

## 基于“碘-罗丹明B”缔合物荧光探针测定 $\beta$ -内酰胺酶活性

戴兴德 雷林强 安军红 张小林\*  
(甘肃医学院, 平凉 744000)

**摘要:** 碘( $I_3^-$ )对罗丹明B(RB)具有荧光猝灭作用, 可使RB的荧光信号强度减弱甚至消失, 而 $\beta$ -内酰胺酶作用下的青霉素水解产物青霉噻唑酸可将 $I_3^-$ 还原为 $I^-$ , 使体系荧光信号再现, 据此建立了以碘-罗丹明B缔合物为荧光探针测定药剂中青霉素含量的新方法。在激发波长360nm, 发射波长580nm条件下进行了 $\beta$ -内酰胺酶活性的荧光测定。结果表明, 在0~2.4U/mL范围内,  $\beta$ -内酰胺酶活性与其荧光强度变化值呈良好的线性关系, 检出限为0.002U/mL。方法的加标回收率为96.67%~103.3%, 相对标准偏差( $n=6$ )2.0%~4.5%。该方法简便快速、准确可靠、灵敏度高, 成功用于自制酶液酶活性测定。

**关键词:** 罗丹明B; 碘;  $\beta$ -内酰胺酶; 荧光法

**中图分类号:** R9      **文献标志码:** A

## Determination of $\beta$ -lactamase activity using iodine-rhodamine B associated content as a fluorescent probe

Dai Xing-de, Lei Lin-qiang, An Jun-hong and Zhang Xiao-lin  
(Gansu Medical College, Pingliang, Gansu 744000)

**Abstract** When the fluorescence signal intensity of rhodamine B (RB) weakens or even disappears in the iodine ( $I_3^-$ ) solution, penicillin thiazolidic acid as a product of penicillin hydrolysis catalyzed by beta-lactamase can reduce  $I_3^-$  to  $I^-$ , which makes the system fluorescent signal reappear. Based on this reaction, a method for determining the  $\beta$ -lactamase activity by using the iodine-rhodamine B associate as a fluorescent probe was established. In this paper, fluorescence determination of  $\beta$ -lactamase activity was carried out at an excitation wavelength of 360nm and an emission wavelength of 580nm. The results showed that there was a good linear relationship between  $\beta$ -lactamase activity and fluorescence intensity change in the range of 0~2.4U/mL. The limits of detection (LOD) was 0.002U/mL and the relative standard deviations ( $n=6$ ) ranged at 2.0%~4.5%. The recovery rate was between 96.67% and 103.3%. Thus, the anti-fluorescence quenching method was simple, rapid, accurate, and reliable, and could be used for the determination of enzyme activity in self-prepared enzyme solution.

**Key words** Rhodamine B; Iodine;  $\beta$ -Lactamase activity; Fluorescence quenching

$\beta$ -内酰胺酶又称青霉素酶, 可水解青霉素类药物而使其失效, 常被用于青霉素药品的无菌试验<sup>[1]</sup>。目前 $\beta$ -内酰胺酶活力测定有碘量法<sup>[2]</sup>、羟胺法<sup>[3]</sup>和紫外分光光度法<sup>[4]</sup>。羟胺法稳定性较差, 摩尔吸光系数小于600L/(mol·cm), 检出量偏低; 紫外光度法方便快速, 但由于反应速度快, 反应时间短, 误差较

大; 碘量法采用的是中止反应法, 原理简单, 但过程干扰因素多, 很难做到痕量检测。

罗丹明B(rhodamine B, RB)具有荧光特性,  $I_3^-$ 离子可通过静电引力与RB的阳离子形成离子缔合物, 并使其荧光猝灭。基于碘化钾的还原性和RB荧光猝灭原理测定氧化性物质研究较多<sup>[5-8]</sup>, 但尚未见利用

收稿日期: 2019-09-14

基金项目: 甘肃省高等学校创新能力提升项目(No. 2019A-159)

