

文章编号:1673-0062(2011)01-0087-04

## 丹酰氯荧光猝灭法测定芹菜中芹菜素含量

向 艳,杨慧仙\*,于军晖,杨胜园,朱 博

(南华大学 公共卫生学院,湖南 衡阳 421001)

**摘 要:**在 pH 7~8 的弱碱性条件下,丹酰氯可与芹菜素反应生成一种酚酯化合物,使丹酰氯的内源性荧光发生猝灭,其猝灭程度( $\Delta F = F_0 - F$ )与加入芹菜素的量在一定范围内呈良好的线性关系.在优化的条件下,体系  $\Delta F$  与芹菜素的浓度在  $6.40 \times 10^{-7} \text{ mol/L} \sim 5.92 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  范围内线性关系良好,线性回归方程为  $\Delta F = 112.18C_{\text{Ap}} (\times 10^{-5} \text{ mol/L}) - 1.25$ ,相关系数  $r = 0.9989$ .检出限为  $1.92 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ,RSD 为 2.6%~4.1%,加标回收率为 98.1%~101.5%.本方法简便、快速,用于芹菜中芹菜素的含量测定结果满意.

**关键词:**芹菜素;丹酰氯;荧光猝灭

中图分类号:O656.31;O657.30 文献标识码:A

### Determination of Apigenin in Celery by Dansyl chloride Fluorescence Quenching Spectrophotometry

XIANG Yan, YANG Hui-xian\*, YU Jun-hui, YANG Sheng-yuan, ZHU Bo

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

**Abstract:** After the phenol ester compound generated by apigenin reacting with dansyl chloride in weakly alkaline medium, the endogenous fluorescence of dansyl chloride was quenched, and there was a good linear relationship between the quenching value ( $\Delta F = F_0 - F$ ) and the concentration of apigenin. And under the optimal conditions, the linear range of calibration curve for determination of apigenin was  $6.40 \times 10^{-7} \sim 5.92 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ , and the linear regression equation was  $\Delta F = 112.18C_{\text{Ap}} (\times 10^{-5} \text{ mol/L}) - 1.25$  with correlation coefficient 0.9989 and the detection limit for apigenin was  $1.92 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ . The method was than 4.1% and the recoveries for apigenin from 98.1%~101.5%. The developed method was sensitive and had low detection limit and could be suitable for determining apigenin in celery.

**key words:** apigenin; dansyl chloride; fluorescence quenching

收稿日期:2010-09-25

基金项目:湖南省教育厅基金资助项目(07C634)

作者简介:向 艳(1969-),女,湖南省邵阳人,南华大学公共卫生学院预防医学实验中心实验师.主要研究方向:卫生理化检验.\*通讯作者.

芹菜素又名芹黄素,属于黄酮类化合物,芹菜素的化学结构为5,7,4'-三羟基黄酮,广泛存在于蔬菜、水果中。其5,7,4'位置的三个羟基和C2, C3双键决定了其独特的药理学效应和生物学特性。研究表明,芹菜素有降压和影响中枢神经、抑制致癌物质的致癌活性和保护心脏的作用,可用于治疗帕金森氏症,也可以作为抗HIV抗病毒药物及MAP激酶的抑制剂,及消炎作用等<sup>[1-4]</sup>。

目前测定芹菜素的方法主要有毛细管电泳法<sup>[5-6]</sup>、反相高效液相色谱法<sup>[7-8]</sup>、毛细管电泳—电化学检测法<sup>[9]</sup>和铝显色分光光度法<sup>[10]</sup>等,荧光光度法尚未见报道。本研究旨在利用芹菜素对丹酰氯的荧光猝灭作用,建立荧光猝灭法测定芹菜中芹菜素的新方法。一般而言,荧光猝灭法比直接荧光测定法更为灵敏,具有更高的选择性<sup>[11]</sup>。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器和试剂

RF5310型荧光光度计(日本岛津公司);F-4500型荧光光度计(日本日立公司)。

芹菜素(金测分析技术有限公司)标准溶液:  $3.700 \times 10^{-4}$  mol/L,溶剂为60%乙醇溶液;丹酰氯(DNS-Cl, Alfa Aesar 10141137)溶液:0.05 g/L,溶剂为60%乙醇溶液。

