

Electrochemiluminescence Determination of Levofloxacin Based on $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /Nafion/SWCNTs Composite Film

Zhejian Li, Xuemei Fan, Shumin Wang, Ping Liu, Yimeng Wang, Qian Liu, Xiaofeng Mi

College of Chemical Engineering and Modern Materials, Shangluo University, Shangluo Shaanxi
Email: Zhejian2621@163.com

Received: Apr. 11th, 2018; accepted: Apr. 29th, 2018; published: May 10th, 2018

Abstract

Based on the enhanced effect of levofloxacin on the electrochemical luminescence of ruthenium bipyridyl [$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$], an electrochemiluminescence (ECL) method for the determination of levofloxacin was established. The results showed that the ECL intensity was directly related to the logarithm of levofloxacin concentration in the range of 1.0×10^{-9} mol/L~ 1.0×10^{-3} mol/L, with a detection limit of 3.0×10^{-10} mol/L. With the advantages of simple, sensitive, stable, high recovery rate, this method could be used for rapid detection of levofloxacin injection.

Keywords

Electrochemiluminescence, Carbon Nanotube, Ruthenium Bipyridyl, Levofloxacin

基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /Nafion/SWCNTs 电化学发光传 感器用于左氧氟沙星的检测

李哲建, 樊雪梅, 王书民, 刘萍, 王毅梦, 刘倩, 米晓峰

商洛学院化学工程与现代材料学院, 陕西 商洛
Email: Zhejian2621@163.com

收稿日期: 2018年4月11日; 录用日期: 2018年4月29日; 发布日期: 2018年5月10日

文章引用: 李哲建, 樊雪梅, 王书民, 刘萍, 王毅梦, 刘倩, 米晓峰. 基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /Nafion/SWCNTs 电化学发光传感器用于左氧氟沙星的检测[J]. 分析化学进展, 2018, 8(2): 51-57. DOI: 10.12677/aac.2018.82007

摘要

基于左氧氟沙星对固定于SWCNTs/Nafion复合膜修饰玻碳电极上的吡啶钉弱电化学发光信号有强的增强作用，建立了一种高灵敏检测左氧氟沙星的电化学发光分析方法。实验结果表明，在 1.0×10^{-9} mol/L~ 1.0×10^{-3} mol/L的浓度范围内，电化学发光的强度与其左氧氟沙星的浓度呈良好的线性关系，检出限为 3.0×10^{-10} mol/L。本方法操作简便、灵敏、稳定、回收率高，可用于左氧氟沙星注射液的快速测定。

关键词

电化学发光，碳纳米管，联吡啶钉，左氧氟沙星

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

左氧氟沙星[1] (levofloxacin, LVFX)系第三代喹诺酮类药物，又名氟嗌酸，属广谱抗菌药物，对细菌、支原体及部分厌氧菌有效，左氧氟沙星结构式见图1。服用不当或长期使用，会出现过敏反应、中枢神经反应、精神障碍、血液系统反应等不良反应及致病菌易产生耐药性和某些喹诺酮类潜在致癌性质。目前测定左氧氟沙星的方法有紫外光谱法[2] [3]、荧光光谱法[4] [5]、高效液相色谱法[6] [7]、毛细管电泳法[8] [9]、电化学分析法[10] [11]、电化学发光分析法[12]以及化学发光法[13]等，但这些方法存在操作复杂、灵敏度较低、线性范围窄、操作繁琐等不足。因此，建立一种检测左氧氟沙星的新方法十分必要。

电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)是电化学和化学发光相结合的产物，是指通过对电极施加一定的电压进行电化学反应，在电极表面上产生激发态物质，该产物从激发态回到基态时而产生的一种发光现象。电化学发光分析法灵敏度高、线性范围宽、操作方便、快速等优点[14]。联吡啶钉/Nafion/单壁碳纳米管($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /Nafion/SWCNTs)复合膜，应用于电化学发光的研究中在很短时间内得到了飞速的发展。因为Nafion是一种离子交换型聚合物，具有很高的抗化学侵蚀性质，强的抗氧化性，碳纳米管具有良好的导电性，催化活性和较大的比表面积，这样就能够稳定有效的固定 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，而且可以防止其泄露，因而保持了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电化学发光的持久稳定性，提高了检测的效率。

