

文章编号: 1674-8085(2019)02-0010-05

基于纳米银-二氧化钛-壳聚糖复合物修饰电极的 芦丁电化学传感器的构建及其应用研究

齐焯迪, 张诗琪, 周鑫悦, 陈莉, 林晓, 赖昕, *余丽双

(福建中医药大学药学院, 福建, 福州 350122)

摘要: 本实验以 Ag-TiO₂-CS 纳米复合物修饰电极构建电化学传感器, 建立适用于其分析检测的电化学分析方法。利用 Ag-TiO₂-CS 修饰电极, 以此制备芦丁电化学传感器。用循环伏安法(CV)对电极的电化学特性进行研究, 之后用差分脉冲伏安法(DPV)对芦丁进行检测, 建立芦丁的电化学检测新方法。CV 实验表明 Ag-TiO₂-CS 纳米复合物具有良好的电化学活性, 可以应用于芦丁检测。DPV 实验进一步表明, 修饰电极峰电流值与芦丁浓度在一定范围内呈线性关系, 稳定性、抗干扰性等良好, 此电化学传感器可以对芦丁片中的芦丁进行测定, 结果良好。该传感器制作方法简单, 灵敏度较高, 稳定性好, 可用于芦丁片中芦丁的分析测定。

关键词: 芦丁; 电化学传感器; Ag-TiO₂-CS 纳米复合物; 修饰电极

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2019.02.003

CONSTRUCTION AND APPLICATION OF RUTIN ELECTROCHEMICAL SENSOR BASED ON Nano-silver-TiO₂-Chitosan COMPLEX MODIFIED ELECTRODE

QI Ye-di, ZHANG Shi-qi, ZHOU Xin-yue, CHEN Li, LIN Xiao, LAI Xin, *YU Li-shuang

(College of pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China)

Abstract: In this experiment, an electrochemical sensor was constructed by using Ag-TiO₂-CS nanocomposite modified electrode to establish a new method of electrochemical analysis suitable for the analyzing and detecting rutin which is a flavonoid extracted from plants and has anti-inflammatory, anti-radiation and anti-oxidation effects. The rutin electrochemical sensor was prepared by modifying the electrode with Ag-TiO₂-CS. The electrochemical characteristics of the electrode were studied by cyclic voltammetry (CV), the rutin was detected by differential pulse voltammetry (DPV) to establish a new electrochemical detection method for rutin. CV experiments showed that Ag-TiO₂-CS nanocomposites had good electrochemical activity and could be applied in rutin detection. DPV experiments further showed that the peak current values of the modified electrode were linear with the rutin concentration within a certain range. The electrochemical sensor with good stability and anti-interference can measure the rutin in the rutin tablet, and the result is good. The sensor has simple preparation

收稿日期: 2018-12-11; 修改日期: 2019-01-02

基金项目: 福建省科技厅计划项目(2017Y0051, 2018J01871); 福建省教育厅计划项目(JZ160445, JAT170288); 福建中医药大学校管课题重点专项(X2017012-重点)

作者简介: 齐焯迪(1992-), 女, 河北石家庄人, 硕士生, 主要从事中药分析方法学研究(E-mail:1175056354@qq.com);

张诗琪(1994-), 女, 吉林长春人, 硕士生, 主要从事中药分析方法学研究(E-mail:729329177@qq.com);

周鑫悦(1995-), 女, 重庆人, 硕士生, 主要从事中药分析方法学研究(E-mail:604108084@qq.com);

陈莉(1980-), 女, 福建福州人, 副教授, 主要从事中药质量控制研究(E-mail:shirly_chli2018@163.com);

林晓(1985-), 女, 福建福州人, 讲师, 主要从事中药质量控制研究(E-mail:15031815@qq.com);

赖昕(1987-), 女, 福建福州人, 讲师, 主要从事中药质量控制研究(E-mail:117802843@qq.com);

*余丽双(1982-), 女, 福建莆田人, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药分析方法学研究(E-mail:sly2018@126.com).

method, high sensitivity and good stability, and can be used for the analysis and determination of rutin in rutin tablets.

