

木犀草素在导电聚合物膜修饰电极上的电催化性能及其测定

刘爱林 陈伟 张少波 林新华*

(福建医科大学药学院 药物分析系 福州 350004)

摘要 目的:研究木犀草素在4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚(PAR)导电聚合膜修饰玻碳电极上的电化学行为,建立测定木犀草素含量的电化分析新方法。方法:采用循环伏安法研究木犀草素在导电聚合膜修饰玻碳电极上的电化行为及其电极反应机理,以差分脉冲伏安法建立了检测木犀草素含量的电化分析新方法。结果:在磷酸盐缓冲液(pH 4.0)中,在-0.2~+0.8 V范围内木犀草素在PAR膜修饰电极表面是受吸附控制,发生准可逆单电子转移电极反应过程,电子转移系数 $\alpha=0.47$;在导电聚合膜厚度为40圈($100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$),富集电位-0.2 V,富集时间180 s,利用差分脉冲伏安法可测得其氧化峰电流 I_p 与浓度分别在 $3.0\times 10^{-8}\sim 1.0\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内呈良好的线性关系,检出限为 $1.0\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论:本法操作简单、快速、灵敏、准确,并可为木犀草素的质量控制提供科学依据。

关键词:循环伏安法;修饰电极;黄酮类化合物;4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚(PAR);木犀草素

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2011)08-1516-05

Electrochemical behavior and determination of luteolin on the polymer modified glassy carbon electrode

LIU Ai-lin, CHEN Wei, ZHANG Shao-bo, LIN Xin-hua*

(Department of Pharmaceutical Analysis of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

Abstract Objective: To study the voltammetric behavior of luteolin on the poly 4-(2-pyridylazo)-resorcinol (PAR) modified glassy carbon electrode (GCE) and establish a novel method for the determination of the concentration of luteolin. **Method:** The electrochemical behavior of luteolin was studied by voltammetry on the ploy-PAR modified GCE. The results exhibited the well-defined redox peak of luteolin was observed and the electrode process is adsorption-controlled. The charge transfer coefficient (α) was calculated as 0.47 in phosphate buffer solution (pH 4.0). **Result:** The relationship between oxidation peak current and the concentration of luteolin linear in the range of $3.0\times 10^{-8}\sim 1.0\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The detection limits of luteolin have been estimated as $1.0\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The method is simple, rapid, sensitive and accurate. It can provide scientific basis for the quality control of luteolin.

Key words: voltammetry; modified electrode; flavonoids; poly 4-(2-pyridylazo)-resorcinol; luteolin

木犀草素 3,5,7-三羟基-2-(3,4-二羟基苯基)苯并吡喃-4-酮(luteolin,其结构式如图1)属于黄酮类植物化学物,主要存在于金银花、菊花、荆芥、白毛夏枯草等药物中^[1]。具有最强的抗氧化活性、抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤及扩张血管等作用^[2-7]。因此,对木犀草素测定方法的研究无论是在质量检测方面,还是在临床应用方面都具有重要的意义。

目前用于检测木犀草素的方法主要有高效液相

色谱法^[8-11]、毛细管电泳法^[12]和紫外分光光度法^[13],但这些方法存在操作烦琐、灵敏度不高等特点,故不能快速地检测木犀草素。导电聚合膜修饰电极可增加传质速率,在电化检测中聚合物修饰电极应用颇受关注。由于木犀草素是3',4',5,7-四羟基黄酮^[14,15](如图1)在裸玻碳电极上有1对良好的氧化还原峰,但峰电流较小。本文用电聚合成功研制了PAR修饰电极,并利用伏安法探讨了木犀草素在PAR修饰电极的电催化性能,并利用其氧