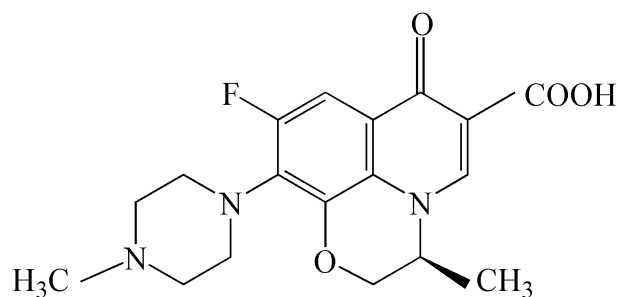


Figure 1. The chemical structure of levofloxacin

图1. 左氧氟沙星的结构式

本文采用 Nafion/SMCNTs 复合膜固定 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的固定方法, 利用 Nafion/MCNT 复合膜固定技术, 实现了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 高效稳定的固定, 成功组装在了修饰电极表面, 制备出了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$ 修饰电极, 利用该修饰电极对左氧氟沙星的电化学发光行为进行了探究。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

左氧氟沙星注射液(0.2 g, 100 mL 四药有限公司); 羧基化单壁碳纳米管(SWNTs, 长: $\sim 30 \mu\text{m}$)购自深圳纳米港公司(中国); 钌联吡啶化合物 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, Nafion (全氟代磺酸脂), 氯金酸和柠檬酸钠购自 Sigma 公司; 三丙正胺(Tri-n-propylamine, 简称 TPrA)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钾、铁氰化钾、亚铁氰化钾均购自国药集团化学试剂有限公司。磷酸盐缓冲溶液(PBS), 用磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制; 其它试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。所有试剂均为分析纯。

电化学发光测量过程用 MPI-E 型电化学发光仪(西安瑞迈电子公司)进行检测。25 mm \times 25 mm 称量瓶用来作为电化学发光的检测池。电极体系为传统的三电极系统, 玻碳电极(直径 2.0 mm)作为工作电极, 铂丝电极作为对电极, 饱和 Ag/AgCl 作为参比电极。检测时光电倍增管(PMT)的高压为 -600 V, 除非另有说明。电化学测量过程使用 CHI 660D 电化学工作站(上海辰华仪器公司, 中国)。pHS-25 型 pH 计购于上海雷磁仪器厂; KQ-100B 型超声波清洗器购于昆山超声仪器有限公司。

2.2. 裸电极预处理

直径 2 mm 的玻碳电极用粒径为 0.3 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 泥浆中打磨抛光, 然后依次用体积比 1:1 的硝酸、无水乙醇和二次蒸馏水超声清洗 2 分钟, 最后用氮气吹干备用。

2.3. SWNTs 的预处理

称取约 100 mg 的 SWNTs, 将 2 M 的浓硝酸 100 mL 置于 500 mL 圆底烧瓶中加热冷凝回流 48 h。然后通过超速离心(9000 rpm)、洗涤、再分散循环预处理三次, 最后在真空干燥箱中干燥。为了使单壁碳纳米管截短和氧化, 将上述处理的单壁碳纳米管在体积比为 1:3 的硝酸和硫酸混合液中超声 2 h, 将纯化的 SWNT 变短。接着用水充分洗涤, 直至滤液呈中性为止。干燥后的单壁碳纳米管进行进一步分散超声分散在 0.4 mL 0.5 wt% 的 Nafion 溶液中, 得到 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的碳纳米管悬浮液。

2.4. 电化学发光传感器的制备

滴加 Nafion/SWCNTs 悬浮液到预先处理好的玻碳电极电极表面, 自然晾干后在滴加 5 μL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 得到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}$ 修饰的玻碳电极, 将该传感器避光保存于 4 $^\circ\text{C}$ 环境下备用。用 0.01 mol/L pH = 7.4 的 PBS 溶液冲洗电极, 去除非特异性吸附的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, 再用循环伏安技术将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$ 电极在 0.9 V~1.4 V 的电位窗口下扫描至稳定, 除去电极表面多余的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, 最终可制得修饰电极 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$ 。图 2 为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$ 修饰电极的制备过程及检测图。

3. 结果与讨论

3.1. 电化学发光传感器的发光稳定性研究

在预先处理好的玻碳电极上滴加 5.0 μL 0.5 mg/mL 的 Nafion/SWCNTs 悬浮液, 室温晾干, 再滴加 5.0 μL $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液, 室温晾干备用, 形成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$ 修饰电极,

