

Determination of Baicalin by Enhanced Fluorimetry and Anti-Oxidation Effect of Baicalin

Lijuan Du, Yan Hu, Xiaoming Li, Manxiu Li*

The department of chemistry, Xinzhou teachers' university, Xinzhou 034000

Abstract

The interaction between compound of Tween 80/benzene/n-butyl alcohol/water O/W microemulsion medium and β -CD were studied by spectrofluorimetry. Based on the significant enhancement of fluorescence intensity of analysed in inclusion complex, a spectrofluorimetry method with high sensitivity and selectivity was developed for the determination of Baicalin in aqueous solution. The linear range of the method was $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ — $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ with a detection limit of $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, and the relative standard deviation was 0.98%. The recoveries of deltamethrin are 99.2% -101.0%. The results also showed that Baicalin have good antioxidant activity.

Key words : Baicalin; β -CD; O/W Microemulsion; Enhanced Fluorimetry; Antioxidant Activity.

协同增敏荧光法测定黄芩苷及抗氧化性的研究*

杜丽娟 胡艳 李泉铭 李满秀*

忻州师范学院化学系 山西忻州 034000

摘要：利用荧光光谱法探讨了 β -环糊精和 O/W 微乳液的混合物对黄芩苷荧光强度的增敏作用，建立了定量检测黄芩苷的荧光分析方法。在 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ — $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内，黄芩苷溶液的荧光强度与浓度呈良好的线性关系，相关系数 $r=0.9986$ ，方法的检出限为 $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ，相对标准偏差为 0.98%。该体系的抗干扰能力及稳定性好，对实际样品进行了分析，回收率为 99.2%-101.0%。试验还表明，黄芩苷具有良好的抗氧化性。

关键词：黄芩苷 增敏荧光法 β -环糊精 O/W 微乳液，抗氧化性

引言

黄芩苷(Baicalin)是从黄芩根中提取分离出来的一种黄酮类化合物，具有显著的生物活性，具有抑菌、利尿、抗炎、抗变态及解痉作用，具有较强的抗癌反应等生理效能，在临床医学中占有重要地位。黄芩苷还能吸收紫外线，清除氧自由基，又能抑制黑色素的生成，因此既可用于医药，也可用于化妆品，是一种很好的功能性美容化妆品原料^[1]。随着科学的发展，人们越来越重视黄芩苷的医药作用，对黄芩苷的研究给予了越来越多的关注。

目前，有关黄芩苷的检测手段主要有高效液相色谱法^[1-3]等，这些方法具有检出限低，准确度高的优点，但前期处理较为繁琐。微乳液作为反应介质，对光度分析具有很好的增溶增敏能力，可提高分析的灵敏度，被广泛应用在分析测定中^[4-7]，但目前未见微乳液应用于黄芩苷的测定。本实验采用 β -环糊精与 O/W 微乳液协同增敏建立了黄芩苷测定的新方法，操作简单快速，具有较高的灵敏度和较好的选择性，成功地用于黄芩苷含量的测定，同时对其抗氧化性试验，结果令人满意。

*本文为山西省大学生创新创业训练项目（编号 2015381）、忻州师范学院大学生科技创新项目（2015）基金资助。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500 荧光光谱仪（日本日立公司），752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),电子天平（梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司），恒温水浴箱（北京科伟永兴仪器有限公司），pHS-3B 型精密数显酸度计（上海天达仪器有限公司）。

黄芩苷（泽朗植提）， β -环糊精（北京奥博星生物技术有限公司），吐温 80（天津市光复精细化工研究所），苯、正丁醇（天津市风船化学试剂科技有限公司），二苯带苦肼基自由基(DPPH \cdot)试药（东京化成工业株式会社），其它试剂均为分析纯，实验用水为二次蒸馏水。

黄芩苷标准储备液： 1.0×10^{-3} mol/L， β -环糊精溶液 0.01mol/L，O/W 微乳液的配制：吐温 80：苯：正丁醇：水=4.2：1.3：1.4：93.1（质量比）。

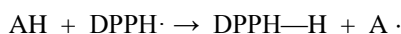
Britton-Robinson(B-R)缓冲溶液：准确称取硼酸 0.6183g，85%磷酸 0.68mL，36%乙酸 1.16mL，用蒸馏水溶解，定容至 250mL 容量瓶中。取一定量的三酸混合溶液，向其中加入 0.2mol/L 的氢氧化钠溶液，用 pH 计测定，得到 pH2.0 -13.0 的缓冲溶液。