* 通讯作者 Tel: (0591) 22862016; E-mail: xh111963@sina.com

化峰电流与浓度呈现良好的线性关系,建立了检测木犀草素含量的新方法,该方法灵敏度高、重现性好,为更好地控制该药质量提供科学依据。

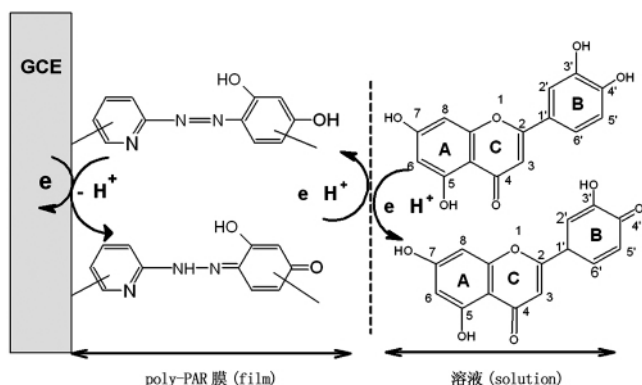


图1 木犀草素在 PAR 导电聚合膜电极上的反应图
Fig 1 The electrochemical behavior of luteolin on a PAR modified electrode

1 仪器与试剂

CHI630C 电化学分析仪(上海辰华仪器有限公司),三电极体系:工作电极为玻碳电极(GCE),参比电极为 Ag/AgCl 电极,对电极为铂丝电极;KQ-218 型超声波清洗器,pHS-3B 精密 pH 计。木犀草素(中国药品生物制品检定所);4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚(PAR)(购于 Sigma 公司);脉舒胶囊(浙江康恩贝制药股份有限公司);其余试剂均为分析纯;全部溶液均用二次蒸馏水配制。

2 聚 PAR 膜修饰电极的制备

电极的预处理:玻碳电极依次用金相砂纸、0.3 μm、0.1 μm 和 0.05 μm 氧化铝粉末与水的混合物抛光,再依次经 1:1 硝酸、1:1 乙醇和纯水超声清洗。然后将电极置于 0.05 mol · L⁻¹ 硫酸溶液中,在 -0.4 V ~ +1.6 V 电位区间循环扫描至伏安曲线 CV 图稳定为止(约 10 min)

聚 PAR 膜修饰电极按照文献[16]中的方法制备:将处理好的玻碳电极置于含 0.3 mmol · L⁻¹ PAR 的 PBS 缓冲液(pH 6.0)中,于 -0.8 V ~ +1.3 V 电位区间内,以 100 mV · s⁻¹ 的扫速聚合 40 圈。取出洗净即制得 PAR 膜修饰电极。放在磷酸盐缓冲溶液中保存备用。

3 PAR 膜修饰电极对木犀草素电催化作用的研究

木犀草素溶于 0.05 mol · L⁻¹ 稀碱溶液配制成 1.0 × 10⁻³ mol · L⁻¹ 的浓度于 10 mL 量瓶中,用时再用缓冲溶液稀释至所需浓度。在 CHI630C 电化学工作站上,以 PAR 膜修饰玻碳电极作为工作电极,以 PAR 膜修饰玻碳电极作为工作电极,在 0 ~ +

0.8 V 电位区间内,用循环伏安法研究聚合圈数、溶液 pH 以及扫描速率等对木犀草素电催化过程的影响。

4 结果与讨论

4.1 木犀草素在 PAR 膜修饰电极上的循环伏安图

图 2 为 0.5 μmol · L⁻¹ 木犀草素在 0.05 mol · L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液(pH 4.0)中的循环伏安曲线。在 0 ~ +0.8 V 电位区间内,木犀草素存在 1 对峰形良好的氧化/还原峰,其峰电位依次为 0.448 V 和 0.373 V; ($E_p = 75$ mV,由 $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 2.3 RT/nF$ (59/n mV, 25 °C) 可推算出 $n \approx 1$ 。由图 2 可得,木犀草素氧化峰的半峰宽为 118 mV,由关系式 $W_{1/2} = 62.5/(1 - \alpha)n^{[14]}$,可得电子转移系数 $\alpha = 0.47$ 。由氧化峰和还原峰电流比 $I_{pa} : I_{pc} = 1.45 : 1$,可见在 -0.2 ~ +0.8 V 电位区间内,木犀草素在玻碳电极上表现为准可逆的单电子转移的电极反应的过程(如反应图 1)。对比修饰前后的木犀草素的氧化峰电流增加了近 3 倍,表明此聚 PAR 膜修饰电极对木犀草素产生了很强的电催化作用。