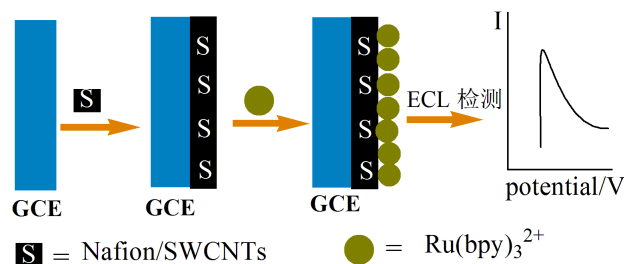


Figure 2. Schematic diagram of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$

图 2. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$ 修饰电极的原理图

即为电化学发光传感器。图 3 为该修饰电极在电化学发光检测仪上连续扫描 10 圈得到的电化学发光曲线图，可以看出连续扫描后电化学发光强度依然保持稳定，结果说明 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}$ 复合膜良好，三联吡啶钌能够稳定的固定在 GCE 电极上。这是由于 Nafion 良好的成膜效应，Nafion 带负电和三联吡啶钌带正电，二者由于静电作用相互吸引，使三联吡啶钌能够稳定的固定在电化学发光传感界面上。

3.2. 可行性讨论

为了证明该试验方法的可行性，采用电化学发光技术进行研究。对比了修饰的玻璃碳电极上存在目标物左氧氟沙星和不存在目标物左氧氟沙星的电化学发光强度。如图 4 所示，为修饰电极与不同浓度的左氧氟沙星反应后检测的电化学发光强度。曲线 a 为不存在左氧氟沙星时，电化学发光强度非常低。曲线 b 为 1.0×10^{-8} mol/L 的左氧氟沙星与修饰电极结合后的电化学发光强度，电化学发光强度增强。当左氧氟沙星浓度继续升高为 1.0×10^{-7} mol/L 时，曲线 c 为 1.0×10^{-7} mol/L 的左氧氟沙星，电化学发光强度也增强(如曲线 c 所示)。这表明随着溶液中左氧氟沙星的浓度增加电极的电化学发光强度显著增强。因此，修饰电极 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$ 可用于检测左氧氟沙星。

3.3. 电化学发光传感器检测左氧氟沙星的性能研究

图 5 为相同的修饰电极在不同浓度左氧氟沙星与其对应的电化学发光强度，此图分析研究了电化学发光传感器与不同浓度左氧氟沙星相互作用情况，在此实验条件下对左氧氟沙星进行了定量检测。由图可以分析出，当左氧氟沙星的浓度不断增大时，电化学发光越强，同时也可以验证出左氧氟沙星对联吡啶钌 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的电化学发光信号有较强的增敏作用。

图 6 为不同浓度的左氧氟沙星与其在修饰电极上电化学发光强度的线性曲线，结果表明随着左氧氟沙星溶液浓度的不断增大，电化学发光强度值也不断增大。以三次平行测量左氧氟沙星所得电化学发光强度的平均值对左氧氟沙星浓度的对数作图在 1.0×10^{-9} mol/L~ 1.0×10^{-3} mol/L 的浓度范围内，电化学发光的强度与其左氧氟沙星的浓度呈良好的线性关系，线性方程为 $I = 1774 \log C + 19092$ ，线性相关系数 $R = 0.9853$ ，检出限($S/N = 3$)为 3.0×10^{-10} mol/L。结果表明，相对于电化学方法[10][11]和化学发光法[13]具有较高的灵敏度和较低的检出限。而且无需加入杂交指示剂，使操作程序大大简化。

3.4. 传感器的重现性和贮存稳定性

通过研究 5 支按相同方法制备的修饰电极与同一浓度(1.0×10^{-5} mol/L)的左氧氟沙星杂交前后电化学发光强度的变化值来考察传感器的重现性，5 支电极测定结果的 RSD 为 5.3%。结果表明，该电化学发光传感器测定左氧氟沙星有良好的重现性。构制的传感器不用时 4°C 下于 PBS 中避光保存。在 20 d 时间内，间断性地考察修饰电极 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Nafion}/\text{SWCNTs}/\text{GCE}$ 传感器对 1.0×10^{-5} mol/L 的左氧氟沙星的响应

