

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是我在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

作者签名：刘海燕 日期：2006.5.11

## 学位论文授权使用声明

本人完全了解华东师范大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅。有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

学位论文作者签名：刘海燕

导师签名：方海之

日期：2006.5.11

日期：2006.5.11

# 流动注射-化学发光法在药物分析及农药残留分析中的应用研究

## 中文摘要

化学发光法被认为具有高灵敏度、线性范围宽、分析快速和仪器设备简单等优点,近年来在无机物、生物活性物质、有机痕量和超痕量分析领域都得到了广泛应用。由于化学发光过程无需光源,因此化学发光法的背景发射比荧光法低得多。任何能影响化学发光反应,引起发光强度、速度和波长发生改变的物质都能成为化学发光法的分析对象。本文在系统评述化学发光分析法的发展历史、基本原理、主要反应体系及其与流动注射、电化学、印迹分子、高效液相色谱、毛细管电泳等联用技术的原理及应用的基础上,介绍了我们在化学发光与流动注射联用技术应用方面的一些研究工作,并重点介绍了基于碱性鲁米诺、N-溴代丁二酰亚胺、酸性 Ce(IV)-NaSO<sub>3</sub>、KMnO<sub>4</sub>-HCHO、KMnO<sub>4</sub>-Rh 6G 等五种化学发光体系,采用流动注射-化学发光分析方法,对几种药物及农药残留分析测定的研究,对可能的化学发光反应机理,采用试验数据及文献资料进行了初步探讨。本论文主要研究内容如下:

1. 在碱性溶液中,盐酸多巴酚丁胺与鲁米诺反应能够产生微弱的化学发光,铁氰化钾/亚铁氰化钾对该发光反应具有明显的增强作用。基于此,建立了一种新的测定盐酸多巴酚丁胺的流动注射化学发光方法。考察了各种影响因素,确立了反应的最佳条件。在优化条件下,盐酸多巴酚丁胺在  $1.0 \times 10^{-10} \text{ g mL}^{-1}$  到  $1.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$  范围内与相对化学发光强度有良好的线性关系,检测限为:  $2.6 \times 10^{-11} \text{ g mL}^{-1} (3\sigma)$ 。对含量为  $1.0 \times 10^{-8} \text{ g mL}^{-1}$  的标准溶液平行测定 11 次,相对标准偏差为 1.23%。该法已成功用于注射液中盐酸多巴酚丁胺含量测定,结果与药典方法测定值吻合。利用文献资料及实验结果,对化学发光反应机理做了初步探讨。

2. 基于美洛昔康与 N-溴代丁二酰亚胺在碱性介质中的反应,首次提出一种

快速灵敏的流动注射化学发光测定方法。在优化条件下, 在  $2.2 \times 10^{-7} \sim 2.8 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内美洛昔康浓度的对数值与相对化学发光强度的对数值有良好的线性关系, 检测限为  $7.7 \times 10^{-8}$  mol/L ( $3\sigma$ ), 对浓度为  $2.8 \times 10^{-6}$  mol/L 的美洛昔康标准溶液平行测定 11 次, 相对标准偏差为: 2.14%。该法用于美洛昔康药片含量测定, 结果与药典法吻合, 并利用光谱数据对发光机理进行了初步探讨。

3. 基于酒石酸美托洛尔对酸性条件下 Ce(IV) 和  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  微弱化学发光反应的增敏作用, 建立了一种简单、快速、灵敏的测定酒石酸美托洛尔的流动注射-化学发光方法, 优化了各种影响化学发光信号的实验条件, 在优化条件下, 相对化学发光强度与酒石酸美托洛尔的浓度在  $1.5 \times 10^{-8} \sim 7.3 \times 10^{-6}$  mol/L 范围内呈现良好的线性关系。根据 IUPAC 规定, 以空白值的标准偏差的 3 倍为标准, 计算方法的检测限为  $4.7 \times 10^{-9}$  mol/L, 对含量为  $7.3 \times 10^{-7}$  mol/L 的标准溶液平行测定 11 次, 相对标准偏差为 2.20 %。将该法用于酒石酸美托洛尔片及尿样中的含量测定, 将测定结果与药典规定的标准方法进行比较, 同时进行标准加入回收试验, 结果令人满意。

4. 基于磺胺嘧啶对酸性条件下  $\text{KMnO}_4$ -HCHO 化学发光反应的增敏及催化作用, 建立了一种选择性测定复方滴鼻液中磺胺嘧啶的流动注射-化学发光分析方法。对影响发光的各种因素进行了实验优化, 在所选择的实验条件下, 磺胺嘧啶的浓度与化学发光强度在  $8.0 \times 10^{-7}$  到  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 范围内有良好的线性关系, 检测限为:  $2.0 \times 10^{-7}$  mol/L ( $3\sigma$ )。对  $5.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的磺胺嘧啶标准溶液平行测定 11 次, 测量的相对标准偏差为 2.53%。本法用于处方药复方滴鼻液中磺胺嘧啶的测定, 结果令人满意。

5. 基于速灭威的碱性降解产物在罗丹明 6G 存在下, 硝酸酸性介质中, 与  $\text{KMnO}_4$  的化学发光反应, 建立了一种用于测定速灭威的简单、快速、灵敏的流动注射-化学发光方法。对影响发光的各种因素进行了实验优化, 在优化条件下, 相对化学发光强度与速灭威的浓度在  $2.0 \times 10^{-9}$  到  $2.0 \times 10^{-7}$  g/mL 范围内有良好的线性关系, 方法的检测限是:  $6.6 \times 10^{-10}$  g/mL ( $3\sigma$ ), 为了验证方法的精密度, 对  $2.0 \times 10^{-8}$  g/mL 的速灭威平行测定 11 次得到日内测定的相对标准偏差为 2.28%; 每天测定 5 次, 连续测定 5 天得到日间测定的相对标准偏差为 4.85%。本法已用于蔬菜样品中速灭威的残留量测定, 回收率结果令人满意。并利用所建立的方法, 对不同的放置时间及清洗步骤对速灭威残留量的影响进行了比较。

关键词：流动注射；化学发光；盐酸多巴酚丁胺；美洛昔康；酒石酸美托洛尔；  
磺胺嘧啶；速灭威；杀虫剂残留；机理研究

## Study on Analysis of Pharmaceutical and pesticide residue using Flow injection-Chemiluminescence

### Abstract

Chemiluminescence analysis (CL) can provide a high versatility in the determination of a wide variety of organic or inorganic substances, biological substances that exhibit bioactivities even at extremely low concentrations along with high sensitivity, wide linear range, rapidity, simplicity, which require only simple and low-cost-measuring devices. The noise from CL is much less than fluorescence method, because its excitation doesn't need any light source. A substance, which can affect CL reaction including the change of intensity, rate, wavelength, can be determined by CL method. It is introduced in this article the history of CL development, essential principle, most reaction system, some coupling techniques with CL, including flow-injection analysis, electrochemistry, molecularly imprinted polymer, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, and our research work on the application of FI-CL, with an emphasis on the determination of some pharmaceuticals and the residue of pesticide based on alkaline luminal CL system, NBS CL system, acidic Ce(IV)-NaSO<sub>3</sub> CL system, KMnO<sub>4</sub>-HCHO CL system, KMnO<sub>4</sub>-Rh 6G CL system, using a FI-CL method. The possible mechanisms of some CL reactions were preliminarily discussed using experiment and references. The main content of this article is as follows:

1. It was found that the weak chemiluminescence produced from the reaction of dobutamine hydrochloride with luminol in alkaline solution could be strongly enhanced by potassium ferricyanide and potassium ferrocyanide. Based on this found, a new flow injection chemiluminescence method is proposed for the determination of dobutamine hydrochloride. Under the optimum conditions, the proposed method has a linear range of  $1.0 \times 10^{-10}$  g ml<sup>-1</sup> to  $1.0 \times 10^{-7}$  g ml<sup>-1</sup>, with a detection limit of  $2.6 \times 10^{-11}$  g ml<sup>-1</sup> for dobutamine hydrochloride ( $3 \sigma$ ). A complete analysis could be performed in 40 s including washing and sampling, giving a throughput of about 90 h<sup>-1</sup>. The relative standard deviation (RSD) for 11 parallel measurements of  $1.0 \times 10^{-8}$  g ml<sup>-1</sup> dobutamine is 1.23%. The proposed method has been applied for the

determination of dobutamine hydrochloride in its pharmaceutical formulations. The results obtained compared well with those by an official method. The possible mechanism of this chemiluminescence reaction was also proposed.