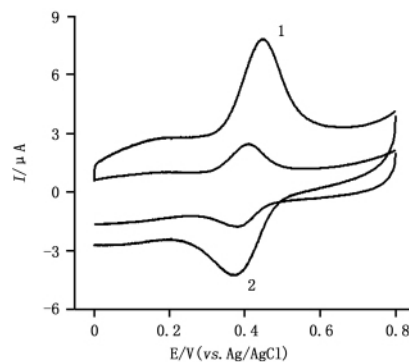


图2 木犀草素循环伏安曲线图
Fig 2 Cyclic voltammograms of luteolin in PBS
扫速(scan rate): 100 mV · s⁻¹

实验考察得到木犀草素在 PAR 修饰玻碳电极上伏安扫描的氧化峰(如图 2 峰 1)和还原峰(如图 2 峰 2)电流随扫速的增加而增大(如图 3 - A)。在 20 ~ 500 mV · s⁻¹ 的范围内,木犀草素氧化峰和还原峰电流随扫速的变化均呈线性关系(如图 3 - B $I_{pa} = -0.05554 + 0.03989 v$ $r = 0.9989$; $I_{pc} = 0.3451 - 0.03066 v$ $r = -0.9999$),说明木犀草素对应的电极反应为吸附控制过程。又据实验考察,在溶液 pH 3 ~ 9 的范围内,木犀草素在 PAR 修饰玻碳电极上伏安扫描的氧化峰电位都与 pH 呈线性关系(如图 3 - C $E_{pa} = -0.0581pH + 0.626$ $r = 0.997$),并且氧化峰电位随溶液 pH 的增加出现负移,表明该过程有质子参加反应。根据其氧化峰电位与 pH 之间的

线性关系中斜率 ($K = -0.058$) 等于 $0.059 m/n$ (n 为电子转移数), 由 $n = 1$, 从而有 $m \approx 1$ 。证实木犀草素的氧化过程中有等数目的电子和质子参加, 即木犀草素在 PAR 修饰电极上的反应为单质子、单电子的准可逆过程^[14]。

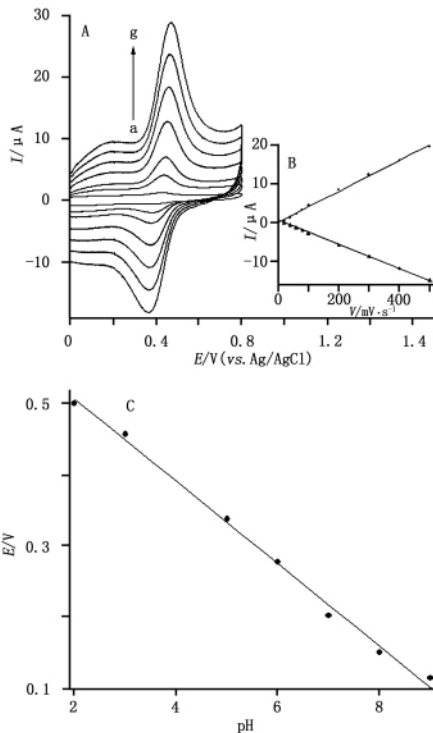


图3 (A) 木犀草素在修饰电极上不同扫速的循环伏安曲线 (B) 木犀草素氧化峰和还原峰电流与扫速关系图。C 木犀草素的氧化峰电位随 pH 的变化

Fig 3 (A) CVs of luteolin on PAR modified GCE at different scan rates. (B) The relationship between the scan rate and peak current. (C) The effect of pH on the potential of luteolin oxidized peak

4.2 差示脉冲伏安法测定条件选择及测定

4.2.1 聚 PAR 膜厚度的影响 PAR 膜在玻碳电极表面电聚合时间对木犀草素电催化性能有显著的影响。如图 4 示, 随着扫描圈数的增加, 木犀草素的氧化峰电流逐渐上升。当扫描圈数达到 40 圈 ($100 mV \cdot s^{-1}$) 时, 木犀草素的氧化峰电流达到最大。然后随着圈数的递增木犀草素的峰电流开始下降, 这是由于聚 PAR 膜厚度增加, 导致电极表面电子的传输受阻。因此, 本次实验选择 40 圈的聚 PAR 膜修饰玻碳电极作为工作电极。