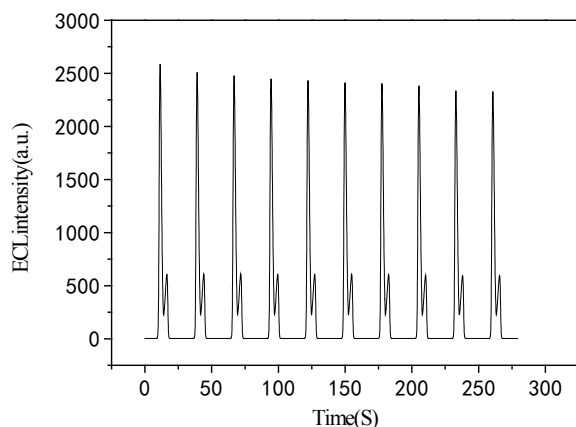


Figure 3. ECL intensity-time curves obtained from continuous potential scanning over 10 cycles in 0.10 M TPA - 0.10 M PBS (pH 7.4) with a scan rate of 50 mV/s at Ru(bpy)₃²⁺/Nafion/SWCNTs/GCE

图 3. 修饰电极 Ru(bpy)₃²⁺/Nafion/SWCNTs/GCE 在 0.10 M TPA - 0.10 M PBS (pH 7.4) 混合溶液中连续扫描 10 圈的电化学发光强度 - 时间曲线图(扫描速率: 50 mV/s)

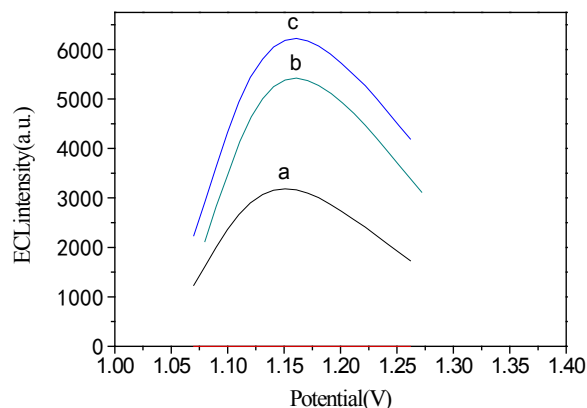


Figure 4. ECL intensity vs potential profiles of the ECL sensor before (line a) and after interaction with 1.0×10^{-8} mol/L levofloxacin (line b) and 1.0×10^{-7} mol/L (line c) levofloxacin. The ECL measurement conditions were the same as in Figure 3

图 4. 电化学发光传感器与浓度 1.0×10^{-8} mol/L (曲线 b) 和 1.0×10^{-7} mol/L (曲线 c) 左氧氟沙星的响应电化学发光强度 - 电压曲线图。电化学发光检测条件与图 3 的相同

情况, 以此考察传感器的贮存稳定性, 实验结果如表 1 所示, 结果显示该传感器具有相对较好的贮存稳定性。

4. 结论

本文将 Ru(bpy)₃²⁺ 固定在 Nafion/SWCNTs 膜修饰的玻碳电极表面, 构建了电化学发光传感器。以左氧氟沙星为目标物质, 以钉联吡啶为信号物质, 发展了一种快速、高灵敏测定左氧氟沙星的电化学发光传感器。由于碳纳米管有较大的比表面积和电催化作用, 固定化的联吡啶钉的氧化还原电流大大增加,

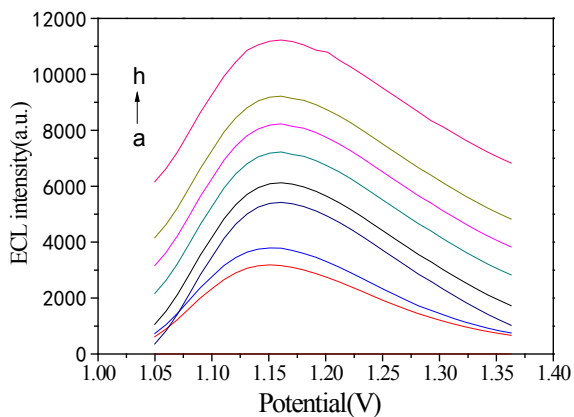


Figure 5. ECL intensity-potential profiles of ECL sensor after interaction with different concentrations of levofloxacin. (a) 0 mol/L, (b) 1.0×10^{-9} mol/L, (c) 1.0×10^{-8} mol/L, (d) 1.0×10^{-7} mol/L, (e) 1.0×10^{-6} mol/L, (f) 1.0×10^{-5} mol/L, (g) 1.0×10^{-4} mol/L, (h) 1.0×10^{-3} mol/L

图 5. 电化学发光传感器与不同浓度左氧氟沙星反应的电化学发光强度 - 电压曲线图。(a) 0 mol/L, (b) 1.0×10^{-9} mol/L, (c) 1.0×10^{-8} mol/L, (d) 1.0×10^{-7} mol/L, (e) 1.0×10^{-6} mol/L, (f) 1.0×10^{-5} mol/L, (g) 1.0×10^{-4} mol/L, (h) 1.0×10^{-3} mol/L

