

表面活性剂增敏--牛血清白蛋白荧光猝灭法测定槐花中芦丁含量

刘桂林¹ 杨慧仙^{2△} 魏竞智²

(1 岳阳市云溪区血吸虫病防治站 湖南 岳阳 414009; 2 南华大学公共卫生学院 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:应用牛血清白蛋白荧光猝灭法建立一种测定槐花中芦丁含量的新方法。方法:牛血清白蛋白(BSA)具有很强的内源荧光性,而芦丁溶液本身不产生荧光。当芦丁与 BSA 结合后,会导致其荧光强度下降,表面活性剂吐温-80(T-80)对体系有促进荧光猝灭作用。BSA 在 $\lambda_{\text{ex}}=338\text{ nm}$ 处的荧光猝灭程度与芦丁的量在一定浓度范围内呈良好的线性关系,据此建立测定槐花中芦丁含量的新方法。结果:该结合物的最大发射波长为 $\lambda_{\text{max}}=338\text{ nm}$,与芦丁摩尔浓度在 $6\times 10^{-7}\sim 3.0\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好。其线性回归方程为 $\Delta F=136.36\text{ CRu}(\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})-0.5454$,相关系数 $r=0.9976$,检出限为 $1.58\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,RSD 为 2.8%~4.3%,加标回收率为 97.6%~101.2%。结论:本方法操作简便、快速,用于实际样本的测定,结果满意。

关键词: 芦丁;牛血清白蛋白(BSA);荧光猝灭;T-80

中图分类号:R284 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-354-03

Determination of Rutin in FlosSophorae by Bovine Serum Albumin Fluorescence Quenching Method

LIU Gui-lin¹, YANG Hui-xian^{2△}, WEI Jing-zhi²

(1 Yueyang Yunxi institute of schistosomiasis prevention and cure, Yueyang, Huann 414009, China;

2 School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate a new method to detect the rutin in flos sophorae by fluorescence quenching of bovine serum albumin. **Methods:** The Bovine serum albumin (BSA) has a strong intrinsic fluorescence because of tryptophan and tyrosine. The fluorescence intensity of BSA decreased when the rutin combination with the BSA, and surface-active agent tween-80 (T-80) enhanced the fluorescence quenching on the system. In a certain range, the fluorescence quenching of BSA in the $\lambda_{\text{ex}}=338\text{ nm}$ has a good linear relationship with the concentration of rutin. The new method to detect the rutin in flos sophorae was established. **Results:** The conjugate of BAS and rutin had a max fluorescence value at 338 nm which was found the decreased intensity of fluorescence at 338nm was proportion to rutin in the range of $6\times 10^{-7}\sim 3.0\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The linear regression equation was $\Delta F=136.36\text{ CRu}(\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})-0.5454$ with a correlation coefficient of 0.9976. The detection limit was $1.58\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The relative standard deviation was 2.8%~4.3% and the average recovery of sample was 97.6%~101.2%. **Conclusion:** The method was simple and rapid. It can be applied to detect the trace rutin in flos sophorae with satisfactory results.

Key words: Rutin; Bovine serum albumin (BSA); Fluorescence quenching; T-80

Chinese Library Classification(CLC): R284 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-354-03

前言

芦丁为黄酮类化合物(Flavonoids)是色原酮或色原烷的衍生物,具有增强免疫功能、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等生理活性^[1-2],为人体所必需的营养素之一,其在槐花中的含量很高,了解槐花中芦丁的含量可以为人们科学饮食或进行营养搭配提供理论依据,因此建立槐花中芦丁含量的测定方法具有重要的意义。

目前,测定芦丁的方法主要有:分光光度法^[3],高效液相色谱法^[4],电化学方法,卡尔曼滤波光度法,薄层扫描法,单扫示波极谱法,毛细管电泳法^[5]等。然而槐花中芦丁的测定方法很少文献报道,本研究采用表面活性剂增敏-牛血清白蛋白荧光猝灭

法测定槐花中芦丁含量,方法灵敏度高,结果准确,简便易行,且试剂和仪器易获得。

1 资料与方法

1.1 实验试剂

牛血清白蛋白(BSA)标准储备溶液(090119,上海蓝季科技发展有限公司):称取 0.0340 g BSA 于小烧杯中,加入少量 B-R 缓冲液溶解,转移至 50 mL 容量瓶中,并用缓冲液定容至刻度,所得溶液浓度为 $1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,标准工作溶液由标准储备液稀释至 $0.75\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。不同 pH 值的标准 B-R 缓冲液。所用试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中,依次加入 $0.75\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 溶液 0.5 mL, $1.95\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ T-80 表面活性剂 0.5 mL 和一定量的芦丁标准工作溶液, pH 值 9.37 的 B-R 缓冲液定容至 5 mL 刻度。将比色管置于室温(22 ℃)15 min 后,荧光分光光度

