

郑丹,王文静,张清峰. 环糊精增敏荧光法测定十字花科植物总芥子碱含量[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):222-225.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.056

# 环糊精增敏荧光法测定十字花科植物总芥子碱含量

郑丹,王文静,张清峰

(江西农业大学食品科学与工程学院/江西省天然产物与功能食品重点实验室,江西南昌 330045)

**摘要:**芥子碱是十字花科植物中主要的功效成分,具有降压、抗肿瘤、平喘、抗辐射等功效。研究芥子碱的荧光性质及环糊精(CD)的增敏作用,建立芥子碱荧光定量方法并用于4种十字花科植物种子中的芥子碱含量的测定。芥子碱的最大激发波长为350 nm,最大发射波长为470 nm。 $\alpha$ -CD和 $\beta$ -CD疏水性的空腔可与芥子碱形成包合物从而增强芥子碱的荧光强度,而 $\gamma$ -CD基本没有影响。芥子碱的荧光强度在pH值为3~6的酸性条件下稳定;随着pH值的继续升高,其荧光强度迅速下降。采用常温浸提和超声辅助提取菜菔子、黄芥子、白芥子和油菜籽粕中的芥子碱,并利用建立的荧光定量方法测定。结果表明,超声辅助可有效增加芥子碱提取效率;白芥子中芥子碱含量最高,为14.25 mg/g,其次为油菜籽粕,黄芥子中芥子碱含量最低,为7.69 mg/g。

**关键词:**芥子碱;环糊精;十字花科植物;荧光;测定

**中图分类号:** TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0222-03

芥子碱是一种季铵盐生物碱(图1),广泛存在于十字花科植物种子中,如白芥子、黄芥子、菜菔子、油菜籽等,并主要以芥子碱硫氰酸盐的形式存在<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明,芥子碱具有多种生理活性,可通过扩张支气管平滑肌,起到平喘的作用<sup>[2]</sup>;能够抑制肿瘤血管的生成,起到抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>;具有抗雄激素活性,起到抑制前列腺增生的作用<sup>[4]</sup>;芥子碱还具有降压、降血脂、抗辐射、辅助神经元再生等作用<sup>[5-8]</sup>。

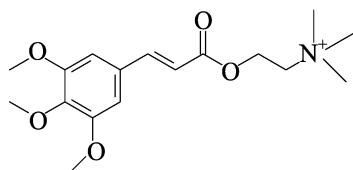


图1 芥子碱化学结构

《中国药典》以芥子碱含量评价芥子、菜菔子等中药材的质量,要求芥子中芥子碱含量不低于0.5%,菜菔子中不低于0.4%<sup>[9]</sup>。目前,芥子碱的测定方法主要是通过高效液相色谱法(HPLC)<sup>[10-11]</sup>和毛细管电泳法<sup>[12]</sup>对芥子碱单体分离后再定量。这需要较长的分析时间及较为昂贵的设备和专业的人员操作,并且十字花科植物种子中还含有3-羟基-4-甲氧基桂皮酰胆碱、4-羟基苯甲酰胆碱、3,4-甲氧基苯甲酰胆碱、芥子酸等芥子碱衍生物,这些成分具有相似的生物活性<sup>[13]</sup>。因此,快速测定芥子中总芥子碱类含量对评价其药材质量也有一定的意义。测定总芥子碱的方法目前有分光光度法<sup>[14]</sup>和雷氏盐沉淀法等<sup>[15]</sup>。本试验研究了芥子碱的荧光特性,并利用环糊精空腔包结作用的荧光增强效应,建立芥子碱

含量的荧光测定方法,并用于4种十字花科植物种子中的总芥子碱含量的测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂与原料** 芥子碱硫氰酸盐标准品购自上海同田生物技术股份有限公司; $\alpha$ -环糊精(cyclodextrin, CD)、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精购自江苏丰园生物技术有限公司;菜菔子、黄芥子、白芥子购买于中药店;油菜籽粕购买于菜市场;其他所用试剂均为分析纯。