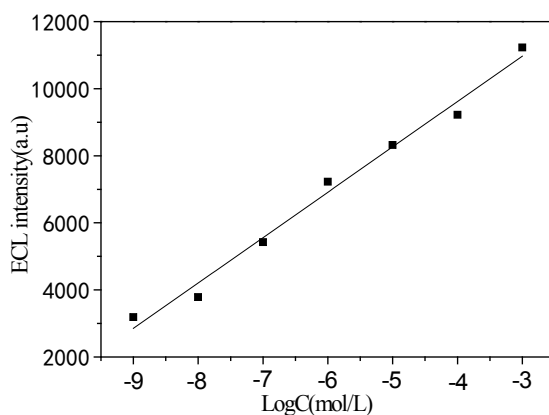


Figure 6. Calibration curve of levofloxacin

图 6. 电化学发光强度与左氧氟沙星浓度间的线性关系

Table 1. Determination results of sensor storage stability

表 1. 传感器贮存稳定性测定结果(n = 3)

时间	当天	7 天	15 天	20 天
与目标物反应后 ECL 强度值	8180	7894	7427	670
传感器贮存前后 ECL 强度下降值百分比		3.5%	9.2%	18%

电化学发光信号也有很大的增强。该传感器具有制作简单, 快速等优点, 该研究工作建立的固定化方法为构建 DNA 杂交传感器、适体传感器的构建和药物的检测提供了新思路。

基金项目

本文系陕西省教育厅项目(16JS028)、商洛市科技局项目(SK2015-37)和商洛学院项目(15sky024)资助。

参考文献

- [1] 谢平, 孙效东, 王睿, 等. 氧氟沙星耐药性的初步研究[J]. 中国药房, 1993, 4(5): 21-22.
- [2] 胡萍. 紫外分光光度法测定左氧氟沙星片的含量[J]. 长江大学学报, 2005, 2(3): 88-89.
- [3] 胡卫平, 王鑫, 董学芝. 刚果红 - 孔雀石绿 - 左氧氟沙星分光光度法测定左氧氟沙星的含量[J]. 分析科学学报, 2012, 28 (2): 257-260.
- [4] 刘波, 吕颖捷, 王金中, 等. 荧光衍生法测定左氧氟沙星的含量[J]. 化学研究, 2004, 15(11): 40-42.
- [5] Shanin, I., Shaimardanov, A. and Thai, N.T.D. (2015) Determination of Fluoroquinolone Antibiotic Levofloxacin in Urine by Fluorescence Polarization Immunoassay. *Journal of Analytical Chemistry*, **70**, 712-717. <https://doi.org/10.1134/S1061934815060167>
- [6] 蔡先菊, 徐笑军, 蔡先念. 高效液相色谱法测定左氧氟沙星片的含量[J]. 药品检测, 2003, 12(7): 33-35.
- [7] 王琦, 黄伟, 梁熙, 等. HPLC 法检测兔胫骨及骨髓中的左氧氟沙星[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(2): 146-150.
- [8] 贾丽, 张君倩. 氧氟沙星片剂与针剂中有效成分的毛细管区带电泳快速测定[J]. 分析测试学报, 2000, 19(6): 78-80.
- [9] 林伟丰, 康信煌, 陈缙光, 等. 毛细管电泳法测定氧氟沙星及左氧氟沙星在其制剂中的含量[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(12): 756-758.
- [10] 李建成, 周武杰, 关艳娟. Gran 电位滴定法测定三种剂型盐酸左氧氟沙星[J]. 疾病监测与控制杂志, 2010, 4(9): 540-541.
- [11] 滕怀凤, 佟晓波, 李尚颖. 高效毛细管电泳法拆分氧氟沙星对映体及其分析[J]. 中国药师, 2014, 17(7): 1102-1106.
- [12] 刘二保, 卫洪清, 韩素琴, 等. 化学发光法测定左氧氟沙星[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(4): 399-401.
- [13] 王芬, 白亮. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 体系电化学发光法测定盐酸左氧氟沙星[J]. 分析科学学报, 2014, 30(2): 291-293.
- [14] 罗峰, 林志杰, 陈曦. 电致化学发光研究的新材料和新方法[J]. 化学进展, 2011, 23(12): 2588-2597.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2163-1557, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: aac@hanspub.org