

植物体内结合态对氨基苯磺酸钠测定方法的研究

张炼辉 林孔勋

(植保系)

提 要

为明确对氨基苯磺酸钠对不同植物体内叶酸合成选择性抑制的作用机制,有必要检测该化合物进入植物体内后是否形成了结合态对氨基苯磺酸钠,但是目前尚无直接测定结合态对氨基苯磺酸钠的方法。本研究在李禄先等测定小麦体内对氨基苯磺酸钠总含量的方法(I法)基础上提出了测定植物体内游离对氨基苯磺酸钠含量的方法(II法),并对I法作了三点改进:①用0.2M磷酸钠缓冲液(pH7.2)代替蒸馏水提取植物细胞内含物;②用30%三氯乙酸代替盐酸水解样品;③不用氢氧化钠。从而克服了采用I法时由于长豇豆体内干扰因子的影响而使测定值显著偏低的缺点。这种改进方法对结合态对氨基苯磺酸(对乙酰氨基苯磺酸)有很强的水解能力,可将对氨基苯磺酸从其结合状态中完全释放出来,而且,对于只含有游离态对氨基苯磺酸钠的植物样品,改进方法和测定游离态药物的I法的测定结果无差异($P=0.1$)。这表明改进方法是一个测定植物体内对氨基苯磺酸钠总含量的理想方法,可以和测定游离态药物的I法配合用以检测植物体内的结合态对氨基苯磺酸钠。

前 言

我们过去的试验表明,施用对氨基苯磺酸钠后,花生体内叶酸合成严重受抑制,而长豇豆体内的叶酸合成未受干扰。但该化合物对这两种豆科植物中叶酸合成选择性抑制的原因尚不明确。已经发现,磺胺类药物进入生物体内之后,其芳伯氨基有可能与蝶呤或乙酰基结合形成复合物^{[4][5][7]}。蝶呤是叶酸的组成成分,而磺胺类药物乙酰化后则不能与对氨基苯甲酸竞争而失去抑制叶酸合成的活性。因此,了解对氨基苯磺酸钠在植物体内能否形成以及形成哪一种复合物,显然有助于进一步阐明该化合物选择性抑制这两种植物体内叶酸合成的作用机制。但至今还没有直接测定上述两种复合物的方法。

Marshall^[8]首先提出了测定芳伯氨基与乙酰基结合的磺胺类药物的间接方法。其原理是,磺胺类药物的芳伯氨基经乙酰化转变为芳酰胺基后,不能进行重氮—偶氮化显色,据此,可先测定样品中游离药物的含量。但经盐酸水解后,原来处于结合状态的

本文承蒙范怀忠教授、李明启教授和广东省农科院周亮高研究员审阅,那仲老师提出了宝贵意见并予大力帮助,均此致谢。

1985年12月14日收稿

药物的芳伯氨基可游离出来参加上述反应，此时的测定值为样品中药物的总含量。总含量与游离药物含量的差即为样品中乙酰化药物的量。而这种方法不是特异性的，因为磺胺类药物的芳伯氨基与很多分子之间的共价键都可以在酸性加热条件下被打断。我们在实验中确也发现，叶酸样品中大部分对氨基苯甲酸与蝶呤之间的—NH—CH₂—键可以在同样条件下断裂。看来，这种方法可能也适用于检测植物体内是否存在与蝶呤类化合物结合的磺胺类药物。

六十年代初期，李禄先等^[1]根据Brotton和Marshall^[3]测定血液中磺胺总含量的方法原理，拟定了测定小麦体内对氨基苯磺酸总含量的方法(以下简称I法)。按Brotton和Marshall^[3]测定游离磺胺的方法原理，在I法中除去加盐酸在100℃水解和水解后用氢氧化钠中和多余盐酸这两个分析步骤，即为测定植物体内游离磺胺类药物的方法(以下简称II法)。从理论上来说，根据I法和II法对同一样品的测定值，就可以知道样品中结合态对氨基苯磺酸钠的含量，但我们在对花生和长豇豆进行的预备试验中发现，I法对长豇豆叶提取液(无酶蛋白)中的定量对氨基苯磺酸钠的测定值可复性(recovery)很不理想，测定值显著偏低，显然有必要加以改进。据此，本文提出了几种改进方法，并检验了它们和测定游离态药物的II法配合测定植物体内结合态对氨基苯磺酸钠的可行性。