**1.1.2 主要仪器设备** 970CRT型荧光分光光度计,购自上海精密科学仪器有限公司;UV-5200PC型紫外可见分光光度计,购自上海元析仪器有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 芥子碱最佳荧光体系的建立** 精确称取芥子碱标准品,用超纯水溶解得到浓度为1.35 mg/mL的标准溶液,放置于4℃冰箱备用。(1)pH值的影响试验:准确移取200  $\mu$ L芥子碱标准溶液于10 mL容量瓶中,用不同pH值的磷酸缓冲液(0.2 mol/L)定容至10 mL,充分摇匀放置30 min后,在激发波长350 nm、发射波长470 nm条件下测量荧光强度。(2)CD的影响试验:用pH值为6的磷酸缓冲液(0.2 mol/L)配制浓度为10 mmol/L的 $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD溶液。准确移取200  $\mu$ L芥子碱标准溶液于10 mL容量瓶中,加入不同体积的CD溶液后,用pH值为6的磷酸缓冲液定容,充分摇匀后放置30 min,在激发波长350 nm、发射波长470 nm条件下测量荧光强度。

**1.2.2 芥子碱标准曲线的绘制** 分别移取0、10、20、30、40、50  $\mu$ L的芥子碱标准溶液于10 mL容量瓶中,加入7 mL 15 mmol/L  $\beta$ -CD溶液(0.2 mol/L磷酸缓冲液配制,pH值为6)和1 mL 60%乙醇,用pH值为6的磷酸盐缓冲液定容至10 mL。充分摇匀后在室温下放置30 min,在激发波长350 nm、发射波长470 nm条件下测量荧光强度。

收稿日期:2017-05-22

基金项目:江西省教育厅基金(编号:GJJ160416);江西省天然产物与功能食品重点实验室开放基金(编号:2015003)。

作者简介:郑丹(1994—),女,江西上饶人,硕士研究生,主要从事天然产物与功能食品研究。E-mail:1610555140@qq.com。

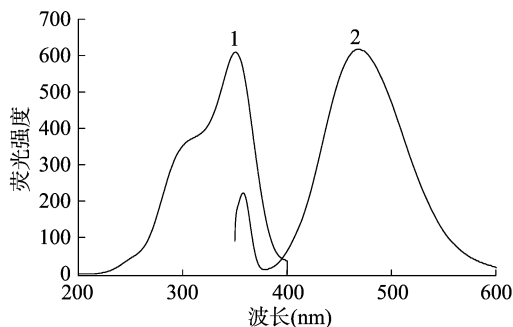
通信作者:张清峰,博士,副教授,主要从事天然产物与功能食品研究。E-mail:zhqf619@126.com。

1.2.3 十字花科植物中芥子碱的提取与测量 菜菔子、黄芥子、白芥子、油菜籽粕粉碎后过 40 目筛。准确称取 0.25 g 样品,加入 25 mL 60% 乙醇。采用浸提和超声 2 种提取方式,浸提时间为 120 min,超声提取时间为 30 min,提取均在常温下进行。提取完成后过滤,取 0.2 mL 滤液于 10 mL 容量瓶中,加入 0.8 mL 60% 乙醇,再加入 7 mL 15 mmol/L  $\beta$ -CD 溶液,用 pH 值为 6 的磷酸盐缓冲溶液定容至 10 mL。充分摇匀后在室温下放置 30 min,在激发波长 350 nm、发射波长 470 nm 条件下测量荧光强度。根据标准曲线计算芥子碱浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 芥子碱的荧光性质

