

文章编号: 1674-8085(2019)04-0018-05

基于功能化的纳米锐钛矿 TiO₂ 膜修饰电极的 乌药醚内酯电化学传感器及其应用研究

*余丽双, 孙照霞, 陈 莉, 林 晓, 赖 昕

(福建中医药大学药学院, 福建, 福州 350122)

摘 要: 将功能化的纳米锐钛矿 TiO₂ (介孔结构) 修饰电极作为乌药醚内酯电化学传感器的氧化还原探针, 实现电化学方法检测乌药醚内酯。实验优化了电极修饰液用量、支持电解质和仪器参数等条件。在最优化的条件下, 乌药醚内酯的线性范围为 0.1~20 μg/mL, 检测限为 0.058 μg/mL。将所建立的电化学新方法应用于乌药中乌药醚内酯类的含量测定及药材真伪的鉴定, 测得其平均含量为 0.303 mg/g, 并实现乌药与其伪品荆三棱药材的快速鉴别。

关键词: 乌药醚内酯; 电化学传感器; 功能化纳米锐钛矿 TiO₂; 修饰电极

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2019.04.004

CONSTRUCTION AND APPLICATION OF LINDERANE ELECTROCHEMICAL SENSOR BASED ON FUNCTIONALIZED NANO-TIO₂ MODIFIED ELECTRODE

*YU Li-shuang, SUN Zhao-xia, CHEN Li, LIN Xiao, LAI Xin

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

Abstract: The functionalized nanoparticulate anatase TiO₂ (mesoporous structure) modified electrode was used as the redox probe of the electrochemical sensor of linderane, which could be applied to detect linderane. The experiment optimized the experimental conditions, such as the amount of electrode modification solution, supporting electrolyte and instrument parameters. Under the optimal conditions, the linear range of linderane ranged from 0.1 μg/mL to 20 μg/mL with a detection limit of 0.058 μg/mL. The new electrochemical method was applied to determine the content of linderane in *Scirpus maritimus*, and identify it and its counterfeit *S. yagara*.

Key words: linderane; electrochemical sensor; functionalized nano-anatase TiO₂; modified electrode

乌药为樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm 的干燥块根。乌药根主要由异喹啉类生物碱及呋喃倍半萜成分组成, 其中最为主要活性成分的乌药醚内酯就属于呋喃倍半萜类。现代药理学研

究表明, 乌药具有广泛的药理活性^[1-2], 主要有顺气止痛、温肾散寒等功效。

目前, 对于乌药中乌药醚内酯的含量测定及成分鉴定方法主要是高效液相色谱法和近红外光谱

收稿日期: 2019-02-02; 修改日期: 2019-04-22

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); 福建省卫计委项目计划(2017-2-48); 福建中医药大学校管课题重点专项(X2017012-重点)

作者简介: *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);

孙照霞(1990-), 女, 山东烟台人, 硕士, 主要从事中药分析方法学研究(E-mail:1570355182@qq.com);

陈 莉(1980-), 女, 福建福州人, 副教授, 硕士, 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, 硕士, 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, 硕士, 主要从事中药质量控制研究(E-mail:117802843@qq.com)。

法等^[3-7],例如余翠琴等^[3]采用反相高效液相色谱法测定天台乌药中的乌药醚内酯;邓桂明等^[6]运用超高效液相色谱-电离子喷雾-质谱/质谱法研究乌药化学成分;杜伟锋等^[7]利用近红外光谱法快速测定乌药中乌药醚内酯的含量。但上述方法无法实现在线快速地检测及鉴定,因此建立一种快速、在线、高灵敏的分析方法将具有很大的应用价值。

电化学分析法具有检测时间短、操作简便、成本低、便于微型化等诸多优势,有望在快速、在线、高灵敏准确监测食品和药品安全上获得突破^[8-10]。但乌药醚内酯本身没有电活性,无法直接利用电化学方法进行测定。笔者查阅相关文献未见采用电化学分析法测定乌药醚内酯的报道。本实验将功能化的纳米锐钛矿 TiO₂ (介孔结构)修饰电极作为乌药醚内酯电化学传感器的氧化还原探针,构建乌药醚内酯电化学传感器用于检测乌药中乌药醚内酯的含量并快速鉴别乌药与其伪品荆三棱药材。

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:功能化的纳米二氧化钛膜修饰金电极为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极。