材 料 和 方 法

(一) 供试植物

花生 (*Arachis hypogaea* Linn. 粤油551—116)，长豇豆 (*Vigna sesquipedalis* (L.) Fruwirth 齐尾青)；温室内盆栽，至花生第四复叶，长豇豆第三复叶展开后，采集花生第三复叶，长豇豆第二复叶供作测定材料。

(二) 供试药剂

对氨基苯磺酸钠(97%工业品)。

(三) 试剂及使用浓度

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠，0.2M缓冲液(pH7.2)，1N盐酸，2N氢氧化钠，0.2%皂素，30%三氯乙酸，0.1%亚硝酸钠，0.1%氨磺酸铵，0.5%N甲萘基乙二胺，发烟硫酸，乙酰苯胺，无水乙醇；对乙酰氨基苯磺酸，参照地巴唑的合成方法^[2]进行合成：将干燥的烧瓶置于冰水浴中，加入30克发烟硫酸，将7.5克乙酰苯胺分次(约每隔2~3分钟)少量加入，加样后用玻棒充分搅拌，待乙酰苯胺溶于发烟硫酸后，再继续加样，整个加样过程注意保持反应温度在15℃以下；加样完毕后，将烧瓶置于65~75℃水浴中，反应持续20分钟后，将烧瓶取出，冷却至室温，倒入盛有120克冰的烧瓶中，同时不断搅拌，对乙酰氨基苯磺酸呈白色结晶析出；将白色结晶转移至放有双层滤纸的漏斗中，用80毫升无水乙醇反复搅拌淋洗，以去除未参加反应的乙酰苯胺和硫酸；然后用20毫升蒸馏水淋洗，收集滤液，去除不溶或难溶于水的杂质；重复上述做法将滤液倒入100克冰中重结晶，用50毫升无水乙醇淋洗；然后将对乙酰氨基苯磺酸结晶转移至烧杯中，真空减压干

燥至恒重, 产品为白色粉末状物。

(四) 仪器

岛津uv-120-02分光光度计。

(五) 对氨基苯磺酸钠标准药液的制备

(1) 对氨基苯磺酸钠水溶液: 用蒸馏水分别配制每毫升含对氨基苯磺酸钠 0、20、40、60、80、100微克的溶液;

(2) 对氨基苯磺酸钠缓冲液溶液: 改用磷酸钠缓冲液作为溶剂, 做法同上。

(六) 植物组织提取液的制备

(1) 植物组织水提取液: 称取未施药的花生或长豇豆叶片 1 克, 加蒸馏水 20 毫升制成匀浆, 置离心管中离心 15 分钟 ($3000 \times g$), 取出上清液定容至 25 毫升; 吸取 20 毫升上清液, 加皂素 10 毫升, 三氯乙酸 10 毫升, 再次离心, 上清液即为无酶蛋白的植物组织提取液。

(2) 植物组织缓冲液提取液, 改用磷酸钠缓冲液代替蒸馏水作为提取溶剂, 其它做法同上。

试验结果

(一) I 法对长豇豆样品中定量对氨基苯磺酸钠的测定值偏低的原因

用两组具塞定量试管, 各吸取植物提取液或蒸馏水 1 毫升, 并加不同浓度的对氨基苯磺酸钠水溶液 1 毫升, 分别用 I 法和 II 法进行测定*, 结果见表 1、表 2。

试验结果表明, II 法对不同植物样品中定量对氨基苯磺酸钠的测定值与对照无显著差异, 但 I 法对长豇豆样品的测定值比对照极显著偏低。显然, 长豇豆体内存在干扰 I 法测定的某种因子。由于 I 法比 II 法仅仅多了加盐酸在 100°C 水解及加氢氧化钠中和这两个反应步骤, 因此, 从长豇豆体内的干扰因子仅影响 I 法测定, 而不影响 II 法这个事实可以推测, 它的干扰作用可能与盐酸水解反应或氢氧化钠中和反应有关。