2. A rapid and sensitive flow injection - chemiluminescence (FI-CL) method is described for the determination of meloxicam based on its reaction with N-bromosuccinimide in alkaline medium. Under the optimum conditions, the proposed method allows the measurement of meloxicam over the range of  $2.2 \times 10^{-7}$  mol/l to  $2.8 \times 10^{-5}$  mol/l with a detection limit of  $7.7 \times 10^{-8}$  mol/l ( $3\sigma$ ). The relative standard deviation for 11 parallel measurements of  $2.8 \times 10^{-6}$  mol/l meloxicam is 2.14%. The method was applied satisfactorily to the determination of meloxicam in pharmaceutical preparations. The results agreed well with those obtained by spectrophotometry. The mechanism of the chemiluminescence reaction was briefly explained with spectroscopic evidence.

3. In this paper, a simple, rapid and sensitive flow-injection chemiluminescence method has been developed for the determination of metoprolol tartrate, which acts as a kind of sensitizer in the chemiluminescence emission from the redox of  $\text{SO}_3^{2-}$  with Ce(IV) in acidic medium. Under the optimized conditions, the proposed method allows the measurement of metoprolol tartrate over the range of  $1.5 \times 10^{-8}$  to  $7.3 \times 10^{-6}$  mol/L with a detection limit of  $4.7 \times 10^{-9}$  mol/L ( $3\sigma$ ), and the relative standard deviation for  $7.3 \times 10^{-7}$  mol/L metoprolol tartrate ( $n = 11$ ) is 2.20%. The utility of this method was demonstrated by determining metoprolol tartrate in tablets and human urine sample.

4. A sensitive flow injection-chemiluminescence method was developed based on the enhancement and catalysis of sulfadiazine on acidic  $\text{KMnO}_4$ -HCHO chemiluminescence reaction, which was applied to selectively determine sulfadiazine in compound naristillae. The conditions that influence the chemiluminescence signal were optimized. Under the optimized conditions, the proposed method allows the measurement of sulfadiazine over the range of  $8.0 \times 10^{-7}$  to  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L with a detection limit of  $2.0 \times 10^{-7}$  mol/L ( $3\sigma$ ), and the relative standard deviation for  $5.0 \times 10^{-5}$  mol/L sulfadiazine ( $n = 11$ ) is 2.53%. The proposed method was successfully applied to determine the content of sulfadiazine in compound naristillae.

5. A sensitive, simple and rapid flow-injection chemiluminescence (CL) method is described to determine tsumacide pesticide residue based on the CL reaction of the

alkaline degradation product of tsumacide with acidic  $\text{KMnO}_4$  when rhodamine 6G was present. Under the optimum conditions, the relative CL intensity is linear with the concentration of tsumacide in the range of  $2.0 \times 10^{-9}$  to  $2.0 \times 10^{-7}$  g/mL. The detection limit is  $6.6 \times 10^{-10}$  g/mL ( $3\sigma$ ) and the relative standard deviation for  $2.0 \times 10^{-8}$  g/mL of tsumacide solution was 2.28% (intra-day) and 4.85% (inter-day). The proposed method has been applied to determine the residue of tsumacide in vegetable sample, and the recovery test is very satisfactory.

**Key words:** Flow-injection analysis; Chemiluminescence; dobutamine hydrochloride; meloxicam; metoprolol tartrate; sulfadiazine; tsumacide; pesticide residue; mechanism study

# 第一章 绪论

## 1. 化学发光的发展历史及特点

发光是分子从激发态回到基态时释放出光子的一种现象。这一发光根据激发能的不同可以分为多种类型，如：光致发光（荧光或磷光，光激发），电致发光（电激发），热致发光（热能激发），摩擦发光（摩擦作为激发能），结晶发光（结晶能作为激发能），化学发光和生物发光（化学反应能作为激发能）。

化学发光和生物发光是在没有光、电、磁、声、热源激发的情况下，由化学反应或生物化学反应产生的一种光辐射。吸收化学反应所释放的化学能而处于电子激发态的反应中间体或反应产物，一种形式是直接回到基态而产生光辐射称为直接化学发光，另一种形式是将能量转移给其他的分子而产生发光，称为间接或者增敏化学发光。如果在化学发光的反应过程中，有酶参与催化或者发生在生物体内，这种发光就被称为生物发光。由于生物发光也经历了化学反应，因此，人们通常也把生物发光纳入化学发光的范畴。

生物发光和化学发光是自然界中一种普遍的现象。至今人们已经知道能发光的生物，种类繁多，从低等的细菌到高等的发光鱼类，从植物幼苗、植物枝叶到人体表面经络穴位、脑、肝、血清等，其发光的主要物质几乎都是由荧光素酶、荧光素及其辅助因子所组成。15 世纪，德国医生 Brand 发现某种“白色磷光体”能在黑暗中持续发光，此现象被广泛地关注。1885 年，法国生理学家 Dubois 在实验室里提取了萤火虫的荧光素和荧光素酶，指出萤火虫的发光是一种化学反应，把发光现象归属于一种相对简单的有机反应。1877 年，Radziszewski [1]发现了洛酚碱(2, 4, 5-三苯基咪唑)在碱性介质中被过氧化氢等试剂氧化而发出绿色的光。1928 年，Albrecht [2]观察到鲁米诺(3-氨基邻苯二甲酰肼)在碱性介质中的化学发光行为。1935 年，Gleu 和 Petsch [3]报道了光泽精(N, N-二甲基吡啶硝酸盐)与过氧化氢反应产生化学发光。然而，大多数化学发光非常微弱，且存在寿命很短，因此化学发光的研究发展缓慢。直到二十世纪 60 年代，随着电子技术的迅速发展，集成电路的广泛使用，高灵敏度光电倍增管的出现，化学发



光反应才逐渐应用于分析化学。到八十年代,随着分析仪器的的发展,化学发光新体系的发现,化学发光开始广泛地应用于化学分析、环境科学、生命科学和医学等领域[4-12]。特别是在某些关键技术,如生物传感器[13]、基因序列分析[14],活体细胞 ATP [15,16]的测定等方面取得的一系列重大突破,使化学发光的应用范围进一步扩大,几乎涵盖了现代科学的各个领域。

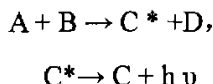
根据化学发光反应产生的光辐射强度或发光总量来确定反应中相应组分含量的分析方法称为化学发光分析法。其突出优点是不需要任何外来光源,避免了瑞利散射和拉曼散射等噪音,没有空白,因而光电倍增管在高压下工作时具有比荧光法更高的信噪比。化学发光分析法由于具有很高的灵敏度,很宽的线性范围,同时仪器设备又很简单、廉价、易微型化,在二十世纪的最后十年发展非常迅速。化学发光和生物发光分析法在无机物、有机痕量和超痕量分析领域内都得到了广泛应用。特别是近年来,化学发光和生物发光在多类复杂有机物质,如氨基酸、蛋白质、维生素、核酸、DNA、激素、生物碱及各类药物及毒物的检测,多种生物活性物质的分析,多种抗体和抗原的免疫分析,基因芯片、蛋白质芯片、受体芯片、酶芯片、微流控芯片研究中得到了广泛地应用,而且呈现出上升趋势。为生命科学、环境科学、材料科学的研究提供了许多新的、高灵敏度的、有效的分析手段,推动了这方面科学理论和高新技术的发展;同时,其他相关学科的研究成果也为化学发光和生物发光提供了许多新的技术和手段,出现了许多新的化学发光和生物发光法,如纳米发光、发光成像、发光活体分析,大大促进了化学发光和生物发光的发展及应用。将化学发光与流动注射、微透析、毛细管电泳、传感器技术和芯片技术等结合起来可以建立很多高灵敏度的、微型化的和高度自动化的分析方法和仪器。有关化学发光和生物发光分析的文献和综述已有很多报道[17-47],本文将仅从化学发光的基本原理、主要发光体系、化学发光与其他技术的联用及其在药物和农药残留分析中的应用等作一总结评述。

