

文章编号: 1000-5862(2012)05-0534-05

D-色氨酸荧光猝灭法同时测定激动素和 6-苄基腺嘌呤

赵小辉, 秦光炯, 朱乾华, 冯雪梅, 贺 薇, 杨季冬

(长江师范学院化学化工学院, 重庆 408000)

摘要: 在 pH 值为 3.00 的 B-R 缓冲溶液中, D-色氨酸均能与 6-苄基腺嘌呤(6-BA)和激动素(KT)这 2 种天然细胞分裂素作用并产生不同强度的荧光猝灭信号。首先利用荧光偏振信号计算获得的荧光偏振度(p)和荧光各向异性(r)来区分 6-苄基腺嘌呤和激动素这 2 种天然细胞分裂素, 同时利用荧光猝灭信号和双标准曲线计量分析法对 2 种天然细胞分裂素进行同时测定, 并将该方法应用于市售苦瓜和番茄样品表皮中 6-苄基腺嘌呤和激动素的同时测定, 结果令人满意。

关键词: 荧光偏振; 荧光猝灭; 荧光各向异性; 6-苄基腺嘌呤; 激动素; 同时测定

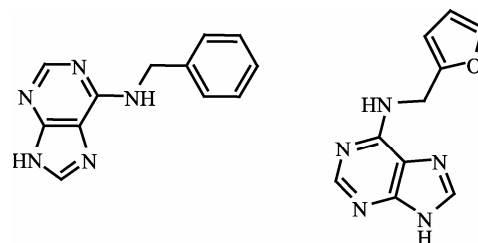
中图分类号: O 655

文献标志码: A

0 引言

6-苄基腺嘌呤(6-Benzylaminopurine, 简称 6-BA)和激动素(Kinetin, 简称 KT)均为外源性细胞分裂素^[1], 其主要来自植物的 RNA 代谢过程^[2]。细胞分裂素广泛应用于果树、农业及园艺作物的组织培养中, 其浓度的高低可以反映出植物的生长环境状况及病变情况。因此对它们进行快速准确的定量测定无论是对药物分析还是农产品药物残留量的检测都具有重要意义。

由于 6-苄基腺嘌呤和激动素结构非常相似, 都属于腺嘌呤的衍生物(见图 1), 用一般的化学或物理方法难以对其进行分离, 因此其定量测定存在难度。笔者结合以前的工作^[3-6], 研究发现, 在 pH 值为 3.00 的 B-R 缓冲溶液中, D-色氨酸均能与 6-苄基腺嘌呤(6-BA)和激动素(KT)这 2 种天然细胞分裂素作用并产生不同强度的荧光猝灭信号, 本文首先利用荧光偏振信号计算获得的荧光偏振度(p)和荧光各向异性(r)来区分 6-苄基腺嘌呤和激动素这 2 种天然细胞分裂素, 同时利用荧光猝灭信号和双标准曲线计量分析法对 2 种天然细胞分裂素进行同时测定, 并将该方法应用于市售苦瓜和番茄样品表皮中 6-苄基腺嘌呤和激动素的同时测定, 结果令人满意。



6-苄基腺嘌呤(6-BA) 6-呋喃甲基腺嘌呤(又称激动素, KT)

图 1 6-苄基腺嘌呤和激动素的分子结构

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

6-苄基腺嘌呤、激动素和 D-色氨酸分别用二次蒸馏水配制成 1×10^{-2} mol/L 的储备液, 所用试剂均为分析纯。

配有 2 个偏振片的 F-2500 型荧光分光光度计(日本, 日立)。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光偏振光谱测量方法 在 pH 值为 3.00 时分别配制与 D-色氨酸作用的一系列 6-苄基腺嘌呤和激动素溶液, 然后在带偏振器的荧光分光光度计上进行水平方向和垂直方向荧光强度的测量, 保持狭缝宽度 5.0 nm, 光电倍增管的电压为 400 V 下以激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=273$ nm 测定荧光偏振强度, 同时测定不加偏振片时的荧光强度。