1.2 实验方法

准确移取 1.0mL 1.0×10^{-4} mol/L 黄芩苷标准溶液于 10mL 比色管中，再加入 1.0mL 0.01mol/L β -环糊精溶液，1.0mL O/W 微乳液，用蒸馏水稀释至刻度，充分摇匀，放置 15min 后室温下测其荧光强度。

1.3 黄芩苷的抗氧化性研究

DPPH 是一个大分子的稳定自由基，预期模式为：



依据 DPPH 具有单电子，在 517nm 处具有一强吸收（深紫色），自由基清除剂与其单电子配对使其逐渐消失，其褪色程度与所接受电子数成定量关系，因而可用分光光度法进行定量分析。

分别移取一定体积的被测物于 10 mL 比色管中，再加入 2.0mL 2×10^{-4} mol/L DPPH 溶液，用乙醇定容，摇匀 30min 后，用被测物作参比在 517nm 处测定其吸光度 $A_{\text{样}}$ ，同时用无水乙醇做参比，测定 2.0mL 2×10^{-4} mol/L DPPH 溶液与 2.0mL 无水乙醇混合后溶液的吸光度 $A_{\text{对}}$ ，根据下面公式计算清除率^[8]：

$$\text{清除率} = \frac{A_{\text{对}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{对}}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

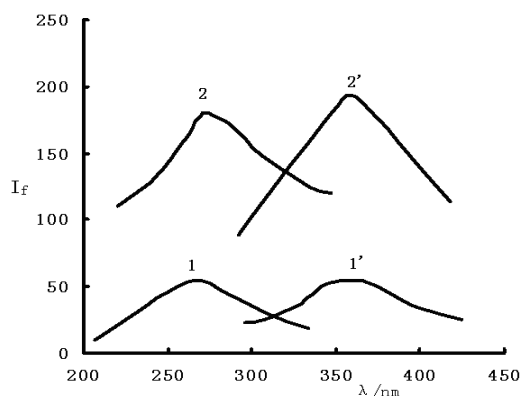


图 1 黄芩苷的激发和发射光谱

1,1' 黄芩苷；2,2' 黄芩苷+ β -CD 和微乳液

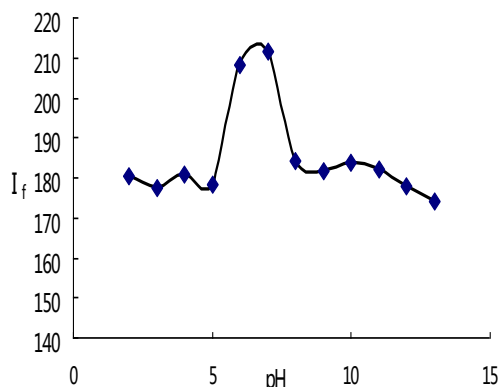


图 2 pH 值对荧光强度的影响

2.1 黄芩苷的荧光光谱

黄芩苷溶液在激发波长 270nm, 发射波长 361nm 处发射弱的荧光, 加入 β -环糊精和微乳液混合体系后, 荧光强度明显增强, 荧光光谱如图 1 所示, 激发和发射通带均为 10nm。

2.2 增敏介质和用量选择及机理初探

按实验方法考察了 β -环糊精、O/W 微乳液及 O/W 微乳液与 β -环糊精介质对体系荧光强度的影响。结果表明, O/W 微乳液与 β -环糊精在一起, 具有协同增敏作用, 比单一体系增敏效果更好, 本实验确定使用 O/W 微乳液与 β -环糊精混合体系, 用量为 1.0mL。

β -环糊精是由 7 个吡喃葡萄糖单元以 1、4 糖苷键依首尾相连而形成的一种筒状分子, 其空腔具有疏水性, 分子表面呈现亲水性, 可与黄芩苷形成超分子包合物, 使其荧光强度增强。在吐温 80/苯/正丁醇/水组成的 O/W 微乳液中, 黄芩苷被增溶、富集到分散相液滴的核内, 使荧光强度增强。随着微乳液原液量的增加, 不仅增加了体系中表面活性剂和助表面活性剂的量, 分散相中苯的量也同时按比例增加, 增溶量也随体系中苯的量成比例的增加。

