

胶束十二烷基硫酸钠增敏荧光法测定 银杏叶片槲皮素含量

陈金城, 张海容

(忻州师范学院生化分析技术研究所, 山西 忻州 034000)

摘要:建立了银杏叶片中测定槲皮素含量的十二烷基硫酸钠(SDS)增敏荧光新方法。实验考察了表面活性剂种类、用量及pH等外界条件对槲皮素荧光强度的影响。结果表明,所选用的SDS、十六烷基三甲基溴化铵(CTMAB)、曲拉通X-100(Triton X-100)、 β -环糊精(β -CD)4种有序介质,SDS在碱性(pH=9.12)介质中对槲皮素荧光增敏效果最好,在最大激发波长464 nm、最大发射波长542 nm处有强荧光发射峰。在pH=9.12、SDS浓度为 1.5×10^{-2} mol/L优化实验条件下,体系荧光强度与槲皮素含量成线性关系,线性范围为2~14 $\mu\text{g/mL}$,检出限为0.16 $\mu\text{g/L}$,RSD为1.56%。本方法用于4种银杏叶片中槲皮素含量测定,结果满意。

关键词:十二烷基硫酸钠;荧光光度法;槲皮素;银杏叶片

中图分类号:TQ423 文献标识码:A 文章编号:1001-1803(2018)06-0348-04

DOI:10.13218/j.cnki.csdc.2018.06.009

Determination of quercetin in *Ginkgo* leaves tablets by micellar SDS enhanced fluorimetry

CHEN Jin-e, ZHANG Hai-rong

(Institute of Biochemical Analysis, Xinzhou Teachers College, Xinzhou, Shanxi 034000, China)

Abstract: A new method for the determination of quercetin in *Ginkgo* leaves tablets was established by sodium dodecyl sulfate (SDS) enhanced fluorimetry. The effects of external conditions, such as the type and amount of surfactant and pH on the fluorescence intensity of quercetin were investigated. Results show that among the four kinds of ordered media, i. e., SDS, CTMAB, Triton X-100 and β -CD, the fluorescence intensity of quercetin is greatly enhanced in SDS solution under alkaline condition (pH=9.12) with a strong fluorescence emission peak at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 464/542$ nm. Under the optimal experimental conditions of pH=9.12 and SDS concentration of 1.5×10^{-2} mol/L the linear relationship between fluorescence intensity and concentration of quercetin is kept in the range of 2-14 $\mu\text{g/mL}$ with the detection limit of 0.16 $\mu\text{g/L}$ and RSD of 1.56%. The method has been applied to the determination of quercetin in four kinds of *Ginkgo* leaves tablets with satisfactory results.

Key words: sodium dodecyl sulfate; fluorimetry; quercetin; *Ginkgo* leaves tablets

银杏叶片为银杏叶提取物制剂,主要成分为黄酮醇苷和萜类内酯^[1],其含有的槲皮素是典型的黄酮类化合物。

近年来,胶束增敏荧光法由于操作简便、分析灵敏度高在药物分析中受到人们的广泛关注^[2-6],如杨功俊等^[3]用胶束增敏荧光法测定了血清中喹诺酮

类药物,梁丽华等^[4]用胶束增敏荧光法测定了片剂吡哌酸,马红燕^[5]用胶束增敏荧光法测定了药片甲氧氯普胺含量,贾丽华等^[6]用胶束增敏荧光法测定了实验粉剂中恩诺沙星含量。槲皮素的主要测定方法有紫外分光光度法^[7,8]、高效液相色谱法^[9,10]等,但直接使用荧光法测定银杏黄酮类物质的方

收稿日期:2017-12-25;修回日期:2018-05-09

基金项目:山西省科技厅软科学研究计划(2017041015-2);山西省教育厅1331化学优势学科(2017)

作者简介:陈金城(1957-),女,山西忻州人,副教授,E-mail:jine3048895@163.com。

通讯联系人:张海容,教授,博士,硕士生导师,电话:18003505076,E-mail:hairong1015@163.com。

法^[11-14]尚不多见。本文尝试研究了4种有序介质即十二烷基硫酸钠(SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTMAB)、曲拉通X-100(Triton X-100)、 β -环糊精(β -CD)对槲皮素的荧光增敏效应,建立了用表面活性剂SDS增敏直接测定槲皮素含量的方法,旨在为黄酮类物质产品质量控制、药物分析提供参考依据。

