

## 血浆和组织中皮质酮的荧光测定法

熊忠 索有瑞

中国科学院西北高原生物研究所, 810001 西宁

**摘要** 皮质酮是肾上腺皮质激素之一。本文试验研究了用荧光分光光度法测定小哺乳动物血浆和组织中皮质酮含量的方法。方法的线性范围为 $0.01 \sim 0.24 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 470\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 525\text{nm}$ ), 标准回收率平均为96.0%, 相对标准偏差( $n = 10$ )为4.2%。本法具有快速、简便、准确和灵敏等特点, 能同时运用于血浆或肾上腺组织中皮质酮的测定。

**主题词** 皮质酮, 荧光法测定

皮质酮是肾上腺皮质分泌的一种糖皮质激素, 其分泌受下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRF)和垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)的调控。目前皮质酮在血浆和组织中含量的测定有荧光分光光度法和放射免疫测定法, 两者各有优缺点, 比较起来还是多用荧光法测定。早期文献[1~6]报道的方法各异, 实际运用时均存在操作手续繁杂, 条件要求严格, 分析精度不高等缺点, 而近年来采用荧光法测定皮质酮的文献未见报道, 本文建立了一种适用于一般实验室测定血浆和组织中皮质酮含量的快速简便的方法。

### 原 理

皮质酮经二氯甲烷萃取后在紫外光照射下发出紫蓝色荧光, 再经过硫酸乙醇反萃取, 在470nm处激发, 发出特定的绿色荧光, 荧光峰在525nm。根据荧光强度与皮质酮含量成正比, 用标准曲线法定量测定血浆或组织中皮质酮含量。

### 仪器、试剂和材料

一、仪器 RF540型荧光分光光度计。

二、试剂 标准溶液( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  皮质酮): 准确称取皮质酮 $10\text{mg}$ 溶于 $100\text{mL}$ 无水乙醇中, 使用时取 $40 \mu\text{L}$ 用 $0.04\text{mol/L}$  NaOH 稀至 $10\text{mL}$ 制成浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液; 二氯甲烷(分析纯); 硫酸乙醇呈色液; 量取7份分析纯浓硫酸和3份分析纯无水乙醇混和;  $0.04\text{mol/L}$  NaOH 溶液。

三、材料 (1) 血浆制备: 将Wistar大鼠迅速断头, 取血, 离心得血浆, 置冰箱 $-30^\circ\text{C}$ 冷冻贮藏。(2) 肾上腺组织制备: 大鼠或根田鼠(Microtus oeconomus)断头法处死, 剖腹、摘取双侧肾上腺, 仔细剔去脂肪等结缔组织, 准确称重, 置冰箱 $-30^\circ\text{C}$ 冷冻贮藏。

### 测定方法

#### 一、样品测定

1. 血浆皮质酮测定: 取大鼠血浆 $0.50\text{mL}$ , 加入 $0.50\text{mL}$   $0.04\text{mol/L}$  NaOH 溶液, 充分混匀后置 $60\text{mL}$ 分

液漏斗中,加5mL 二氧甲烷充分振荡2min,静置分层后,弃水相,用10mL 试管收集二氧甲烷,加入2.5mL (7+3) 硫酸乙醇呈色液,充分摇匀2min后静置30min,小心用细头吸管将二氧甲烷层吸去,呈色液静置30min后在荧光分光光度计上,  $\lambda_{ex} = 470\text{nm}$ 、 $\lambda_{em} = 525\text{nm}$  (激发波长狭缝10nm,发射波长狭缝20nm)处测定荧光值。

2. 肾上腺组织皮质酮测定:在冰水浴中用1mL 0.04mol/L NaOH 溶液研磨肾上腺组织,研磨液在60mL 分液漏斗中经5mL 二氧甲烷萃取,以下步骤同血浆测定方法。

3. 标准曲线制作:将浓度为0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准液用0.04mol/L NaOH 稀释成浓度为:0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.16、0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,取各浓度标准溶液1.00mL 于分液漏斗中,加5mL 二氧甲烷振荡萃取,以下按样品分析手续测定荧光强度值,绘制标准曲线。

## 实验结果

### 一、荧光物质的光谱特性

标准皮质酮和血浆、组织中皮质酮经荧光反应后形成的荧光物质,经光谱扫描后显示出一致的光谱特性,激发波长  $\lambda_{ex} 470\text{nm}$  (狭缝10nm),发射荧光波长  $\lambda_{em} 525\text{nm}$  (见图1)。当标准品或样品浓度变化时,荧光光谱相位不发生改变,仅改变峰高。