1.1.2 试剂

乌药醚内酯(中国药品生物制品有限公司);乌药药材(河南省怀化市);荆三棱药材(江西青春康源中药饮片有限公司);MPS(阿拉丁公司);TiO₂ 由福建师范大学洪振生副教授提供^[11];不同 pH 值不同浓度的磷酸盐缓冲液、甲醇、乙酸(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 电极修饰液的制备

功能化纳米 TiO₂ 的制备方法在文献[12]的基础上进行了改动,具体方法如下,在 1.0 mL 1.0 mol/L HAc 溶液中含 94% 甲醇、5% 二次水、1% MPS 加入 1.0 mL TiO₂ (0.5%) 溶液,应用磁力搅拌器搅拌 2 h,离心收集 TiO₂ 并用无水甲醇洗 3 次,再分散到 2 mL 的蒸馏水中待用。

1.3 乌药醚内酯电化学传感器的制备

金电极在修饰前,依次用 1.0, 0.3, 0.05 μm 的 α-Al₂O₃ 粉末在专业抛光布上抛光成镜面,每次打磨后置蒸馏水中超声清洗。将处理好的电极置于含 5 Mm K₃Fe(CN)₆ 铁氰化钾的 0.5 M KCl 溶液中,采用三电极系统(金电极为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝为辅助电极),在扫描电压 -1 ~ +0.8 V 用循环伏安法(CV)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 的硫酸溶液,在扫描电压 0 ~ +1.7 V 用循环伏安法(CV)进行扫描,直到峰电流不再增加。

用微量进样器取 12 μL 修饰液滴涂于预处理好的金电极表面,室温下自然晾干即制得功能化的二氧化钛膜修饰金电极即乌药醚内酯电化学传感器。

1.4 乌药醚内酯对照品溶液的制备

精密称取乌药醚内酯对照品适量,用甲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。

1.5 乌药及荆三棱药材药品处理

平行称取 6 份乌药药材粉末和一份荆三棱药材粉末(过 80 目筛)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,浸泡 30 min,100 Hz 超声提取 30 m,摇匀,滤过。将滤液蒸干,残渣用甲醇复溶并定容于 5 mL 容量瓶中,然后过 0.22 μm 微孔滤膜,备用。

1.6 电化学方法

以 pH 为 8.0 的 0.1 M 磷酸二氢钠-0.1 M 磷酸氢二钠缓冲溶液为支持电解质,采用三电极系统,用差分脉冲伏安法对乌药醚内酯在修饰电极上的电化学反应行为进行研究并对其进行定量测定。

2 实验结果与讨论

2.1 纳米二氧化钛的表征

纳米二氧化钛透射电镜 (TEM) 表征结果如图 1 所示, 所合成的纳米二氧化钛为介孔结构, 有很好的微孔结构和大的比表面积^[11]。

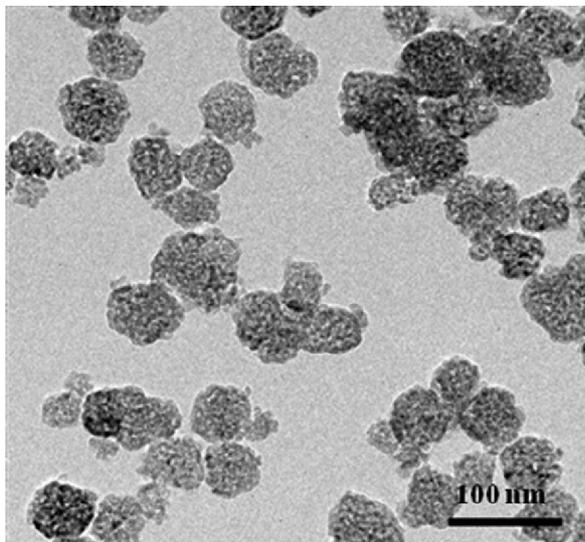
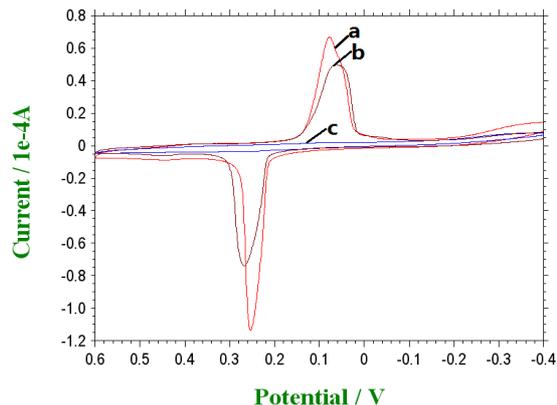