芥子碱在紫外光的激发下可产生荧光,由图 2 可知,芥子碱的最大激发波长为 350 nm,最大发射波长为 470 nm。



1—芥子碱的激发光谱; 2—芥子碱的发射光谱

图2 芥子碱的激发光谱和发射光谱

### 2.2 环糊精对芥子碱荧光强度的影响

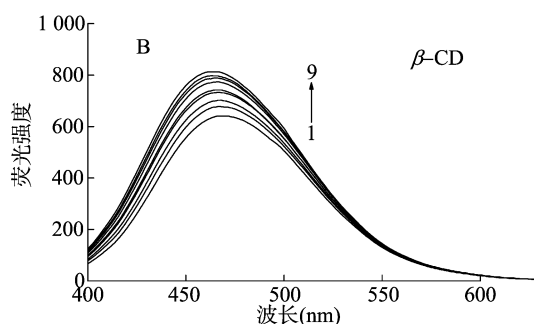
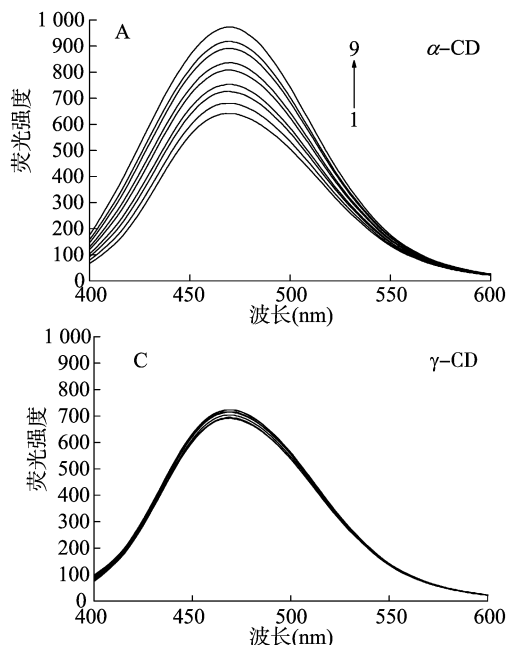
环糊精是一类由 D-吡喃型葡萄糖通过  $\alpha$ -1,4-糖苷键连接而成的环状低聚糖,其分子形状为上宽下窄中空的一环

筒状,可与客体分子通过范德华力、疏水作用、空间匹配效应及氢键等相互作用力形成主客体包合物。CD 疏水性的空腔微环境可以影响客体分子的理化性质,如改变其紫外-可见吸收、荧光等光谱性质,从而在分析化学上有广泛的应用,可以提高检测的灵敏度和准确性<sup>[16]</sup>。由图 3 可知,芥子碱的荧光强度随着  $\alpha$ -CD 和  $\beta$ -CD 浓度的升高而逐渐增强,而  $\gamma$ -CD 的影响不明显。并且  $\beta$ -CD 会使芥子碱的最大发射波长向短波方向移动,从原来的 470 nm 蓝移至 460 nm。这些现象说明  $\alpha$ -CD 和  $\beta$ -CD 可与芥子碱形成包结物,从而影响其荧光性质。荧光强度的增强可能是因为芥子碱分子进入 CD 的疏水性空腔,增加了芥子碱的刚性结构,减少了荧光猝灭,从而导致其荧光强度增强<sup>[16]</sup>。而  $\gamma$ -CD 因为空腔尺寸较大,与芥子碱空间匹配程度较差,不形成包结物。

根据芥子碱在 470 nm 处荧光强度随  $\alpha$ -CD 和  $\beta$ -CD 浓度的变化而变化,二者包结反应的平衡常数  $K$  可以由 Benesi-Hildebrand 方程(公式 1)求得<sup>[17]</sup>:

$$\frac{1}{F-F_0} = \frac{1}{KkQ[G]} \cdot \frac{1}{[CD]} + \frac{1}{kQ[G]} \quad (1)$$

