

赤霉素荧光测定法改进研究

Q946.885.5

薛泉宏, 李东, 汤莉

TQ467

(西北农林科技大学 资源与环境科学系, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 研究了硫酸体积分数、硫酸用量、样品前处理及温度与时间对赤霉素测定结果的影响, 对赤霉素的经典荧光测定法作了必要改进, 并对荧光法与福林法的测定值进行了比较。结果表明: ①改进荧光法与经典荧光法测定结果一致; ②改进荧光法操作简便, 不需冰浴及真空抽干设备; ③节省试剂(50%~75%); ④测定精确度和样品回收率高; ⑤反应产物的荧光值具有一定的时间和温度稳定性; ⑥该法适合于发酵液及固态产品中赤霉素的测定; ⑦福林法选择性差, 不能用于成分较为复杂的样品中赤霉素的测定。

[关键词] 赤霉素; 赤霉素测定; 荧光法; 福林法

测定方法, 改进荧光法, 发酵, 生物激素

[中图分类号] Q946.885+.5

[文献标识码] A

赤霉素(GA)是一种具有高度生理活性的生物激素。GA 发酵液和固态发酵产品中 GA 含量测定十分重要。目前赤霉素的测定方法主要有两大类: 其一为生物法^[1], 其二为理化测定法, 如荧光比色法^[1,2]、溴酸钾滴定法^[1]、福林反应法^[3]、磷钼杂多酸法^[4]以及气相和液相色谱法等。气相和液相色谱法比较准确, 但分析费用高, 一般实验室无条件测定。溴酸钾滴定法^[1]选择性较差, 不能用于发酵液中赤霉素测定。荧光是 GA 测定的经典方法, 但该方法操作过繁, 试剂消耗量大, 且需要真空泵及冰浴等条件。本研究对原有的荧光法进行了一些必要改进(称为 GA 改进荧光法), 并与福林法的测定结果进行比较, 目的在于为发酵液及其他成分复杂产品中 GA 测定提供一种更为有效、快速的方法。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

仪器 930 荧光光度计, 721 分光光度计(上海)。

福林试剂^[3] GA 乙醇溶液(20 mg/L), 乙酸乙酯, 浓硫酸, 0.5 mol/L 盐酸溶液, 0.2 mg/L 荧光黄溶液。

1.2 方法

经典荧光法^[1,2]和福林法^[3]。GA 改进荧光法如下。

1.2.1 待测样品制备 ①液体发酵样品。将发酵液离心, 取上清液过滤, 滤液用 0.5 mol/L 盐酸调 pH 至 1。吸取 pH=1 的滤液 1 mL 于 5 mL 具塞刻度试管中, 加入乙酸乙酯 2 mL, 加塞剧烈振荡, 静置分层, 上层即为 GA 萃取液。②固体发酵样品。取固体样 1 份, 加 4 份蒸馏水, 30 ℃ 保温浸提 1 h, 离心过滤, 滤液中 GA 萃取方法同上。

[收稿日期] 1999-07-20

[作者简介] 薛泉宏(1957—), 男, 副教授。

1.2.2 标准曲线制作 分别吸取 20 mg/L GA 乙醇溶液 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mL 于 5 mL 具塞烘干刻度试管中, 沸水浴加热蒸干, 冷却后加体积分数 85% 的硫酸 5 mL, 加塞摇匀, 40 min 后测定荧光值, 制作标准曲线。

1.2.3 荧光光度计校正 每次测定 GA 前先用 0.2 mg/L 荧光黄水溶液将荧光计调整到标准状态(荧光值为 5), 以保证各次测值具有良好可比性。

1.2.4 待测样品 GA 测定 准确吸取 GA 乙酸乙酯萃取液 0.5 mL 于 5 mL 具塞烘干刻度试管中, 沸水浴加热蒸干(约 2~3 min), 冷却后加入体积分数 85% 硫酸 5 mL, 加塞摇匀, 40 min 后测定荧光值, 根据标准曲线计算样品中 GA 浓度。

$$GA(\text{mg/L}) = C(\text{mg/L}) \times \frac{5}{0.5} \times \frac{2}{0.88} \times n$$