收稿日期: 2012-07-23

基金项目: 国家自然科学基金(21175015)和重庆市教委科技课题(KJ121306)资助项目。

作者简介: 赵小辉(1979-), 女, 河北唐山人, 讲师, 硕士, 主要从事环境及药物分析研究。

1.2.2 荧光偏振度和荧光各向异性的测定 利用荧光偏振法测定^[7], 荧光偏振度和荧光各向异性的计算公式分别为

$$P = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH}), \quad (1)$$

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH}), \quad (2)$$

$$G = I_{HV} / I_{HH}, \quad (3)$$

其中 I_{VV} 和 I_{VH} 为起偏器取向垂直, 而检偏器分别取向垂直和水平时测得的荧光强度, G 为光栅矫正因子. I_{HV} 和 I_{HH} 为起偏角取向水平, 而检偏角分别取向垂直和水平时测得的荧光强度.

2 结果与讨论

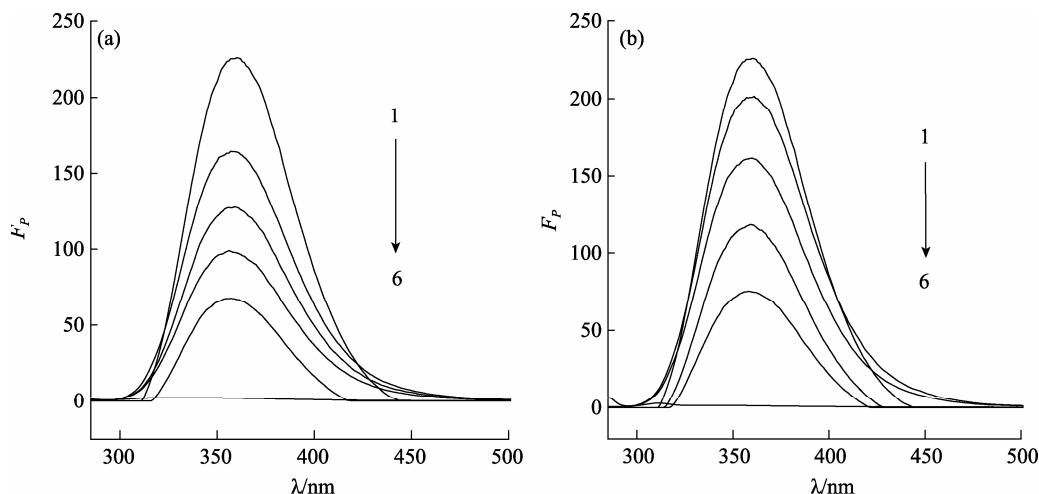
2.1 6-苄基腺嘌呤、激动素与 *D*-色氨酸体系的荧光偏振光谱特征

将偏振器的起偏角和检偏角分别固定在水平或垂直方向后, 在荧光分光光度计上以激发波长

$\lambda_{ex}=273\text{ nm}$ 测定荧光偏振猝灭强度, 可得到 *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤和 *D*-色氨酸-激动素体系的荧光偏振猝灭光谱(见图 2). 在整个扫描范围内, 荧光偏振猝灭强度随 6-苄基腺嘌呤(激动素)浓度的改变而改变, *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤体系的峰除了强度上与 *D*-色氨酸-激动素体系存在差异外, 其峰形基本一致, 均在 358 nm 处出现了最大荧光偏振峰.

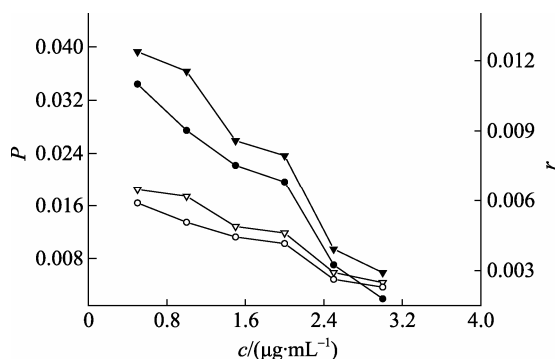
2.2 偏振数据处理及分析

根据实验数据以及 (1) 式或 (3) 式计算得到 6-苄基腺嘌呤与激动素这 2 种天然细胞分裂素的荧光偏振度以及荧光各向异性. 从图 3 可看出 6-苄基腺嘌呤与激动素这 2 种天然细胞分裂素对应的荧光各向异性度和荧光偏振度仅在数值上有区别, 其变化趋势极为类似, 因此可同时用荧光各向异性度(r)和荧光偏振度(P)来区分 6-苄基腺嘌呤与激动素这 2 种天然细胞分裂素.



pH 值为 3.00; The angles of FP : 0°; Concentration: *D*-Trp, 1.5×10^{-4} mol/L; (a) 6-BA($\mu\text{g/mL}$), from 1 to 6: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 20.0; (b) KT($\mu\text{g/mL}$, from 1-6): 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 20.0.