1 实验部分

1.1 主要材料、试剂与仪器

银杏叶片:1号样(广西亿康药业股份有限公司)、2号样(桂林漓江制药有限公司)、3号样(涿州东乐制药有限公司)和4号样(桂林红会制药厂),将样品研钵研碎,装瓶并贴上编号备用;槲皮素(分析纯),北京化工厂;SDS(分析纯),上海试剂采购供应站;Triton X-100(化学纯),北京化学试剂公司;CTMAB(分析纯),新华活性材料研究所; β -CD(生化试剂),北京奥博生物技术责任有限公司;实验用水皆为二次水;其他试剂均为国产分析纯。

F-4600 荧光光度计,日本日立公司;pHS-3TC 精密数显酸度计,上海天达仪器有限公司;KQ-100DB 数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 表面活性剂溶液的配制

本研究选用典型的SDS、CTMAB和Triton X-100 3种表面活性剂及 β -CD,为了使用方便,配制表面活性剂溶液摩尔浓度均大于临界胶束浓度(cmc)一定倍数。在25℃时,SDS、CTMAB和Triton X-100 cmc分别为 8.1×10^{-3} 、 9.2×10^{-4} 和 3.0×10^{-4} mol/L,配制的工作液浓度分别为 1.0×10^{-1} 、 1.0×10^{-2} 和 3.0×10^{-3} mol/L;由于溶解度限制,配制 β -CD工作液浓度为 1.0×10^{-2} mol/L。

1.2.2 三酸缓冲溶液的配制

准确称取2.4745 g 硼酸于小烧杯中,溶解后转移至1000 mL容量瓶;用移液管准确量取2.71 mL 85%的磷酸和2.35 mL 36%的乙酸直接加入容量瓶后,二次水定容至刻度。使用时取一定体积三酸缓冲液,加入0.2 mol/L 氢氧化钠调节至所需pH。

1.2.3 标准溶液的配制

准确称取槲皮素标准品0.0302 g,用95%乙醇配制成100 mL 1.0×10^{-3} mol/L 储备液,使用时稀释为 1.0×10^{-4} mol/L 工作液。

1.2.4 银杏叶片样品溶液的配制

准确称取4种银杏叶片样品各0.5 g,分别放入1、2、3、4号锥形瓶中,加入95%乙醇25 mL 超声提取,设定超声温度为25℃,功率为80 W,时间为30 min。提取完成后,离心分离,重复提取2次,合并提取液。将提取液分别转移至1、2、3、4号100 mL容量瓶中并定容,再用移液管分别移取10 mL至另外4个100 mL容量瓶中,95%乙醇定容至刻度,样品液待测。

1.2.5 银杏叶片样品中槲皮素含量测定

比色管中依次加入1 mL 样品溶液、1.5 mL 1.0×10^{-1} mol/L SDS溶液和1 mL 缓冲液,二次水定容至刻度,摇匀,室温放置10 min后转移至1 cm 荧光比色皿,荧光光度计测其荧光强度,激发和发射狭缝均为10 nm。

2 结果与讨论

2.1 表面活性剂选择

不同种类的表面活性剂形成的胶束结构不同,胶束内芯的疏水性也不同。本文选择常见的阴离子表面活性剂(SDS)、阳离子表面活性剂(CTMAB)、非离子表面活性剂(Triton X-100)及 β -CD,考察4种有序介质对槲皮素荧光增敏作用,实验结果见表1。由表1可知,除CTMAB外,其他3种有序介质对槲皮素荧光强度均有一定的增敏作用,其中SDS的增敏作用最大。SDS对荧光的增敏作用与胶束的增溶作用、疏水空腔结构^[15]有关,当表面活性剂浓度超过cmc时,形成不同形状外亲水、内亲油胶束粒子结构,槲皮素分子进入胶束粒子疏水空腔后,不仅使其溶解度增大、微环境改变,而且有效保护了槲皮素分子激发单线态,荧光量子产率增大,发射增强。本文选用SDS为增敏剂,建立槲皮素-SDS二元测定体系。