作者简介: 戴兴德, 男, 生于1978年, 学士, 副教授, 研究方向: 食品药品分析, E-mail: plyz\_dxd@163.com

\*通讯作者, E-mail: zxlplyz2005@126.com

RB- $I_3^-$ 体系荧光恢复进行还原性物质分析的报道, 本研究发现, 碘溶液( $I_3^-$ )和RB混合的瞬间即可发生荧光猝灭现象, 若加入 $\beta$ -内酰胺酶催化青霉素水解物青霉噻唑酸(PNC), 缔合物“RB- $I_3^-$ ”中的 $I_3^-$ 被还原为 $I^-$ , 溶液重新发出荧光, 其荧光强度与 $\beta$ -内酰胺酶活性在一定范围内呈线性关系, 据此建立了一种全新的 $\beta$ -内酰胺酶活性荧光测定方法, 其过程不受样品浑浊度和色度影响且有极低的检出限。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

930N荧光分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 分析天平(0.1mg, 上海天平仪器厂); pHs-3C精密pH计(上海雷磁仪器厂)。

$\beta$ -内酰胺酶标准品(美国Sigma公司, 1000U/mg), 注射用青霉素钠(哈药集团),  $\beta$ -内酰胺酶冻干粉(B1728048, 阿拉丁试剂上海有限公司), RB(固体, 天津市致远化学试剂有限公司), 青霉素G钾(美国Sigma公司), 醋酸(天津市盛奥化学试剂有限公司), 醋酸钠(天津市百世化工有限公司), 碘(天津市盛奥化学试剂有限公司), 氢氧化钠(天津市百世化工有限公司), 浓盐酸(天津市盛奥化学试剂有限公司), 碘化钾(上海银典化工有限公司)。所用试剂均为分析纯; 水为二次蒸馏水。

### 1.2 溶液配制

$\beta$ -内酰胺酶标准溶液: 15U/mL。50mmol/L盐酸-柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)溶解 $\beta$ -内酰胺酶标准品, 4℃保存, 供2d使用。

青霉素溶液: 2000U/mL(相当于 $3.37 \times 10^{-3}$ mol/L青霉素)。称取标示量为400MU、总质量为2.4g注射用青霉素钠(哈药集团)1.2g, 用pH6.0盐酸-柠檬酸钠缓冲液溶解, 定容至1000mL, 4℃保存备用。1mg青霉素钠效价值为1667U。

50mmol/L盐酸-柠檬酸钠缓冲液(pH6.0): 取柠檬酸钠7.359g, 溶于约400mL水, 以1mol/L盐酸调pH6.0后定容至500mL, 该溶液用来配制青霉素液, 保持青霉素的稳定性。

RB标准溶液: 准确称取0.1198g RB固体, 加水溶解并稀释定容至250mL, 配成浓度为 $1.00 \times 10^{-3}$ mol/L的标准溶液, 作为储备液, 使用时稀释至 $1.00 \times 10^{-4}$ mol/L。