表 1 I 法对不同植物样品中定量对氨基苯磺酸钠测定结果*

对氨基苯磺酸钠 浓度 (微克/毫升)	光 密 度		
	花生水提取液	长豇豆水提取液	蒸馏水(对照)
20	0.200±0.001	0.162±0.002**	0.205±0.000
60	0.601±0.002	0.429±0.001**	0.601±0.001
100	0.958±0.001	0.768±0.002**	0.961±0.002

* 测定时, 对氨基苯磺酸钠水溶液 1 毫升加植物提取液或蒸馏水 1 毫升。表中数字为 2 重复平均值 (±标准差)。植物样品与对照差异极显著 ($P=0.01$)。

在 I 法中原来是采用 500~520mu 滤光片比色, 但我们发现对氨基苯磺酸钠的化学显色物的吸收峰原在 545mu, 因此, 在本研究中均改在 545mu 进行测定。

表2 I法对不同植物样品中定量对氨基苯磺酸钠的测定结果*

对氨基苯磺酸钠浓度 (微克/毫升)	光 密 度		
	花生水提取液	长豇豆水提取液	蒸馏水(对照)
20	0.209±0.002	0.206±0.001	0.209±0.000
60	0.608±0.001	0.613±0.003	0.601±0.001
100	0.967±0.002	0.964±0.002	0.964±0.001

*测定时, 对氨基苯磺酸钠水溶液1毫升加植物提取液或蒸馏水1毫升。表中数字为2个重复平均值(±标准差)。植物样品测定值与对照无显著差异($P=0.05$)。

(二) 几种不同改进方法的比较

基于I法对长豇豆样品中定量对氨基苯磺酸钠的测定值偏低原因的分析, 我们试验了三种不同的改进方法: (1) 对氨基苯磺酸钠水溶液1毫升, 加植物组织水提取液1毫升, 按I法分析步骤, 但在加盐酸100°C水解之后不加氢氧化钠; (2) 对氨基苯磺酸钠水溶液1毫升, 加植物组织水提取液1毫升, 按I法分析步骤, 但样品的水解用2毫升三氯乙酸代替盐酸, 不加氢氧化钠; (3) 对氨基苯磺酸钠缓冲液溶液1毫升, 加植物组织缓冲液提取液1毫升, 按I法分析步骤, 但改用三氯乙酸2毫升代替盐酸水解样品, 不加氢氧化钠。

从表2可以看出, II法测定过程不受干扰因子的影响, 而对I法进行改进的目的在于寻找一种能和II法配合测定植物体内结合态对氨基苯磺酸钠的方法, 因此, 在改进试验中, 我们以II法测定值作为对照, 理想的改进方法是, 当样品中只存在游离态的磺胺类药物时, 它的测定结果与II法一致; 当测定结合态磺胺类药物时, 它又有强的水解能力, 能使磺胺类药物从结合状态中全部游离出来, 参加显色反应。

试验结果见表3、4、5、6和7。可以看出, 改进方法(3)可以很好地消除长

表3 改进方法(1)与I法对长豇豆样品中定量对氨基苯磺酸钠的测定结果*

对氨基磺酸钠浓度 (微克/毫升)	光 密 度	
	改进方法 (1)	I法
20	0.177±0.001	0.206±0.000
40	0.345±0.002	0.408±0.001
60	0.505±0.002	0.603±0.002
80	0.661±0.001	0.790±0.001
100	0.834±0.002	0.964±0.001

*测定时, 对氨基苯磺酸钠水溶液1毫升加长豇豆叶水提取液1毫升。表中数字为2个重复平均值(±标准差)。两种方法的测定结果有显著差异($P=0.01$)。

表4 改进方法(2)与I法对长豇豆样品中定量对氨基苯磺酸钠的测定结果*

对氨基苯磺酸钠浓度 (微克/毫升)	光 密 度	
	改进方法 (2)	I法
20	0.186±0.001	0.206±0.000
40	0.357±0.001	0.408±0.001
60	0.518±0.002	0.603±0.002
80	0.685±0.001	0.790±0.001
100	0.860±0.002	0.964±0.001