式中: $F_0$  为无 CD 时的荧光强度; $F$  为添加不同浓度 CD 后的荧光强度; $[CD]$  为 CD 浓度, mol/L; $K$  为二者包结反应的平衡常数, L/mol; $[G]$  为芥子碱浓度, mol/L; $Q$  为包结物荧光量子产率; $k$  为仪器参数。由  $1/(F-F_0)$  对  $1/[CD]$  作图,通过斜率和截距可计算得到平衡常数  $K$ 。如图 3-D 所示,回归曲线呈良好的线性关系,说明  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD 与芥子碱的包合比为 1:1。计算结果列于表 1, $\beta$ -CD 与芥子碱的包结平衡常数大于  $\alpha$ -CD,说明  $\beta$ -CD 与芥子碱包合物更稳定。因为  $\beta$ -CD 更廉价易得,且与芥子碱包结更稳定,所以后续试验选用  $\beta$ -CD 为荧光增敏剂。



1~9 的 CD 浓度分别为 0、1、2、3、4、5、6、7、8 mmol/L; 芥子碱浓度为 270  $\mu$ g/mL;

图 3-D 为  $1/(F-F_0)$  对  $1/[CD]$  作的双倒数曲线

图3  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CD 对芥子碱的荧光光谱的影响

### 2.3 最佳荧光体系的建立

如图 4-A 所示,芥子碱荧光强度在 pH 值为 3~6 的酸

性条件下基本稳定;随着 pH 值的继续升高,其荧光强度迅速下降。所以,选择 pH 值为 6 的磷酸缓冲液进行后续试验。

表 1 环糊精与芥子碱包结反应的平衡常数

环糊精类型	回归方程	$r^2$	$K$
$\alpha$ -CD	$y = 2.567 \times 10^{-5}x + 2.190 \times 10^{-4}$	0.996 5	8.531
$\beta$ -CD	$y = 2.495 \times 10^{-5}x + 2.954 \times 10^{-4}$	0.997 3	11.840

芥子碱与 CD 的包结可能需要一定的时间才能稳定,如图 4-B 所示,芥子碱荧光强度随放置时间的延长迅速下降,25 min 后趋于稳定。因此,后续试验中溶液配制混合均匀后,