碘标准溶液:  $1.00 \times 10^{-3}$ mol/L。按文献[9]提供方法配制。

### 1.3 实验方法

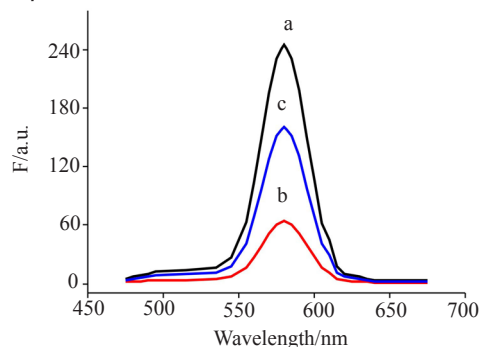
在50mL容量瓶中, 加入2000U/mL青霉素溶

液5mL,  $\beta$ -内酰胺酶稀释液(酶活性约0~120U/mL)1.00mL, 37℃恒温放置15min, 加入 $1.00 \times 10^{-3}$ mol/L碘标准溶液2.00mL, 振荡反应2min, 依次加入 $1.00 \times 10^{-4}$ mol/LRB5.00mL, 0.1mol/L醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH4.5)5.00mL, 蒸馏水定容, 静置10min, 以365nm作激发波长, 580nm作发射波长,  $1.0 \times 10^{-6}$ mol/L RB作为灵敏度调试液, 测定荧光强度 $F$ 。同时完成酶空白试验 $F_0$ 测定, 根据 $\Delta F(\Delta F = F - F_0)$ 确定 $\beta$ -内酰胺酶活性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光光谱

考察了RB、RB+ $I_3^-$ 和PNC+ $I_3^-$ +RB体系的荧光光谱, 见图1。结果表明, 当 $\lambda_{ex} = 365$ nm时, RB在580nm处有一最大荧光峰(曲线a), 加入碘液后, 荧光猝灭, 但峰位未发生改变(曲线b), 说明RB和碘发生了缔合;  $\beta$ -内酰胺酶催化青霉素水解产物PNC还原缔合物中的 $I_3^-$ , RB荧光得以恢复(曲线c), 荧光恢复程度与 $\beta$ -内酰胺酶活性有关联。



a: RB; b: RB+ $I_3^-$ ; c: PNC+ $I_3^-$ +RB;

$c(RB) = 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L,  $c(I_3^-) = 4.0 \times 10^{-5}$ mol/L,  $E = 1.2$ U/mL

图1 不同体系的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of different systems

### 2.2 RB用量考察

RB的荧光特性与其浓度密切相关<sup>[10]</sup>。实验证实, 在1.0~7.5mL范围内, RB体积与其荧光强度有线性关系,  $V > 7.5$ mL, 即当 $c(RB) \geq 1.5 \times 10^{-5}$ mol/L时, RB可形成聚集体, 自熄灭作用增强, 线性度消失, 该结果与文献[10]报道一致。为了保证酶活性测定范围的最大化,  $1.0 \times 10^{-4}$ mol/L RB溶液的加入量定为5.00mL, 确保PNC+ $I_3^-$ +RB体系中RB浓度为 $1.0 \times 10^{-5}$ mol/L。

### 2.3 碘液用量

在RB+ $I_3^-$ 体系中, 考察了碘液用量对RB荧光猝灭的影响(图2)。结果表明, 随着碘液量的增加, RB的荧光强度逐渐降低, 在0~2mL碘液用量范围内, 线性度较好。当碘液加入量增加到4.00mL时, RB的

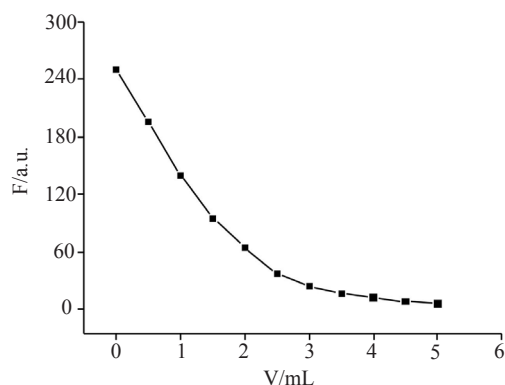


图2 碘液体积影响

Fig. 2 Effect of the volume of iodine on F

荧光强度开始呈现平缓趋势,当碘液增加到6.00mL时, RB的荧光强度趋于稳定。为了得到较为准确的实验结果,选择碘液用量为2.00mL。

#### 2.4 缔合物pH环境考察

由于pH值对RB<sup>[10]</sup>和碘的存在形式有明显影响,进而影响RB与碘之间的缔合作用,故就pH值对RB+I<sub>3</sub><sup>-</sup>体系荧光强度的影响做了进一步考察(图3)。结果发现,随着pH值的增加,游离态RB的羧基开始电离,并且电离程度逐渐增大,从而使得其吸电子能力逐渐减弱,荧光强度逐渐增大; pH4.0~8.0时,荧光强度基本保持恒定,说明缔合物荧光探针和游离型RB相对浓度保持不变,荧光猝灭程度最高;当体系的pH值大于9.0时,缔合物中的碘发生歧化,体系荧光强度出现二次增大。pH4.0~8.0时,更有利于RB和I<sub>3</sub><sup>-</sup>缔合,本方法选择pH4.5的醋酸-醋酸钠缓冲溶液作荧光探针缓冲介质。