图2 *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤和*D*-色氨酸-激动素的偏振荧光光谱图



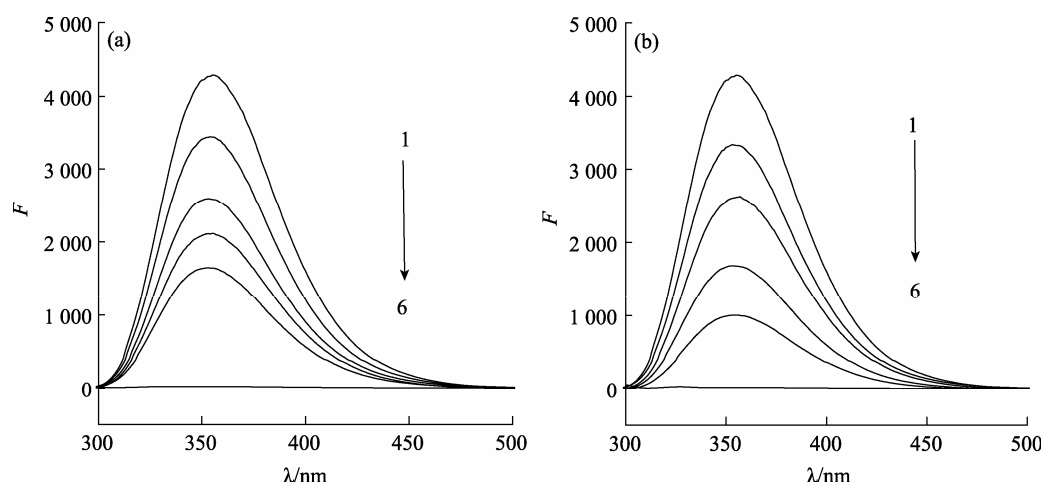
注: pH值为 3.00; $\lambda=358\text{ nm}$; Concentration: *D*-Trp, 1.5×10^{-4} mol/L; \circ , P_{KT} ; ∇ , P_{6-BA} ; \bullet , r_{KT} ; \blacktriangledown , r_{6-BA} .

图3 *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤和*D*-色氨酸-激动素的荧光偏振度和荧光各向异性度

2.3 6-苄基腺嘌呤、激动素与 *D*-色氨酸体系的荧光光谱

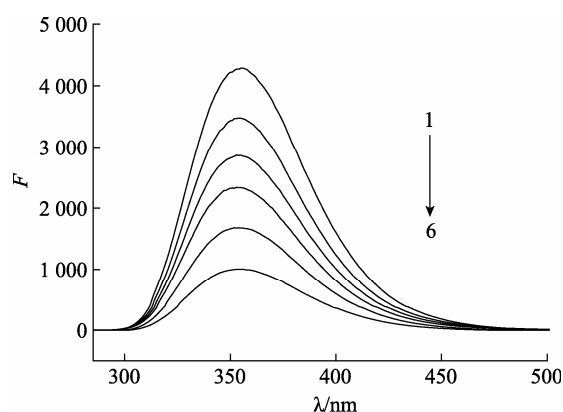
6-苄基腺嘌呤和激动素与 *D*-色氨酸反应体系的荧光光谱如图 4 所示. 由图 4 可知, 在 pH 值为 3.00 时, 整个扫描范围内 6-苄基腺嘌呤和激动素的荧光信号均很弱, *D*-色氨酸在 354 nm 出现最大荧光峰, 且随着 6-苄基腺嘌呤和激动素的加入, *D*-色氨酸的荧光强度均被猝灭. 单独 *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤、单独 *D*-色氨酸-激动素体系及两者的混合体系与 *D*-色氨酸作用后的荧光峰均出现在 354 nm, 故本实验选择 354 nm 作为数据读取波长.