4.2.2 富集电位和富集时间的影响 木犀草素对应的电极反应为吸附控制过程, 富集电位和时间对其氧化峰电流会有显著影响。如图 5 - A 所示, 随着富集电位从 $-0.4 V$ 增大时, 木犀草素氧化峰电流随之增大, 当富集电位到达 $-0.2 V$, 木犀草素氧

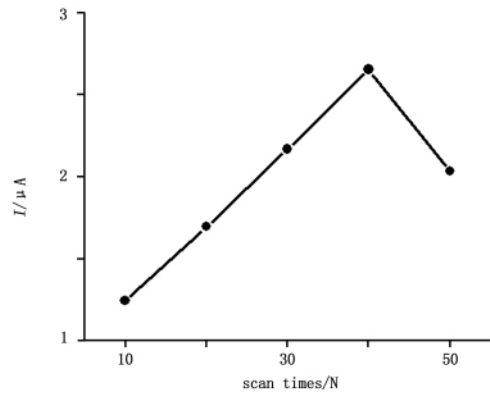


图4 不同聚合圈数木犀草素氧化电流的影响

Fig 4 Different scans time on the electrochemical response of of Luteolin

化峰电流达到最大; 随后木犀草素氧化峰电流随富集电位的升高而逐渐减小; 故实验选择 $-0.2 V$ 为木犀草素的富集电位。同时考察了在富集电位为 $-0.2 V$, 富集时间对木犀草素氧化峰的影响(如图 5 - B) 随着富集时间的增加, 氧化峰电流也增加, 在富集 180 s 时, 木犀草素氧化峰电流达到最大; 随后, 木犀草素氧化峰电流随富集时间增加而减小, 实验木犀草素的富集时间选择为 180 s。

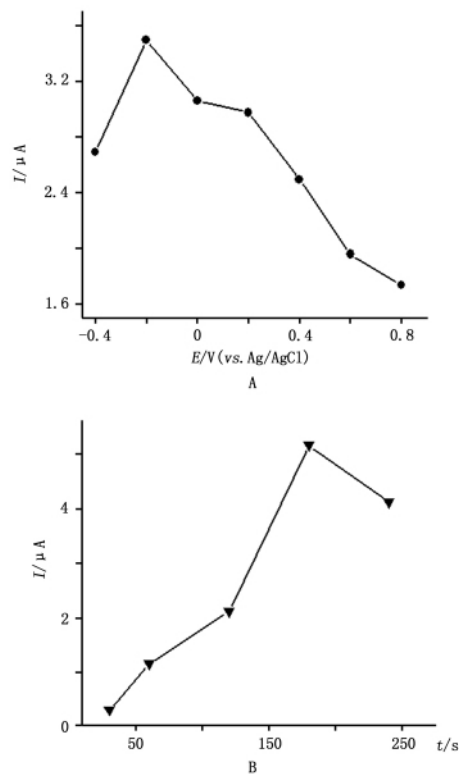


图5 木犀草素氧化峰电流分别富集电位关系图(A)和富集时间关系图(B)

Fig 5 The relationships between the gathering potential (A) /time (B) and peak current of luteolin oxidized peak

4.2.3 酸度对木犀草素氧化峰电流的影响 如图

6 所示,在酸度为 pH 3.0 ~ 9.0 的 PBS 缓冲液范围内,随 pH 增大,木犀草素在 PAR 膜修饰电极上氧化峰电流逐渐上升,到 pH 4.0 时,木犀草素的峰电流最大,然后随着 pH 的增加而降低,这与黄酮类化合物因分子中 4',7-酚羟基 pK_a 大约 4 左右^[1,15] 一致。因此,综合考虑后本实验选择 pH 4.0 的磷酸盐缓冲溶液作为支持的电解质溶液。

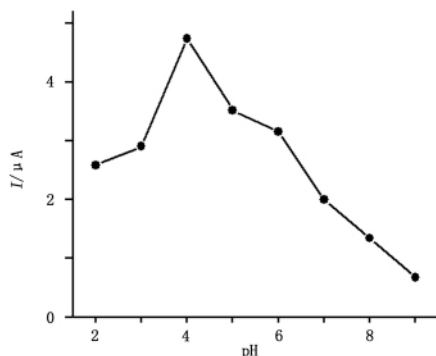


图6 木犀草素氧化峰电流与 pH 的关系
Fig 6 The effect of pH on the luteolin peak current
扫速 (scan rate): 100 mV · s⁻¹