Key words: rutin; electrochemical sensor; Ag-TiO₂-CS nanocomposite; modified electrode

芦丁 (Rutin), 化学名是 3', 4', 7-三[O- (2-羟乙基) -5 羟基黄酮-3]-芸香苷, 又称为芸香苷、维生素 P, 它是从植物中提取出来的天然黄酮类物质, 存在于很多传统中药以及食物中^[1], 例如荞麦、苹果和茶, 它是食品和植物饮料的重要膳食成分^[2-4]。芦丁具有血管舒张和降低脆性作用, 具有抗炎抗菌、抗辐射以及抗氧化作用^[5-10], 对心血管、痛风等病也有一定的疗效^[11]。芦丁在临床上主要用于防治高血压、急性出血性肾炎、脑溢血等疾病^[12]。

文献报道, 测定芦丁原药材^[13-15]的方法主要为高效液相色谱法, 测定芦丁制剂比较常用的方法除了高效液相色谱法(HPLC)^[16-18]外, 还有荧光分光光度法^[19]、紫外-可见分光光度法^[20-21]、电泳法^[22]、流动注射化学发光法^[23]等。在电化学领域, 电化学分析法具有灵敏度高、选择性好、响应时间短和方法简便等优点, 是一种公认的微量和痕量分析方法, 在一些苛刻的环境条件下, 也可以进行有效快速的测定^[24]。

本实验进一步探索芦丁的检测新方法, 以纳米材料修饰电极构建电化学传感器, 建立适用于其分析检测的电化学分析新方法, 旨在通过构建电化学传感器建立芦丁质量控制的简便、灵敏、快速的新分析方法, 为芦丁的分析检测研究、代谢研究提供有效的技术手段。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

CHI660C 型电化学工作站 (上海辰华仪器有限公司); 舒美 KQ116 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 雷磁 PHS-3C 型精密酸度计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); XS105 电子分析天平 (Mettler Toledo); CJJ79-1 磁力加热搅拌器 (金坛市白塔新宝仪器厂); HH-4 数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); TGL-16G 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); TECNAI G2F20 场发射透射

电子显微镜 (美国 FEI 公司)。

三电极体系: 氧化铜/Nafion 膜修饰电极为工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极。

1.1.2 试剂

芦丁 (中国药品生物制品有限公司); 复方芦丁片 (上海朝晖药业有限公司); 不同 pH 值不同浓度的磷酸盐缓冲液、壳聚糖、硼氢化钠、硝酸银溶液 (国药集团化学试剂有限公司)。

实验中所用水均为二次蒸馏水, 经 Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司) 处理。

1.2 对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品适量, 用乙醇溶解并制成浓度为 1.0 mg/mL 的对照品储备液, 检测时用支持电解质稀释到一定的浓度。

1.3 Ag-TiO₂-CS 纳米复合物的制备

Ag-TiO₂-CS 纳米复合物参照文献方法制备^[25-26]。取 0.5 mL TiO₂(5%)、1.0 mL AgNO₃(0.05 mol/L)和 0.5 mL CS(0.1%)溶液于烧杯中, 接着向烧杯中逐滴滴加 0.125 mL NaBH₄(0.01 mol/L)溶液, 直至烧杯中溶液的颜色变成咖啡色, 再继续搅拌 30 min。将制得的 Ag-TiO₂-CS 纳米复合物进行离心、洗涤, 即得。最后将制得的 Ag-TiO₂-CS 超声分散于 2.0 mL 的蒸馏水中, 得到均匀的咖啡色悬浮液。