从图 5 可看出, 由 6-苄基腺嘌呤与激动素以 1:1 比例混合成系列不同的浓度, 在最大荧光峰处其



注: pH 值为 3.00; Concentration: *D*-Trp, 1.5×10^{-4} mol/L; (a) 6-BA ($\mu\text{g/mL}$, from 1~6): 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 20.0; (b) KT ($\mu\text{g/mL}$, from 1~6): 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 20.0.

图4 *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤(a)和*D*-色氨酸-激动素(b)体系的荧光光谱图



注: pH 值为 3.00; Concentration: *D*-Trp, 1.5×10^{-4} mol/L; 6-BA+KT ($\mu\text{g/mL}$, from 1~6): 0, 0.40+0.40, 0.84+0.84, 1.22+1.22, 1.70+1.70, 2.20+2.20.

图5 *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤和激动素混合体系的荧光光谱图

ΔF 随着混合药物的浓度增大而增强, 说明 2 种药物在混合体系中其荧光猝灭光谱强度具有加和性. 基于此可建立混合物体系的标准曲线, 借此可求得混合物的总量; 再分别根据 6-苄基腺嘌呤和激动素体系在 354 nm 处的荧光光谱数据(两者的猝灭强度不同)获得它们的标准曲线, 并根据对应 2 条标准曲线围成的扇形面积和二元一次方程图解法, 可求得扇形面积内测量点的 2 种细胞分裂素的含量比. 从而建立荧光光谱和双标准曲线计量分析法同时测定 6-苄基腺嘌呤和激动素的分析方法, 该方法具有较高的灵敏度和很好的计量选择性.

2.4 标准曲线及其相关参数

在适宜的反应条件下, 分别以不同浓度的 6-苄基腺嘌呤、激动素及其混合物与 *D*-色氨酸反应, 在其最大荧光猝灭峰处读取其荧光强度, 并以荧光猝

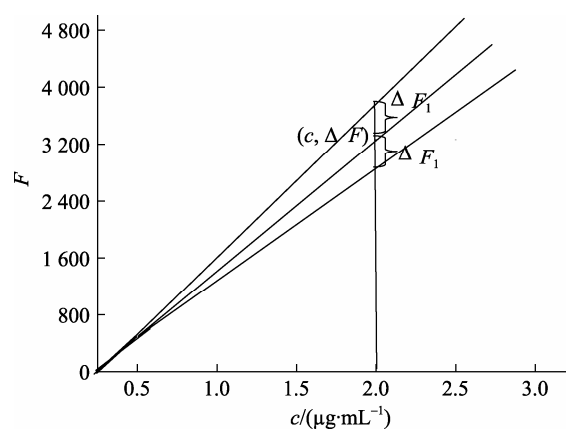
灭强度对其浓度作图, 绘制标准曲线, 线性范围、相关参数和检出限列于表 1.

图 6 是 *D*-色氨酸与 6-苄基腺嘌呤、激动素相互作用的同原射线图. 3 条直线均为 6-苄基腺嘌呤和激动素以 1:1 混合后与 *D*-色氨酸反应体系的标准曲线, 3 条标准曲线相交于原点附近. 直线 1 和直线 2 分别为 *D*-色氨酸-激动素、*D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤体系的标准曲线, 2 直线分别相交于同一原点(0.274,

表1 6-苄基腺嘌呤和激动素标准曲线的相关参数

体系	线性回归方程	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检出限/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>R</i>
6-BA	$\Delta F = 1\,175.4c + 360.5$	0.029~3.100	2.85	0.999 2
KT	$\Delta F = 1\,582c + 137$	0.021~2.500	2.12	0.999 3
6-BA+KT	$\Delta F = 1\,377.8c + 248$	0.027~2.800	2.73	0.999 0

注: 波长均为 354 nm.



注: 1. *D*-Trp-KT; 2. *D*-Trp-6-BA; 3. KT+6-BA-*D*-Trp; 实验条件同图 5.