式中, C 为根据标准曲线查得的 GA 含量; 0.88 为 pH=1 且乙酸乙酯: 水浸液=2:1 时 GA 的抽提率; n 为稀释倍数。

2 结果与讨论

2.1 硫酸体积分数与荧光强度的关系

经典荧光法^[1,2]采用体积分数 100% 的浓硫酸与 GA 作用, 二者作用的产物在紫外光(460 nm)下产生荧光。在一定的 GA 浓度范围内, 荧光强度与 GA 含量间存在线性关系。由于浓硫酸粘度较大, 不便进行荧光测定, 有人提出用体积分数 80%~90% 的硫酸均可^[3]。选择合适的硫酸体积分数对 GA 荧光测定有重要意义。

表 1 采用不同体积分数 H_2SO_4 时的荧光值

H_2SO_4 体积分数/%	H_2SO_4 本底		GA + H_2SO_4	
	荧光值	荧光值增率/%	荧光值	荧光值增率/%
80	3.5	175	40.3	112.6
85	4.8	240	50.3	140.5
90	2.5	125	39.5	110.3
100	2.0	100	35.8	100

由表 1 可以看出, 不加 GA 时, 不同体积分数 H_2SO_4 的本底荧光值不同。体积分数 85% H_2SO_4 的本底荧光值为 4.8, 较体积分数 100% H_2SO_4 的荧光值高 140%; 相同用量不同浓度硫酸与相同份额 GA 反应所得产物产生的荧光强度不同, 其中体积分数 85% 的硫酸与 GA 反应后产生的荧光最强, 较体积分数 100% 浓硫酸提高 40.5%。因此, 在荧光测定中选用体积分数 85% 的硫酸代替纯硫酸, 可以提高测定灵敏度。

2.2 沸水浴蒸干对荧光值的影响

一般认为, GA 的破坏温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ ^[1]。因此, 在经典荧光测定法中, GA 萃取液采用真空低温抽干法蒸干乙酸乙酯, 以免高温处理破坏 GA^[2]。采用该方法需要真空抽干设备, 操作繁琐。印天寿^[3]在福林法中提出用沸水浴将萃取液蒸干, 该法简便, 但对 GA 的测定结果有无影响未见报道。本研究对沸水浴蒸干的影响进行了试验, 结果见表 2。

从表 2 可以看出, 真空抽干和沸水浴蒸干两组数据的平均荧光值分别为 49.1 和 49.9。t 检验表明, 两种处理的荧光值无明显差异, 即沸水浴蒸干并未对反应物产生的荧光强度有明显影响。因此, 在 GA 的荧光测定中, 少量样品萃取液可以直接用沸水浴蒸干,

不必进行真空抽干处理,从而使样品前处理更为简便。

表 2 两种蒸干方式下的 GA 荧光值

处理	第 1 批标样				第 2 批标样				$\bar{X} \pm S$	t 值
	1	2	3	4	5	6	7	8		
沸水浴蒸干(98.7℃)	41	44	44	48	53	54	57	58	49.9±6.5	t=0.727
真空抽干(室温,25℃)	42	46	47	48	48	51	53	58	49.1±4.8	t _{0.05} =2.36

2.3 硫酸用量对荧光值的影响

在传统 GA 荧光测定中,硫酸用量很大。每个样品在加 1 mL 待测液的同时需加 19 mL 浓硫酸。大批量测定时,试剂消耗很大。GA 测定是否需要加入如此大量的硫酸,向 GA 待测液中加入大量 H₂SO₄ 过度稀释对测定结果有无影响,均未见报道。

表 3 不同 H₂SO₄ 用量的荧光值

体积 分数 85% H ₂ SO ₄ 用量/mL	GA 加入量/ μ g									
	2(A)					3(B)				
	GA 质量 浓度/ (mg·L ⁻¹)	$F_{理}$	$F_{实}$	$\Delta E_f / \%$	$(\frac{F_{本}}{F_{实}}) \times 100\%$	GA 质量 浓度/ (mg·L ⁻¹)	$F_{理}$	$F_{实}$	$\Delta E_f / \%$	$(\frac{F_{本}}{F_{实}}) \times 100\%$
5	0.40	40.5	40.5	0	11.1	0.60	60.2	60.2	0	7.5
10	0.20	20.2	20.4	0.9	22.1	0.30	30.1	29.7	-1.3	15.2
15	0.13	13.5	15.2	12.6	29.6	0.20	20.1	20.5	2.0	22.0
20	0.10	10.1	12.5	23.8	36.0	0.15	15.1	20.7	37.1	21.7

