

植物中 α -三联噻吩的荧光分光光度法检测

王玉健¹, 胡 林^{1,2}, 徐汉虹¹

(1 农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642;

2 华东交通大学 应用化学研究所, 江西 南昌 330013)

摘要: 介绍了应用荧光分光光度法测定 α -三联噻吩的分析方法, 该法线性范围为 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$, 检测限可达 $2.4 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$, 比高效液相色谱法检测限 ($0.41 \mu\text{g/mL}$) 低 3 个数量级, 灵敏度好、快速方便、重现性好, 为植物中 α -三联噻吩的研究提供了一种可行的检测方法. 并应用此法测定了菊科植物孔雀草 *Tagetes patula* 和万寿菊 *T. erecta* 根、茎、花冷浸提取物中 α -三联噻吩的含量.

关键词: α -三联噻吩; 光活化毒素; 荧光分光光度法

中图分类号: TQ450.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 01-0073-03

Analysis of α -terthienyl by fluorescence spectrophotometry

WANG Yu-jian¹, HU Lin^{1,2}, XU Han-hong¹

(1 The Key Lab of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education,

Lab of Insect Toxicology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Applied Chemistry Institute of East China Jiaotong University, Nanchang 330013, China)

Abstract: Experimental results showed that fluorescence spectrophotometry was a convenient and highly sensitive analytic method for α -terthienyl with a linear range of $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$ and good recurrence. The detection limit for detecting α -terthienyl was $2.4 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$, which was one thousand times lower than that of HPLC. Therefore, it offered a feasible detecting technique for light-activated pesticides, and this technique was used to quantitate the α -terthienyl in the whole root, stem, and flower of *Tagetes patula* and *T. erecta*, respectively.

Key words: α -terthienyl; photoactive toxin; fluorescence spectrophotometry

α -三联噻吩 (α -T) 普遍存在于菊科植物中, 尤其在万寿菊族、菊族、向日葵族和堆心菊族植物中的含量最高. 它是一种优良的光活化毒素, 目前已证实对蚊子、蝇类、蛾类、蜂等多种昆虫有效. 在光照时其杀虫活性成几十倍地提高. α -T 在阳光下的半衰期为 4 h, 对环境安全, 很有希望成为一类新型杀虫剂^[1]. 但是由于它在植物体中含量很低, 所以 α -T 一直缺乏准确、灵敏、重现性好的定量检测方法. 目前对 α -T 含量的分析多采用高效液相色谱法, 但灵敏度低, 痕量 α -T 甚至无法检测出^[2]. 荧光分析检测的是叠加在很小背景上的荧光强度 $[I_f = K' (I_0 - I)]^{[3]}$, 低浓度时, 荧光强度与物质浓度呈线性关系, $I_f = kc^{[4]}$. α -T 本身具有荧光特性, 在

一定波长的光照下可以发出黄绿色荧光, 本文使用荧光分光光度法研究了 α -T 的测定参数, 绘制出标准工作曲线, 找出其线性范围, 为 α -T 的荧光分光光度法检测提供了重要的测定参数. 采用该法测定了菊科植物孔雀草 *Tagetes patula* 和万寿菊 *T. erecta* 根、茎、花的丙酮冷浸提取物中 α -T 的含量, 并与高效液相色谱法进行了比较.

1 材料与方法

1.1 材料

仪器: HITACHI F-4500 型荧光分光光度计 (Tokyo); HP1100 型高效液相色谱仪 (美国惠普, 配可变波长的紫外检测器), 色谱柱型号为 Hypersil

收稿日期: 2004-06-30

作者简介: 王玉健 (1979-), 女, 博士研究生, 通讯作者: 徐汉虹 (1961-), 男, 教授, 博

士; E-mail: hhxu@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (010319); 广东省自然科学基金重点项目 (36837)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ODS 250 mm×4 mm, 5 μ m (Agilent, USA); Laborata 4001 型旋转蒸发器(德国 Heidolph); Maxi Dry Plus 型真空冷冻干燥仪(Heto Dry Winner).