表1 不同介质中槲皮素荧光强度

介质	$c/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	荧光强度
Triton X-100	3.0×10^{-4}	364.1
SDS	1.0×10^{-2}	376.9
CTMAB	1.0×10^{-3}	34.5
β -CD	1.0×10^{-3}	120.5

2.2 槲皮素荧光激发和发射光谱

测定槲皮素($10 \mu\text{g/mL}$)单独存在和在SDS(1.0×10^{-2} mol/L)-缓冲液体系的荧光激发和发射光谱,实验结果见图1。由图1可知,无SDS体系(曲线1)与含SDS体系的荧光激发/发射波长完全相同(曲线2),

最大激发波长为 464 nm,最大发射波长为 542 nm,荧光信号较弱;当体系存在一定浓度 SDS 时,荧光强度显著增大。

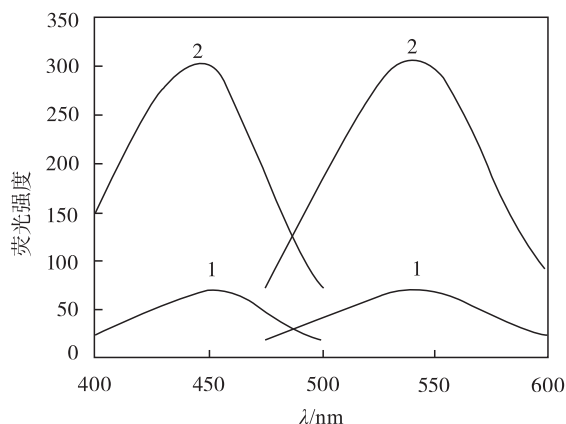


图1 槲皮素荧光激发和发射光谱图

Fig. 1 Fluorescence excitation and emission spectra of quercetin

2.3 pH 值对荧光强度的影响

考察不同 pH 值(2~13)对槲皮素-SDS 体系荧光强度的影响,实验结果见图 2。由图 2 可知,pH 在 8~11 范围内,荧光信号较大且变化不大。因此,选择测量体系 pH 值为 9.12。

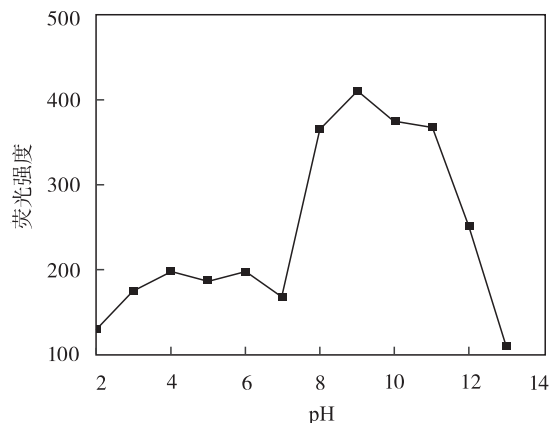


图2 pH 对槲皮素-SDS 体系荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of pH on the fluorescence intensity of quercetin-SDS system

2.4 SDS 用量对荧光强度的影响

在上述优化条件下,改变 SDS 的浓度,考察其对槲皮素荧光强度的影响,实验结果见图 3。由图 3 可知,当 SDS 浓度大于 cmc (8.1×10^{-3} mol/L) 时,由于形成胶束粒子,为槲皮素提供了一个极性较低的疏水微环境,有效地保护了激发单线态荧光发射,从而减少了槲皮素分子去活化过程及荧光猝灭效应,导致槲皮素的荧光显著增强;继续增加 SDS 浓度,荧光强度趋于平缓不再增加。考虑到实际操作的便利性,选择 SDS 浓度为 1.5×10^{-2} mol/L。