4.2.4 电极的重现性 PAR 膜修饰电极在含 $0.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 木犀草素的 PBS 缓冲液内,利用差示脉冲伏安法连续测定 10 次,木犀草素氧化峰电流的重复性好, RSD 为 2.6 %。

4.2.5 线性范围及检出限 配制一系列不同浓度的木犀草素标准溶液,在优化实验条件的情况下,用 PAR 膜修饰电极以差示脉冲伏安法对木犀草素进行测定。实验表明,随着木犀草素浓度的增加,其氧化峰电流相应增大(图 7 - A),木犀草素的氧化峰电流与浓度在 $3.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($I_p = -0.1787 + 0.6722c$ $r = 0.9999$) 范围内呈良好的线性关系(如图 7 - B);检出限可达 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4.2.6 样品及回收率的测定

准确称取 10 粒脉舒胶囊内容物,研细后,准确称取 1 粒的量 0.25 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,精密加入无水乙醇 25 mL,称定重量,浸泡 1 h 之后,回流提取 45 min,迅速冷却至室温,再称定重量,用无水乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取滤液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为样品溶液。

准确移取样品溶液 50 μL 到 10 mL PBS (pH 4.0) 的电解池中,按差示脉冲伏安法测定。样品平

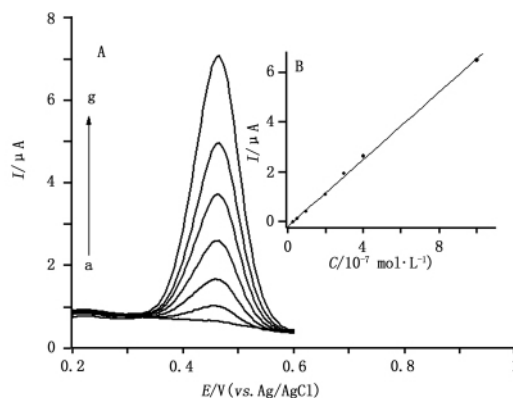


图7 不同浓度木犀草素的差示脉冲伏安曲线(A)和氧化峰电流与浓度变化的工作曲线(B)
Fig 7 DPVs of different luteolin concentrations at PAR modified GCE (A) and the relationship between luteolin concentrations and peak current (B)

行测定 6 次,结果表明,每粒胶囊中的木犀草素平均含量为 4.12 mg 左右,与药典方法测定结果一致。同时在样品中加入定量的木犀草素对照品进行回收率实验(如表 1),结果令人满意。

表 1 脉舒胶囊中木犀草素的检测 (n = 6)
Tab 1 Determination of luteolin in Maishu capsules

| 本法测定值 (detected data) /mg | 加标量 (added data) /mg | 测定值 (found data) /mg | RSD /% | 回收率 (recovery) /% |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------|-------------------------|
| 4.12 | | | | |
| 4.12 | 0.5 | 4.66 | 2.9 | 108 |
| 4.12 | 1.00 | 5.13 | 3.7 | 101 |
| 4.12 | 1.50 | 5.59 | 3.6 | 98 |
| 4.12 | 2.00 | 6.14 | 3.3 | 101 |

5 结论

本文研究了木犀草素在聚 4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚聚合膜修饰玻碳电极表面的电化学反应。结果表明此聚合物修饰玻碳电极对木犀草素有很强的电催化活性。在 0 ~ +0.8V 区间内,木犀草素在 PAR 修饰电极表面可得到 1 对氧化还原峰,其电催化反应是单质子参与的受吸附控制的单电子转移可逆电极反应。利用差示脉冲伏安法建立了检测木犀草素含量的新方法,并用于实际样品脉舒胶囊中木犀草素的含量检测,结果令人满意。本新方法与其他分析方法相比,具有所用样品量少、灵敏度高、检出限较低、反应快速、稳定性好和操作简单等特点。可为木犀草素药物质量的控制和检测提供了一种新的简便方法。