作者简介:刘桂林(1973-),女,主管技师。

电话:0730-8476480,13077151076,E-mail:511581080@qq.com

△通讯作者:杨慧仙,E-mail: xianer1013@126.com

(收稿日期:2010-10-02 接受日期:2010-10-25)

计上进行波长扫描,得到荧光光谱。在 $\lambda_{\text{ex}}=338.0 \text{ nm}$ 处测量溶液的荧光强度 F 和试剂空白 F_0 , ($\Delta F=F_0-F$)。

2 结果

2.1 荧光光谱

BSA 的荧光强度随着芦丁含量的增加而逐渐减弱,在 $\lambda_{\text{ex}}=338 \text{ nm}$ 处荧光峰的荧光强度减弱且与芦丁含量有良好的线性关系,如图 4(曲线 0-9)。

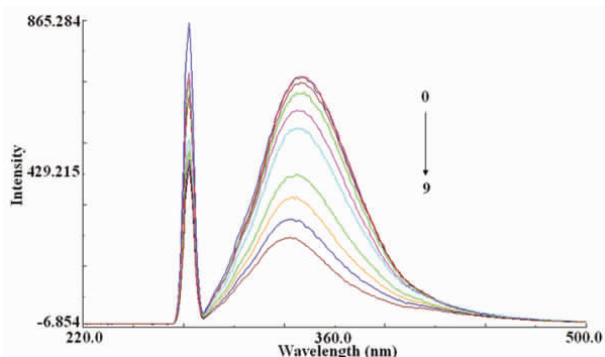


图 1 荧光光谱 $\lambda_{\text{ex}}=338 \text{ nm}$, CBSA= $0.75 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CRu($\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 0,0.06,0.18,0.3,0.6,1.2,1.8,2.4,3.0,3.6 CT-80= $1.95 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 1 Dimensions spectra of the system ($\lambda_{\text{ex}}=338 \text{ nm}$, CBSA= $0.75 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CRu($\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 0,0.06,0.18,0.3,0.6,1.2,1.8,2.4,3.0,3.6 CT-80= $1.95 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.2 实验条件的优化

2.2.1 表面活性剂的影响 分别试验了十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTMAB)、聚乙烯醇(PVA)、乳化剂(OP)、CR、吐温-80(T-80)、吐温-20(T-20)、 β -环糊精(β -CD)等多种表面活性剂。结果表明,T-80 表面活性剂对荧光猝灭的促进效果最好, F 最大,故确定 T-80 作为本实验的增敏剂。然后进一步试验不同浓度 T-80 对荧光猝灭的影响。实验结果如图 5, 当 T-80 浓度为 $1.95 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, F 出现最大值, 故而选择浓度为 $1.95 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 T-80 为增敏剂。

2.2.2 BSA 浓度的影响 试验了浓度分别为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.75 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.25 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液。通过实验发现:浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 F 有最大值。但仪器最大值测量值为 1000, 对照组为 983, 过于接近上限, 故选择浓度为 $0.75 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 缓冲体系的影响 试验了 B-R 缓冲液与磷酸钾盐缓冲液, 得出在 B-R 缓冲液猝灭效果较好, 进而确定其最佳 pH 值, 结果如图 6, 当 pH 值为 9.37 时, F 出现最大值, 故而选择 pH 为 9.37 的 B-R 缓冲液。

2.2.4 反应温度及时间的影响 按照实验方法配制溶液, 分别准确控制反应温度为 18°C , 22°C , 40°C , 发现 22°C 时体系的荧光猝灭值最大, 故选用 22°C 作为反应体系的最佳温度。在反应温度 22°C 时的条件下, 研究了反应时间对反应体系的影响, 得出结果: 反应时间在 10 min 后, F 值达到最大且 2 h 内基本稳定。故实验选择反应时间为 15 min, 在 2 h 内完成测定。

2.2.5 试剂加入顺序的影响 分别按(1)BSA, T-80, 芦丁, B-R;

(2)BSA, 芦丁, T-80, B-R; (3) 芦丁, T-80, BSA, B-R; (4) B-R, BSA, T-80, 芦丁, B-R; (5) B-R, BSA, 芦丁, T-80, B-R; (6) B-R, 芦丁, T-80, BSA, B-R; 六种顺序加入试剂, 由实验结果可看出: 按顺序(1)BSA, T-80, 芦丁, B-R 加入试剂 F 出现最小值, 即 F 出现最大值, 故确定顺序(1)为本实验加入顺序。