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

于10 mL具塞比色管中,依次加入0.05 g/L丹酰氯溶液0.25 mL、pH 7.00 Tris-HCl缓冲溶液2.0 mL和一定体积的芹菜素标准溶液,60%乙醇定容至5.00 mL,20℃放置10 min;220~650 nm波长范围内荧光光谱扫描,激发和发射狭缝宽度始终为10 nm。并在 $\lambda_{ex} = 320$  nm,  $\lambda_{em} = 480$  nm处,测定溶液的荧光强度 $F$ 和 $F_0$ (试剂空白),以 $\Delta F$ ( $\Delta F = F_0 - F$ )对芹菜素物质的量浓度进行线性回归。

## 2 结果与讨论

### 2.1 光谱特征

#### 2.1.1 三维荧光光谱

图1~图3分别为芹菜素、DNS-Cl、芹菜素与DNS-Cl结合后的三维荧光光谱图。由图1可见,芹菜素在乙醇溶液中并不具有荧光现象,而DNS-Cl溶液(图2)在 $\lambda_{ex} = 320$  nm,  $\lambda_{em} = 480$  nm处有很强的荧光。从图3可知,随着芹菜素的加入,DNS-Cl在 $\lambda_{em} = 480$  nm处的荧光峰明

显下降,这可能是DNS-Cl与芹菜素发生了结合,形成酚酯产物<sup>[12]</sup>。

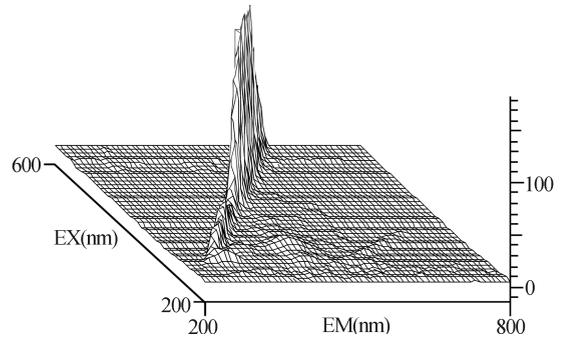


图1 芹菜素的三维荧光图谱

Fig. 1 The 3-D fluorescence spectra of apigenin

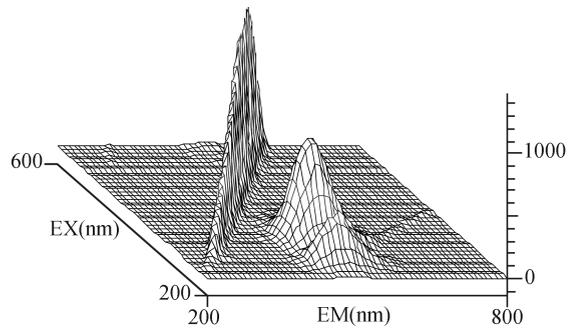


图2 DNS-Cl的三维荧光图谱

Fig. 2 The 3-D fluorescence spectra of DNS-Cl

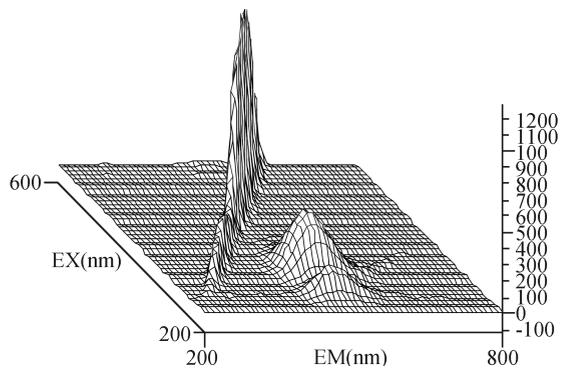


图3 DNS-Cl-芹菜素的三维荧光图谱

Fig. 3 The 3-D fluorescence spectra of DNS-Cl-apigenin

#### 2.1.2 荧光光谱

DNS-Cl的荧光强度随芹菜素含量的增加而逐渐减弱,在 $\lambda_{em} = 480$  nm处的荧光强度减弱程度与芹菜素含量有良好的线性关系,如图4(曲线1~6),因此选择 $\lambda_{em} = 480$  nm作为测量波长。

