

方波伏安法间接测定壳聚糖的研究^{*}

谭学才^{1,2}, 罗利军², 麦智彬², 邱俊明², 蔡沛祥²

(1. 广西民族学院化学与生态工程学院, 广西 南宁 530006;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 建立了以茜素红 (AR) 为电活性探针方波伏安法间接测定无电活性的壳聚糖 (CS) 的新方法。在 0.1 mol/L HAc-NaAc (pH 4.5) 缓冲溶液中, AR 与 CS-AR 在 GCE 上均能形成一准可逆的吸附伏安峰 ($V_{pc} = -0.46$ V, $V_{pa} = -0.41$ V)。实验表明, CS 在低浓度 ($1.25 \times 10^{-8} \sim 2.5 \times 10^{-7}$ mol/L) 和高浓度 ($2.5 \times 10^{-7} \sim 1.25 \times 10^{-5}$ mol/L) 的条件下对体系的峰电流分别具有线性增敏和减敏效应。采用标准加入法测定了不同样品中壳聚糖的含量, 其回收率在 97.33%~102.00% 之间, 结果满意。

关键词: 壳聚糖; 茜素红; 方波伏安法; 测定

中图分类号: O657.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 01-0129-03

壳聚糖 (chitosan, 以下用 CS 表示) 是目前自然界惟一带正电荷的可食用的碱性多糖大分子, 它是甲壳素 (其在自然界的产量仅次于纤维素) 脱乙酰基后的产物, 其分子中含有丰富的亲水性的氨基和羟基, 具有良好的生物活性、生物相容性、易成膜性和配位性等, 近年来其已在食品、医药保健、化妆、环保、农业及化学化工等领域得到研究、开发和应用^[1,2]。在医药保健方面, 已证明其具有抗肿瘤、降血脂、抗血栓、抗凝血和增强免疫等功能, 因此其生物活性及其在生物体内的作用机理是目前研究的热点。有关 CS 光谱法^[3] 和高压液相色谱法^[4] 测定已有文献报道, 但 CS 就像蛋白质一样, 本身没有电活性, 无法用电化学方法直接测定。在实验中发现 CS 对茜素红 (alizarin red, 带负电, 以下用 AR 表示) 的电化学反应具有增敏和减敏的双重效应, 本文据此首次提出了以 AR 为电活性探针并利用灵敏的方波伏安法间接测定 CS 的新方法。与已报道的方法相比, 本法所用仪器简单、快速、灵敏。用于实际样品测定, 效果良好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 CHI660 电化学工作站 (CH Instruments Inc. USA), 以玻碳 (GC) (φ 3 mm) 电极为工作电极 (GCE), Ag/AgCl 为参比电极, 铂丝为对电极。

壳聚糖 (脱乙酰度 99%, 上海伯奥生物科技有限公司), 平均相对分子质量约 400 000。称取

0.500 0 g 壳聚糖溶于 100 mL $\varphi = 1.0\%$ 的醋酸溶液中, 超声振荡 30 min 得 1.25×10^{-5} mol/L 壳聚糖储备溶液。茜素红 (上海试剂三厂), 称取 0.018 1 g 茜素红用水溶解并定容于 50 mL 容量瓶中得 1.0×10^{-3} mol/L 标准储备溶液。所用化学试剂均为分析纯, 实验用水为二次石英蒸馏水。

1.2 实验方法 GCE 先在 1200 号金相砂纸上打磨, 然后分别用 1、0.3、0.05 μm $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 在抛光垫上抛光, 每一步均用二次水洗净, 洗净的电极分别在体积比为 1:1 HNO_3 、无水乙醇及二次水中超声清洗各 5 min, 在于室温晾干备用。在 10 mL 带刻度的具塞试管中加入 1.0 mL 1 mol/L HAc-NaAc 和不同量的壳聚糖及茜素红, 然后用二次水稀释至刻度, 摇匀。电化学实验前将测试液通入高纯氮出氧 15 min, 然后记录循环伏安曲线或方波伏安曲线并得到电流及电位值。

2 结果与讨论

2.1 AR 在 GCE 上的伏安图 图 1 是 AR 在 GCE 上的循环伏安图 (CV)、微分脉冲伏安图 (DPV) 和方波伏安图 (SWV) 的比较。从图 1 (a) 可知, 在 pH 4.5 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中, AR 在 GCE 上具有一对可逆的氧化还原峰, 其 $V_{pc} = -0.45$ V, $V_{pa} = -0.41$ V, $\Delta V_p = 0.04$ V, $I_{pc} = I_{pa}$; 从图 1 可知, SWV 比 DPV 和 CV 的灵敏度要高得多, 这正是可逆反应伏安法的典型特征^[5], 故除特别说明外, 以后的定量测定均采用 SWV 法。实验证明,

* 收稿日期: 2004-09-07

基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金资助项目 (0141037, 0342018)