2.3 pH 对荧光强度的影响

采用 B-R 缓冲溶液配制 pH2.0 -13.0 的黄芩苷与 O/W 微乳液及 β -环糊精混合物的溶液, 按实验方法测定其荧光强度。其荧光强度随 pH 值变化关系如图 2 所示。由图可知, pH=7.0 时荧光强度最大, 所以选用 pH=7.0 的 B-R 缓冲溶液, 用量为 1.0mL。

2.4 温度对荧光强度的影响

在 6 支 10mL 比色管中分别加入 1.0mL 1.0×10^{-4} mol/L 黄芩苷标准溶液, 1.0mL 0.01mol/L β -环糊精溶液, 1.0mL O/W 微乳液, 用蒸馏水定容至刻度, 充分振荡, 分别在常温、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 时测其荧光强度, 所得荧光强度随温度变化关系如图 3 所示。

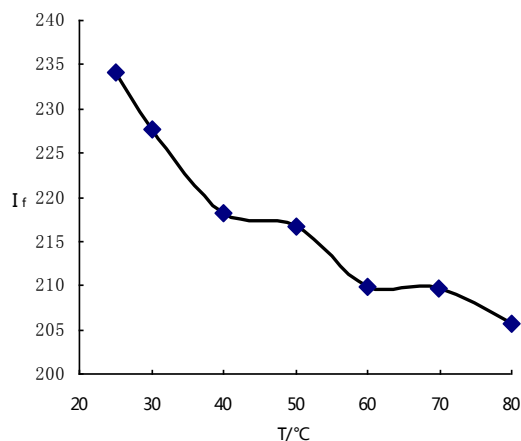


图 3 温度对荧光强度的影响

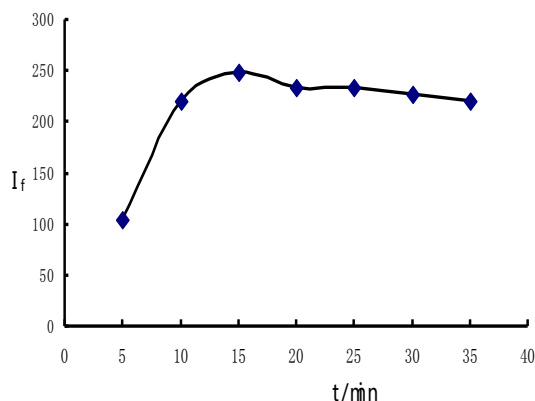


图 4 放置时间对荧光强度的影响

由图 3 可知, 随着温度的升高, 荧光强度不断降低, 常温下荧光强度最大, 所以选择在常温下测定。

2.5 放置时间对荧光强度的影响

在 10mL 比色管中加入 1.0mL 1.0×10^{-4} mol/L 黄芩苷标准溶液, 1.0mL 0.01mol/L β -环糊精溶液, 1.0mL O/W 微乳液, 用蒸馏水稀释至刻度, 充分振荡, 每隔 5min 测定其荧光强度, 结果如图 4 所示。由图可知, 随着放置时间的增加, 荧光强度增强, 在 15min 时荧光强度最大, 之后, 放置时间再增加, 荧光强度基本不变, 选择放置时间为 15min。

2.6 共存物质的影响

当黄芩苷浓度为 1.0×10^{-4} mol/L，相对误差 $\leq\pm5\%$ 时， 1.0×10^{-3} mol/L 的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、葡萄糖均不干扰测定， 1.0×10^{-3} mol/L 的 Fe^{2+} 有微弱干扰。

2.7 黄芩苷的分析特性

在 6 支 10mL 比色管中分别加入不同体积 1.0×10^{-4} mol/L 黄芩苷标准溶液，1.0mL 0.01 mol/L β -环糊精溶液，1.0mL O/W 微乳液，1.0mL pH7.0B-R 缓冲溶液，充分振荡，在常温下静置 15 分钟后测其荧光强度，绘制标准曲线。黄芩苷溶液在 5.0×10^{-6} mol/L— 4.0×10^{-5} mol/L 范围内与其荧光强度呈现良好的线性关系，线性回归方程为： $y=29.31x+28.09$ ，相关系数 $r=0.9986$ ，方法检出限($S/N = 3$)为 1.5×10^{-6} mol/L。在 14 支 10mL 比色管中平行加入 1.0mL 1.0×10^{-4} mol/L 黄芩苷标准溶液，测其荧光强度。计算得荧光强度平均值为 155.0，相对标准偏差为 0.98%。