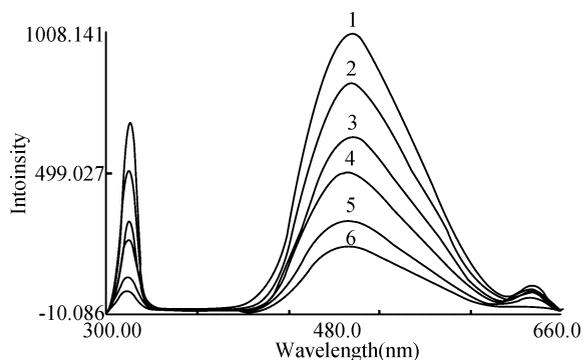


图4 荧光光谱

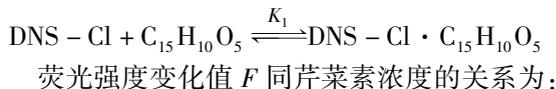
Fig. 4 Fluorescence spectra of the system

$C_{Ap}$  ( $\times 10^{-5}$  mol/L): 0, 1.48, 3.70, 4.44, 5.92, 7.24

## 2.2 结合比推导

DNS-Cl 与芹菜素的结合受很多因素影响,而结合常数可反应主客体的结合力度. Benesi-Hildebrand<sup>[13-16]</sup>法是利用光谱法来测定主客体结合物形成常数的最经典的方法.

如果 DNS-Cl 与芹菜素形成 1:1 结合物,则可表示为:

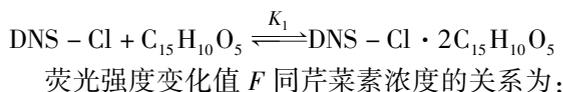


$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{F_0 - F}$$

$$= \frac{1}{K_1 \alpha [\text{DNS-Cl}] [\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]} + \frac{1}{\alpha [\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]}$$

(1)

如果 DNS-Cl 与芹菜素形成 1:2 结合物,则可以表示为:



$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{F_0 - F}$$

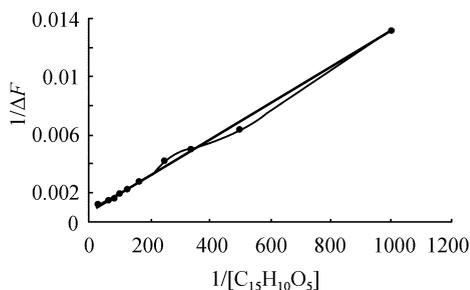
$$= \frac{1}{K_1 \alpha [\text{DNS-Cl}] [\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]^2} + \frac{1}{\alpha [\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]}$$

(2)

式中,  $F, F_0$  分别为芹菜素浓度为一定值和为零时溶液的荧光强度,  $\alpha$  为常数,  $K_1$  为结合常数,  $[\text{DNS-Cl}]$  为 DNS-Cl 的浓度,  $[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]$  为  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$  的浓度.

由式(1)可知,若  $1/\Delta F$  对  $1/[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]$  作图得一直线,则结合比为 1:1. 由式(2)可知,若  $1/\Delta F$  对  $1/[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]^2$  作图得一直线,则结合比

为 1:2. 如图 5 所示,我们可以看到  $1/\Delta F$  与  $1/[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]$  有很好的相关性 ( $R=0.9963$ ). 因此,我们认为 DNS-Cl 与芹菜素的结合比为 1:1.