图 1 纳米 TiO₂ 的 TEM 图
Fig.1 TEM of nano TiO₂

2.2 电极的电化学特性

分别以裸金电极和功能化的纳米 TiO₂ 修饰金电极作为工作电极, 在不同缓冲体系下, 并于 -0.4 ~ +0.6 V 电位区间内进行 CV 扫描。图 2 中 a 是功能化的纳米 TiO₂ 修饰金电极在 0.1 M PBS (pH=8.0) 缓冲溶液中的 CV 图, 曲线 b 和 c 分别是功能化的纳米 TiO₂ 修饰金电极和裸金电极在含 12 μg/mL 的乌药醚内酯的 0.1 M PBS (pH=8.0) 缓冲溶液中的 CV 图。从图可以看出, 乌药醚内酯在裸金电极上无氧化还原峰 (曲线 c); 功能化的纳米 TiO₂ 修饰金电极在空白溶液中出现一对较好的氧化还原峰 (曲线 a), 这说明功能化的纳米 TiO₂ 具有较好的电化学活性; 当加入乌药醚内酯对照品后, 修饰电极的电流响应变低 (曲线 b), 这可能是由于功能化的纳米 TiO₂ 对乌药醚内酯具有较强的吸附作用, 但由于在该缓冲体系下, 乌药醚内酯无电化学活性, 其吸附于电极上阻碍了电子的传输从而使得峰电流值明显减小。实验发现, 修饰电极的峰电流随着乌药醚内酯浓度的增大而逐渐减小, 且峰电流差值 (与修饰金电极在空白溶液中的峰电

流对比) 与乌药醚内酯浓度在一定范围内呈线性关系, 因此可实现乌药醚内酯的测定。另外多次循环伏安实验发现修饰电极的氧化峰的峰电流值更加稳定, 峰型更加理想, 故而选择氧化峰的峰电流值进行乌药醚内酯的定量测定。且每次测量后, 需将三电极系统取出并冲洗, 然后在 -0.4 ~ +0.6 V 电位区间内于空白溶液中进行 CV 扫描, 循环 10 周即可恢复使用。



(a) 修饰电极, 0.1 M PBS; (b) 修饰电极, 0.1 M PBS+12 μg/mL 乌药醚内酯; (c) 裸金电极, 0.1 M PBS+12 μg/mL 乌药醚内酯

图 2 功能化的纳米 TiO₂ 膜修饰金电极与裸金电极在不同缓冲体系下的 CV 图

Fig.2 CV of functionalized nano-TiO₂ modified electrode and bare gold electrode in different buffer systems

2.3 实验条件的优化

2.3.1 电极修饰液用量的优化

通过对功能化的纳米二氧化钛电极修饰液的用量进行了优化选择, 考察了不同修饰液用量 (6~20 μL) 对测定的影响。实验结果表明, 峰电流值开始随修饰液用量增多而增大, 当修饰液用量为 12 μL 时峰电流值最大, 而超过 12 μL 时, 修饰液增多峰电流值反而减小, 故选择最优修饰用量为 12 μL。

2.3.2 支持电解质的选择

实验考察了乌药醚内酯在不同 pH 的 B-R 缓冲, 磷酸盐缓冲, 硼砂-硼酸缓冲, 乙酸-乙酸钠缓冲, 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲等缓冲溶液中的 DPV 行为, 结果表明在固定其他测定条件的情况下, 磷酸盐缓冲作为支持电解质所得到的峰电流值最大且峰型理想, 所以选择磷酸盐缓冲液作为支持电解质。

2.3.3 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲 pH 的选择

实验考察了乌药醚内酯在 0.1 M 磷酸二氢钠-0.1 M 磷酸氢二钠的不同 pH (6.5~9.0) 的缓冲溶液中的 DPV 行为, 实验结果表明, 当 pH 在 6.5~8.0 之间, 电极氧化峰电流值随 pH 值的增大而增大, 当 pH 为 8.0 时, 峰电流值最大, 当 pH 大于 8.0 时, 峰电流值变小, 因而选择 pH = 8.0 为最佳酸度。

2.3.4 仪器参数的优化

DPV 的仪器参数影响测试的灵敏度和分辨率, 实验考察了不同 DPV 仪器参数对乌药醚内酯测定的影响。综合考虑峰电流的大小、峰的形状和分析的速度, 选择的最佳仪器参数见下表 1。最优条件下测定乌药醚内酯对照品的 DPV 图如图 3 所示。

