

甲酸钠增敏鲁米诺化学发光机理研究及应用

唐俊¹, 王滔^{1,2}, 刘二保^{1,2*}

1. 天津师范大学水环境与水资源实验室, 天津 300387
2. 山西师范大学分析测试中心, 山西 临汾 041004

摘要 在表面活性剂十二烷基苯磺酸钠(SDBS)存在下, 传统意义上的自由基清除剂甲酸钠反而对铬酸钾-鲁米诺-腺嘌呤化学发光体系表现出了很好的化学发光增敏效果, 文章通过化学发光发射光谱, 紫外可见光谱及化学反应等手段探讨了这一化学发光体系的增敏机理, 结果表明: 化学发光体系的增敏是由于反应体系中甲酸钠的存在使原有发光体系中的羟基自由基(OH·)转化为氧自由基(O₂·)所致。以此为基础建立了流动注射化学发光法测定腺嘌呤的高灵敏方法, 腺嘌呤在 $2.45 \times 10^{-11} \sim 8.18 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内成良好的线性关系($R^2 = 0.9993$), 检出限为 $8.72 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该法已成功用于测定维生素 B₁ 药品中的腺嘌呤的含量, 结果令人满意。

关键词 流动注射(FI); 化学发光(CL); 机理; 甲酸钠; 维生素 B₁

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)11-2901-03

引言

近年来, 化学发光法在不同领域得到了广泛的研究和应用^[1-3]。鲁米诺体系的化学发光机理研究对提高该体系的化学发光效率及建立高灵敏度检测方法具有重要意义^[4]。一般认为 OH· 自由基清除剂对该体系具有猝灭效果, 本文研究表明: 在十二烷基苯磺酸钠(SDBS)存在下, 由于 OH· 自由基氧化为 O₂· 自由基反而使化学发光效率大大增强, 并以此为基础建立了腺嘌呤的高灵敏检测方法。维生素 B₁ 是腺嘌呤的磷酸盐, 用于防治各种原因引起的白细胞减少症、急性粒细胞减少症。文献报道的有关腺嘌呤检测方法有: 毛细管电泳法^[5, 6], 电化学法^[7, 8], 高效液相色谱法^[9-11]等。化学发光法具有灵敏度高、仪器简单、线性范围宽等优点^[12]。本法用于维生素 B₁ 测定, 无须样品预处理, 测定含量精确、回收率高, 可应用于临床诊断和医药质量控制。

1 实验部分

1.1 仪器和过程

图1是发光体系使用的流动注射示意图, 超弱发光分析仪(IFFM-D, 西安瑞迈电子仪器有限公司), 流动系统使用聚

四氟乙烯(PTFE)管(0.8 mm i. d.), 六通阀的样品回路是 78 mL, 样品通过六通阀注射进载液中, 鲁米诺、氢氧化钠及重铬酸钾的混物流过第一个 Y 型元件汇成一股流路, 接着在位于流动室入口正前方的第二个 Y 型元件里与样品混合, 流动室是直径 35 mm 扭转 5 次的螺旋形的玻璃管(1.3 mm i. d.), 它位于光电倍增管(PMT)检测窗的正前方。光电倍增管把发光信号转化成电信号, 光度计反馈信号产率, 通过特别的软件由电脑记录最终结果。

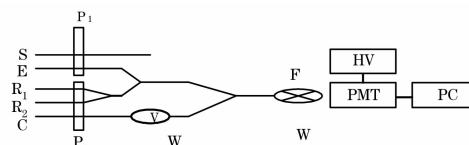


Fig. 1 Schematic diagram of the flow injection chemiluminescence

S: SDS+sample solution; E: Sodium formate; C: Carrier stream; R₁: Luminol+NaOH mixture; R₂: K₂Cr₂O₇; P: Peristaltic pump; V: Six-way injection valve; F: Flow cell; W: Waste solution