1.4 电化学传感器的制备

金电极在修饰前, 先后用 1.0、0.3、0.05 μm 的 α-Al₂O₃ 粉末在专业抛光布上抛光成镜面, 每次打磨后用蒸馏水清洗干净。将处理好的电极置于含 5 mM K₃Fe(CN)₆ 的 0.5 M KCl 溶液中, 采用三电极系统在扫描电压 -1 V~+0.8 V 用 CV 法进行扫描, 根据氧化还原峰电位差判断电极抛光程度, 若符合要求则进行活化。活化用 0.5 mol/L 的稀硫酸溶液, 在扫描电压 0 V~+1.7 V 用 CV 进行扫描, 直到峰电流不再增加。

取 10 μL Ag-TiO₂-CS 悬浮液滴涂于预处理好的金电极表面, 室温下自然晾干即制得 Ag-TiO₂-CS 修饰金电极。

1.5 电化学方法

本实验在 pH 值为 6.5 的 0.1 M 磷酸氢二钠-0.1 M 磷酸二氢钠磷酸盐缓冲溶液为支持电解质的条件下, 采用三电极系统, 用差分脉冲伏安法对芦丁在修饰电极上的电化学行为进行研究并对其进行定量测定。

2 实验结果与分析讨论

2.1 Ag-TiO₂-CS 纳米复合物的表征

Ag-TiO₂-CS 纳米复合物透射电镜 (TEM) 表征结果如图 1 所示, 所用二氧化钛为准八面体构型, 由电镜图可以看出, 银离子成功复合到二氧化钛纳米材料表面, 且比较均匀存在。

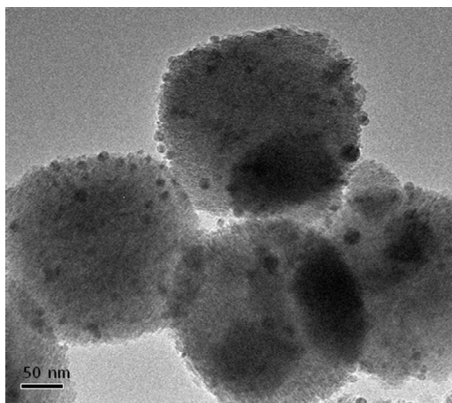


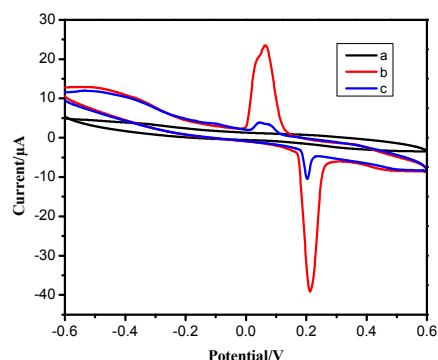
图 1 Ag-TiO₂-CS 纳米复合物透射电镜图

Fig.1 Transmission electron micrograph of Ag-TiO₂-CS nanocomposites

2.2 传感器的电化学行为

分别用裸电极和 Ag-TiO₂-CS 修饰电极作为工作电极, 在缓冲溶液和芦丁溶液中, 在 -0.6 V~+0.6 V 电位范围内进行 CV 扫描。图 2 中曲线 a 是裸电极在含 0.1 mM 的芦丁的 0.1 M PBS (pH = 6.5) 缓冲溶液中的 CV 图, 曲线 b 是 Ag-TiO₂-CS 修饰电极在含 0.1 mM 的芦丁的 0.1 M PBS (pH = 6.5) 缓冲溶液中的 CV 图, 曲线 c 是 Ag-TiO₂-CS 修饰电极在 0.1 M PBS (pH = 6.5) 缓冲溶液中的 CV 图。从图 2 可以看出, 芦丁在裸电极上没有氧化还原峰 (曲线 a), Ag-TiO₂-CS 修饰电极在 0.1 M PBS 中出现一对氧化还原峰 (曲线 c), 说明 Ag-TiO₂-CS 具有较好的电化学活性, 其活性来自零价 Ag 和一价 Ag 之间发生的反应。当加入芦丁对照品之后, 修饰电极的氧化还原峰增大 (曲线 b), 说明芦丁与