#### 2.5 酶促反应时间考察

取15U/mL β-内酰胺酶标准溶液4.00mL,改变酶促反应时间并完成PNC+I<sub>3</sub><sup>-</sup>+RB体系荧光强度测定(图

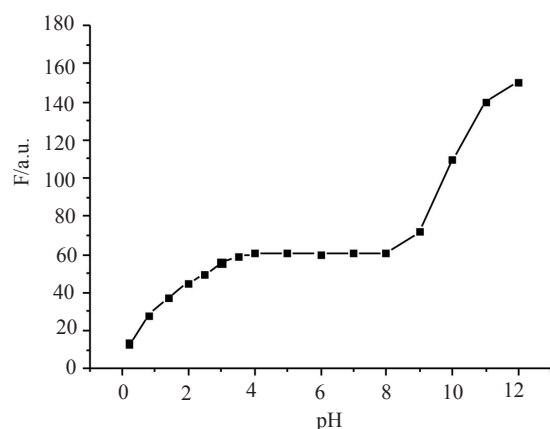


图3 pH条件影响

Fig. 3 Effect of pH conditions

4)。结果表明,随着酶促反应时间延长,青霉噻唑酸还原碘导致I<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度下降,PNC+I<sub>3</sub><sup>-</sup>+RB体系荧光强度递增,在0~10min内,F与时间有线性关系,符合酶催化一级反应特征。13min后,F达到最大并趋于恒定,故酶促反应时间确定为15min。

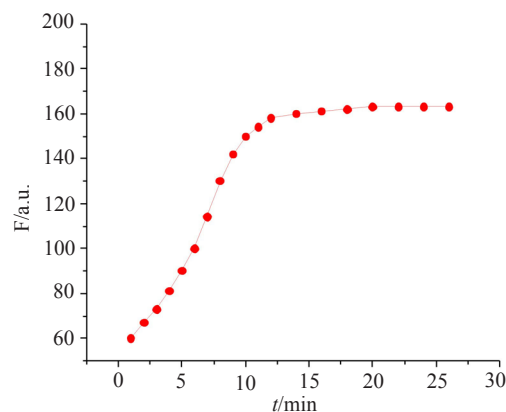


图4 酶促反应时间曲线

Fig. 4 Enzymatic reaction time curve

#### 2.6 工作曲线

取15U/mL β-内酰胺酶标准溶液0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00、8.00mL作测试液,按照“1.3”项实验方法完成荧光测定,以反应液酶活性度E(U/mL)为横坐标,荧光强度变化值(ΔF)为纵坐标绘制工作曲线(图5)。结果发现,β-内酰胺酶(E, U/mL)在0~2.4U/mL范围内与其荧光强度变化值(ΔF)呈良好的线性关系,其线性方程为 $\Delta F = 70.29 E(\text{U/mL}) + 0.8644$ ,  $r = 0.9938$ 。对β-内酰胺酶空白溶液进行10次平行测定,计算标准偏差 $S_b$ ,依据公式 $\text{LOD} = 3S_b / \text{slope}$ ,得到本方法的检出限为0.002U/mL。