WZF-2A UV-Vis 型分光光度计(天津光学仪器厂)绘制吸收光谱, 滤光片(CC143-13, 北京滨松光子技术有限公司)插在流动室和光电倍增管中间, 使用滤光片得到化学发光发射光谱。

收稿日期: 2008-10-16, 修订日期: 2009-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(20671071), 天津市自然科学基金项目(08JCYBJC02800)资助

作者简介: 唐俊, 女, 1984年生, 天津师范大学水环境与水资源实验室硕士 e-mail: tangjun0414@126.com

* 通讯联系人 e-mail: liueb123@163.com

1.2 试剂

重铬酸钾; 十二烷基苯磺酸钠; 甲酸钠; 氢氧化钠; 鲁米诺(陕西师范大学化学系合成)(称取鲁米诺 1.325 8 g, 用 1 mL 浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶解, 于 250 mL 棕色容量瓶里定容, 配制成 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲁米诺储备液, 置于 4°C 的冰箱中保存); 腺嘌呤(北京生物生命科技有限公司)(精密称取腺嘌呤 0.006 8 g 于少量浓盐酸中加热使其完全溶解, 移至 50 mL 棕色容量瓶中, 加超纯水定容, 配成 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的腺嘌呤储备液, 置于 4°C 的冰箱中保存); 维生素 B_1 片(天津力生制药股份有限公司)。所有试剂均为分析纯。水为 Milli-Q 水。

2 结果和讨论

2.1 实验条件的优化

高锰酸、高碘酸盐、铁氧化物、重铬酸盐和过氧化氢等氧化物, 在碱性介质中, Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 发光体系光信号最好, 重铬酸钾的最佳浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 氢氧化钠浓度在 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 $7.2 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内随着鲁米诺浓度的升高化学发光强度提高, 鲁米诺浓度在 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时发光强度达到最大, 再增高鲁米诺浓度, 发光强度几乎不变, 鲁米诺浓度选 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表面活性剂能提高化学发光的产率^[13, 14]及测定的灵敏性, 典型的表面活性剂有非离子表面活性剂吐温 80、阳离子表面活性剂 CTMAB 和 CTAB、阴离子表面活性剂 SDBS 和 SDS。实验表明, SDBS 是 Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -腺嘌呤体系最适宜的增敏剂, 加入 SDBS 发光强度能提高 50 倍, SDBS 浓度为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的效果最好。

甲酸钠对 Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -SDBS 腺嘌呤体系的化学发光具有很好的增敏效果, $1.91 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸钠发光信号最强, 甲酸钠浓度高于或低于 $1.91 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 反应的灵敏度都急剧降低。

流速为 $1.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 光信号的灵敏性和重现性最佳。

2.2 反应动力学

重铬酸钾分别氧化 Luminol 或 Luminol-甲酸钠都只是产生微弱化学发光(图 2a, b), 而当体系中加入用 SDBS($2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶解的腺嘌呤($2.96 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时发光强度极大增强(图 2c, d), 且甲酸钠存在的体系具有最佳的发光效率, 动力学曲线表明发光反应属快速型。

2.3 增敏机理探讨

图 3 所示的不同体系的化学发光光谱表明, 化学发光的最大发射波长均在 425 nm 处, 可以认为发光体是鲁米诺的氧化产物 3-氨基邻苯二甲酸(3-AP)。

图 4 是不同体系的紫外可见光谱, 由图可见: Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -SDBS-sodium formate-Adenine 及 Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -SDBS-adenine 都有相似的光谱, 没有新的发光体产生, SDBS 或 SDBS+甲酸钠二者在反应中所起的作用仅仅是增敏剂而已。