Ag-TiO₂-CS 修饰电极之间有较强的电催化作用。



(a)裸金电极, 0.1 MPBS+0.1mM 芦丁; (b) Ag-TiO₂-CS 修饰电极, 0.1 MPBS+0.1 mM 芦丁; (c) Ag-TiO₂-CS 修饰电极, 0.1 MPBS

图 2 Ag-TiO₂-CS 修饰电极与裸金电极在不同缓冲体系下的 CV 图

Fig.2 CV diagram of Ag-TiO₂-CS modified electrode and bare gold electrode in different buffer systems

2.3 电化学检测条件优化

2.3.1 电极修饰液用量

本实验对电极修饰液的用量进行考察, 检测不同用量对芦丁测定的影响。结果如图 3 所示, 峰电流值一开始随着修饰液用量的增加而增加, 当修饰液用量为 8 μ L 时, 峰电流值达到最大。修饰液用量继续增加, 峰电流值反而下降, 因此最优电极修饰液用量为 8 μ L。

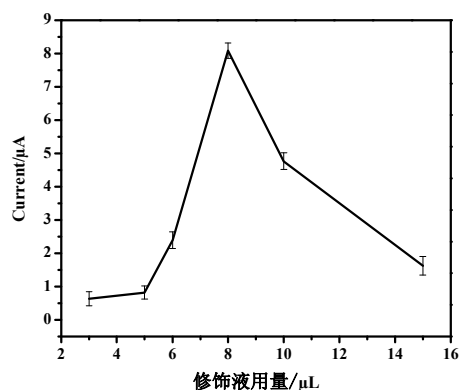


图 3 电极修饰液用量考察

Fig.3 Study on the amount of electrode modification solution

2.3.2 支持电解质 pH 的优化

实验通过对芦丁在不同 pH 的 0.1 M PBS 中的 CV 行为进行考察, 以此来对支持电解质的 pH 进行优化, 实验结果如图 4 所示。当 pH 为 6.5 时, 峰电流值达到最大, 因此选择 6.5 作为最优支持电解质 pH 值。

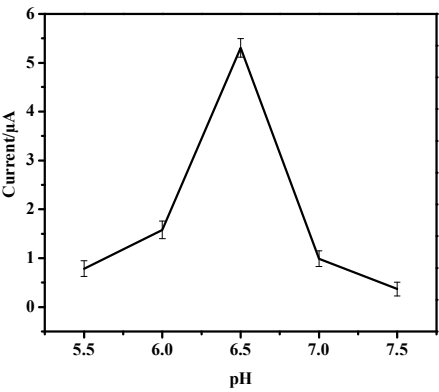


图 4 pH 值考察
Fig.4 pH investigation

2.3.3 仪器参数的优化

实验考察了扫描速率对芦丁电化学测定的影响, 综合考虑峰型、峰值等因素, 选择最优的扫描速率是 100 mV/s。

2.4 电化学传感器的性能

在 pH 值为 6.5, 其他实验条件为最佳条件下, 对芦丁电化学传感器的性能进行分析。在传感器的扫描范围为-0.6~0.6 V, 支持液为 0.1 M 的 PBS 中进行 DPV 检测。

随着芦丁浓度的增加, 芦丁和修饰电极的结合量增加, 进而使催化效果升高, 最终使得电化学传感器的 DPV 检测信号增加。经过对电化学传感器在不同芦丁浓度下的 DPV 分析, 并对不同浓度的芦丁的 DPV 电流峰值进行线性拟合 (图 5) 即 $y = 0.5395x + 0.7099$, 得到电化学传感器线性检测范围为 0.5~100 μM , 检测限为 0.1 μM , 线性相关性为 $R^2 = 0.9939$ 。结果表明该电化学传感器线性范围较好、检测限较低。