2.2 共存物质的影响

在 BSA, T-80, 芦丁的浓度分别为 $0.75 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.95 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的最佳条件下, 根据可能共存的实际情况, 考察了槐花中可能含有的多种干扰物质对测定结果的影响, 当相对误差控制在 $\pm 5\%$ 以内时: 1000 倍量的 Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Ba^{2+} , L-Arg, 草酸; 100 倍量的 SO_4^{2-} , K^+ , 肌酸均不干扰测定。槲皮素($1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对本实验是有干扰的, 但是槐花中槲皮素的含量仅仅为芦丁含量的 2% ^[6], 该干扰可以忽略不计。共存物质对芦丁测定的影响较小, 说明本方法抗干扰能力强, 有良好的实用价值。

2.3 标准曲线、检出限及精密性

2.3.1 标准曲线的建立 按所选择最佳实验条件, 分别移取一定量的 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芦丁标准应用溶液于 10 mL 比色管中, 按 1.2 实验方法, 分别测定荧光强度值, $\text{em}=280 \text{ nm}$, 狭缝宽度为 3 nm, 波长扫描范围 220~500 nm, 狭缝宽度为 5 nm, 以 F 对芦丁浓度绘制工作曲线。试验结果表明, 芦丁在浓度 $6.0 \times 10^{-7} \sim 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与 BSA 荧光猝灭程度呈现良好的线性关系。经数据处理得芦丁回归方程为 $F=136.36 \text{ CRu}(\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})-0.5454$, 相关系数 $r=0.9976$ 。

2.3.2 检出限和精密性 按实验方法进行 11 次空白值测定, 按 $\text{CL}=3\text{Sb}/k$ (Sb 表示标准偏差, k 表示校准曲线的斜率) 计算检出限为 $1.58 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。测定溶液中芦丁含量分别为 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (低), $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (中) 和 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (高), 各作 9 份平行实验, 计算得相对标准偏差分别为 4.3% , 2.8% 和 3.7% 。

2.4 样品分析及回收率测定

2.4.1 样品处理 将三角平底烧瓶置于超声波清洗槽的指定位置上, 于瓶中加入槐花米粗粉 20 g, 水 200 mL, 3% 硼砂 0.7 g。用石灰乳调 pH 值为 8 左右, 开动电动搅拌器及超声波发生器, 于室温下提取 20 min, 过滤, 滤渣加入水 100 mL, 硼砂 0.5 g, 再超声辐射 20 min, 过滤, 合并两次滤液。以盐酸调 pH 2~3, 放置过夜使结晶全部析出, 抽滤得到粗芦丁, 用沸水重结晶得到淡黄色芦丁^[7]。

2.4.2 样品分析及回收率试验 采集 3 份来自不同药店的样品, 按 1.2 实验方法测定, 每份样品做 6 次平行测定, 实验结果如表 1。

3 讨论

BSA、芦丁、BSA 与芦丁结合后的三维荧光光谱如图(1~3)所示。由图 1 可见, BAS 在 $\lambda_{\text{max}}=338 \text{ nm}$ 处有很强的荧光, 而芦丁标准液(图 2)在 $\lambda_{\text{max}}=338 \text{ nm}$ 处并没有荧光。图 3, BAS 液中, 随着芦丁的加入, BAS 在 $\lambda_{\text{max}}=338 \text{ nm}$ 处的荧光峰明显下降, 这表明 BAS 和芦丁发生了结合。根据白蛋白的空间结构, 它含有三个结构域, 每个结构域由两个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒结构, 几乎所有的疏水性氨基酸残基都处在

圆筒内部,形成一个疏水腔。芦丁分子结构既有疏水性基团,又有脂溶性基团,当芦丁与白蛋白作用时,通过疏水作用力而被

表 1 样本测定结果

Table 1 Sample results for the determination (n=6)

样品 Sample	测定均值 Found ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标量 Added ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	总测定值 Total found ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
1	0.28	5.00	5.34	101.2	2.8
2	0.65	5.00	5.55	98.0	3.1
3	0.55	5.00	5.43	97.6	4.1

