.8487
III+V	0.760	0.655	0.625	0.590	0.575	0.530	0.465	0.425	0.355	0.295	0.285	0.006656	1.6526
IV+V	0.765	0.660	0.630	0.595	0.575	0.525	0.470	0.430	0.350	0.295	0.280	0.006248	1.4405
I+I+II	0.750	0.673	0.620	0.587	0.563	0.527	0.473	0.430	0.350	0.300	0.273	0.005449	2.2022
I+I+IV	0.753	0.677	0.623	0.590	0.563	0.523	0.477	0.433	0.347	0.300	0.270	0.005266	1.8990
I+I+V	0.757	0.677	0.623	0.587	0.560	0.520	0.477	0.433	0.347	0.303	0.277	0.005311	1.8829
I+II+IV	0.753	0.667	0.623	0.593	0.570	0.533	0.473	0.430	0.350	0.293	0.273	0.006170	1.7828
I+II+V	0.757	0.667	0.623	0.590	0.567	0.530	0.473	0.430	0.350	0.293	0.280	0.006107	1.8012
I+IV+V	0.760	0.670	0.627	0.593	0.567	0.527	0.477	0.433	0.347	0.293	0.277	0.005700	1.7544
II+II+IV	0.753	0.663	0.623	0.590	0.573	0.527	0.467	0.427	0.353	0.300	0.273	0.005736	2.0921
II+II+V	0.757	0.663	0.623	0.587	0.570	0.523	0.467	0.427	0.353	0.303	0.280	0.005719	1.9234
II+IV+V	0.760	0.667	0.627	0.590	0.570	0.520	0.470	0.430	0.350	0.303	0.277	0.005403	1.8508
II+IV+V	0.760	0.657	0.627	0.593	0.577	0.530	0.467	0.427	0.353	0.293	0.280	0.00587	1.5181

H: 高硫苷品种 89-680, I, II: 低硫苷品种 D₈₀. $S_d = \sqrt{\frac{\sum d^2 - (\sum d)^2/n}{n(n-1)}}$ $t = \sqrt{\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_d}}$ D.F. = 11-1=10 $t_{0.05} = 2.228$

当测值 $t > 2.228$ 时, 差异显著 (*)

参 考 文 献

- 1 中国农科院油料所油菜品质育种组. 氯化钯快速测定油菜籽硫代葡萄糖甙. 中国油料, 1982, (2): 74
- 2 中国农科院油料所油菜品质育种组. 菜籽饼异硫氰酸盐和恶唑烷硫酮的定量测定. 中国油料, 1982, (4): 3~13
- 3 杨伟雄. 硫代葡萄糖甙的降解化学及分析进展. 中国油料, 1983(3): 76~85
- 4 中国农科院油料所油菜品质育种组. 氯化钯法定量测定油菜籽中的硫代葡萄糖甙. 中国油料, 1983, (4): 69~70
- 5 吴新镛. 利用反射仪快速定量油菜籽中硫甙总量. 中国油料, 1987, (3): 61~62
- 6 肖能遑编译. 测定油菜籽硫甙的方法《第七届国际油菜会议文摘》选译. 中国油菜, 1987, (3): 91
- 7 彭良才, 吴新镛, 徐瑞芳. 油菜硫代葡萄糖甙分析方法的改进和应用. 中国油料, 1978(1): 28~61
- 8 吴新镛, 沈仕学, 夏伏建. 油菜硫代葡萄糖甙组成及含量测定—高效液相色谱法(HPLC). 中国油料, 1990(4): 34~37
- 9 官春云编著. 油菜品质改良和分析法. 长沙: 湖南科技出版社, 1985
- 10 童一中编著. 作物育种常用的统计分析法. 上海: 上海科技出版社, 1978
- 11 Sang J. P. et al. Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede, Can J Plant Sci. 1984, 64: 77~93

Determination of Glucosinolate Content in Rapeseed with Palladium Chloride-Spectrometry Method

Huang Jiying Wang Shuzhang Li Sumei

(Shaanxi Academy of Agricultural Sciences, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract The reliability of palladium chloride-spectrometry method and its application condition in material screening with low glucosinolate in rapeseed breeding have been discussed with statistical method in this paper. The results show that: 1. determination with one repetition can produce a correct differentiation for total glucosinolate content of Brassicas oil seeds with different values of 0.048 mg/g for the material screening in early generation; 2. average value determined with two repetitions can result in an accurate estimate for Brassicas oil seed.

Key words rapeseed, glucosinolate analysis, palladium chloride spectrometry