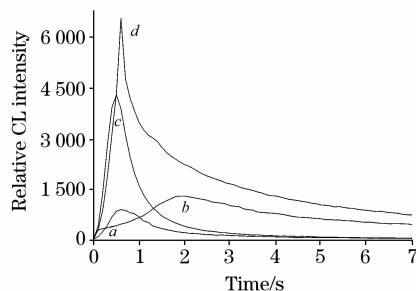


Fig. 2 Kinetic curve

a: Luminol+ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; b: a+sodium formate; c: a+SDS+adenine; d: c+sodium formate; Luminol: $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; NaOH: $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; SDBS: $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Adenine: $2.96 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Sodium formate: $1.91 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

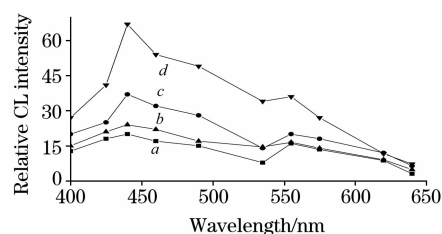


Fig. 3 Emission spectra

a: Luminol+ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ +SDBS; b: a+sodium formate; c: a+adenine; d: b+adenine; Other conditions as same as Fig. 2

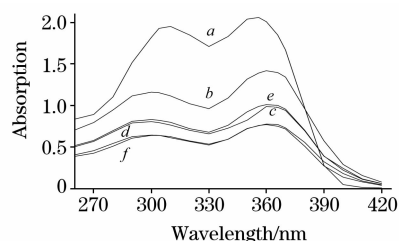


Fig. 4 UV-Visible absorption spectra

a: Luminol+NaOH; b: a+ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; c: b+SDBS; d: c+sodium formate; e: c+adenine; f: d+adenine; Other conditions as same as Fig. 2

为了验证自由基是否参与了发光反应, 在 Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -SDBS-sodium formate-adenine 及 Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -SDBS-adenine 两种发光体系中分别加入自由基清除剂硫脲、抗坏血酸和 D-甘露醇, 结果是: OH^\cdot 自由基清除剂硫脲没有猝灭现象; O_2^\cdot 自由基清除剂 D-甘露醇可产生强烈的猝灭效应, 而广谱自由基清除剂抗坏血酸则可使化学发光完全猝灭, 很明显不仅自由基参与了化学发光反应, 而且 O_2^\cdot 自由基起到了主要作用。

综上所述, 在水溶液中 SDBS 分子形成胶束, 能促进更好的紧密接触并为激发单态提供保护, 使化学发光量子产率显著提高; 甲酸盐的存在使发光强度大大加强, 可以认为: 在 SDBS 胶束的特殊环境中, 作为 OH^\cdot 自由基清除剂的

甲酸根, 在清除 OH^\cdot 自由基反应的过程中与 O_2 反应形成 O_2^\cdot 自由基, O_2^\cdot 自由基的产生使化学发光效率大大提高, 不难想象 Luminol- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -SDBS-sodium formate-adenine 体系最强的发射光得益于 SDBS 与甲酸根共存, 而发光体仍然是鲁米诺的氧化产物 3-氨基邻苯二甲酸(3-AP)。

2.4 标准曲线、精密度、检出限

在优化条件下腺嘌呤在 $2.45 \times 10^{-11} \sim 8.18 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内化学发光强度与浓度呈线性关系, 标准曲线为 $\Delta I = 13.416 \times 10^{-8} c + 387.08$ $R^2 = 0.9993$ ($n = 5$)。对 $1.81 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 腺嘌呤连续 11 次平行测定的标准偏差 (R. S. D. %) 是 1.84%, 检出限为 $8.72 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 样品分析

维生素 B_1 (VB_1), 又名磷酸腺嘌呤。取两片 ($10 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$) 维生素 B_1 片研细, 称取 10 mg 溶于 20 mL 水中, 搅拌

使其溶解, 放于 4°C 的冰箱中静置 24 h 并过滤, 移至 50 mL 棕色容量瓶中定容, 配成待测样品溶液, 置于 4°C 的冰箱中保存。

在上述最佳实验条件下, 维生素药片平行测定 5 次, 测定含量为 $9.8 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$, 与药片的标示含量 ($10 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$) 一致, 回收率为 99.02%~101.33%。