试剂: $w=99.5\%$ 的 α -T 结晶(Aldrich); 分析纯丙酮、石油醚、甲醇、乙醚(天津化学试剂厂); 蒸馏水.

1.2 方法

1.2.1 α -T 标准溶液的配制 称取 α -T 晶体 0.01 g, 用分析纯丙酮配制出 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 μ g/mL 的系列标准溶液, 另设空白对照.

1.2.2 α -T-丙酮体系的最大激发波长与最大荧光发射波长的选择 由紫外分光光度法发现 α -T 最大吸收波长在 352 nm 处, 设定激发光波长为 352 nm, 发射光谱从 360~800 nm 扫描, 激发光和发射光狭缝宽度均为 5.0 nm, 扫描速度为 1 200 nm/min.

设定发射光波长为 428 nm, 荧光分光光度计对激发光从 200~410 nm 扫描, 激发光和发射光狭缝宽度均为 5.0 nm, 扫描速度为 1 200 nm/min.

1.2.3 标准工作曲线的绘制 在激发光波长为 352 nm、发射光波长为 428 nm, 激发光、发射光狭缝宽度均为 5 nm 的参数设置下, 作梯度溶液的标准工作曲线.

1.2.4 荧光分光光度法检测限试验 在荧光分光光度计上测定对照的荧光强度值, 重复测定 10 次, 求出标准偏差. 根据工作曲线及以下公式计算荧光分光光度法的检测限^[5]:

$$X_L = X_B + 3S_B, \quad (1)$$

式中, X_L 为检测限, X_B 为平均空白值, S_B 为空白值的标准偏差.

1.2.5 植物样品的采收、处理与检测 植物样品孔雀草 *Tagetes patula* 和万寿菊 *T. erecta* 于冬季盛花期采于华南农业大学杀虫植物标本园. 采摘后洗净, 根、茎、花分别截成小段, 于真空冷冻干燥机内干燥, 干燥后称质量. 然后用分析纯丙酮冷浸, 分 3 次提取, 溶剂每 2 d 换 1 次, 共提取 6 d. 合并 3 次提取液, 根、茎、花提取物分别在 2 000、1 000 和 200 mL 容量瓶中定容, 避光保存, 测定荧光强度.

1.2.6 添加回收率的测定 在万寿菊、孔雀草的根、茎、花 1 mL 提取物中分别加入 4 μ g/mL 的 α -T 1 mL, 并定容至 10 mL, 测定添加后的荧光强度, 并计算添加回收率.

1.2.7 高效液相色谱法检测限试验 高效液相色谱仪测定条件: 流动相为甲醇和水, $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=85:15$; 流速为 1.000 mL/min; 紫外检测波长为 352 nm.

α -T 在 2~10 μ g/mL 时呈较好的线性关系^[9], 故试验中, 在 2~10 μ g/mL 范围作 α -T 的工作曲

线. 测定 2 μ g/mL 标准样品峰面积, 重复测定 10 次, 求出标准偏差, 并依式(1)及标准工作曲线计算高效液相色谱法对 α -T 的检测限.

2 结果与分析

2.1 最大激发波长、发射波长扫描结果

对 1 μ g/mL α -T 进行扫描, 得其激发波长—荧光强度扫描图(图 1)和发射波长—荧光强度扫描图(图 2).

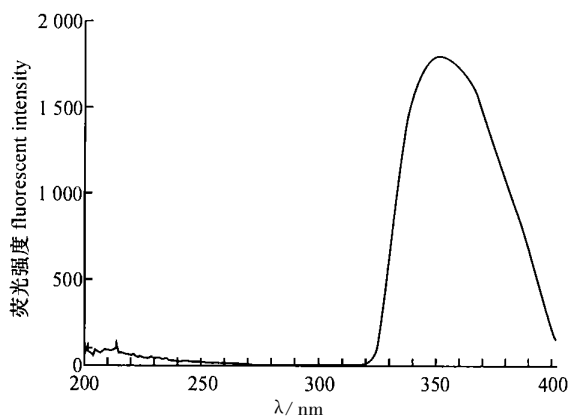


图 1 1 μ g/mL α -三联噻吩激发波长—荧光强度扫描图
Fig. 1 Excitation wavelength of 1 μ g/mL α -terthienyl and fluorescent intensity scanning