图5  $1/\Delta F$  与  $1/[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]$  的关系图Fig. 5 The relation between  $1/\Delta F$  and  $1/[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5]$ 

## 2.3 试剂用量选择

### 2.3.1 缓冲液类型及其酸碱度和用量的选择

分别试验了 pH 值为 4.0、4.8、5.6 的 HAC-NaAc 缓冲液和 pH 值为 7.00、7.50、8.00、8.40、9.00 的 Tris-HCl 缓冲液对体系荧光猝灭程度的影响. 发现体系在 pH 7.00~8.00 的 Tris-HCl 缓冲液中  $F$  值最大. 故实验选择 pH=7.50 的 Tris-HCl 溶液作为体系的缓冲试剂. 通过 Tris-HCl 缓冲液的用量实验发现,其适宜用量范围为 1.5~2.5 mL,超出该范围时  $F$  值出现降低. 这可能是用量不足时, Tris-HCl 缓冲效果不好;当 Tris-HCl 缓冲液加入量过高时,反而抑制了芹菜素与丹酰氯的作用,使  $F$  值降低. 实验选择 pH 7.50 的 Tris-HCl 缓冲液用量为 2.00 mL.

### 2.3.2 DNS-Cl 乙醇溶液用量的选择

DNS-Cl 乙醇溶液的适宜用量范围为 0.10~0.30 mL,超出该范围时  $F$  值明显降低. 这可能是 DNS-Cl 用量不足时,酚酯产物太少,荧光猝灭程度低;而当 DNS-Cl 用量过高时,抑制了酚酯的自聚作用,使荧光猝灭程度降低. 实验表明加入 DNS-Cl 用量在 0.25 mL 时,  $F$  出现最大值,故选择加入 0.05 g/L 的 DNS-Cl 乙醇溶液 0.25 mL.

### 2.3.3 反应时间与温度的选择

实验表明,体系在试剂完全混合后迅速反应,室温放置 10 min 后体系的荧光值达到最大,且 2 h 内体系荧光值基本保持不变. 本文选择体系反应 10 min 后测定.

考察了反应温度在 15~35℃ 时对体系荧光猝灭程度的影响. 温度高于 25℃ 时,猝灭强度变化值  $F$  随着温度的升高而减小,可能原因是升温

时分子热运动增加,分子间作用力和疏水作用减弱,导致分子复合物稳定性降低;当温度低于15℃时,空白荧光值较小, $F$ 变化不大,可能是低温条件下,反应太慢.故实验选择室温(约20℃)下反应10 min后测定.

#### 2.3.4 试剂加入顺序的影响

在已优化的试验条件下,分别1)芹菜素→Tris-HCl缓冲液→DNS-Cl;2)DNS-Cl→Tris-HCl缓冲液→芹菜素;3)芹菜素→DNS-Cl→Tris-HCl缓冲液;三种顺序加入试剂.结果表明,按顺序2)加入试剂出现的 $F$ 值最大,故确定2)为本实验试剂加入顺序.

#### 2.4 干扰试验

考察了蔬菜中可能存在的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 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、草酸;100倍量的 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{K}^+$ 、甲醇、丙酮,均不干扰测定.同为黄酮类物质的槲皮素、芦丁对本实验是有干扰的,但一般芹菜中的槲皮素、芦丁相对芹菜素来说,含量少,对测定的干扰可以忽略不计.

#### 2.5 方法线性范围、检出限和精密度

在优化的实验条件下,向体系中加入不同量的芹菜素标准溶液按1.2实验方法操作,DNS-Cl荧光猝灭程度( $\Delta F$ )与芹菜素在 $6.40 \times 10^{-7} \text{ mol/L} \sim 5.92 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 浓度范围内呈现良好的线性关系,回归方程为 $\Delta F = 112.18 C_{\text{Ap}} (\times 10^{-5} \text{ mol/L}) - 1.25$ ,相关系数为0.9989.按实验方法进行11次空白值测定,按 $C_L = 3S_b/k$  ( $S_b$ 表示标准偏差, $k$ 表示校准曲线的斜率)计算检出限为 $1.92 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ .

测定溶液中芹菜素含量分别为 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (低浓度)、 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (中浓度)和 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (高浓度),各作9份平行实验,计算得相对标准偏差分别为4.2%、3.9%和2.4%.