作者简介: 谭学才 (1964 年生), 男, 博士研究生, 副教授; 通讯联系人: 蔡沛祥; E-mail: caipx@21cn.com

若在相同的体系中加入 CS，具有相同的规律。

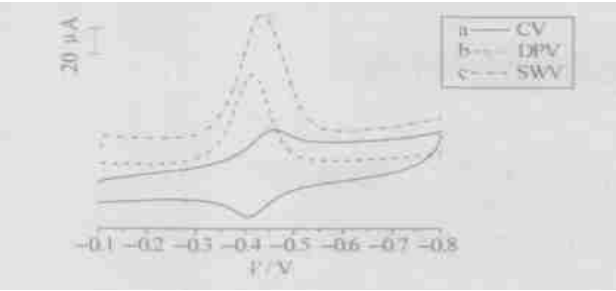


图 1 茜素红的伏安图

Fig. 1 Voltammograms of alizarin red

- 2.0 × 10⁻⁵ mol/L AR, 0.1 mol/L HAc-NaAc (pH 4.5);
- (a) $v=0.05\text{ V/s}$
- (b) 振幅: 0.05 V, 脉冲宽度: 0.05 s
取样宽度: 0.0167 s 脉冲周期: 0.2 s
- (c) 振幅: 0.025 V, $f=15\text{ Hz}$

2.2 CS 对 AR 电极反应的增/减敏效应及解释 图 2 为 AR (虚线) 及在其中加入不同量的 CS (实线) 的 CV 图, 由图可见, 加入 CS 前后的峰电位基本不变, 但不同浓度的 CS 对峰电流具有增敏 (低浓度) 和减敏 (高浓度) 双重效应。实验结果表明, 采用方波伏安法测定时, 当固定 AR 的浓度为 2.0 × 10⁻⁵ mol/L 时, CS 的浓度在 1.25 × 10⁻⁸ ~ 2.5 × 10⁻⁷ mol/L 时, 峰电流随 CS 的浓度的增加而线性增加, 表现出增敏效应, 其线性回归方程为

$$I(\mu\text{A}) = 123.67 + 4.37c_{\text{CS}}(10^{-8}\text{ mol/L})$$

回归系数 $R = 0.9991$; 而当 CS 的浓度在 2.5 × 10⁻⁷ ~ 1.25 × 10⁻⁵ mol/L 时, 峰电流随 CS 的浓度的增加而线性降低, 表现出减敏效应, 其线性回归方程为

$$I(\mu\text{A}) = 134.41 - 5.64c_{\text{CS}}(10^{-7}\text{ mol/L})$$

回归系数 $R = 0.9917$ 。可见, 减敏效应的线性范围比增敏的线性范围要宽得多。增敏和减敏效应可解释为: 在 pH 4.5 的条件下, CS 分子中大量的 -NH₂ 质子化从而使 CS 分子带有大量的正电荷 (CS 的等电点 $pI = 6.3$), 这一方面可以使 CS 能在负向扫描的电极表面借静电和氢键 (AR-CS) 作用成膜, 另一方面, 带正电的 CS 分子 (膜) 能强烈地与带负电的 AR 分子发生相互作用, 从而使电极表面附近的 AR 分子增多, 这相当于起了富集作用; 而当 CS 的浓度进一步加大时, 由于 CS 的双螺旋结构^[1]趋势的增加和分子间氢键的形成, 会使部分 AR 分子镶嵌到双螺旋结构的内部或被包裹在 CS 聚集体中, 同时电极表面 CS 膜的厚度也会逐渐增加, 从而导致 AR 在电极表面进行电子转移的难度增加, 也即响应电流逐渐下降。因此, 利用这种效

应本文提出了以 AR 为电活性探针对非电活性 CS 进行定量测定的新方法。

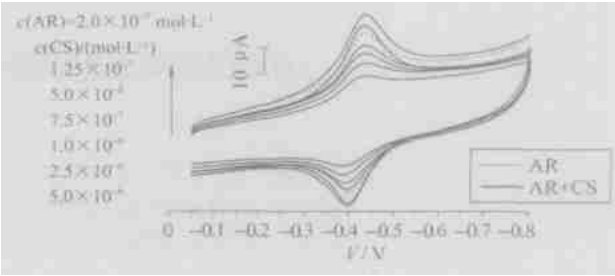


图 2 茜素红及其与壳聚糖的结合物的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of alizarin red and its complex with chitosan
0.1 mol/L HAc-NaAc (pH 4.5); $v=0.05\text{ V/s}$

2.3 实验条件的选择 AR 在酸性 (H₂SO₄, HCl, HAc-NaAc 等) 和中性 (KCl, PBS 等) 介质中都能产生准可逆氧化还原峰, 但以酸性介质的灵敏度为高, 考虑到 CS 是用 HAc 作为溶剂, 故本实验采用 HAc-NaAc 缓冲溶液为支持电解质。实验证明, HAc-NaAc 的总浓度在 0.05 ~ 0.2 mol/L 之间且 pH 4.5 时峰电流基本不变, 故本实验选择 0.1 mol/L HAc-NaAc (pH 4.5) 为支持电解质。实验证明, AR 与 CS 的反应速度很快, 在 2 min 之内达到平衡, 且电流和电位值在 6 h 内基本不变。扫描前的静止时间对峰电流具有重要的影响, 对本体系而言, 静止时间大于 15 s 时, 峰电流基本不变, 因此本实验的扫描前静止时间均选为 10 s。连续 CV 扫描时, AR 和 AR-CS 的峰电流均不同程度的下降, 说明它们的电极反应均具有吸附性。