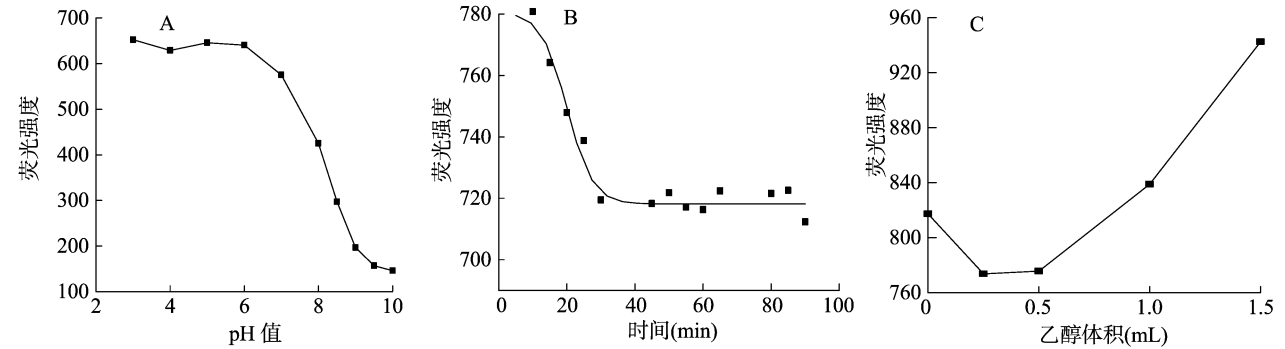


图 4 芥子碱荧光强度影响因素

2.4 荧光法测定芥子碱方法考察

根据“1.2.3”节的方法步骤,测定一系列已知浓度的芥子碱标准溶液的荧光强度,绘制标准曲线。如图 5 所示,芥子碱的荧光强度与其浓度呈良好的线性关系。当体系中存在  $\beta$ -CD 时,同一浓度的芥子碱荧光强度更高,说明  $\beta$ -CD 有增敏效果。在空白体系中芥子碱的标准曲线方程为  $y = 5.10x + 22.53, r = 0.998$ ;添加  $\beta$ -CD 后,标准曲线方程为  $y = 5.94x + 45.00, r = 0.996$ ;式中: $y$  为荧光强度, $x$  为芥子碱浓度,  $\mu\text{g/mL}$ 。根据斜率比值,  $\beta$ -CD 的增敏倍数为 1.16 倍。连续测定浓度为 20  $\mu\text{g/mL}$  的芥子碱标准品 6 次,计算荧光强度的相对标准差为 1.67%,表明方法稳定性很好。

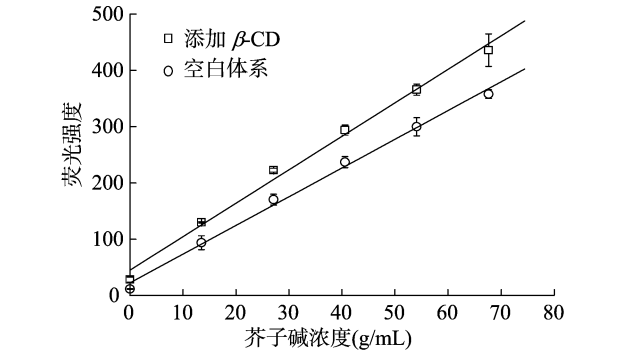


图 5 芥子碱的标准曲线

2.5 十字花科植物样品中芥子碱含量测定结果

采用常温浸提和超声辅助提取萝卜籽、黄芥子、白芥子和油菜籽粕中的芥子碱,并利用建立的荧光定量方法进行测定,结果如表 2 所示。超声辅助提取能有效提高芥子碱的提取效果,可能是因为超声波穿透力强,细胞更易破碎,因此提取效率更高。4 种十字花科植物种子中,白芥子中芥子碱含量最高,为 14.25 mg/g,其次为油菜籽粕,黄芥子含量最低,原因是十字花科植物种子中还含有 3-羟基-4-甲氧基桂皮酰胆碱、4-羟基苯甲酰胆碱、3,4-甲氧基苯甲酰胆碱、芥子酸等芥子碱衍生物,这些化合物结构相似,都会有荧光。因此,本法测定得到的是十字花科植物种子中总芥子碱含量。

放置 30 min 再开始测量荧光强度。

在提取十字花科植物中芥子碱时,多用乙醇水溶液为提取溶剂<sup>[11,18-19]</sup>。因此,在测定实际样品时,要考虑乙醇对芥子碱荧光的影响。如图 4-C 所示,在 10 mL 容量瓶中加入不同体积的无水乙醇,因为乙醇会影响溶剂极性,对芥子碱荧光强度影响很大。因此,绘制标准曲线和测定样品时要保证乙醇体积一致。

表 2 十字花科植物样品中芥子碱含量测定结果

样品	提取方式	芥子碱含量 (mg/g)	
		荧光法	分光光度法
莱菔子	浸提	7.51 $\pm$ 0.17	13.19 $\pm$ 0.33
	超声辅助	12.25 $\pm$ 0.21	23.19 $\pm$ 0.16
黄芥子	浸提	5.05 $\pm$ 0.08	10.72 $\pm$ 0.11
	超声辅助	7.69 $\pm$ 0.16	14.89 $\pm$ 0.22
白芥子	浸提	10.14 $\pm$ 0.26	11.75 $\pm$ 0.17
	超声辅助	14.25 $\pm$ 0.17	14.39 $\pm$ 0.22
油菜籽粕	浸提	10.77 $\pm$ 0.10	12.38 $\pm$ 0.18
	超声辅助	14.23 $\pm$ 0.25	15.14 $\pm$ 0.31