## 2. 化学发光的基本原理

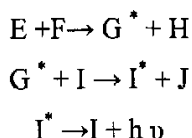
化学发光是指在没有任何光、电、热的作用下,只是靠吸收化学反应放出的化学能而激发产生光的辐射而进行的发光形式。

最简单的化学发光反应是由两个关键步骤组成:激发和发射。

化学发光反应可以简单的分为两种类型，两种物质 A 和 B 经化学反应生成一种激发态产物  $C^*$ ，当  $C^*$  返回到基态时，以光子形式释放能量，产生发光现象。基本反应式：



另一种类型是能量转移化学发光，它主要由三个步骤组成。首先，物质 E 和 F 通过反应形成一种激发态中间体  $G^*$ ，接着  $G^*$  迅速将能量转移给另一能量接受体 I，I 接受能量跃迁到激发态，形成激发态的  $I^*$ ， $I^*$  返回基态，产生化学发光。基本反应式：



化学发光反应的必须条件概括起来有以下几方面：

(1) 化学反应必须释放出足够的能量，使发光体处于激发态。

根据经典的光化学理论，由于化学发光不包含热和电功，化学发光反应的自由能变化与发光波长的关系可用如下公式表示： $-\Delta G > h c / \lambda_{ex}$

其中  $h$  是普朗克常数，其数值为  $6.626 \times 10^{-34}$  焦耳·秒。 $c$  为光速，其数值为  $2.998 \times 10^8$  米/秒。 $\lambda_{ex}$  是激发态分子发射的最大波长。

由该公式可知，对于 1 mol 反应生成物质而言

$$\begin{aligned} -\Delta G &\geq h c / \lambda_{ex} \\ &= 0.1195 / \lambda_{ex} \text{ 焦耳} \cdot \text{米} \end{aligned}$$

由上式可知，400 nm - 700 nm 的可见光发射所需要的自由能变  $\Delta G$  的数值应在 171-299 千焦/摩尔之间。而氧化还原反应所提供的能量介于其中，所以大多数的化学发光反应为氧化还原反应。

(2) 反应历程应有利于激发态产物的形成而不至于将能量转化为热能。

(3) 激发态产物必须能辐射光或将能量传给另一种发光体而使此发光体被激发。

(4) 由于化学激发的瞬时性，激发能必须由某一步骤单独提供，否则，前一步反应所释放的能量将会因分子振动而被消耗掉。

由于化学发光反应经历两个过程：激发和发射。反应物质在激发过程中生成激发态的产率  $\Phi_{CE}$  定义为：生成激发态的分子数与参加反应的分子数之比。发射

过程的产率  $\Phi_{EM}$  定义为：发光分子数与生成激发态的分子数之比。而化学发光反应的效率  $\Phi_{CL}$  定义为，发光分子数与参加反应的分子数之比。即  $\Phi_{CL} = \Phi_{CE} \Phi_{EM}$ 。

化学发光反应的发光强度  $I_{CL}$  与化学发光反应的效率  $\Phi_{CL}$  及反应物浓度  $C$  有下面关系：

$$I_{CL}(t) = \Phi_{CE} \Phi_{EM} dC/dt = \Phi_{CL} dC/dt$$

对于给定发光体的发光体系， $\Phi_{CL}$  为常数。

不同的化学发光反应可以产生不同波长的光的辐射，化学发光分析法的定量基础就是化学发光的光强度决定于化学发光反应的反应速度，因而一切影响反应速度的因素都可以作为建立测定方法的依据，通常反应速度决定于反应分子的浓度，这样通过测定化学发光的光强，间接求出待测物浓度。

化学发光法被普遍认为具有高灵敏度、快速和简便等优点。首先，由于化学发光的激发过程无需激发光源，因此化学发光法的背景发射比荧光法低得多。此外，化学发光反应可受各种反应条件的影响。这种影响大多表现在对化学发光强度的改变，有时也可能表现在发光速度和发光波长的改变。这一特性使得化学发光分析法有更广泛的应用。因为任何能影响化学发光反应，引起发光强度、速度和波长发生改变的物质都能成为化学发光法的分析对象。

化学发光分析测定的物质可以分为三类：第一类物质是化学发光反应中的反应物；第二类物质是化学发光反应中的催化剂、增敏剂或抑制剂；第三类物质是偶合反应中的反应物、催化剂、增敏剂等。这三类物质还可以通过标记方式用来测定人们感兴趣的其他物质，进一步扩大了化学发光分析的应用范围。

近年来，应用较为广泛的化学发光体系有：鲁米诺(Luminol)及其衍生物、光泽精(Lucigenin)及吖啶酯(Acridium Ester)、过氧化草酸酯(Peroxyoxalates)、1, 2-二氧杂环丁烷类(Adamantyl Dioxetanes)、三(2, 2'-联吡啶)钌(III)(Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III))等金属配合物、 $KMnO_4$  等体系，下面对这些体系近年来的发展作一阐述。

### 3. 化学发光反应体系

#### 3.1. 鲁米诺化学发光体系

鲁米诺(3-氨基-邻苯二甲酰肼, 结构式见图 1a), 是 1928 年 Albrecht 首先发现的一种发光试剂[2]。鲁米诺、异鲁米诺(4-氨基-邻苯二甲酰肼, 结构式见图 1b)及其衍生物是目前研究最多、应用最广泛的化学发光试剂之一。所有鲁米诺及其衍生物的化学发光反应均为氧化反应, 这些反应或者在疏质子溶剂中发生, 如二甲基亚砜, N, N-二甲基甲酰胺, 或者在质子溶剂中发生, 如水及低级醇等[48, 49]。

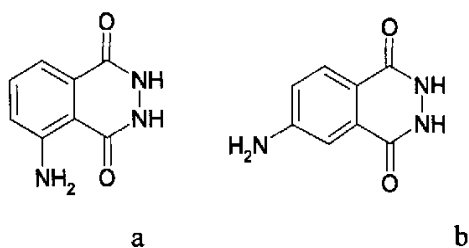


Fig. 1 The structure of Luminol(a) and Isoluminol(b)

鲁米诺的化学发光量子产率 ( $\Phi_{CL}$ ) 在二甲基亚砜中约为 0.05, 在水溶液系统中约为 0.01-0.02[48-50]。异鲁米诺比鲁米诺的化学发光弱 10-100 倍[51, 52]。众所周知, 鲁米诺类发光化合物的  $\Phi_{CL}$  与其自身结构及氧化条件有关。有文献报道, 当将鲁米诺或异鲁米诺的环形的邻苯二甲酰肼部分进行修饰后, 得到的衍生物完全丧失了化学发光特性 [49, 50]。