### 3 样品分析

将市售芹菜除去非食用部分,称取4.00 g样本参照文献[17]处理,制得样品分析溶液.取样品分析溶液1.00 mL按1.2实验方法进行测定,结果如表1.

表1 样品测定结果

Table 1 Determination results of the samples ( $n=5$ )

Sample	Found $/(\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD $/\%$	Added $/(\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Total found $/(\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery $/\%$
1	0.014	4.1	0.3	0.309	98.4
2	0.016	2.6	0.3	0.321	101.5
3	0.010	3.2	0.3	0.304	98.1

### 4 小结

由实验可知,在pH 7.50 Tris-HCl缓冲液中,芹菜素与DNS-Cl作用,在 $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$ 处产生荧光猝灭,DNS-Cl荧光猝灭程度与加入芹菜素的量在一定范围内呈良好的线性关系,据此建立荧光猝灭法测定蔬菜中芹菜素含量的新方法.该方法简单快速用于实际样品的分析,结果满意.

#### 参考文献:

[1] 孙斌瞿,伟菁,张晓玲.芹菜素的药理作用研究进展[J].中药材,2004,27(7):531-534.  
[2] Berashvili D T, Alaniya M D, Bakuridze A D. Apigenin glucuronide from *Perilla nankinensis* leaves[J]. Chemis-

try of Natural Compounds, 2005, 41(5):97-100.

[3] Masaharu Tatsuta, Hiroyasu Iishi, Miyoko Baba, et al. Suppression by apigenin of peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats[J]. Clin Experim Metastasis, 2001, 7(18):657-661.  
[4] Huang Y T, Kuo M L, Liu J Y. Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3T3 cells by apigenin[J]. European J Cancer, 1996, 18(32):146-151.  
[5] 吕元琦, 郭春华, 袁倬斌. 毛细管电泳法测定密蒙花中的橙皮素、木犀草素和芹菜素[J]. 分析试验室, 2004, 23(6):14-17.  
[6] 王月伶, 吕元琦, 袁倬斌.  $\beta$ -环糊精修饰区带毛细管电泳法测定野菊花中刺槐素、木犀草素和槲皮素[J]. 理化检验—化学分册, 2005, 41(8):544-546.

- [7] 肖建波,朱华,钟世安. 反相高效液相色谱法用于地钱中黄酮类化合物的分离与测定[J]. 分析试验室, 2005,24(4):17-19.
- [8] Li L, Jiang H, Wu H. Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 37(3):615-618.
- [9] 傅亮,楚清脆,黄宝康. 毛细管电泳—电化学检测法测定蜘蛛香中多元酚类化合物[J]. 分析化学研究简报, 2005, 33(2):161-163.
- [10] 李艳丽,黄强,班春兰,等. 分光光度法测定银杏叶提取液中总黄酮含量[J]. 河南化工, 2006, 23(1):35-36.
- [11] 董念,曹淑红,陈晓青,等. 不同取代烃基黄酮类化合物与血清白蛋白的相互作用分析[J]. 分析测试学报, 2009, 28(1):45-54.
- [12] 杨慧仙,李贵荣,何爱桃,等. 预衍生化—共振散射光谱法测定4—壬基酚[J]. 理化检验—化学分册, 2008, 44(6):517-522.
- [13] Wang X, Wang J, Wang Y, Chen, Z. Z, Tang, B. Study. On the multirecognition mechanism of interaction in thiabendazole/ $\beta$ -cyclodextrin/TritonX-100 [J]. J. Photobiol. A., 2007, 18(6):194-201.
- [14] 杨华,赵曙辉,李兰,等. 紫外—可见光谱法研究 $\beta$ -环糊精分散染料的包和作用[J]. 染料与染色, 2006, 43(2):40-44.
- [15] 张海容,王文艳,陈金娥,等. 荧光法研究萘酚与胍的包和性质[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(10):1153-1158.
- [16] 续浩,陈亮. 环糊精包结物包结比的测定[J]. 分析测试技术与仪器, 2001, 7(3):152-156.
- [17] 李荣华,夏薇,吴坤. 蔬菜中芹菜素高效液相色谱测定[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(7):894-895.