*测定时, 对氨基苯磺酸钠水溶液1毫升加长豇豆叶水提取液1毫升。表中数字为2个重复平均值(±标准差)。两种方法的测定结果有显著差异($P=0.01$)。

豇豆体内干扰因子对对氨基苯磺酸钠含量测定的影响, 在花生和长豇豆样品的测定中, 改进方法(三)和II法的测定结果在 $P=0.1$ 水平上差异都不显著(表5、6)。而且两法对不同浓态的对氨基苯磺酸钠含量的测定结果的相关系数均大于0.99, 这说明在测定浓度范围内, 浓度和光密度之间存在着很好的线性关系。从比较I法和改进方法(1)、改进方法(2)的测定结果(表1、3、4), 还可以认为, 关于长豇豆体内干扰因子的作用与盐酸水解反应或氢氧化钠中和反应有关的推测是正确的。

表7的结果表明, 改进方法(8)对对乙酰氨基苯磺酸样品中对氨基苯磺酸含量的测定值与理论值的相对误差在1.3~2.4%之间, 而绝对误差平均值仅为-0.33。考虑到Brotton-Marshall方法的误差率为2%^[6], 因此, 可以认为三氯乙酸能够将样品中的对氨基苯磺酸从其结合状态中全部释放出来。

从比较表2、表5和表6中II法对花生和长豇豆样品中对氨基苯磺酸钠的测定结果, 可以看到, 缓冲液对II法测定过程没有影响。因此, 应用此法时, 可根据具体情况考虑采用蒸馏水或磷酶钠缓冲液提取植物样品均可。

讨论和结论

本研究在李禄先等¹⁾测定小麦体内对氨基苯磺酸总含量的方法(I法)基础上试验了三种不同的改进方法, 结果表明, 其中改进方法(8), 亦即对I法作三点改进: (1)改用0.2M磷酸钠缓冲液(PH7.2)代替蒸馏水提取植物细胞内含

表5 改进方法(8)与II法对长豇豆样品中定量对氨基苯磺酸钠的测定结果*

对氨基苯磺酸钠浓度 (微克/毫升)	光 密 度	
	改进方法 (8)	II法
20	0.196±0.001	0.202±0.000
40	0.394±0.001	0.403±0.001
60	0.587±0.001	0.600±0.001
80	0.776±0.001	0.788±0.000
100	0.949±0.002	0.963±0.002

*测定时, 对氨基苯磺酸钠缓冲液1毫升加长豇豆叶缓冲液提取液1毫升。表中数字为2个重复平均值(±标准差)。两种方法的测定值无差异($P=0.1$)。

表6 改进方法(8)与II法对花生样品中定量对氨基苯磺酸钠的测定结果*

对氨基苯磺酸钠浓度 (微克/毫升)	光 密 度	
	改进方法 (8)	II法
20	0.206±0.000	0.208±0.002
40	0.403±0.002	0.400±0.001
60	0.605±0.002	0.599±0.003
80	0.778±0.000	0.782±0.001
100	0.957±0.001	0.959±0.001

*测定时, 对氨基苯磺酸钠缓冲液溶液1毫升加花生叶缓冲液提取液1毫升。表中数字为2个重复平均值(±标准差)。两种方法的测定结果无差异($P=0.1$)。

表7 改进方法(8)对对乙酰氨基苯磺酸分子中对氨基苯磺酸含量的测定结果*

对乙酰氨基 苯磺酸 (微克)	对氨基苯磺酸(微克)		相对误差%
	理论值	测定值	
20	16.47	16.87±0.24	2.4
60	49.40	50.39±0.57	2.0
100	82.33	81.26±0.75	1.3