2.8 样品分析

称取黄芪 15.06g，超声提取黄芩苷，并定容于 250 mL 容量瓶中，准确移取 1.0mL 上述溶液于 50mL 容量瓶中，用蒸馏水定容，作为样品储备液。

准确移取上述样品储备液 0.5mL 于 10mL 比色管中，加入 1.0mL 0.01mol/L β -环糊精溶液，1.0mL O/W 微乳液，1.0mL pH7.0 B-R 缓冲溶液，充分振荡，在常温下静置 15 分钟后，测得荧光强度为 207.5。代入线性方程计算浓度为 3.06×10^{-6} mol/L，计算得 15.06g 黄芪中含有黄芩苷 3.41g，质量分数为 22.64%。

表 1 回收试验

编号	测定值 $\times10^{-5}$ mol/L	加入量 $\times10^{-5}$ mol/L	测定总值 $\times10^{-5}$ mol/L	回收率 %
1	1.26	1.25	2.50	99.2
2	2.04	2.00	4.06	101.0

3 黄芩苷抗氧化性的研究

取黄芪粉 1g，加入 80mL 蒸馏水，使其完全浸入水中。用微波提取 2min 过滤，后加 70mL 水于滤渣中再次微波 2min 过滤，合并提取液至 250mL 容量瓶中定容。分别吸取此被测物 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6mL 于 10mL 比色管中，按实验方法测定其对 DPPH 清除率。

由图 5 可知黄芩苷对 DPPH·自由基有明显的清除作用，在浓度 0.424—2.544mg/L 的浓度范围内，黄芩苷清除 DPPH·自由基的能力为 49.64%—57.33%，且清除效果与浓度之间存在明显的量效关系。

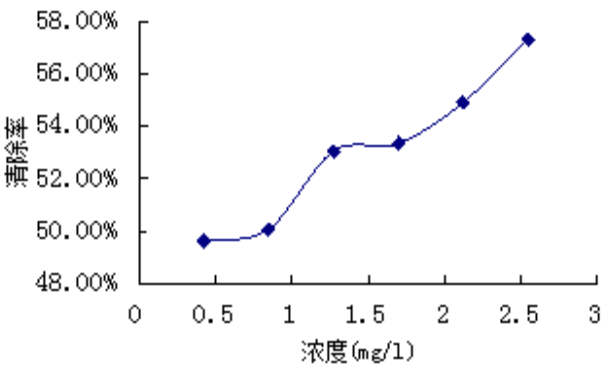


图 5 黄芩苷对 DPPH 清除率

4 结论

本文对黄芩苷的荧光性质进行了研究, 建立协同增敏荧光分析法测定了中草药中黄芩苷的含量, 操作简便, 具有较高的准确度和精密度。黄芩苷对 DPPH· 的清除作用, 说明黄芩是良好的天然抗氧化剂。在追求时尚与健康的今天, 它们在营养品、化妆品和医药及食品添加剂等方面必然会有广阔的应用前景。

5 参考文献

- [1] 徐玫, 袁琦, 赵辉, 等. HPLC 等度洗脱法同时测定银黄薄膜衣片中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (5): 691-693
- [2] 姚雅琦, 王诗卓, 黄敏, 等. HPLC-UV 法同时测定豨莶草中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32 (1): 36-39
- [3] 李冰岚, 陈宗良, 蒋士鹏. HPLC 法测定复方蒲苓片中黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志; 2010, 30 (4): 129-131
- [4] 李艳辉, 刘英红, 马卫兴, 等. 微乳液增敏水杨基荧光酮分光光度法测定微量铟[J]. 冶金分析, 2009, 29(5): 50-52
- [5] 董文丽, 徐刚. 铁-硫氰酸根-乙基罗丹明缔合体系微乳液分光光度法测定铝合金中铁[J]. 理化检验 (化), 2013, 49 (1): 75-77
- [6] 李慧芝, 许崇娟, 郭建方. 微乳液增敏催化荧光光度法测定叶酸的研究[J]. 分析科学学报, 2009, 25 (4): 208-210
- [7] 姜蓉蓉, 朱霞石. 微乳液/离子液体协同增敏分光光度法测定水中苯酚[J]. 分析化学, 2011, 39 (6): 945-946
- [8] 郭刚军, 何美莹, 邹建云, 等. 苦荞黄酮的提取分离及抗氧化活性研究[J]. 食品科学; 2008, 29 (12): 373-376