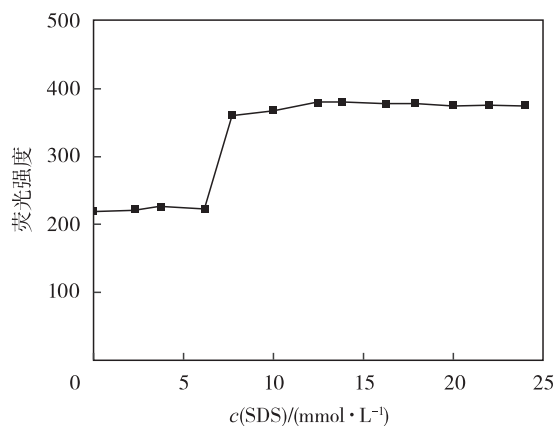


图3 SDS 添加量对槲皮素-SDS 体系荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of SDS concentration on the fluorescence intensity of quercetin-SDS system

2.5 干扰实验

对 10 种不同物质进行槲皮素荧光强度的干扰测定。测定结果表明,各种共存物允许量(相对误差小于 $\pm 5\%$)为:60 倍量的 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Al^{3+} 、 Co^{2+} 、 Sn^{2+} , 30 倍量的 Cl^- 、 PO_4^{3-} 、 Ac^- , 25 倍量的丙氨酸、蔗糖,10 倍量的 Fe^{3+} 。

2.6 分析曲线及精密度

在 pH=9.12、SDS 浓度为 1.5×10^{-2} mol/L 优化实验条件下,体系的荧光强度 I_F 与槲皮素质量浓度 ρ 呈良好的线性关系,线性范围为 2~14 $\mu\text{g}/\text{mL}$,回归方程为 $I_F = 75.88\rho + 23.41$,相关系数为 0.998。根据 IUPAC 规定,检出限计算公式为 $K S_0/S$,当置信水平为 90% 时, $K=3$ 作为检出限计算标准, S_0 为标准偏差, S 为分析曲线斜率,计算得检出限为 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。选槲皮素质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优化条件下进行 10 次平行测定,RSD 为 1.56%。

2.7 样品分析和回收率测定

测定 4 种不同银杏叶片样品中槲皮素含量,实验结果见表 2。标准加入法测定 4 种不同银杏叶片槲皮素回收率($n=7$),实验结果见表 3(见下页)。通过精密度、回收率实验表明,用胶束 SDS 增敏荧光法测定 4 种银杏叶片中槲皮素含量,RSD 为 2.03%~4.22%,测定结果具有可靠性,方法简便、快速准确。

表2 银杏叶片槲皮素含量测定($n=7$)

样品	标示值/(mg/片)	测定值/(mg/片)	RSD/%
1号	22.33	21.13	2.03
2号	17.32	17.71	4.22
3号	27.67	24.41	3.15
4号	22.74	21.93	2.26

表 3 银杏叶片槲皮素回收率测定 ($n=7$)Tab. 3 The quercetin recovery of *Ginkgo* leaf tablets ($n=7$)

样品	本底值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 /%	RSD /%
1 号	9.13	5	13.87	94.8	1.08
2 号	7.71	5	12.52	96.2	3.52
3 号	8.40	5	13.26	97.2	2.56
4 号	7.93	5	13.17	104.8	4.31