表 1 乌药醚内酯测定最佳 DPV 参数表

Table 1 The optimum instrumental parameters for the determination of linderane by DPV

IncrE (V)	Amplitude (V)	Pulse Width (s)	Pulse Period (s)	Quiet Time (s)
0.011	0.17	0.002	0.5	2

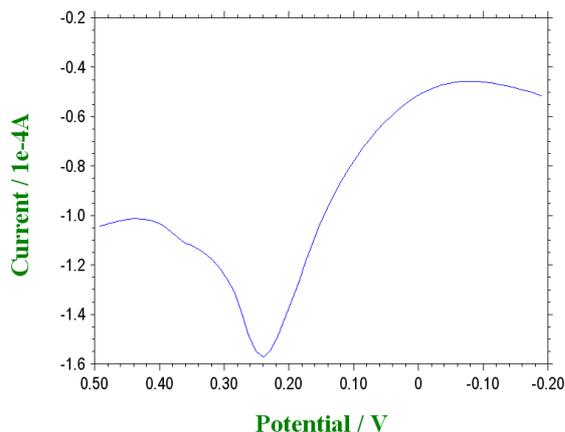


图 3 最优条件下测定乌药醚内酯对照品的 DPV 图
Fig.3 DPV of linderane under optimal conditions

2.4 方法学验证

2.4.1 电极重现性

平行制备 6 根金电极, 测定同份一样品, 测得 RSD 为 0.79%, 说明修饰膜在电极表面是比较均匀和稳定的, 表明电极重现性良好。

2.4.2 工作曲线与检测限

在最佳实验条件下进行测定分析, 得到的工作曲线为: $I_p(\mu A) = 153.76 - 6.7952c(\mu g/mL)$, 相关系数 r 为 0.9996, 检测限为 0.058 $\mu g/mL$, 定量限为 0.1 $\mu g/mL$ 。结果表明: 乌药醚内酯在浓度为 0.1~20 $\mu g/mL$ 的范围内, 峰电流差值(与修饰金电

极在空白溶液中的峰电流对比)与浓度呈良好的线性关系。

2.4.3 仪器精密度

按“1.4”项下方法制备含 15 $\mu g/mL$ 的乌药醚内酯对照品溶液, 在最优实验条件下重复测定 6 次, 实验测得 RSD 为 4.39% (n = 6), 表明仪器精密度良好。

2.4.4 方法重复性

取乌药药材, 按“1.5”项下方法平行制备供试品溶液 6 份进行分析, 测得 RSD 为 2.08% (n = 6), 表明方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率

为了能够更好地研究功能化的纳米二氧化钛膜修饰金电极对乌药醚内酯实际样品的分析, 我们对处理好的乌药样品进行了加样回收率的测定, 加样回收率平均值为 98.33%, RSD 为 2.61%, 测试结果如表 2 所示。

表 2 加样回收率测定结果

Table 2 The results of spiked sample recovery rate

标号	称样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%) (n = 6)
1	1.01220	0.306697	0.30021	0.6135	101.1	98.33	2.61
2	1.00722	0.305188	0.30021	0.5821	96.14		
3	1.00812	0.30546	0.30021	0.5817	96.04		
4	1.00070	0.303212	0.30021	0.5782	95.82		
5	1.00745	0.305257	0.30021	0.6099	100.7		
6	1.00680	0.30506	0.30021	0.6063	100.2		

2.5 实际样品测定

为了检验功能化的纳米二氧化钛膜修饰金电极是否可以用于乌药药材中乌药醚内酯的含量测定, 在最佳条件下, 实验测定了平行 6 份样品中乌药醚内酯的含量, 求出平均值为 0.303 mg/g, 相对标准偏差 RSD = 2.53% (n = 6), 测试结果如表 3 所示。

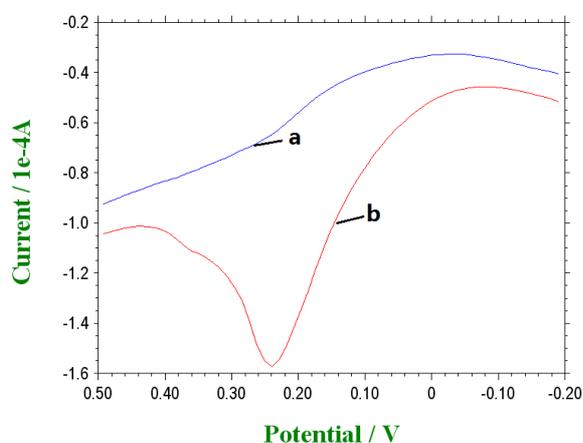
表 3 乌药药材中乌药醚内酯的含量测定结果

Table 3 The results of the content of linderane in Scirpus maritimus L.