图6 *D*-色氨酸与 6-苄基腺嘌呤和激动素相互作用的同原射线图

56.13), 围成一定范围的扇形面积, 因此可用二元一次方程图解此范围内测量点的 2 种细胞分裂素的含量比^[7].

2.5 分析应用

2.5.1 同时测定 6-苄基腺嘌呤和激动素的荧光光谱分析方法的建立 (1)加和性的测试: 测试 6-苄基腺嘌呤-激动素(1: 1)标准混合物的荧光猝灭光谱值, 并与 1 份 6-苄基腺嘌呤的荧光猝灭光谱值和 1 份激动素标样的荧光猝灭光谱值之和对照. 结果表明, 在所选波长下相对误差小于 5%, 说明其加和性很好. (2)方法的选择性试验: 在 354 nm 处以 6-苄基腺嘌呤-激动素(1: 1)混合物(总量为 5.0 μg/mL)进行实验, 当相对误差为±5% 时, 以下共存物质不干扰测定(以 mg/L 计): K⁺(210), Na⁺(120), Cu²⁺(100), Zn²⁺(40), Co²⁺(25), Ni²⁺(15), Ca²⁺(12), 甘氨酸(30), 壳聚糖(20), 葡萄糖(200), *L*-组氨酸(20), 尿素、乳糖(180), 蔗糖(200), 麦芽糖(280). 因此方法具有良好的选择性. (3)双标准曲线计量分析法的建立: 根据 2.4 节的分析, 可建立同时测定 6-苄基腺嘌呤-激动素的荧光猝灭光谱的双标准曲线计量分析法. 以 *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤体系的标准曲线和 *D*-色氨酸-激动素体系的标准曲线作为 2 条相交于同一点的标准曲线, 如图 6 形成扇形面积范围. 在 354 nm 处的实验测量点, 若落在*D*-色氨酸-激动素体系的标准曲线(直线 1)

上则可计算 6-激动素的含量; 若落在 *D*-色氨酸- 6-苄基腺嘌呤体系的标准曲线(直线 2)上则可计算 6-苄基腺嘌呤含量; 若混合物落在 2 条同原射线围成的扇形面积范围内, 如在直线 3 上, 则可借助二元一次方程的图解法求得 6-苄基腺嘌呤和激动素的含量比, 即如图 6 所示, $c_{KT}/c_{6-BA} = (\Delta I_2 + \Delta I_1) / \Delta I_1$, 再由测量点对应的横轴值可直接量得混合物的总量, 即可分别计算出 6-苄基腺嘌呤和激动素的含量.

2.5.2 实际样品中的 6-苄基腺嘌呤和激动素的同时测定 取市售苦瓜和番茄样品, 将其表皮捣碎, 再分别准确称取 10 g 已均匀捣碎的样品于 50 mL 烧杯, 加入 30 mL pH 值为 7.00 的 B-R 缓冲溶液, 搅拌, 浸泡至过夜, 用变频超声仪(频率设置 25 KC)充分振荡, 抽滤, 余液转移至离心管中, 高速离心 10 min (设置转速设置 8 000 r/min), 取上清液加水稀释 2 倍, 取适量处理后的稀释液分别置入 3 支 10 mL 比色管中, 再分别加入适量的 6-苄基腺嘌呤和激动素标准溶液, 然后加入 pH 值为 3.00 的 B-R 缓冲溶液 1.0 mL 和 1.0×10^{-3} mol/L 的 *D*-色氨酸溶液 1.5 mL, 用水稀至刻度, 摇匀; 另一组不加待测药物, 加入同样的其它试剂并同上操作, 作空白检测.按照荧光法和双标准曲线计量分析法同时测定市售苦瓜和番茄表皮样品中 6-苄基腺嘌呤和激动素的含量, 并检验方法的 *RSD* 和回收率, 结果见表 2.