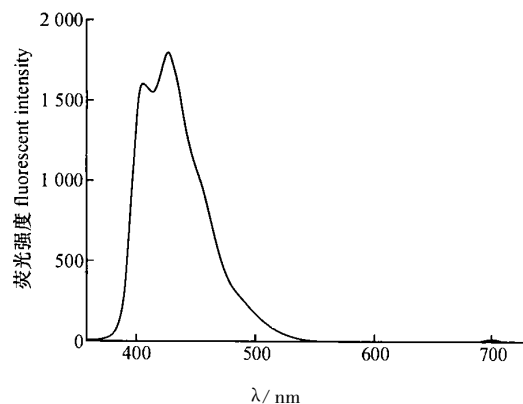


图 2 1 μ g/mL α -三联噻吩发射波长—荧光强度扫描图
Fig. 2 Emission wavelength of 1 μ g/mL α -terthienyl and fluorescent intensity scanning

由扫描图可见: α -T 的最大激发波长为 352 nm, 最大荧光发射波长为 428 nm.

2.2 α -T 标准样品浓度与荧光强度值的工作曲线及检测限数据结果

在激发光波长为 352 nm, 发射光波长为 428 nm 下, 作出 α -T 标准溶液的工作曲线(图 3). 由图 3 可见: 在 0.2~1.0 μ g/mL 范围内, α -T 质量浓度与荧光强度呈良好的线性关系($R=0.9991$). 根据此工作曲线和空白样品标准偏差计算得出, 荧光分光光度法对 α -T 的检测限为 2.4×10^{-4} μ g/mL.

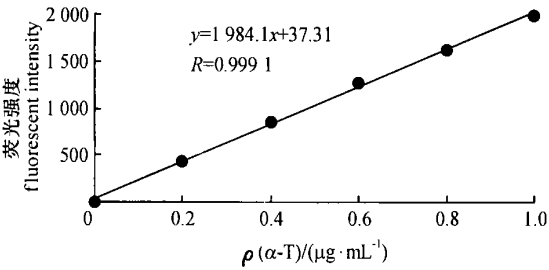


图 3 α -三联噻吩(α -T)质量浓度与荧光强度标准工作曲线
Fig. 3 Concentrations of α -terthienyl (α -T) and fluorescent intensities standard curve

2.3 孔雀草和万寿菊根、茎、花中 α -T 含量的测定
用荧光分光光度法测定孔雀草、万寿菊根、茎、花丙酮提取液的荧光强度, 根据工作曲线计算得出 α -T 在丙酮提取液中的浓度. 结合孔雀草、万寿菊根、茎、花干燥后的净质量, 折算得出其中 α -T 的含量(表 1).

表 1 孔雀草和万寿菊根、茎、花中 α -三联噻吩(α -T)的含量¹⁾
Tab. 1 α -terthienyl contents of *Tigetes patula* and *T. erecta*
(2003-06, 广州 Guangzhou)

材料 material	m (干燥后 after dried)/g	荧光强度 (fluorescent intensity)	$\rho(\alpha\text{-T})/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$w(\alpha\text{-T})/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
孔雀草根 root of <i>T. patula</i>	2.955	3 224.8	1.607	543.90
孔雀草茎 stem of <i>T. patula</i>	2.628	1 733.2	0.855	325.32
孔雀草花 flower of <i>T. patula</i>	1.401	379.1	0.172	122.59
万寿菊根 root of <i>T. erecta</i>	1.127	1 988.8	0.984	872.96
万寿菊茎 stem of <i>T. erecta</i>	2.879	391.9	0.179	62.17
万寿菊花 flower of <i>T. erecta</i>	3.512	123.2	0.043	12.24

1) 表中数据为 5 次测定的平均值

由表 1 可知, 孔雀草、万寿菊根、茎、花中的 α -T 含量有较大的差异. 其中, 根中分布最多, 孔雀草根中 α -T 的质量分数为 $543.90 \mu\text{g/g}$, 万寿菊根中 α -T 的质量分数为 $872.96 \mu\text{g/g}$, 有一定的提取开发价值.