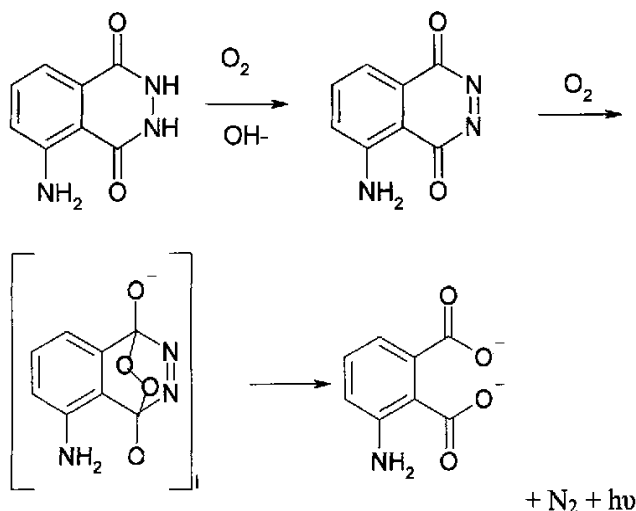


Fig 2. Possible chemiluminescence reaction of luminol

人们对鲁米诺的化学发光反应已作过详细大量的研究[53-57], 在不同的反应条件下反应机理稍有不同, 现被普遍接受的鲁米诺反应机理如图 2 所示[56], 在

水溶液中鲁米诺本身被氧化成 3-氨基邻苯二甲酸盐, 最大发射波长为 425nm。

在碱性溶液中, 鲁米诺可以被许多氧化剂(如  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 $\text{NaClO}$ 、 $\text{KIO}_4$ 、 $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、活性氧等)氧化而发光, 其中  $\text{H}_2\text{O}_2$  最为常用, 但由于鲁米诺氧化发光的反应速度较慢, 添加某些酶类或无机催化剂是非常有必要的。其中常用的酶类有: 辣根过氧化物酶(HRP)、微过氧化物酶、黄嘌呤氧化酶、髓过氧化物酶、过氧化氢酶, 金属蛋白类有细胞色素 C、血红蛋白。无机类催化剂包括: 臭氧分子、卤素、过硫酸盐、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  以及他们的配合物[46, 48-50]。值得指出的是, 某些金属离子与配位剂结合后, 具有比金属离子本身更高的催化活性。如利用鲁米诺-过氧化氢-邻菲罗啉银体系, 测定银离子的检测限达到了  $2.7 \times 10^{-7} \text{ g/L}$ [58]。另外, 一些增敏剂, 如对碘酚、6-羟基苯并噻唑、苯基硼酸对鲁米诺类发光试剂的化学发光反应的增敏作用也已有报道[59-62]。由于这些氧化剂、催化剂、增敏剂不但可以氧化、催化、增敏鲁米诺的化学发光反应, 而且发光强度与氧化剂、催化剂、增敏剂的浓度往往存在线性关系, 由此可以对这些物质进行测定。

研究表明, 鲁米诺及其衍生物的  $\Phi_{\text{CL}}$  部分依赖于芳香邻二羧酸根离子的荧光量子产率[64-69]。因此, 有较高荧光量子产率的化合物结构, 可望成为鲁米诺类化学发光试剂的骨架结构, 这一策略已经被众多研究者运用于某些化学发光化合物和试剂合成的基本设计中[63-65, 70]。

鲁米诺及其衍生物由于具有量子产率高、易合成、水溶性好等特点, 已成为迄今应用最为广泛的化学发光试剂之一, 广泛应用于包括免疫诊断和非免疫分析的各个领域。利用鲁米诺化学发光体系, 不但可以测定很多金属离子[71-79], 还可以测定很多其它无机物和有机物, 如水中的溶解氧[80]、 $\text{NO}_2$ [81]、卤素[82]、硫[83]等。有机物中的氨基醇类, 以及带有  $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$  的苯的衍生物[84, 85], 还有一些还原剂如抗坏血酸[86]等对 Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{Cu}^{2+}$  的发光体系具有抑制作用, 据此可以对这些物质进行测定。同时, 大量鲁米诺的衍生物可以用于标记其它分子包括生物分子等[87-89], 开拓了鲁米诺化学发光体系的应用范围。

### 3.2. 光泽精及吡啶酯化学发光反应体系

1935 年, Glue 和 Petsch[3]首次合成并发现了 10, 10-二甲基 9, 9-双吡啶二

硝酸盐（俗称光泽精）的化学发光特性，现在光泽精已经成为研究和应用最为广泛的化学发光试剂之一。在碱性条件下，被过氧化氢氧化成 N-甲基吡啶酮，发射出 470nm 的光[90]，其发光量子效率介于 0.01-0.02 之间[91]。文献[92, 93]认为，二氧杂环丁烷衍生物是其化学发光反应的关键中间体，由此提出了光泽精的化学发光反应机理，如图 3 所示。光泽精的化学发光反应可以被很多的金属离子所催化，其中包括一些对鲁米诺的化学发光反应无催化作用的金属离子，如 Bi(III)。该体系可用于测定金属离子[94]、抗坏血酸[95]及碱性磷酸酶[96]。光泽精的发光反应要求的 pH 条件较为严格，一般在 0.1~1.0 mol/L 的强碱溶液中进行，需单独加入。光泽精的反应时间较长，发光信号几分钟才能到达峰值。在流动注射化学发光分析中，由于光泽精的反应产物不溶于水，因此易沉积到流通管道及检测池壁上，但加入少量表面活性剂如 SDS 就可以避免沉淀的发生，从而有利于定量测定。

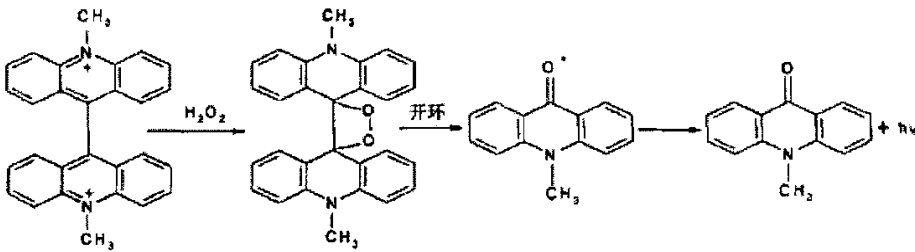


Fig. 3. Chemiluminescence reaction of Lucigenin

研究发现许多吡啶类化合物都具有化学发光特性，其中研究最多的是吡啶酯。1983年 Weeks 等人[97]合成了第一个用于标记蛋白质的吡啶酯试剂 4-(2-琥珀酰亚胺基氧羰基)苯基-10-甲基吡啶-9-羧酸酯氟磺酸盐。吡啶酯可以通过其分子结构上特有的取代基团与抗原、抗体、多肽和 DNA 等生物大分子结构上的氨基、羧基或者磷酸基直接或间接作用，从而标记这些生物大分子，实现这些生物物质的化学发光分析测定。吡啶酯发光效率高、背景低，可以在中性或微碱性的条件下标记多肽、抗体和抗原等，且发光量子产率及生物活性几乎不受影响，已成为性能优良的化学发光免疫分析标记试剂。通过对其结构的改造，大大增加了吡啶酯类化合物参与微量免疫分析的可能性，在生命科学领域中应用日趋广泛。林金明等[98]用吡啶酯类化合物为探针对人类的促性腺激素进行了免疫分析，Nelson 等[99]进行了 DNA 的免疫分析。水解不稳定性是吡啶酯类化学发光标记

物的一大弱点,但研究人员发现,吡啶酯可以嵌入核酸杂交双链之间,且在嵌入后其酯键得到保护而不易被水解,由此设计出水解保护分析(HPA)探针。将吡啶酯用特殊的标记臂标记于探针的某个部位,探针体与待测核酸序列形成杂交体后,探针上的吡啶酯自发地嵌入核酸杂交双链之间,那些过量的游离探针上的吡啶酯用特殊的水解试剂进行水解失活。最后通过测定被保护的吡啶酯的化学发光强度对待测核酸序列进行定量分析。