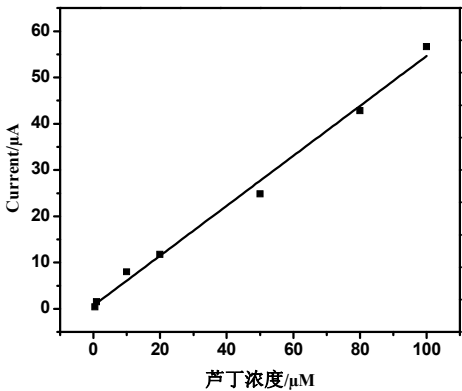


图 5 峰电流值与芦丁的线性曲线
Fig.5 Peak current value and linear curve of rutin

2.5 电化学传感器的重现性和稳定性

平行制备 6 根电极, 在完全相同的体系下对同一份芦丁对照品溶液进行电化学检测, 测得 RSD 为 2.13%, 可见修饰膜可以稳定并且均匀地存在于金电极表面, 所构建的电化学传感器的重现性良好。

将所构建的 Ag-TiO₂-CS 芦丁电化学传感器悬挂在 0.1 MPBS 中, 于 4℃温度条件下分别放置一天、一周后, 对同一芦丁对照品溶液进行测定, 放置一天以及一周后测得的峰电流值分别为最初的 95.23%, 93.3%, 所以可得此芦丁电化学传感器的稳定性良好。

2.6 实际样品的测定

为了检验 Ag-TiO₂-CS 修饰金电极是否可用于芦丁片中芦丁的含量测定, 在最优的实验条件下, 平行制备了 6 份供试品溶液进行检测, 实验测得其平均含量为标示量的 96.60%, 相当于含芦丁 19.32 mg/片, RSD 为 4.96%, 测定结果如表 1 所示。

表 1 实际样品的测定
Table 1 Determination of actual samples

标号	I (μA)	含量 (标示量的%)	平均含量 (标示量的%)	RSD (% , n = 6)
1	15.59	87.71	96.60	4.96
2	17.91	101.38		
3	16.89	95.36		
4	17.33	97.96		
5	17.29	97.72		
6	17.59	99.49		

2.7 干扰实验

本实验对芦丁片中常见的填充剂淀粉、崩解剂干淀粉、润滑剂硬脂酸镁等进行考察, 经研究发现片剂中常用的辅料对芦丁片的测定均无干扰。

3 小结

本实验通过制备 Ag-TiO₂-CS 纳米复合物并将其固载在金电极表面, 制得电化学免疫传感器。Ag-TiO₂-CS 复合物疏松、均质且具有良好的电化学活性, 有利于电子的运输, 其制作简便且稳定性好。本实验通过对 Ag-TiO₂-CS 纳米复合物的用量、检测体系的 pH 值、仪器参数等条件进行优化后, 得到最佳的实验条件。在最优的实验条件下进行电化

学传感器的抗干扰性、稳定性等考察,结果表明所构建的电化学传感器经过良好表征和优化后具有良好的分析性能,如线性检测范围宽、检测限低、灵敏度高,且重现性好、稳定性好,同时所建立的新方法可用于测量芦丁片中的芦丁含量,检测结果满意。

参考文献:

- [1] 王斌,赵明,陈志勇,等. 芦丁对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的作用研究[J].时珍国医国药,2018,29(8): 1796-1800.
- [2] Kreft S, Knapp M, Kreft I. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis[J].Agric Food Chem,1999, 47:4649-4652.
- [3] Kuntic' V, Pejic' N, Ivkovic' B, et al. Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms[J]. Pharm Biomed Anal ,2007,43:718-721.
- [4] Gulpinar A R, Orhan I E, Kan A, et al. Estimation of in vitro neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey[J]. Food Res Int,2012, 46:536-543.
- [5] 石生益,梁晶晶,杨明. 苦荞麦中芦丁的正交提取工艺及 HPLC 检测研究[J].中国酿造,2010,29(11):162-164.
- [6] Samsonowicz M, Kaminska I, Kalinowska M, et al. Alkali metal salts of rutin - Synthesis, spectroscopic (FT-IR,FT-Raman,UV-VIS),antioxidant and antimicrobial studies[J].Spectrochim Acta A, 2015, 151:926-938.
- [7] Pes T S, Sacco EMH, Ourique G M, et al. Effect of diets enriched with rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*)[J]. Fish Physiol Biochem, 2016, 42: 321-333.
- [8] 王斯慧,黄琬凌,陈庆松,等. 芦丁、槲皮素对 α - 葡萄糖苷酶活性抑制研究[J].中国酿造, 2012, 31(1): 133-135.
- [9] 贾娜,王乐田,邵俊花,等.芦丁对冷藏猪肉糜脂肪和蛋白氧化及品质特性的影响[J].食品与发酵工业, 2016, 42(10): 105-111.
- [10] 翟巍,郑赛飞,王素红,等. 芦丁锗的抗氧化能力观察[J]. 郑州大学学报:医学版, 2013, 48(1): 115-117.
- [11] 马溶,庞广昌. 芦丁对现代文明病的作用[J].食品科学, 2013, 34(7):307-311.
- [12] 魏江存,陈勇,阙祖亮,等. 优化槐米中芦丁提取工艺的实验研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,2017,38(2): 91-95,101.
- [13] 王信,李彩东,潘新波,等. HPLC 法同时测定珠子草中没食子酸、短叶苏木酚、柯里拉京、鞣花酸和芦丁的含量[J].药物分析杂志,2018,38(9):1641-1645.
- [14] 程聪梅,毛菊华,余乐. HPLC 法同时测定桑叶药材及其炮制品中绿原酸、芦丁和异槲皮苷的含量[J]. 中国药房, 2016, 27 (21):2990-2992.
- [15] 周静,美丽万,阿不都热依木. HPLC 法测定维药刺山柑种子中没食子酸和芦丁的含量[J].西北药学杂志, 2014, 29(2): 117-119.
- [16] 郑宓. 高效液相色谱法测定复方芦丁片中维生素 C 的含量[J].海峡药学, 2014, 26(4): 66-68.
- [17] 孙银华. 双波长高效液相色谱法测定复方芦丁片中维生素 C 和芦丁的含量[J].安徽医药, 2012, 16(1): 30-32.
- [18] 马君义,张串曙,赵保堂. RP-HPLC 法测定不同厂家芦丁片和复方芦丁片中芦丁的含量[J].西北师范大学学报,:自然科学版, 2010, 46(5): 74-81.
- [19] 于沙蔚,程伟青,潘爱萍. L-Cys-CdS 纳米荧光探针荧光猝灭法测定芦丁含量[J].化学研究与应用, 2014, 26(8): 1291-1294.
- [20] 曾华金,梁会丽,游静,等. 偏小二乘法结合流动注射化学发光法同时测定芦丁和维生素 C[J].发光学报, 2013, 34(3): 369-374.
- [21] 杨赟. 分光光度法测定复方刺五加片中总黄酮含量研究[J].中国现代医生, 2012, 50(7): 90-91.
- [22] 韦淑阳,朱平川,薛莹,等. 胶束毛细管电泳法同时测定消栓通络片中 5 种有效成分[J]. 分析测试学报, 2012, 31(8): 992-995.
- [23] 朱琳,任清木,徐笑颖.高速逆流色谱分离纯化苦荞中芦丁、槲皮素[J].食品科学, 2014, 35(2): 47-50.
- [24] 徐苗青. 电化学分析实验研究综述报告[J].化工管理,2013(6):147-149.
- [25] Paddon C A, Marken F. Hemoglobin adsorption into TiO_2 phytate multi-layer films: particle size and conductivity effects[J]. Electrochem Commun, 2004(6): 1249-1253.
- [26] Tan L,Chen Y Q, Yang H, et al. Alpha-l-fetoprotein antibody functionalized Au nanoparticles: catalytic labels for the electrochemical detection of α -l-fetoprotein based on TiO_2 nanoparticles synthesized with ionic liquid[J]. Sensor Actuat B-Chem, 2009, 142: 316-320.