### 二、线性范围

皮质酮标准溶液在0.01~0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内呈现良好的线性关系,曲线方程为

$$Y = 328x + 3.8, r = 0.9991$$

### 三、方法精密度

取皮质酮标准品0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  在不同时间分别重复测定10次,以考证方法在实际样品分析中的精密度,其结果见表1。

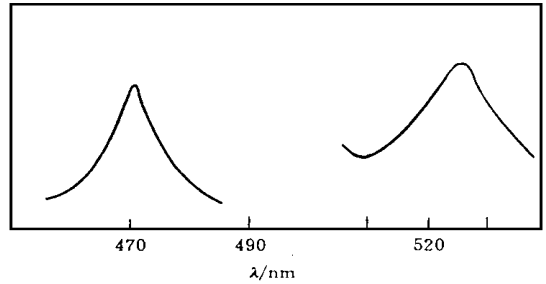


图1 皮质酮的激发光谱(左)和发射光谱(右)

Fig. 1 Excitation (left) and emission (right) of corticosterone

表1 方法的精密度

Tab. 1 Precision of the method

标准浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	<i>n</i>	平均值 $\mu\text{g}/\text{mL}$	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)
0.04	10	0.039	0.002	5.1
0.20	10	0.199	0.007	3.5

### 四、标准加入回收

将大鼠血浆3.00mL 分成4份,0.50mL 和1.00mL 各两份。1份0.5mL 和1份1mL 各加入0.05 $\mu\text{g}$  标准皮质酮,进行标准回收实验,结果见表2。

表2 标准加入回收实验

Tab. 2 Recovery experiments

血浆量/mL	加入标准/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	测得值/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	回收率(%)
0.50	0	0.018	/
0.50	0.05	0.065	94
1.00	0	0.039	/
1.00	0.05	0.087	98

## 讨 论

采用本法和经典的 Royer 肾上腺皮质酮荧光法<sup>[5]</sup>和 Zenker 血清皮质酮测定法<sup>[6]</sup>进行比较, 测定同一血样结果基本一致, 本法测得血浆(大鼠)含量为 $4.1 \pm 0.56 \mu\text{g}/100\text{mL}$ , 用 Zenker 法测得为 $3.71 \pm 0.49 \mu\text{g}/100\text{mL}$ , 此结果与杜继曾等<sup>[7]</sup>采用 Zenker 法测得结果 $3.46 \pm 0.57 \mu\text{g}/100\text{mL}$  基本一致。作者用本方法测定了根田鼠的肾上腺皮质酮水平昼夜节律, 其峰值在上午10:00 ( $1.32 \pm 0.12 \mu\text{g}/100\text{mg}$  湿组织), 谷值在下午20:00 ( $0.47 \pm 0.054 \mu\text{g}/100\text{mg}$  湿组织) 根据肾上腺皮质酮白天含量普遍高于黑夜含量的结果, 提出这又是一个昼行性活动的野生动物的显著特征。

最后, 该方法应注意三点: 用二氯甲烷萃取皮质酮时, 当有少量乙醇存在时, 会干扰萃取量, 使皮质酮不能完全被提取。而且随乙醇含量增加, 干扰越大, 最后可能致荧光信号波动不稳; 皮质酮标准溶液(指浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$  的) 应现用现配; 硫酸乙醇呈色液配好后在三天之内使用。

## 参 考 文 献

- 1 Kitabchi A E et al *Anal Biochem.*, 1970; **34**: 529
- 2 Finkelstein M. *Nature*, 1952; **169**: 929
- 3 Mclaughlin J et al *Anal Chem.*, 1958; **30**: 1517
- 4 Flack J D et al *Anal Biochem.*, 1969; **27**: 47
- 5 Royer Guillen in M D. *J. Lab Clin. Med.*, 1959; **53**: 830
- 6 Zenker K, Bernstein D E. *J. Biol Chem.*, 1958; **231**: 695
- 7 DU Jizing et al (杜继曾等). *Acta Theriologica Sinica* (兽类学报), 1983; **3**(1): 47

## SPECTROFLUOROMETRIC DETERMINATION OF CORTICOSTERONE IN PLASMA AND TISSUE

X DNG Zhong and SUO Yourui

*Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, 810001 Xining*

**Abstract** Corticosterone is one of the adrenal hormones. This paper reported the determination of corticosterone in plasma and tissue of small mammals with spectrofluorometry. The linear relationship between the fluorescence intensity and the concentration of corticosterone is over the range of  $0.01 \sim 0.24 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 470\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 525\text{nm}$ ). The average rate of standard recovery is 96.0% and RSD ( $n = 10$ ) is 4.2%. This method is simple, rapid and sensitive.

**Keywords** Corticosterone, Spectrofluorometric determination

(Received July 17, 1996)