### 3.3. 过氧化草酸酯类化学发光体系

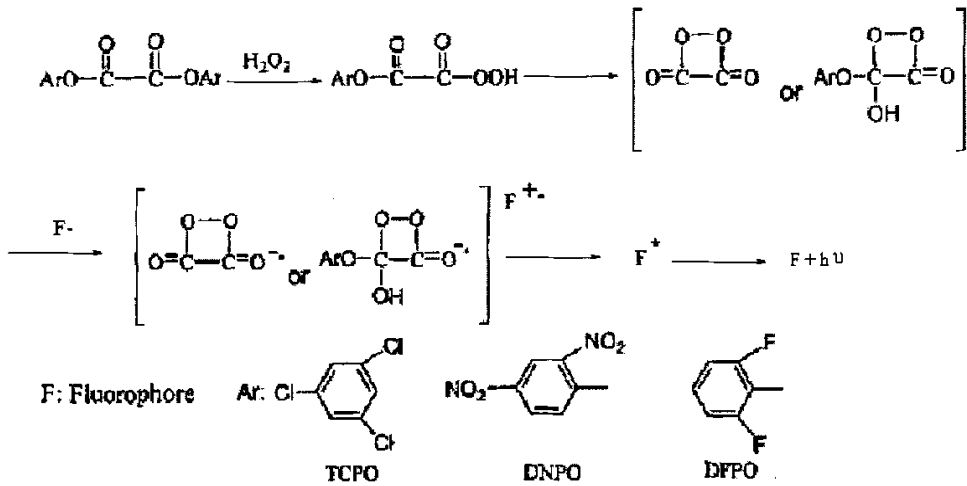


Fig. 4. Peroxyoxalate chemiluminescence reaction

1963年, Chandross[100]在实验中首次发现并报道了过氧化草酸酯的化学发光(POCL)现象,将草酰氯加到含有荧光物质,如葱、9,10-二苯基葱或N-甲基吡啶酮的过氧化氢溶液中,就会有化学发光现象发生。从此以后,有关过氧化草酸酯类发光试剂的合成、应用及发光机理等已经有大量的研究和报道。过氧化草酸酯类化学发光体系通常包括:一种二芳基草酸酯,一种氧化剂通常为过氧化氢,二者之间发生化学反应,生成一种双氧基中间体储能物;一种荧光剂,通常为线性稠环芳烃。发生反应时,该荧光试剂的分子结构通常保持不变,只是起转移能量和发射荧光的作用。最典型的芳香基草酸酯化合物是双[2,4-二硝基苯基]草酸酯(DNPO)、双[2,4,6-三氯苯基]草酸酯(TCPO)。研究表明,化学发光强度与芳香

基草酸酯的结构及所使用的溶剂有关,并且可以通过调节 pH 值得到改善。Rauhut 认为化学发光的量子产率随草酸衍生物结构的变化而变化[101]。过氧化草酸酯的发光机理如图 4 所示。

过氧草酸酯的化学发光量子效率可达 27%, 并且允许的 pH(4~10) 范围较大。TCPO 可在 pH5~9 的范围内使用, pH 7.50 时, 发光强度最大; DNPO 可在 pH 3.5 的条件下使用。过氧化草酸酯类化学发光体系主要用于直接测定过氧化氢[102-104], 通过过氧化氢间接测定其它样品[105-116], 如苯醌、葡萄糖、尿酸、氨基酸、谷氨酸、乙酰胆碱、胆碱、多胺等, 也可以用于荧光物质[117-122]的分析, 主要包括多环芳烃及其衍生物和一些丹磺酰或荧光标记的分析物。另外, 一些易被氧化的非荧光物质如二氧化硫、苯胺、有机硫化物等能猝灭[123]化学体系的发光, 通过测定发光强度的减弱也可以进行定量分析。

Makoto Tsunoda 等[124]对过氧草酸酯的化学发光反应与液相色谱、流动注射及毛细管电泳结合起来在分析中的应用中作了综述报道。

### 3.4.1, 2 - 二氧杂环丁烷类化学发光体系

自 1969 年 Kopecky 和 Mumford 合成 1, 2-二氧杂环丁烷以来, 其化学发光也研究得比较多, 这类化合物经单分子转变后生成两个含羰基的产物, 产物之一可生成激发态。由于许多化学发光和生物发光的中间体都可能生成这种过渡态而早已受到人们的注意, 目前 1, 2-二氧杂环丁烷及其衍生物已经成为一类重要的化学发光试剂。通过选择环烷烃、苯基、蒎基、烷氧基等不同取代基修饰 1, 2-二氧杂环丁烷, 改变 1, 2-二氧杂环丁烷衍生物的发光和分解动力学性质, 1, 2-二氧杂环丁烷类衍生物的化学发光得到不断发展。

在免疫分析中, Kamtekar 等将该类化合物作为酶转化的底物[125], 利用碱性磷酸酶(AP) 催化 1, 2-二氧杂环丁烷的磷酸盐衍生物的水解产生化学发光来测定 Zn( II )、Be( II )、Bi( III )。Takeshi Imanishi 等合成一类新型 1, 2-二氧杂环丁烷衍生物, 这类物质含有吡啶-10-乙酸酯基团, 通过吡啶环平面结构和螺旋己二环烷烃的稳定作用, 使试剂稳定性增强, 在碱性试剂中, 该化合物发光快速, 具有较好的发光性能[126]。利用 1, 2-二氧杂环丁烷类化合物作为化学发光探针和标记物, 由于其刚性结构可方便地通过控制温度而产生化学发光, 从而



获取某一点的信息。

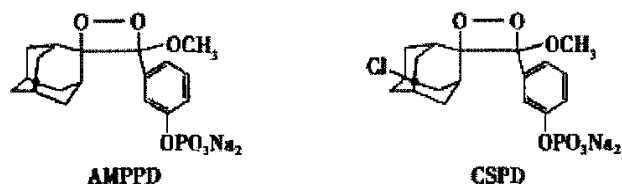


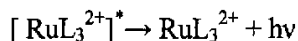
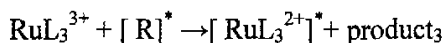
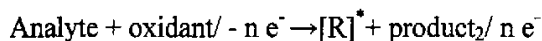
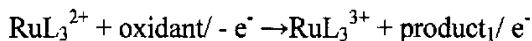
Fig. 5 The structure of AMPPD and CSPD

3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷氧酰苯基)-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD, Fig. 5)是1,2-二氧杂环丁烷类中最重要的发光剂[127]。它在碱性磷酸酯酶(AP)催化下的AMPPD分解反应是近年来最受人们青睐的化学发光反应。AP-AMPPD发光体系具有稳态发光特性,量子产率在0.90以上,用于碱性磷酸酶的测定,灵敏度可以高达 $10^{-21}$  mol (<1000AP)分子,是目前最灵敏的核酸检测方法之一[128];用碱性磷酸酶作为标记物,以该化学发光反应为基础的免疫分析、基因分析和基因芯片已得到了广泛的应用。在AMPPD基础上加以改进并具有更好的反应动力学和更高灵敏度的新一代底物CSPD (Fig. 5)也已出现。这些体系已广泛用于各种基因、病原体DNA的鉴定。

### 3.5. 钌(II) 配合物化学发光反应

目前,用于化学发光分析的钌(II)配合物主要是三(2,2'-联吡啶)钌(II)[Ru(bipy) $_3^{2+}$ ]和三(1,10-菲咯啉)钌(II)[Ru(phen) $_3^{2+}$ ]。1966年,Hercules和Lytle首次报道了[Ru(bipy) $_3^{2+}$ ]的化学发光现象[129]。此后,钌(II)配合物的化学发光性质得到了深入的研究,其在化学发光分析中的应用日益广泛[130]。有关钌(II)配合物(RuL $_3^{2+}$ )化学发光反应机理的研究[131-142]表明,不同物质与它的化学发光反应都包括以下三个步骤:第一,RuL $_3^{2+}$ 和参与化学发光反应的物质分别与氧化剂(例如固体PbO $_2$ 或Ce(IV)溶液)作用或在电极上被氧化,生成RuL $_3^{3+}$ 和某种强还原性的自由基中间体[R] $^*$ ;第二,RuL $_3^{3+}$ 与强还原性的自由基中间体[R] $^*$ 作用,得到发光物质[RuL $_3^{2+}$ ] $^*$ ;第三,[RuL $_3^{2+}$ ] $^*$ 回到基态,将激发态的能量以光辐射的形式释放出来。上述步骤中所说的“参与化学发光反应的物质”通常是体系中的被分析物,RuL $_3^{2+}$ 的发光强度与其浓度有关。因此,钌(II)配合物化学发

光的机理可以用如下的四个方程表示:



从上述机理可见, 在钌(II) 配合物化学发光反应过程中, 钌(III) 的产生是最重要的步骤。目前用来产生  $\text{RuL}_3^{3+}$  的方法主要有三种: 化学氧化法、光化学氧化法以及电化学氧化法, 其中电化学氧化法中的原位电致化学发光法(in situ ECL) 应用最为广泛。

研究表明,  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  与脂肪胺的化学发光强度, 叔胺是仲胺的 10~100 倍, 仲胺是伯胺的 10 倍左右。脂肪族叔胺的检测限可以达到 10 nmol/L、1 pmol/L 甚至更低。而另一方面, 芳香族胺如苯胺、二苯胺在该体系中却没有化学发光现象。测定氨基酸的检测限根据结构的不同, 可以达到 1  $\mu\text{mol/L}$  到 1 mmol/L。