注:① $F_{理}$ 、 $F_{实}$ 和 $F_{本}$ 分别为理论荧光值、实测荧光值和所加入体积分数 85% H₂SO₄ 的本底荧光值(4.5); $F_{理}$ 是根据加入 5 mL 体积分数 85% H₂SO₄ 时的 $F_{实}$ 和分别加入 10、15 及 20 mL 体积分数 85% H₂SO₄ 时的稀释倍数计算的。

② $\Delta E_f = \frac{F_{实} - F_{理}}{F_{理}} \times 100\%$, ΔE_f 表示 $F_{实}$ 对 $F_{理}$ 的偏差。

由表 3 可以看出,在 A 及 B 两个 GA 质量浓度系列中,随 H₂SO₄ 用量从 5 mL 增至 20 mL,实测荧光值与理论荧光值的偏差 ΔE_f 分别从 0 增至 23.8% 及从 0 增至 37.1%。在 H₂SO₄ 用量较少的情况下,GA 含量与实测荧光值成比例(如加入 5~10 mL 硫酸),而过度稀释(加入 15 mL 体积分数 85% H₂SO₄)导致实测荧光值偏离理论值,A、B 的偏差分别为 12.6% 及 2.0%,即在 GA 质量浓度较低时,过度稀释导致测定偏差增大;当硫酸用量为 20 mL 时,GA 含量与实测荧光值的比例关系受到了严重破坏,A、B 的偏差分别为 23.8% 和 37.1%。过度稀释引起的偏差与硫酸的本底荧光值有关。硫酸本身具有一定的荧光值,在 GA 质量浓度高时,本底荧光在样品测定所得表观荧光值($F_{实}$)中所占份额较小,表观荧光值主要取决于 GA 与 H₂SO₄ 反应产物的多少。随着 H₂SO₄ 加入量增加,GA 质量浓度降低, $F_{实}$ 减小, $F_{本}$ 在 $F_{实}$ (表观荧光值)中所占比率($F_{本}/F_{实}$)在 A 系统中由 11.1% 增到 36.0%,B 系统与之类似。 $F_{本}$ 在 $F_{实}$ 中所占比率的大幅度提高,破坏了 $F_{实}$ 与 GA 质量浓度之间的线性关系。因此,H₂SO₄ 用量过大不仅浪费试剂,更重要的是增大了测定误差。在实际测定时将体积分数 85% H₂SO₄ 用量控制在 5 mL(在 GA 质量浓度为 0.2~0.4 mg/L),可以有效避免过度稀释引起荧光值的非比例变化,以及由此引起的 GA 测值偏高,提高 GA 测定准确度,同时可以节约 50%~75% 的硫酸。

2.4 GA 与 H₂SO₄ 反应产物的荧光稳定性

GA 与硫酸的反应产物在紫外光照射下产生荧光。该产物能否稳定存在或其产生的荧光在一定条件(时间与环境温度等)下是否稳定,对 GA 测定条件确定十分重要。由表 4 可见,GA 和体积分数 85% 硫酸反应后,其反应产物的荧光值在 10 h 内保持稳定,0.2 及 0.5 mg/L GA 标准样品 6 次测值的变异系数分别为 3.2% 及 2.1%。由表 5 可以看出,10~35℃ 时,0.2 及 0.4 mg/L 标准样品在 5 种温度下的 GA 荧光值亦无明显差异。二者的变异系数分别为 3.8% 及 2.6%。GA 荧光值对环境温度及时间的稳定性为 GA 荧光法测定条件的确定提供了十分宽松的条件。