2.6 干扰实验

按照实验方法, 研究了样品中可能的共存物对腺嘌呤测定的影响。在相对偏差小于 5% 的情况下, 对于体系中 $2.92 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的腺嘌呤, 1 000 倍的 NaCl 、 NaHCO_3 、尿素、100 倍的 CaSO_4 、 MgCl_2 、赖氨酸、50 倍的谷氨酸、10 倍的 MnCl_2 、 FeCl_3 、以及 2 倍的亮氨酸对测定腺嘌呤无干扰; 200 倍的肌酐、肌酸和 1 000 倍的葡萄糖产生正性干扰。

参 考 文 献

- [1] Wu Y F, Zhuang Y F, Liu S Q, et al. *Anal. Chimica Acta*, 2008, 630: 186.
- [2] Pérez J F H, Campana A M G. *Anal. Chimica Acta*, 2008, 630: 194.
- [3] Bezzi S, Loupassaki S, Petrakis C, et al. *Talanta*, 2008, 77: 642.
- [4] Xue B C, Wang T, Liu E B. *Journal of Anal. Chem.*, 2008, 63: 1181.
- [5] Wessel T, Lanvers C, Fruend S, et al. *J. Chromatogr. A*, 2000, 894: 157.
- [6] Wang W P, Zhou L, Wang S, et al. *Talanta*, 2008, 74: 1050.
- [7] Wang H S, Ju H X, Chen H Y. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 461: 243.
- [8] Alvarez J L M, Calzón J A G, Fonseca J M L. *J. Electroanal. Chem.*, 1998, 457: 53.
- [9] Moral P G, Arín M J, Resines J A, et al. *J. Chromatogr. B*, 2005, 826: 257.
- [10] Olesen K M, Hansen S! H, Sidenius U, et al. *J. Chromatogr. B*, 2008, 864: 149.
- [11] Pellegrino S, Bruno F S, Petrarulo M. *J. Chromatogr. B*, 1999, 729: 103.
- [12] WANG Tao, XUE Bing-chun, LIU Er-bao(王滔, 薛冰纯, 刘二保). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2008, 28(5): 1026.
- [13] Zhang S C, Ju H X. *Anal. Chimica Acta*, 2003, 475: 163.
- [14] Paleologos E K, Vlessidis A G, Karayannis M I, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2003, 477: 223.

Study on the Mechanism of Sodium Formate Enhancing Luminol Chemiluminescence and Its Application in Micellar Medium

TANG Jun¹, WANG Tao^{1,2}, LIU Er-bao^{1,2*}

1. Water Environment and Water Resources Laboratory, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

2. Analytical and Testing Centre, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China

Abstract In the presence of sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS) surfactant micelles, the signal of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -luminol-adenine chemiluminescence system was strongly enhanced by sodium formate, which is conventionally considered as free radical scavenger. The present article discussed the sensitizing mechanism of chemiluminescence through the methods of chemiluminescence emission spectra, UV-visible absorption spectra, and chemical reactions. The result indicated that free radical OH^\cdot , which existed in the original chemiluminescence system, was transformed into free radical O_2^\cdot by the existence of sodium formate. Based on that, a highly sensitive flow injection-chemiluminescence method to determine adenine was established. Under optimal experimental conditions, the concentration of adenine was linear with the chemiluminescence intensity in the range of 8.18×10^{-9} to $2.45 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The limit of detection (3σ) was $8.72 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The method has been successfully applied to the analysis of adenine in VB_1 pills and the results are satisfactory.

Keywords Flow-injection; Chemiluminescence; Mechanism; Vitamine B_1 ; Sodium formate

* Corresponding author

(Received Oct. 16, 2008; accepted Jan. 18, 2009)