由于  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  在化学发光反应中可以循环使用, 因此在某些情况下, 将其固定于电极表面是非常有利的。 $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$  可以通过控制电极电势氧化而得到, 分析物在电极表面与  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$  作用, 发光反应后, 又生成  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ , 在电极上又可以被氧化成  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ , 从而使反应可以循环进行。近几年来, 有关钌(II) 配合物化学发光分析的新体系和新方法研究得到了迅猛发展, 在药物、环境、食品等生命科学相关领域得到了广泛应用。虽然钌(II) 配合物化学发光新体系有较高的选择性, 新方法可进行两组份同时测定, 但要进行复杂体系中特定组份分析, 还必须与分离技术结合。因此, 将化学发光的高灵敏度与现代高效的分离技术结合, 是化学发光分析一个重要的研究方向。两者结合后在药物、有机酸和有机碱分离分析中得到了广泛应用, 如 HPLC-CL 联用测定血浆样品中的三环抗抑郁剂[143], 利用微芯片与化学发光联用测定可待因和草酸等[144, 145]。Lin 等人[146]将  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  固定在阳离子交换树脂上制成了化学发光传感器, 此传感器性质稳定, 可用于测定草酸盐、亚硫酸盐和乙醇。Wang 等人[147]将  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  固定在玻碳电极表面的 Eastman-AQ55D-硅胶薄膜上, 制成了一种稳定时间长、响应速度快的电致化学发光传感器, 并用其检测草酸盐、三丙胺以及氯丙嗪, 得到了满意的结果。Egashira 等人[148] 将  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  固定在涂敷于电极表面的 Nafion 膜上, 得到了一种电致化学发光传感器。此传感器对于

三甲胺气体具有很强的响应(线性范围为 10~310 ppb, 检测限为 3 ppb), 可用于监测海产品的新鲜程度。

### 3.6. 高锰酸钾化学发光反应体系

1920 年, Grinberg 首次将酸化的高锰酸钾用作化学发光试剂, 在过氧化氢存在下研究了连苯三酚的氧化[149]。2001 年 Barnett 等[27]详细综述了酸性高锰酸钾化学发光体系的分析应用; 最近他们[150]又提出了酸性高锰酸钾化学发光体系的发光机理, 认为这类化学发光是化学反应诱导的激发态  $\text{Mn(II)}$  的磷光, 类似于固态  $\text{Mn(II)} \ ^4\text{T}_1 \rightarrow \ ^6\text{A}_1$ , 的转换。高锰酸钾在酸性介质中, 能够氧化很多有机物及无机物, 并产生光发射, 已用于生物碱及药物的分析测定[151-157]。Townshend 用高锰酸钾发光体系测定了尿液、血液、麻醉镇痛药物中吗啡的含量[158], 并且, 他们在酸性高锰酸钾溶液中用甲酸/罗丹明 B 为载流研究了可作为辅助还原剂的一些含氮亲核试剂[159]。高锰酸钾化学发光反应体系的灵敏度一般较低, 通常需要在体系中加入增敏剂, 常用的有: 还原性物质, 如: 甲醛、乙二醛、戊二醛、 $\text{Mn(II)}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、甲酸等, 荧光类物质, 如罗丹明 B、核黄素、奎宁及一些表面活性剂和  $\beta$ -环糊精等, 另外, 为了提高该发光体系的灵敏度, 高锰酸钾的酸性介质经常使用多聚磷酸。

### 3.7. Ce(IV)化学发光反应体系

Ce(IV)作为一种强氧化剂, 可以在酸性条件下氧化某些还原性物质而发光。与 Ce(IV)有关的化学发光反应大体可以归纳为如下几类:

1. 直接还原 Ce(IV)体系。直接还原 Ce(IV)体系的发光应用较少。某些药物如萘普生[160]、盐酸异丙嗪[161]、非那西汀[162]、扑热息痛[163]等可直接还原 Ce(IV)发生化学发光反应, 由此建立了测定这些药物的化学发光方法。
2. Ce(IV)-亚硫酸盐体系。基于对 Ce(IV)- $\text{SO}_3^{2-}$ 体系化学发光的增强作用, 测定了盐酸环丙沙星、诺氟沙星[164]、可的松及氢化可的松[165]。利用氧氟沙星, 氟哌酸、卷须霉素及洛美沙星等[166]增强 Ce(IV)-亚硫酸盐体系的化学发光这一性质对这些药物进行了测定。

3. Ce(IV)-巯基化合物体系。Ce(IV)与含有巯基或含硫的药物反应,一些荧光物质如喹琳、罗丹明 B 或罗丹明 6G 等对其有增敏作用,据此测定了青霉素[167]、头孢氨苄[168]、卡托普利[169]、氟非那嗪、甲氧异丁嗪、异丁嗪等药物[170]。

4. Ce(IV)-联吡啶钇(II)体系。Ce(IV)可氧化  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  产生化学发光,某些有机酸、有机碱及药物能增强该体系的发光强度。何治柯等人[171]对结构相似的有机酸如:乳酸,丙氨酸,丙酮酸,草酸在  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}/\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ -有机酸(HA)-Ce(IV)体系中的化学发光反应动力学进行了比较研究。他们[172]还利用巴比妥酸对 Ce(IV)氧化钇(II)-联吡啶化学发光反应的增强作用,建立了痕量巴比妥酸的自动脉冲注射-化学发光测定法。

### 3.8. N-溴代琥珀酰亚胺化学发光体系

1990年, Halvatzis 等[173]首次将 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)用于化学发光分析,他们发现 NBS 氧化异烟肼时产生化学发光,而铵离子的存在可以大大增强发光强度,据此,建立了检测异烟肼的化学发光分析法。此后, NBS 作为一种相对稳定和有效的氧化剂,在化学发光领域得到了广泛的应用,并研究了增敏剂对该化学发光体系的作用。NBS 作为氧化剂用于化学发光反应,比直接使用  $\text{HBrO}$  更加稳定;同时又比电生  $\text{HBrO}$  更加方便和简单;和化学发光反应中所常用的无机氧化剂如高锰酸钾、铁氰化钾、溴水等相比,该试剂的一大优点是没有颜色,因此对光的自吸收很微弱,有利于灵敏度的提高;此外,该试剂既可以溶于极性溶剂,又可以溶于非极性溶剂,因此具有应用于有机相的化学发光分析的潜力。

Halvatzis 等[173]将 NBS 用于化学发光反应检测异烟肼时,发现加入  $\text{NH}_4^+$  时发光强度和灵敏度均得到很大提高,他们认为其增敏机理可能是“协同作用”,即  $\text{NH}_4^+$  被 NBS 氧化生成激发态  $\text{N}_2$ , 然后激发态  $\text{N}_2$  再激发体系的发光体,从而增强体系的发光强度[173, 174]。他们[175]在研究中还发现,  $\text{NH}_4^+$  被 NBS 氧化时,产生的激发态  $\text{N}_2$  可以激发共存的二氯荧光素,产生化学发光,实现对  $\text{NH}_4^+$  的灵敏检测。Wang 等[176]建立了检测西咪替丁的 NBS-荧光素体系,并与微超滤采样技术联用,用于研究西咪替丁和牛血清白蛋白的结合反应,计算出该结合反应的结合位点数和结合常数。方卢秋等[177]基于硫酸沙丁胺醇对 NBS-荧光素

化学发光体系的强烈抑制作用,建立了硫酸沙丁胺醇的抑制化学发光分析法,并探讨了抑制化学发光可能的机理,认为是硫酸沙丁胺醇消耗了NBS,从而抑制NBS和荧光素的化学发光反应。方禹之等 [178],基于美洛昔康与NBS在碱性介质中的反应,首次提出一种快速灵敏的流动注射化学发光测定方法,该方法成功运用于药品中的美洛昔康含量测定,并由光谱证据说明,在NBS氧化美洛昔康时,产生激发态的中间体,然后将反应产生的能量转移给荧光素,从而产生化学发光。Safavi等[179]研究了焦酚和NBS的化学发光反应,并发现在体系中加入盐酸羟胺和表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)时可以大大增强化学发光。Wang等[180, 181]在研究二甲双胍和苯乙双胍在NBS-荧光素体系中的化学发光行为时发现加入超过临界胶束浓度的CTAB时,化学发光强度可提高上百倍。对于这种现象,他们认为是由于超过临界胶束浓度的CTAB抑制了激发态荧光素的内转化过程,提高了量子产率的缘故。