芥子碱的紫外吸收光谱在 332 nm 有最大吸收峰,因此也可以用分光光度法测定。本研究比较了分光光度法和荧光法的测定结果。在 332 nm 下,芥子碱的标准曲线为  $y = 0.00586x + 0.00682, r = 0.997$ ,式中: $y$  为吸光度; $x$  为芥子碱浓度,  $\mu\text{g/mL}$ 。对同一样品的测定结果如表 2 所示,分光光度法测定的芥子碱含量普遍高于荧光法测定结果,这是因为分光光度法没有选择性,提取液中还含有其他在 332 nm 下有光吸收的物质。而荧光法具有一定的选择性,因此对于复杂样品,测定结果比分光光度法更准确。

3 结论

芥子碱的最大激发波长和发射波长分别为 350、470 nm。 $\alpha$ -CD 和  $\beta$ -CD 可以通过包结作用,增强芥子碱荧光强度。建立了芥子碱荧光定量方法,并用于莱菔子、黄芥子、白芥子和油菜籽等 4 种十字花科植物种子中的芥子碱含量的测定,结果表明白芥子中芥子碱含量最高,黄芥子最低。

参考文献:

[1]柯木根,吴国欣,林燕妮,等. 芥子碱的研究概况[J]. 中草药, 2007,38(9):1436-1439.  
[2]王 辉,苑艳霞,邱 琳,等. 芥子碱平喘作用及其机制研究[J]. 中草药,2011,42(1):134-136.

华艳宏, 庞春花, 张永清, 等. 藜麦种子不同溶剂提取物及其抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 225–228.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.057

# 藜麦种子不同溶剂提取物及其抗氧化活性

华艳宏<sup>1</sup>, 庞春花<sup>1,2</sup>, 张永清<sup>1</sup>, 贺笑<sup>1</sup>, 杨世芳<sup>1</sup>, 薛蓉<sup>2</sup>

(1. 山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004; 2. 山西师范大学现代文理学院生物系, 山西临汾 041000)

**摘要:**以一号藜麦种子为研究对象, 分别采用蒸馏水、70% 甲醇、70% 乙醇、70% 丙酮、甲醇、乙醇、丙酮为溶剂, 通过超声波浸提方法, 比较不同溶剂提取藜麦种子提取物中活性物质含量及其抗氧化活性差异。结果表明, 不同溶剂提取的藜麦种子总多酚、总黄酮含量存在一定差异, 提取液中总多酚含量为 1.14~3.28 mg/g, 其中以 70% 乙醇为溶剂时含量最高; 总黄酮含量为 1.34~1.98 mg/g, 以 70% 乙醇、蒸馏水为溶剂时含量较高, 且二者之间无显著差异; 不同溶剂藜麦种子提取液均具有一定的 DPPH、羟基自由基清除能力和铁还原能力。同时相关性分析表明, 不同溶剂提取物中总多酚含量与其抗氧化活性间的相关性显著, 总黄酮含量与其抗氧化活性间的相关性较小。70% 乙醇是藜麦种子中总多酚、总黄酮提取及其抗氧化活性研究的最好溶剂。本研究可为藜麦种子提取物的开发利用提供参考。

**关键词:**藜麦; 不同溶剂; 提取物; 总多酚; 总黄酮; 抗氧化活性

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0225-04

藜麦 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 别称南美藜, 是藜科 (Chenopodiaceae) 藜属 (*Chenopodium*) 的 1 年生草本植物, 原产于南美洲的安地斯山脉, 是当地的一种农作物, 有几千年的种植历史<sup>[1]</sup>。目前在我国西藏、山西及西北地区都有种植。

收稿日期: 2017-06-11

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31571604); 山西师范大学科技开发与应用基金 (编号: YK1402); 山西师范大学现代文理学院大学生创新创业训练项目 (编号: 2017CXJY-01)。