*表中测定值为8个重复平均值(±标准差)理论值按对氨基苯磺酸分子量/对乙酰氨基苯磺酸分子量=177.19/215.22计算。

物，(2)改用30%三氯乙酸代替盐酸水解样品，(3)不加氢氧化钠，可以克服I法对长豇豆样品测定值偏低的缺点。对于只存在游离态对氨基苯磺酸钠的不同植物样品，改进方法(3)和测定游离态的II法的测定结果无差异(表5、表6)；而对于处于结合状态的药物，改进方法(3)又有很强的水解能力，可将对氨基苯磺酸从其结合状态中全部释放出来参加显色反应(表7)。显然，改进方法(3)是一种测定植物体内对氨基苯磺酸钠总含量的理想方法，可以和II法配合检测植物体内的结合态对氨基苯磺酸钠。

I法对长豇豆样品测定值偏低的原因可能是由于该植物体内存在某种干扰因子。从比较表1和表3、4的结果，可以认为干扰因子的作用与盐酸水解或氢氧化钠中和反应有关，或者说这种盐酸水解及氢氧化钠中和反应的反应条件有利于干扰作用，而反应系统中磷酸钠缓冲液的存在及用三氯乙酸水解样品则可抑制这种干扰因子发挥作用(表4、5)。Brotton和Marshall^[3]在测定血液中的磺胺含量时，也曾注意到测定值偏低的现象，但未提出克服这种干扰作用的有效方法。干扰因子是什么物质，其性质及作用方式如何，目前尚不清楚。

参 考 文 献

- [1] 李禄先、陶增鑫、薛世金：对氨基苯磺酸防治小麦锈病的物理和化学的研究，《植物病理学报》，(2) 1964：89~107。
- [2] 南京医学院主编：《药物化学》，322，人民卫生出版社，1978年。
- [3] Brotton, A. C. and Marshall, J. E. K. 1939. A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.* 128 (2) : 536—540.
- [4] Brown, G. M. 1962. The biosynthesis of folic acid II, Inhibition by sulfanamides. *J. Biol. Chem.* 237 (2) : 536—540.
- [5] Crowdy, S. H. and Jones, D. R. 1958. The translocation of sulphonamides in higher plants II: Acetylation and deacetylation of sulphaniilamide in broad beans and wheat. *J. Expt. Bot.* 9 (26) : 220—228.
- [6] Hutchings, B. L., Stokstad, E. L. R. and Booth, J. H. 1947. A Chemical method for the determination of pteroylglutamic acid and related compounds. *J. Biol. Chem.* 168 : 705.
- [7] Jones, R. D. and Wignall, J. 1955. Acetylation of sulfanilamide in plants. *Nature* 175 : 207—208.
- [8] Marshall, E. K., Cutting, W. C. and Emerson, K. 1937. Acetylation of para-aminobenzene-sulfonamide in the animal organism. *Science* 85(2199) : 202—203.

STUDIES ON THE METHOD OF DETERMINATION OF CONJUGATED SODIUM SULFANILATE IN PLANTS

Zhang Lianhui Lin kunghsun

(Department of Plant Protection)

ABSTRACT

In order to elucidate the inhibitory effect of sodium sulfanilate on the biosynthesis of folic acid in different plants, it is necessary to demonstrate if there is formation of sodium sulfanilate-conjugated compound. Due to the unavailability of a method for testing the conjugate of sodium sulfanilate, a modified one of Li's method (method I), which is traditionally used to determine the total content of sulfanilic acid in wheat, was developed for analyzing the total content of the test compound, including bound and free ones. The modifications were (1) 0.2 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.2) was used for the extraction of plant tissue instead of distilled water; (2) thirty percent trichloroacetic acid was used for hydrolysis of bound sodium sulfanilate instead of HCl; and (3) no NaOH was used. Free sodium sulfanilate in plant tissue was quantitatively analyzed by Li's method with a deletion of the procedures of HCl hydrolysis and NaOH neutralization. Such method was termed method II. The original Li's method was found not suitable for analyzing sodium sulfanilate in asparagus long bean plant, showing an under-recovery of the test compound added to the sap of the plant. But the modified method was shown to be excellent in overcoming the defect of Li's method. The cause of under-recovery is thought to be the presence of some unknown interfering factors in the plant. Both the modified method and method II can be used to determine the content of free sodium sulfanilate added to cell sap (no enzyme) of different plants without any significant difference ($P=0.1$). These facts indicate that the modified method in combination with method II can be used to determine bound sodium sulfanilate in plant.