表 2 实际样品中 6-苄基腺嘌呤和激动素的分析数据*

样品	Determined/(μg·mL ⁻¹)		Added/(μg·mL ⁻¹)		Found/(μg·mL ⁻¹)		回收率/%		相对标准偏差/%	
	6-BA	KT	6-BA	KT	6-BA	KT	6-BA	KT	6-BA	KT
苦瓜表皮	ND	ND	2.00	2.00	1.95	1.96	97.50±3.12	98.00±2.43	2.77	2.45
	ND	ND	3.00	3.00	2.93	2.95	97.70±3.24	98.30±3.18	3.12	3.45
番茄表皮	ND	ND	2.00	2.00	2.08	2.04	104.00±3.42	102.00±3.57	2.23	2.87
	ND	ND	3.00	3.00	3.11	3.08	103.70±3.34	102.70±2.89	2.49	3.34

*5 次平行测定的平均值; ND: 未测出.

3 结论

荧光偏振技术^[8]可用于区分 6-苄基腺嘌呤和激动素这对细胞分裂素与 *D*-色氨酸作用的体系. 研究结果表明, 6-苄基腺嘌呤和激动素由于其结构的差异对不同角度的偏振光响应信号产生不同的影响, 用公式量化后即表现为: *D*-色氨酸-6-苄基腺嘌呤体系对应着较大的荧光偏振度和荧光各向异性度,而 *D*-色氨酸-激动素体系则对应着较小的荧光偏振度和荧光各向异性度, 因此通过计算其荧光偏振度和

荧光各向异性可对这 2 种细胞分裂素的混合体系进行研究表征, 该方法简单、快速、灵敏. 同时利用荧光猝灭光谱和双标准曲线计量分析法对 2 种细胞分裂素进行同时测定, 并将该方法应用于市售苦瓜和番茄表皮等实际样品中 6-苄基腺嘌呤和对激动素的同时测定, 结果令人满意.

4 参考文献

[1] Haberer G, Kieber J J. Cytokinins: new insights into a classic phy-

- tohormone [J]. Plant Physiol, 2002, 128: 354-362.
- [2] Zazimalova E, Kaminek M, Brezinova A, et al. Biochemistry and molecular biology of plant hormones. in: Hooykaas P J J, Hall M A, Libbenga K R (Eds) [C]. Amsterdam: Elsevier, 1999: 141.
- [3] 赵小辉, 黄承志. 蛋白质与十二烷基硫酸钠相互作用的光散射偏振特性 [J]. 科学通报, 2006, 51(23): 2729-2732.
- [4] 杨季冬. 用 RRS 光谱和“同原射线计量分析法”同时测定 *D*-和 *L*-色氨酸对映异构体 [J]. 分析科学学报, 2006, 22(4): 454-457.
- [5] 杨季冬. 共振瑞利散射光谱法同时测定 α -萘酚和 β -萘酚异构体 [J]. 化学通报, 2008(7): 539-544.
- [6] 张书然, 杨季冬. 共振瑞利散射光谱法对盐酸异丙嗪与盐酸氯丙嗪的同时测定 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(12): 1362-1367.
- [7] 刘丰. 应用荧光探针 DPH 测定完整细胞膜的流动性 [J]. 南京医科大学学报, 1996(6): 527-529.
- [8] 黄振钟, 裹明华, 黄晓宾. 胡椒基荧光酮与镆的显色反应 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2000, 24(1): 54-57.

Simultaneous Determination of 6-Benzylaminopurine and Kinetin Based on *D*-Trp Fluorescence Quenching

ZHAO Xiao-hui, QIN Guang-jiong, ZHU Qian-hua, FENG Xue-mei, HE Wei, YANG Ji-dong
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408000, China)

Abstract: In pH=3.00 B-R buffer solution, *D*-Trp could react with natural cytokinins of 6-benzylaminourine and kinetin and produced different fluorescence quenching spectra signals. This article first established the degree of fluorescence polarization(*p*) and the degree of fluorescence anisotropy(*r*) based on the measurements of the polarized fluorescence signals to distinguish two natural cytokinins of 6-benzylaminourine and kinetin. Simultaneously based on the fluorescence quenching spectra signals and the double standard curve method, a novel method for simultaneous determination of 6-benzylaminourine and kinetin was developed. The method was applied to simultaneous determination of 6-benzylaminourine and kinetin in balsam pear skin and tomato skin with satisfactory results.

Key words: fluorescence polarization; fluorescence quenching; fluorescence anisotropy; 6-benzylaminopurine; kinetin; simultaneous determination

(责任编辑: 刘显亮)