### 3.9. 高碘酸钾化学发光反应体系

高碘酸钾作为无机的化学发光氧化试剂,与 $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{Ce}(4+)$ 相比,高碘酸钾的水溶液是无色的,因此不会对可见光产生吸收,不会在高浓度时因自吸收而影响化学发光的灵敏度,与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、次氯酸钠、次溴酸钠这些无机氧化剂相比,稳定性更高。高碘酸钾作为化学发光氧化试剂可以单独使用,也可以与过氧化氢、钌的各种配合物等协同作用,用于测定有机化合物及药物。如采用高碘酸钾-过氧化氢化学发光反应体系可用于测定盐酸黄连素、盐酸林可霉素、肾上腺色脞、盐酸土霉素、金鸡纳碱等[182-186]。在焦磷酸存在下,高碘酸钾用于测定葡萄糖、果糖[187],利用羟氨增敏用于测定乙二醇[188]。高碘酸钾与钌的各种配合物协同作用,用于测定空气中的 $\text{SO}_2$ [189]及各种氨基酸[190]。

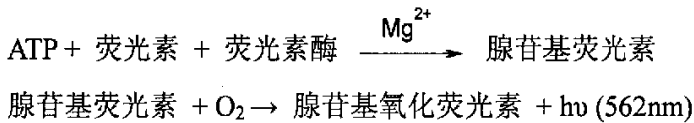
### 3.10. 罗丹明族化合物的化学发光体系

罗丹明族化合物属于碱性吖吨染料,其水溶液具有较大的摩尔吸收系数,分子结构有较大的刚性平面,因此其单体水溶液可产生很强的荧光,另外罗丹明族化合物还具有很好的氧化还原特性。近年来,罗丹明族化合物在化学发光分析方

面也有较多应用，但多数只作为化学发光反应的增敏剂。近来有研究[191, 192]表明，在硫酸介质中，Ce(IV)氧化罗丹明 B 本身就可以产生很强的化学发光，并将罗丹明 B-Ce(IV)-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 这一新的化学发光体系用于微量抗坏血酸和 DNA 的测定。

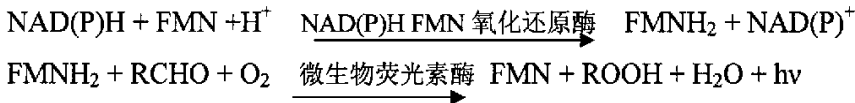
### 3.11. 生物化学发光反应

生物发光是化学发光的一个特殊类型，它是由生命活性物质所产生的发光现象，发光所需的激发能来自于生物体内的酶催化反应。催化此类反应的酶称为荧光素酶。由于生物发光法具有简便、快速、灵敏、重现性好、设备简单等优点，因此广泛应用于生化领域某些酶活性(如肌酸激酶, 丙酮酸激酶)和激素类(如 TSH, T<sub>4</sub>、皮质醇)等物质的检测。生物化学发光中研究最多的是萤火虫生物化学发光和细菌生物化学发光。由于前者发光反应需要 ATP 的参与，所以萤火虫生物化学发光又称 ATP 依赖型发光。在这类反应中，萤火虫荧光素(Firefly Luciferin)和荧光素酶(Luciferase)在 ATP, Mg<sup>2+</sup>和 O<sub>2</sub> 存在条件下可发光，反应式示意如下：



其中，第一步反应对 ATP 是特异性的，它已成为定量检测各种样品中 ATP 的基础。在第二步反应中，腺苷基荧光素与 O<sub>2</sub> 作用，形成腺苷基氧化荧光素并发光。在整个反应过程中，放出的光总量取决于荧光素、荧光素酶、O<sub>2</sub> 和 ATP 的浓度。当所有其他反应物均过量时，发出的光总量和最大光强度与 ATP 成正比，借此可以用来测定 ATP。

细菌生物化学发光原理是：



其中, FMN 是脱氢黄素单核苷酸, FMNH<sub>2</sub> 是黄素单核苷酸。烟酰胺腺嘌呤双核苷酸(NADH)和烟酰胺腺嘌呤双核苷酸磷酸(NAD(P)H), 他们能可逆地脱氢与加氢, 因而具有传递氢的作用, 是生物氧化代谢不可缺少的物质。利用上述氧化还原酶和细菌荧光素酶催化的发光反应, 可以定量测定 NADH 和 NADPH [193]。

生物发光由于都是有酶参与的反应，因此选择性比较好。而化学发光反应一般来说由于很多物质的直接测定几乎是在相同条件下，因而选择性较差。近年来，采用化学发光免疫分析、偶合化学发光分析、液相色谱和毛细管电泳与化学发光检测联用等分析手段，在选择性和灵敏度两个方面都取得了较好的效果。

#### 4. 偶合反应化学发光分析

偶合反应化学发光分析过程中存在着两个化学反应，一个称为偶合反应，这种反应能够定量生成或定量消耗某一化学发光反应的反应物(或催化剂)，另一个反应则为相应的化学发光反应。根据测量化学发光反应的化学发光强度(或发光总量)以测定偶合反应中相关物质浓度(或含量)的方法称为偶合反应化学发光分析法。

偶合反应可以是酶或非酶动力学反应、氧化还原反应和配位置换反应，也可以是一些其它有关反应。偶合反应化学发光分析的分析物可以是偶合反应的反应物，也可以是偶合反应的催化剂。由于可利用的偶合反应数量较多，因而可以用化学发光法分析的物质种类和数量就借偶合反应化学发光分析法而大大增加了。更有意义的是分析物可扩展到生命活性物质。如果偶合反应是催化动力学反应，那么相应的偶合反应化学发光分析就具有高于一般化学发光分析的灵敏度；如果偶合反应有较好的选择性，那么相对于那些选择性较差的化学发光分析法而言，相应的偶合反应化学发光分析的选择性就会得到极大的改善。

吕九如、杜建修从酶联化学发光分析、无机偶合反应化学发光分析、光化学反应-化学发光分析和电化学反应-化学发光分析四个方面对偶合反应化学发光分析的研究状况进行了评述[194]。

鲁米诺，光泽精和过氧化草酸酯都是测定过氧化氢的很灵敏的化学发光试剂。许多分析物如葡萄糖、尿酸、胆固醇、单胺、二胺、氨基酸、乙醇、甲醇、黄嘌呤、次黄嘌呤、肌苷、胆碱，都能在各自对应的氧化酶催化下，被溶液中的溶解氧氧化产生过氧化氢。因而他们都能够通过偶合反应，实现灵敏的和选择性的测定，还可以基于化学发光偶合反应构建化学发光传感器，实现活体的在线、实时测定[195, 196]。

Perez-Ruiz 等[197]报道了在乙醇存在下，光诱导维生素 K<sub>3</sub> 产生过氧化氢，

与鲁米诺化学发光体系相耦合测定了维生素 K<sub>3</sub>。David 等[198]报道了氯霉素及其相类似的有关含氮化合物通过光化学反应可产生一种氧化性产物,这一氧化性产物能氧化鲁米诺产生化学发光。Perez-Ruiz 等[199]报道乳酸盐和柠檬酸盐与 Fe(III)形成的络合物的光化学反应,可产生 Fe(II),而 Fe(II)对鲁米诺化学发光反应有强烈的催化作用,基于这一原理建立了测定乳酸盐和柠檬酸盐化学发光法。

## 5. 化学发光与其它技术的联用

### 5.1. 化学发光与流动注射技术的联用

1975 年丹麦学者 Ruzicka 与 Hansen 首次提出流动注射分析技术 (Flow Injection Analysis, FIA), 20 多年来全世界在此领域累计发表论文已近 6000 篇, 专著 10 余部。其发展速度在近代分析化学发展中是比较突出的, 目前主要应用领域有: 水质检测、土壤样品分析, 药物研究、血液分析等。