参考文献

- 1 YAO Xin - sheng(姚新生). Natural Medicinal Chemistry(天然药物化学). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社) 2003. 173
- 2 Lee Y, Howard LR. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper(*Cap sicum annuum*) cultivars. *Food Sci* 1995 60(3): 483
- 3 WANG Xian - kai(王宪楷). Natural Medicinal Chemistry(天然药物化学). Beijing(北京): Beijing People's Medical Publishing House(人民卫生出版社) 1994. 272
- 4 ZHANG Fang - fang(张芳芳), SHEN Han - ming(沈汉明), ZHU Xin - qiang(朱心强). Research progress on anti - tumor effects of luteolin(木犀草素抗肿瘤的研究进展). *J Zhejiang Univ(Med Sci)* [浙江大学学报(医学版)] 2006 35(5): 573
- 5 Hu LH, Chen ZL. Structure elucidation of a new n - pentyl fructofuranoside in *Dendranthena morifolium* (Ramat) Tzvel. *Acta Bot Sin* 1997 39(1): 85
- 6 Chen E C, Pannangpetch P. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure - activity relationships. *Cardiovasc Pharmacol* 2000 35(2): 326
- 7 XIAO Da - kai(肖大凯), QIN Yan - mei(覃燕梅), MO Li - er(莫丽儿), et al. Effect of luteolin on metastasis of ovarian carcinoma cell line(木犀草素对卵巢癌细胞株转移能力的影响). *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志) 2006 22(6): 1199
- 8 Ku YR, Chen CY. Analysis of flavonoids in *Vernonia patula* by high performance liquid chromatography. *J Food Drug Anal* 2002 1: 139
- 9 Liu FF, Ang CYW. Evaluation of major active components in *St. John's wort* dietary supplements by high - performance liquid chromatography with photodiode array detection and electrospray mass spectrometric confirmation. *J Chromatogr A* 2000 888: 85
- 10 DUAN Kun - feng(段坤峰), LU Shu - jie(卢树杰), CHEN Zhong(陈钟), et al. RP - HPLC simultaneous determination of luteolin, apigenin and kaempferol in *Verbena officinalis* L. (RP - HPLC 法同时测定马鞭草中木犀草素、芹菜素和山柰酚). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010 30(6): 995
- 11 ZHAO Kai - xin(赵凯鑫), SU Dan(苏丹), ZHAO Xue - mei(赵雪梅), et al. HPLC determination of luteolin - 7 - O - β - D - glucuronide in herbs of *Ixeris sonchifolia* (HPLC 法测定苦碟子中木犀草素 - 7 - O - β - D - 葡萄糖醛酸苷的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010 30(6): 1019
- 12 LÜ Yuan - qi(吕元琦), WU Chun - hua(邬春华), YUAN Zhuo - bin(袁卓斌). Determination of hesperetin, luteolin and apigenin in *Flos Buddlejae* by capillary electrophoresis(毛细管电泳法测定密蒙花中的橙皮素、木犀草素和芹菜素). *Chin J Anal Lab* (分析实验室) 2004 23(08): 14
- 13 CHEN Chun - tao(陈春涛), MA Qing - yi(马庆一), GAO Yu - mei(高玉美), et al. Study on extraction, purification and antimicrobial activity investigation of luteolin and other components in Peanut Hulls(花生壳中木犀草素等抑菌活性成分的提取、纯化与研究). *Food Sci* (食品科学) 2003 24(5): 84
- 14 Liu AL, Zhang SB. Electrochemical oxidation of luteolin at a glassy carbon electrode and its application in pharmaceutical analysis. *Chem Pharm Bull* 2008 6: 745
- 15 Brett AMO, Ghica ME. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis* 2003 15: 1745
- 16 ZHANG Shao - bo(张少波), LIU Ai - lin(刘爱林). Simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid by electropolymerized 4 - (2 - pyridylazo) - resorcinol film modified electrode(导电聚合物膜修饰电极用于对乙酰氨基酚和抗坏血酸的同时测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008 28(1): 85

(本文于2010年10月28日收到)

《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于2008年10月23日开通稿件在线管理系统。从即日起,凡投稿本刊,请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E - mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50 元。

作者在线投稿后,可在线了解稿件情况:编辑 - 送审 - 专家已审 - 待编辑处理稿件 - 退修 - 编辑加工完成 - 已刊出等。

读者可在线查看本刊目录,了解本刊编委及其他信息,并可在在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题,请与技术支持联系:010 - 69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部