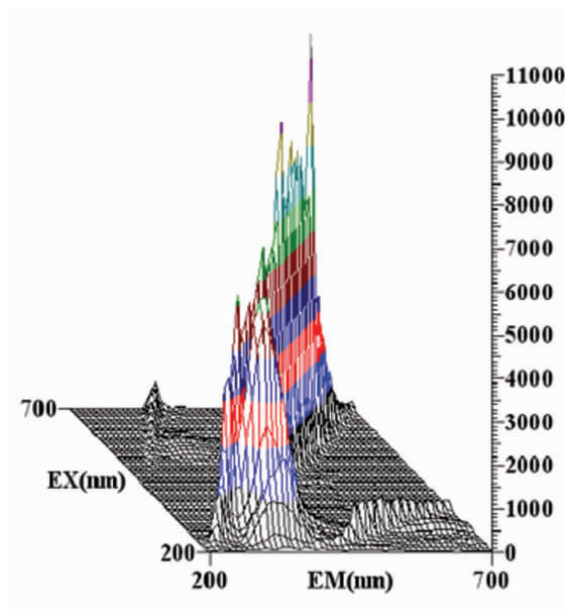


图 2 BSA 的三维荧光光谱

Fig. 2 Three-dimensions fluorescence spectra of BSA

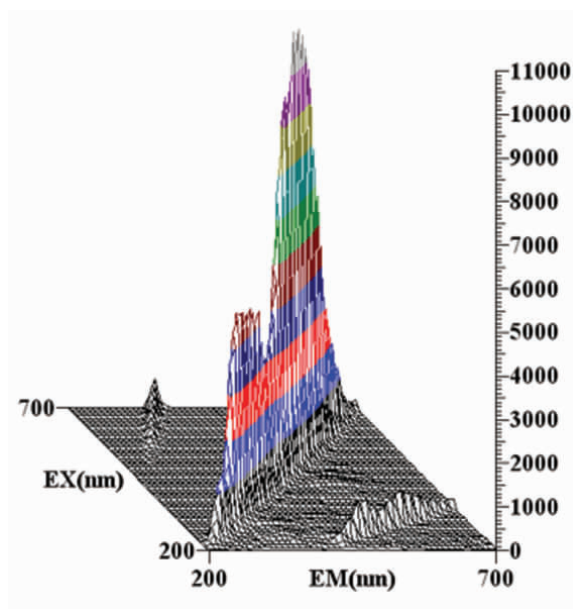


图 3 芦丁的三维荧光光谱

Fig. 3 Three-dimensions fluorescence spectra of Rutin

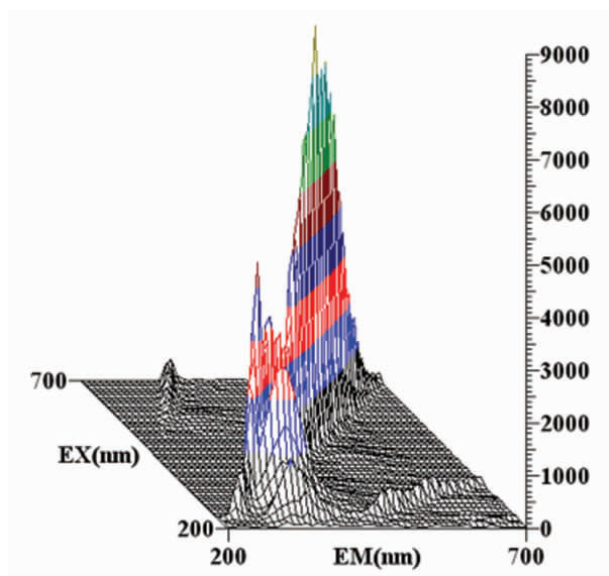


图 4 BSA 和芦丁结合后的三维荧光光谱

Fig. 4 Three-dimensions fluorescence spectra of BSA-Rutin system

由实验可得出,在 pH 9.37 的 B-R 缓冲液中,BSA 与芦丁结合,在 $\text{ex}=338\text{nm}$ 处产生荧光猝灭,该处的 BSA 荧光猝灭程度与芦丁的量呈良好的线性关系,据此建立测定槐花中芦丁含

量的新方法。该方法简便快速,灵敏度高准确性好,可用于槐花中芦丁含量的测定且结果满意。

参考文献(References)

- [1] Tetsuo K, Satomi K M, Keiko H, et al. Pulmonary carcinogenesis Induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin C [J]. Virchows Archiv, 2001, 438 (3): 259-270
- [2] Huleihel M, Ishano V. Effect of propolis extract on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus [J]. Archives of Virology, 2001, 146(4): 1517-1526
- [3] 周红英,李同德,苏雪慧,等.紫外分光光度法测定三种槐叶中芦丁的含量[J].泰山医学院学报,2004,4(25): 280-281
Zhou Hong-ying, Li Tong-de, Su Xue-hui, et al. Determination of rutin in three kinds of pagodatree by Uv [J]. Journal of TAISHAN medical college, 2004, 4(25): 280-281
- [4] 陶俊钰,鲍恩泉,秦绍刚,等. HPLC 法测定蜂胶片中芦丁的含量[J].安徽医药,2008,12(6): 505-506
Tao Jun-yu, Bao En-quan, Qin Shao-gang, et al. Determination of rutin in the propolis tablets by HPLC [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2008, 12(6): 505-506