标号	称样量 (g)	浓度 ($\mu g/mL$)	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%) (n = 6)
1	1.01220	10.31	0.306	0.303	2.53
2	1.00722	10.36	0.308		
3	1.00812	10.26	0.306		
4	1.00070	9.96	0.299		
5	1.00745	10.38	0.309		
6	1.00680	9.70	0.289		

2.6 乌药与其伪品荆三棱的快速鉴别

乌药为常用中药,有温肾散寒、顺气、止痛的功效。今发现有以莎草科植物荆三棱根茎的切片充作乌药使用的情况,现有文献^[13-15]有对荆三棱伪品进行性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别的方法记载,未见应用电化学方法进行荆三棱伪品的鉴别,本研究采用电化学方法进行荆三棱伪品的鉴别,操作简便,检测迅速,检测结果如图4所示。由图可得,乌药药材在+0.24 V位置出峰,而乌药伪品荆三棱药材没有出峰,由电化学检测图谱即可实现乌药与其伪品荆三棱的快速鉴别。



a: 荆三棱 b: 乌药

图4 乌药与荆三棱药材 DPV 图

Fig. 4 DPV of *Scirpus maritimus* L. and its counterfeit *Scirpus yagara* Ohwi

3 小结

本实验将纳米二氧化钛进行功能化,采用滴涂法制备功能化的纳米二氧化钛膜修饰金电极,将其应用于乌药醚内酯的电化学测定,相对于裸金电极,修饰电极具有更好的电化学信号。将修饰电极用于乌药药材中乌药醚内酯的含量测定,加标回收率为95.82%~101.1%,说明本方法准确、可行。应用电化学方法,根据电化学谱图可以实现乌药与其伪品荆三棱药材的快速鉴别,检测迅速,操作简便。该修饰电极制作简单、重复性好,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 1 部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 77-78.
- [2] 中国医学科学院药物研究所. 中药志 (第二册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 926.
- [3] 余翠琴, 陈方亮. 高效液相色谱法测定乌药中乌药醚内酯[J]. 中草药, 2009, 40(06): 983-984.
- [4] 陈瑞芳, 曹高忠, 吴明钊, 等. 6种不同产地乌药中乌药醚内酯的 HPLC 法含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(05): 1123-1124.
- [5] 陈文明, 李珊, 汤艳, 等. 湖南不同产地乌药根、茎、叶中主要化学成分的比较研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(22): 32-36.
- [6] 邓桂明, 向彪, 肖小芹, 等. 基于 GC-MS 和 UPLC-ESI-MS/MS 法研究乌药化学成分[J]. 中药材, 2016, 39(10): 2229-2236.
- [7] 杜伟锋, 吴瑶, 岳显可. 近红外光谱法快速测定乌药中乌药醚内酯和去甲异波尔定含量[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(6): 709-715.
- [8] 杨谦, 苏会岚, 罗欢, 等. 电化学分析法应用于黄曲霉素检测的进展研究[J]. 化学传感器, 2017, 27(2): 23-28.
- [9] 黄春芳, 陈华龙. 一步法合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PDA}-\text{PtNPs}-\text{Hb}$ 复合磁性纳米粒子及其对 H_2O_2 电催化性能的研究[J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2016, 37(2): 24-28.
- [10] 陈海辉. 电化学增强催化的研究进展[J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2014, 35(1): 15-20, 50.
- [11] 洪振生, 洪家兴, 谢超兵, 等. 一种 TiO_2 介壳及其制备方法和应用[P]. 中国专利: ZL201510060086.1
- [12] Morrill A R, Duong D T, Lee S J, et al. Imaging 3-aminopropyltriethoxysilane self-assembled monolayers on nanostructured titania and tin (IV) oxide nanowires using colloidal silver nanoparticles[J]. Chem Phys Lett, 2009, 473(1-3): 116-119.
- [13] 吴大刚. 乌药与伪品荆三棱的鉴别[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(5): 277.
- [14] 元佩兰, 元新华, 谷雨. 乌药伪品荆三棱的鉴别[J]. 包头医学, 1998, 22(1): 25.
- [15] 孔增科. 乌药伪品荆三棱的鉴别[J]. 中草药, 1994, 25(3): 151.