2.4 分析应用 根据线性减敏效应, 对实际样品进行了测定。中科甲尔胶囊 (南京中科生化技术有限公司) 是近期上市的保健药品, 其中主要成分为壳聚糖 (也叫几丁聚糖), 其他成分还有中药丹参、黄芪和三七等。称取胶囊中的粉末 0.5873 g, 先用 30 mL 乙醇超声浸泡 10 min, 过滤, 不溶物再用 30 mL 二次蒸馏水超声浸泡 10 min, 过滤并用二次水洗涤干净, 剩余的不溶物先用 50 mL $\varphi = 1.0\%$ HAc 超声溶解 10 min, 过滤除去褐色不溶物 (中药残渣), 再用 20 mL $\varphi = 1.0\%$ HAc 洗涤 2 次, 滤液转至 100 mL 容量瓶中并用 $\varphi = 1.0\%$ HAc 定容至刻度, 摇匀, 得到样品储备液。在 10 mL 带刻度的具塞试管中加入 1.0 mL 1 mol/L HAc-NaAc, 0.2 mL 1.0 × 10⁻³ mol/L AR 和不同量的壳聚糖样品液, 然后用二次水稀释至刻度, 摇匀。采用标准加入法定量, 测定结果见表 1。用相同方法测定了另一含壳聚糖的保健品康心胶囊 (江苏江山制药有限公司,

样品粉末称取质量为 0.612 7 g), 结果见表 1, 这与文献 [3] 报道的用荧光猝灭法测定的结果基本一致, 说明本法可靠。

表 1 不同样品中壳聚糖的测定结果
Tab 1 Determination results of chitosan in different samples

样 品	平均含量 ¹⁾ /g	平均百分含量/ %
中科甲尔胶囊	0.3173±0.0032	54.40±0.73
康心胶囊	0.3169±0.0043	38.86±0.78

1) $n=6$

回收率的测定按下列步骤进行: 在 1~6 号 10 mL 带刻度的具塞试管中分别加入 1.0 mL 1 mol/L HAc NaAc, 0.2 mL 1.0×10^{-3} mol/L AR, 再在 1~3 号中分别加入 5.0 mL 样品液, 0.3 mL 1.25×10^{-5} mol/L 标准 CS 溶液, 4~6 号中分别加入 6.0 mL 样品液, 0.4 mL 1.25×10^{-5} mol/L 标准 CS 溶液, 然后用二次水稀释至刻度, 摇匀。测定结果见表 2。回收率在 97.33%~102.00% 之间, 结果满意。

表 2 回收率的测定

Tab 2 Detemination results of recovery

样品号	初始值/mg	加入值/mg	测得总量/mg	回收率/ %
1	1.59	1.50	3.05	97.33
2	1.59	1.50	3.07	98.64
3	1.59	1.50	3.11	101.33
4	1.90	2.00	3.94	102.00
5	1.90	2.00	3.87	98.5
6	1.90	2.00	3.92	101.00

参考文献:

[1] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 8—13.
[2] 谭学才, 翟海云, 李荫, 等. 基于溶胶—凝胶壳聚糖/二氧化硅杂化材料的安培型葡萄糖生物传感器[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(9): 1645—1647.
[3] 高贵珍, 焦庆才, 丁一磊, 等. 茜素红 S 荧光猝灭法测定壳聚糖的含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(5): 895—897.
[4] 朱晓兰, 夏文水. 甲壳素纯度的高压液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(4): 9—12.
[5] 张祖训, 汪尔康. 电化学原理和方法[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 369—389.

Study on the Indirect Determination of Chitosan by Square Wave Voltammetry

TAN Xue cai^{1,2}, LUO Li jun², MAI Zhi bin², QIU Jun ming², CAI Pei xiang²

(1. College of Chemistry and Ecological Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A new method to indirectly determine chitosan (CS) was established by using alizarin red (AR) as an electrochemical activity probe and square wave voltammetry. In 0.1 mol/L HAc NaAc buffer solution (pH 4.5), AR and AR-CS complexis can be easily reduced or oxided on the glass carbon electrode (GCE) and they have a well defined quasi reveisble wave ($V_{pc}=-0.45$ V, $V_{pa}=-0.41$ V) with adsorption characteristics. The increase and decrease of reductive peak current of AR are proportional to CS concentration in the range of $1.25\times 10^{-8}\sim 2.5\times 10^{-7}$ mol/L and $2.5\times 10^{-7}\sim 1.25\times 10^{-5}$ mol/L, respectively. The method has been successfully used for the determination of CS in different samples by standard addition. The recovery was measured to be 97.33%~102.00%.

Key words: chitosan; alizarin red; square wave voltammetry; determination