(下转第 316 页)

前化疗、放疗等对 PRPT 的疗效不确切,手术仍是首选治疗方式,应加强不同学科间合作,提高手术技巧,使再次手术时尽可能完整切除复发肿瘤,以有效延长患者生存期,提高长期存活率。

参考文献(References)

- [1] 吴阶平,裘法祖,吴蔚然,等.黄家驷外科学[M].第6版,北京:人民卫生出版社,2007,989
Wu jie-ping, Qiu fa-zu, Wu wei-ran, et al. Huang jiasi's surgery. 6th edition, Beijing: People's Sanitary Press, 2007, 989
- [2] 彭森,李军尧,唐忠志,等.原发性腹膜后肿瘤 114 例手术治疗分析[J].临床军医杂志,2007,35(6):870-871
Peng sen, Li jun-yao, Tang zhong-zhi, et al. Surgical Treatment Analysis on 114 cases of Primary Retroperitoneal Tumor[J]. Clinical Journal of Medical Officer, 2007, 35(6):870-871
- [3] Schwarzbach MH, Hohenberger P. Current concepts in the management of retroperitoneal soft tissue sarcoma [J]. Recent Results Cancer Res, 2009, 179:301-319
- [4] Rout C P, Pisters P W. Retroperitoneal sarcomas: Combined-modality treatment approaches[J]. J Surg Oncol, 2006, 94: 81-87
- [5] 邢玉新.原发性腹膜后肿瘤的诊治进展[J].实用临床医学,2004,5(2):142
Xing yu-xin. Development of diagnosis and treatment of primary retroperitoneal tumor[J]. Practical Clinical Medicine, 2004, 5(2):142
- [6] 夏绍友,李荣,刘苏健.原发性腹膜后肿瘤的诊治[J].第二军医大学学报,2009,30(5):545-548
Xia shao-you, Li rong, Liu su-jian. Diagnosis and treatment of primary retroperitoneal tumor[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2009, 30(5):545-548
- [7] 陈凛,卫勃.原发性腹膜后肿瘤联合脏器切除[J].中国实用外科杂志,2008,28:263-265
Chen lin, Wei bo. Surgical treatment and multivisceral resection of primary retroperitoneal tumor [J]. Chinese Journal of Practical Surgery, 2008, 28:263-265
- [8] Christopher D M. Pathology and genetics of soft tissue and bone[M]. Lyon: IARC Press, 2002: 12-15
- [9] 曹晖,赵恩昊,孙勇伟,等.原发性腹膜后肿瘤 71 例的诊断和治疗[J].中华普通外科杂志,2005,20:575-577
Cao hui, Zhao en-hao, Sun yong-wei, et al. Diagnosis and treatment of primary retroperitoneal tumor in 71 cases[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2005, 20:575-577
- (上接第 356 页)
- [5] 孙国祥,孙毓庆,李阳.毛细管电泳叠加对比法测定复方降压片中 5 组分含量[J].沈阳药科大学学报,2002,19(4):265-268
Sun Guo-xiang, Sun Yu-qing, Li Yang. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2002, 19(4): 265-268
- [6] 李鹏,成玉怀,洪成林,等.新疆产两种槐花中芦丁和槲皮素的含量测定[J].农垦医学,2001,23(1):1-2
Li Peng, Cheng Yu-huai, Hong Cheng-lin, et al. Determination of Rutin and Quercetin of Flos Sophorae in Xinjiang[J]. Agriculture and cultivate medicine, 2001, 23(1): 1-2
- [7] 萨燕平,彭永芳.超声辐射提取槐花米中的芦丁[J].云南化工,1996,(4):25-26
Sa Yan-ping, Peng Yong-fang. A improved method to extract rutin from bud of sophora japonica under Ultrasonic Irradiation[J]. Yunnan chemical, 1996, (4): 25-26
- [8] 俞天智,杨汝栋.芦丁与血清白蛋白的作用研究[J].光谱学与光谱分析,2003,23(4):763-765
Yu Tian-zhi, Yang Ru-dong. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2003, 23(4): 763-765