作者简介: 华艳宏 (1993—), 女, 山西忻州人, 硕士研究生, 主要从事植物生理生态学研究。E-mail: 1925769459@qq.com。

通信作者: 庞春花, 硕士, 副教授, 主要从事植物生理生态学研究。E-mail: pangch6269@126.com。

21 世纪以来, 藜麦在全球范围开始引种和试种, 成为食品领域的研究热点。因其食品的安全性、全营养性, 联合国将 2013 年定义为国际藜麦年<sup>[2]</sup>。许多研究表明, 藜麦蛋白质含量高, 氨基酸分配均衡, 且脂肪酸多为不饱和脂肪酸, 矿物质、抗氧化物质含量丰富, 是一种高蛋白、低热量、活性物质丰富的营养食物, 可充分满足人类生命活动的基本要求, 不仅是健康食品, 更是安全食品<sup>[3]</sup>, 是具有腹腔疾病及过敏体质人群的优良食材<sup>[4]</sup>。多酚、黄酮是广泛存在于植物中的活性物质, 因其具有抗氧化、抗衰老、预防心血管疾病并且能够有效增强自身免疫力等特点而被广泛应用于医药行业。研究已证实藜麦中含有丰富的多酚、黄酮类化合物, 其中大部分是香草酚酸、阿魏酸及其衍生物、槲皮素、山奈酚<sup>[5-6]</sup>, 表现出高抗氧

[3] 张福华. 芥子碱的抗肿瘤血管生成作用及其机制探讨[D]. 福州: 福建师范大学, 2012.

[4] 吴国欣, 林跃鑫, 欧敏锐, 等. 芥子碱的抗雄激素作用[J]. 中国医药学报, 2003, 18(3): 142–144.

[5] 丁韵, 卢轩, 王惠国, 等. 芥子碱氯化盐的制备及其对自发性高血压大鼠的降压作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2013(5): 379–382.

[6] 王群, 孙忠迪, 刘梅, 等. 炒莱菔子中芥子碱对高血脂大鼠血脂水平的影响[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(5): 60–62.

[7] 黄德娟, 徐巍越, 黄德超. 花椰菜芥子碱对果蝇辐射的保护作用[J]. 营养学报, 2009, 31(6): 588–590.

[8] 李群, 郭房庆, 顾瑞琦. 果蝇伴性隐性致死突变试验中芥子碱的辐射保护作用[J]. 实验生物学报, 1993, 26(3): 269–274.

[9] 宋贵军, 林璐璐, 李昱, 等. 芥子碱对 Aβ<sub>25-35</sub> 诱导的认知功能障碍小鼠海马神经元再生的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(6): 785–788.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 149.

[11] 刘丽芳, 王宇新, 张新勇, 等. 莱菔子中芥子碱的含量测定[J]. 中成药, 2002, 24(1): 54–56.

[12] 邢军, 苑艳霞, 冯宝民. 五种十字花科植物中芥子碱的有效提取和高效液相色谱定量分析[J]. 分析科学学报, 2012, 28(4): 523–526.

[13] 蔡梅超. 高效毛细管电泳法测定莱菔子中芥子碱含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011(9): 45–46.

[14] 张青山, 王卓, 孔铭, 等. 芥子中芥子碱类和硫代葡萄糖苷类成分化学稳定性和质量评价研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(1): 148–156.

[15] 林燕妮, 陈密玉, 吴国欣, 等. 芥子碱含量测定方法探讨[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(2): 260–263.

[16] 杨雪萍, 王惠国, 冯宝民, 等. 芥子中总芥子碱类成分的含量测定[J]. 大连大学学报, 2009(6): 53–55.

[17] 童林荟. 环糊精化学: 基础与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[18] Zhang Q F, Jiang Z T, Guo Y X, et al. Complexation study of brilliant cresyl blue with beta-cyclodextrin and its derivatives by UV-vis and fluorospectrometry[J]. Spectrochimica Acta Part A (Molecular and Biomolecular Spectroscopy), 2008, 69(1): 65–70.

[19] 孟祥红, 苏永汶, 孙忠迪, 等. 炒莱菔子中含芥子碱部位醇提工艺优选及市售样品含测分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 5–8.