3 结论

选择阴离子表面活性剂 SDS、阳离子表面活性剂 CTMAB、非离子表面活性剂 Triton X-100 及超分子 β -CD 体系,考察了 4 种有序介质对槲皮素荧光增敏作用,实验结果表明,SDS 的增敏作用最大。建立了 SDS 体系增敏槲皮素荧光分析法,回归方程为 $I_f = 75.88 \rho + 23.41$,线性范围 $2 \sim 14 \mu\text{g}/\text{mL}$,检出限 $0.16 \mu\text{g}/\text{mL}$,RSD 为 1.56%。应用槲皮素-SDS 荧光体系测定不同产地 4 种银杏叶片中槲皮素含量,方法可靠、准确,对医药、食品中槲皮素分析测定具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] Beijing Medical College. Traditional Chinese medicine chemistry [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1996: 105.
- [2] Zhang Hairong, Wang Yale, Chen Jine. Determination of napropamide in different vegetables by micellar enhanced spectrofluorimetry [J]. Journal of Analytical Science, 2012, 28(6): 827-830.
- [3] Yang Gongjun, Hou Yanfang, Meng Wenjing, et al. Micelle-enhanced spectrofluorimetric determination of quinolones in human serum [J]. Journal of Yangzhou University (Natural Science Edition), 2009, 12(4): 35-39.
- [4] Liang Lihua, Wang Jingping, Du Liming. Micelle enhanced fluorimetric determination of pipemidic acid [J]. Journal of Analytical Science, 2003, 19(3): 237-239.
- [5] Ma Hongyan. Studies of metoclopramide by micellar enhanced spectrofluorimetry [J]. Journal of Yanan University, 1999, 18(1): 48-51.
- [6] JIA Lihua, ZENG Xiaodan, WANG Qingbin, et al. Determination of enrofloxacin by micellar sensitized fluorescence spectrometry [J]. Journal of Analytical Science, 2007, 23(1): 111-112.
- [7] Mo Qijin, Zhou Meifang, Zhu Haijun. Uncertainty evaluation for the determination of total flavonoids in guilinggao by spectrophotometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(4): 77-80.
- [8] Li Shiyun, Yan Gongxin, Zhu Dan, et al. Study on quantitative determination of total flavonoids in *Physalis pubescens* L. by spectrophotometry [J]. Food Research and Development, 2016, 37(13): 129-134.
- [9] Fan Jiabin, Wang Shuai, Meng Xiansheng et al. Determination of six flavonoids in *Schizonepeta tenuifolia* from different areas by HPLC [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(11): 2292-2295.
- [10] Liu Ting, Li Hongjiao, Sun Xingjiao et al. Simultaneous determination of four kinds of flavonoids in *Clematis intricata* bunge of mongolian medicinal herb by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2017, 34(10): 1365-1368.
- [11] Liu Chun, Zhao Huichun, Jin Linpei. Fluorimetric study of Tb-EDTA-quercetin and determination of quercetin [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 1999, 19(4): 569-571.
- [12] Feng Ruiqin, Shen Xia, Ding Fen. Fluorimetric study of quercetin-hydrogen peroxide and application [J]. Journal of Beijing Normal University, 2004, 40(4): 499-502.
- [13] Yao Benlin, Shi Xiaobo. Fluorimetric determination of quercetin by use of its complex with aluminum [J]. Physical and Chemical Testing - Chemical Analysis, 2002, 38(4): 186-187.
- [14] Yu Lin, Chen Mei. Study and application of Tin(IV)-quercetin-triton X-100 system [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2000, 19(4): 53-55.
- [15] Zhen Yongxi, Fan Yingxin, Li Longdi. Fluorimetric determination of Se(III) with morin enhanced by sodium Dodecylsulfate [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 1993, 12(2): 8-12.

(编辑:张静)

(上接第 347 页)

- [17] Chen X Q, Yan H Q, Liu H F, et al. Preparation of liquid paraffin Pickering emulsions by bacterial cellulose nanocrystals [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2016, 46(5): 257-263.
- [18] Yi C L, Yang Y Q, Zhu Y, et al. Self-assembly and emulsification of poly{[styrene-alt-maleic acid]-co-[styrene-alt-(N-3,4-dihydroxyphenylethyl-maleamic acid)]} [J]. Langmuir, 2012, 28: 9211-9222.
- [19] Uryupina O Y, Serebryakova N V, Roldughin V I. Structuring and sedimentation stability of titanium phosphate nanoparticles in polymer solutions [J]. Adv Colloid Interfac, 2003, 104(1-3): 227-238.
- [20] Liufu S C, Xiao H N, Li Y P. Investigation of PEG adsorption on the surface of zinc oxide nanoparticles [J]. Powder Technol, 2004, 145(1): 20-24.

(编辑:周婷)

名人名言

知识是青年人最佳的荣誉,老年人最大的慰藉,穷人最宝贵的财产,富人最珍贵的装饰品。

——第欧根尼

在科学上没有平坦的大道,只有不畏劳苦沿着陡峭山路攀登的人,才有希望达到光辉的顶点。

——卡尔·马克思

真理惟一可靠的标准就是永远自相符合。

——欧文