表 4 反应产物放置不同时间时的荧光值

GA 质量 浓度/ (mg·L ⁻¹)	放置时间/h						变异系数/ %
	0	1	2	3	4	10	
0.2	19.0	18.0	18.0	19.0	19.0	19.5	18.8±0.61 3.2
0.5	54.0	53.0	53.0	54.0	51.0	53.0	53.0±1.10 2.1

表 5 反应产物在不同温度下的荧光值

GA 质量 浓度/ (mg·L ⁻¹)	温 度/℃					变异系数/ %
	10	20	25	30	35	
0.2	22.0	21.5	21.0	20.0	20.5	21.0±0.79 3.8
0.4	45.0	42.0	43.0	43.0	44.0	43.4±1.14 2.6

2.5 改进法的 GA 回收率

GA 发酵液或固态发酵产品的水浸液成分复杂,改进荧光法能否用于上述产品中 GA 的测定,取决于该法的 GA 回收率。

从表 6 看出,液体发酵样品和固态样品的 GA 平均回收率分别为 96.5% 和 97.8%, GA 实测值的变异系数为 0.60% 和 0.9%,表明改进法对复杂样品中的 GA 有较高的选择性和测定准确度,可用于发酵液和固态发酵产品中 GA 的测定。

表 6 待测样品 GA 含量及回收率

样品编号	GA 发酵液				固态发酵产品 GA 提取液			
	样品含量	标准 GA 加入量	实测含量	回收率/%	样品含量	标准 GA 加入量	实测含量	回收率/%
1	1.25	8.56	9.50	96.4	1.25	8.56	9.55	97.0
2	1.30	8.56	9.55	96.4	1.37	8.56	9.78	98.2
3	1.19	8.56	9.43	96.3	1.28	8.56	9.66	97.9
4	1.14	8.56	9.43	96.8	1.28	8.56	9.65	98.1
平均值($\bar{X}$)	1.22		9.48	96.5	1.29	8.56	9.66	97.8
标准差(S)	0.07		0.06	0.22			0.09	0.55
变异系数 ($C.V$)/%	5.7		0.6	0.2	4.6		0.9	0.6

注:回收率= $\frac{\text{实测 GA 含量}-\text{样品 GA 含量}}{\text{标准 GA 加入量}} \times 100\%$ 。

2.6 改进荧光法与经典荧光法比较

用经典荧光法测定 GA 时,含 GA 的乙酸乙酯要在低温(40℃)减压条件下蒸干,浓

H₂SO₄ 与含 GA 的无水乙醇在冰浴中作用;改进荧光法采用沸水浴短时间蒸干法以逐去乙酸乙酯,然后直接加入 H₂SO₄ 溶液。两种方法的标准曲线测定结果见表 7。

表 7 经典法与改进荧光法 GA 标准曲线比较

样品编号	GA 质量 浓度/ (mg · L ⁻¹)	荧光值		K 值(荧光系数)	
		经典法	改进法	经典法	改进法
1	0.10	11.0	10.0	110.0	99.5
2	0.20	20.2	20.0	101.0	100.0
3	0.40	42.0	42.0	105.0	105.0
4	0.60	57.8	60.7	96.3	101.0
5	0.80	69.4	71.8	86.7	89.7
平均值 $\bar{x} \pm S$				99.8 ± 8.9	99.0 ± 5.7
变异系数/%				8.9	5.8
t 检验				t = 0.268, t _{0.05} = 3.182 (v = 3)	

注:K = 荧光值/GA 浓度(mg · L⁻¹)。

从表 7 可以看出,用两种方法所测荧光值与 GA 浓度之间均存在良好的线性关系(经典法与改进法标准曲线方程分别为 $y = 4.26 + 85.28x$ 与 $y = 2.78 + 90.76x$, y 和 x 分别为荧光值和 GA 质量浓度,两个方程的相关系数均为 $r = 0.993$, $r_{0.01} = 0.959$, $v = 3$)。经典荧光法与改进法荧光系数 K 的平均值及变异系数分别为 99.8 及 8.9% 与 99.0 及 5.8%。 t 检验表明,两种方法的 K 值无显著差异($P < 0.01$)。从变异系数看出,改进法的 K 值较经典法更为稳定。从 K 值比较还可以看出,在 GA 质量浓度较高(0.60~0.80 mg/L)时,两种方法测得的荧光值均偏低,但改进法的偏差较小。由此可知,改进荧光法与经典荧光法的测定结果一致,可用于 GA 的测定。