#### 2.7 回收率试验

按照标示量将β-内酰胺酶冻干粉用去离子水分别稀释配成80、100和120U/mL,取酶稀释液

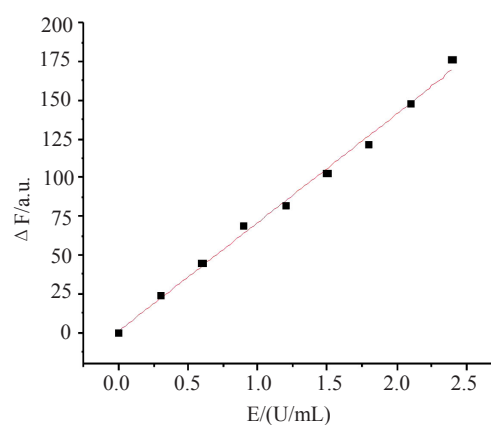


图5 工作曲线

Fig. 5 Working curve

1.00mL, 按“1.3”项实验方法完成酶活性测定, 平行5次, 并进行加标回收试验, 结果见表1。

按照标示量将β-内酰胺酶冻干粉用去离子水稀释配成10000U/mL, 分别用碘量法和荧光法(将配制液再次稀释100倍, 取1.00mL进行分析, 根据稀释倍数计算自配液酶活性)测定, 自配酶液活性测定结果见表2。

通过6次平行实验, 荧光法和碘量法相对标准偏差为0.74%和0.88%, 相对误差仅为0.82%, 表明荧光法和碘量法一样具有一定可行性。

表1 回收率(n=6)

Tab. 1 The recovery rate(n=6)

序号	测定值 /(U/mL)	RSD /%	加标量 /(U/mL)	加标后测定值 /(U/mL)	回收率 /%
1	1.06	2.0	0.90	1.94	97.78
2	1.26	2.6	0.60	1.88	103.3
3	1.68	4.5	0.30	1.97	96.67

表2 方法比较(n=6)

Tab. 2 Methods to compare (n=6)

方法	测定值/(U/mL)	平均值/ (U/mL)	RSD /%	RE /%
荧光法	6447, 6410, 6485, 6397, 6372, 6360	6410	0.74	0.82
碘量法	6475, 6500, 6513, 6362, 6500, 6437	6463	0.88	

### 3 结论

本文基于“碘-罗丹明B”缔合物荧光探针构建了

荧光光度法测定β-内酰胺酶活性的新体系。方法简单且具有很好的灵敏度, 检测限达到0.002U/mL; 干扰因素少, 准确度高, 加标回收率控制在96.67%~103.3%之内; 荧光法用于粗酶样活性分析, 与碘量法测定结果一致。

### 参考文献

- [1] 张凤凯, 张枫. 蜡样芽孢杆菌CMCC(B)63301产生β-内酰胺酶的特性及其应用的研究[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(3): 158-160.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. (2015年版四部). 北京: 化学工业出版社. 2015: 165.
- [3] 王芳, 仪宏, 王丽丽. 羟胺法测定β-内酰胺酶酶活的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(4): 316-319.
- [4] 马韦钰, 马仕洪. 紫外分光光度法用于β-内酰胺酶活性测定的研究[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1142-1145.
- [5] 栾崇林, 黎源倩. CCD阵列检测-激光诱导荧光光度法测定食品中锌[J]. 分析试验室, 2003, 22(3): 74-76.
- [6] 康彩艳, 蒋治良, 奚旦立. 罗丹明B荧光猝灭法测定水中痕量亚氯酸根[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(2): 399-341.
- [7] 乔玉春, 龙大成, 孙宗招, 等. 罗丹明B荧光猝灭法测定水中碘[J]. 化学传感器, 2018, 38(1): 39-43.
- [8] 王海霞, 盛丽, 韩小茜. 罗丹明B荧光猝灭法测定微量溴酸根离子[J]. 光谱实验室, 2007, 24(4): 587-589.
- [9] 白莹, 张小林. 碘标准溶液配制方法改进[J]. 化学教育, 2018, 39(4): 29-30.
- [10] 黄保军, 李建军, 屈凌波. 罗丹明B荧光光谱机理的研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2005, 25(3): 8-10.