在添加回收率试验中, α -T 的添加回收率为 $84.54\% \sim 102.27\%$, 符合痕量分析的要求. 且 5 次荧光强度测量值标准偏差在 $0.75 \sim 9.63$ 之间, 重现性好.

2.4 高效液相色谱法检测限试验结果

据图 4 工作曲线计算得出高效液相色谱法对 α -T 的检测限为 $0.41 \mu\text{g/mL}$, 而荧光分光光度法的检测限为 $2.4 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$, 比高效液相色谱法的检测限低 3 个数量级.

依照王新国^[2]的菊科植物中的 α -T 硅胶柱层析分离法分别对万寿菊、孔雀草的根、茎、叶丙酮提取物依次用石油醚($\varphi = 95\%$ 甲醇)、乙醚($\varphi = 60\%$ 甲醇)、正丁醇/水进行萃取, 萃取物经硅胶柱层析, 以 $V(\text{石油醚}):V(\text{丙酮})=9:1$ 冲柱, 之后以石油

醚洗脱, 分离纯化. 将分离出的 W4(即 α -T)^[2] 组分和除 W4 组分外的其他流分合并液分别蒸发浓缩. 取浓缩后的 W4 组分和除 W4 组分外的成分分别溶解在 100 mL 丙酮中, 进行荧光测定, 发现: 无论是孔雀草的根、茎、叶提取物, 还是万寿菊的根、茎、叶提取物, 在激发光波长为 352 nm, 发射光波长为 428 nm 处, 除 W4 组分外成分的荧光强度值均小于 W4 组分荧光强度值的 5%, 可见, 其他组分对荧光测定的干扰很小.

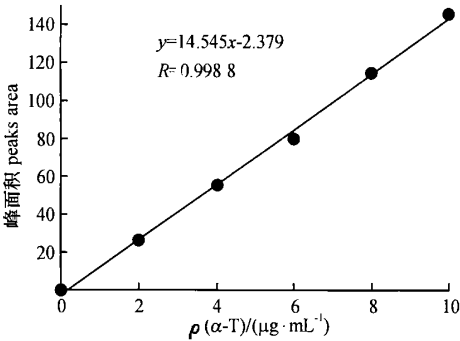


图 4 α -三联噻吩(α -T)质量浓度与液相色谱峰面积标准工作曲线
Fig. 4 α -terthienyl concentrations and chromatogram peaks areas standard curve

3 结论

试验证明, α -T 在 $0.2 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$ 时质量浓度与发射光谱峰值呈非常好的线性关系, 可以采用荧光分光光度法测定样品中 α -T 浓度. 由于荧光分光光度法测定的同时限定了最大激发波长和最大发射波长 2 个测定参数, 故而可有效排除其他化学物质的干扰, 准确度高. 因其检测限低, 灵敏度高, 很容易检测出痕量 α -T, 为 α -T 研究提供了一种更为灵敏、简便、快速、准确的检测方法, 也为植物中其他光活化毒素的定性定量分析提供了一条可借鉴的思路.

参考文献:

[1] 徐汉虹. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 9.
[2] 王新国. 几种菊科植物光活化杀虫剂及有效成分的研究[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院昆虫毒理研究室, 2001.
[3] 张正奇. 分析化学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 323.
[4] 方慧群, 于俊生, 史 坚. 仪器分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 320.
[5] 程介克, 刘锦春, 江祖成. 痕量分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 1993. 41.
[6] 侯学文. 万寿菊发根产生光活化杀虫剂 α -三联噻吩的研究[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院昆虫毒理研究室, 2000.

【责任编辑 李晓卉】