2.7 荧光法与福林法比较

印天寿等^[3]提出的 GA 快速测定法(福林法)用普通分光光度计进行比色测定,样品前处理简单,分析速度较快。福林法用于纯品 GA 测定时,福林试剂与 GA 标准品作用形成的有色产物在比色时符合比尔定律,GA 浓度与有色产物吸光值间呈良好线性关系($y = -0.0128 + 0.0491x$, $r = 0.999$),但用于发酵液中 GA 测定时,误差很大(表 8)。由表 8 看出,荧光法和福林法测出的结果相差很大。在第 1 批样品测定中,荧光法测得的 GA 含量为 4.1~6.7 mg/L,福林法测值为 115.2~373.2 mg/L,福林法为荧光法测值的 24.9~66.6 倍;第 2 批样品测定中也存在类似的结果。由此可知,福林法选择性差,易受样品中杂质的干扰,不能用于成分复杂的发酵样品中 GA 测定。

表 8 发酵液中荧光法与福林法测得的 GA 含量比较

mg/L

样品编号	第 1 批样			第 2 批样		
	改进荧光法(A)	福林法(B)	B/A	改进荧光法(A)	福林法(B)	B/A
5	5.6	373.2	66.6	7.3	352.1	48.2
7	4.1	115.2	28.1	5.5	150.9	27.4
10	6.7	166.8	24.9	6.7	174.4	26.0
11	5.6	163.9	29.3	6.5	229.6	35.3
13	4.2	228.8	54.5	4.6	292.1	63.5

3 小 结

1) 改进荧光法具有以下优点:①用简便易行的沸水浴蒸干法代替真空低温抽干法处理 GA 乙酸乙酯萃取液,设备简单,操作方便;②待测样蒸干后加入硫酸,无水合热产生,省去冰浴处理;③节约硫酸 50%~75%,并且防止了过量加入硫酸造成的测定误差;④对测定环境温度和放置时间具有良好的稳定性。

2) 改进荧光法与经典荧光法的测定结果一致。

3) 福林法对复杂样品中 GA 的选择性很差,不能用于发酵液中 GA 测定。

[参考文献]

- [1] 上海市“920”协作组,“九二〇”的应用和土法生产[M],上海:上海人民出版社,1973.
- [2] 化学工业部上海医药工业研究所. 抗菌素工业分析[M]. 北京:化学工业出版社,1960.
- [3] 印天寿,陈世勇,于群英,等. 赤霉素的快速分光光度测定法的研究[J]. 分析化学,1990,18(10):966—969.
- [4] 陈玉奎,王占文,孙思祥. 赤霉素的磷钼杂多酸光度测定法研究[J]. 南京化工学院学报,1993,15(1):51—54.
- [5] 白玉明,赵良启. 赤霉素荧光比色测定方法的研究[J]. 山西大学学报(自然科学版),1990,13(4):430—433.

Improvment of fluorescence method for the determination of gibberellin

XUE Quan-hong, LI Dong, TANG Li

(Department of Resources and Environmental Science, Northwest Science and Technology
University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of sulphuric acid concentration, sulphuric acid quantity, sample pretreatment, temperature and time on gibberellin determination are studied. The classical fluorescence method for gibberellin determination is improved and compared with Folin method. The results indicate that: ① The determination results of improved fluorescence method (IFM) are consistent with the classical one. ② Easily operated, and with no ice bath and vaccum pump equipment needed. ③ Reagent saving (50%~75%). ④ High accuracy and high recoverys. ⑤ Fluorescence values of reactant are stable within 0~10 hs after reacting and 10 °C~35 °C. ⑥ IFM is suitable for the determination of gibberellin in fermented liquid and solid products. ⑦ Folin method can't be used for the determination of gibberellin in complicated samples without good selectivity.

Key words: gibberellin; gibberellin determination; fluorescence method; Folin method