#### 5.1.1. 流动注射分析的原理

在 FIA 出现之前, 充分的、均匀的混合及在此基础上所达到的物理与化学的平衡状态是溶液化学分析的最基础观念之一。即使对于那些例外的情况来说, 由于化学反应的特性所决定, 无法在化学平衡状态下测定 (如动力学测定, 化学发光测定等) 但仍要理所当然的尽量实现试样与试剂的均匀混合, 因为把试剂加入试样或相反过程及随后的混合过程是无法精确控制的。从物理意义上来说, 在试样与试剂充分混合之前, 在过程开始后的任何一个确定的时间都不可能得到具有良好重现性的混合状态。既然任何化学反应必然依赖于试样中待测物与反应试剂的接触, 在混合过程无法精确控制的情况下, 要取得具有足够精度的响应就只有等到反应达到化学平衡的稳定状态, 此时混合过程初期的非重现状态及反应时间的长短可以忽略不计。

因此, 从一定意义上来说, 上述均匀混合与平衡状态下测定的观念是在物理混合及化学反应过程都无法精确控制的条件下形成的。气泡间隔式连续流动分析之所以在液流中加入气泡也正是为了利用其搅拌与壁垒的双重功能来创造实现物理与化学平衡的条件, 与传统的手工操作相比, 它虽然大大提高了溶液处理



的工作效率，但并未摆脱溶液分析必须达到物理与化学平衡的观念。FIA 技术的优势之一在于它摆脱了最原始的手工间歇式操作模式，并与自动检测仪器联用，从而实现了分析检测自动化，使分析效率提高。而其独特优势就在于它是建立在非平衡状态下实现重现检测的分析手段。它是将一定体积的试样注入到无气泡间隔的流动试剂（载流）中，保证混合过程与反应时间的高度重现性，在非平衡状态下高效地完成试样的在线处理与测定。其变革的根本性质在于打破了几百年来分析反应必须在物理化学平衡条件下完成的传统观念，从而从根本上缩短了检测时间，大大提高了分析效率，被誉为溶液分析化学质的进展。

正是由于FIA是建立在非平衡状态下实现重现检测，它在不稳定反应的定量分析中体现了其它分析手段难以取代的绝对优势。在此方面包括一些高灵敏度，高选择性但不稳定的反应、动力学反应等，本文所涉及的化学发光反应也在此列。

典型的 FIA 中样品与载流（试剂）的混合总是不会完全的，然而，对一个固定的实验装置来说，只要流速不变，在一定的留存时间的分散状态都是高度重现的，因此可以得到重现良好的分析结果。所以，与传统的化学分析操作相比，FIA 既不需要均匀混合，也不需要达到化学平衡，为实现连续自动化分析奠定了基础。

### 5.1.2. 流动注射分析的特点

FIA 只有同特定的检测技术结合才能形成一个完整的分析体系，而一旦实现了这种结合就会使一些传统的检测方法在分析性能方面有显著的提高，甚至飞跃。FIA 基本系统一般包括流动注射部分和检测部分。流动注射部分主要有：载流驱动系统，注样器或注样阀，微型反应器；与 FIA 联用的检测方法主要有分光光度法、高效液相色谱法、原子光谱法、电化学法、化学发光法、荧光法、酶法、免疫分析法等，从而实现了 FIA 技术与多种分析手段的联用，使 FIA 技术具有广泛的适应性。另外，流动注射分析还具有低消耗、高精度、高效率 and 仪器设备简单价廉等优点。

### 5.1.3. 流动注射化学发光法的特点

由于化学发光(CL)反应速度通常很快，在溶液混合的瞬间就产生发光信号，在几秒内发光强度达到峰值，而且较易受环境因素的影响，因此反应过程难于控

制,重现性和选择性较差,使其在定量分析中受到一定限制。而诞生于二十世纪七十年代的流动注射分析技术,是一种在非平衡状态下,溶液自动处理及分析技术,FIA能使样品和试剂以高度重现的方式混合,从混合到检测的时间间隔可以严格控制。因此FIA为CL提供了一个非常好的控制手段,在流动过程中,所有的实验参数,如试剂体积、保留时间、温度、试剂的混合时间和方式等都能严格的控制并重复操作。因此近年来将FIA与化学发光分析联用,在很大程度上克服了化学发光分析重现性差、操作费时、不便于实现自动化等缺点,从而使化学发光作为一种灵敏高效的痕量分析方法在分析化学领域得到了迅速发展。流动注射-化学发光(FI-CL)分析方法主要具有如下优点:

(1) 装置简单:和一般CL分析一样,FI-CL分析无需复杂的分光元件和光强测量装置,只需用光电转换装置将光信号转换为电信号,一般实验室可根据需要自行组装,且操作方便。

(2) 灵敏度高:与化学发光法联用弥补了FI这一非稳定分析技术造成的灵敏度的损失,FI-CL法的检测限一般在 $\text{ng/g}$ ~ $\text{pg/g}$ 数量级,对于一些无机离子检测下限可达 $10^{-12}\text{g/mL}$ ,比光度分析低3到4个数量级。

(3) 线性范围宽:发光强度与被测物浓度可在4~5个数量级范围内成线性关系。

(4) 重现性好:一般CL分析中,由于化学发光反应速度快,且发光强度随时间改变,所以反应过程难于控制,重现性较差。而采用FI技术,试样与试剂在流动中高度重现地混合,显著提高了分析结果的重现性。

(5) 选择性好:化学发光分析主要的缺点是选择性不高,有时需要与分离方法结合,而FI可以实现高效率的在线分离,例如溶剂萃取、渗析、气体扩散、离子交换与吸附等分离过程均可引入流动注射系统,形成FI在线分离体系,不仅实现了分离过程的高效率和自动化,并可与测定过程在线连接,使整个分析过程连为一体,极大地提高了化学发光分析方法的效率和选择性。

(6) 反应条件易于控制:CL对温度、酸度、离子强度等环境因素的变化比较敏感,但这些因素在FI条件下都不难得到控制。

#### 5.1.4. FI-CL 分析流路与实验装置

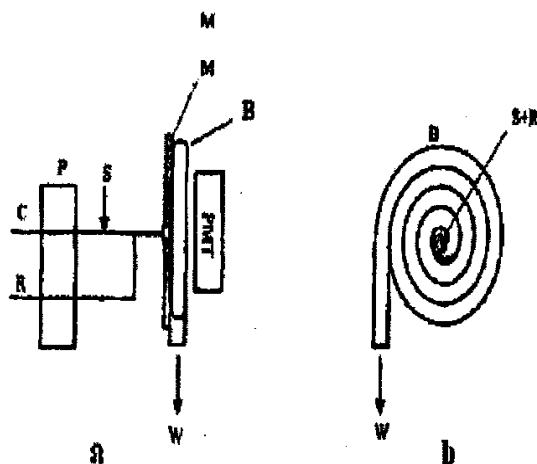


Fig. 6. General device for FI-CL(a) and flow cell (b)

P, peristaltic pump; C, carrier stream; R, reagent; S, sample;  
M, reflector; B, flow cell; W, waste; PMT, photomultiplier tube.

基本的 FI-CL 试验装置如图 6a 所示，一般包括两部分，其一是流动体系部分，控制发光试剂的流速及其混合方式；其二是化学发光检测部分，可以在指定波长或光发射的波长范围内进行检测，将发光反应产生的光信号转变成电信号，并由记录仪记录下其发光响应值。光电转换装置多为光电倍增管，也有用光电二极管的，现已设计出用于 CL 检测的二极管阵列检测器；流通池通常由玻璃管或透明塑料管制成平面螺旋型(图 6b)，以增加光通量，置于紧靠光电倍增管的光窗前。由于 CL 反应速度很快，因此从注射阀至流通池的反应管道一般较短。随着 FIA 技术的发展，商品化流动注射化学发光仪也广泛使用，配备微机系统，自动进样，储存记录，打印结果，使化学发光分析的速度更快。

一般 FI-CL 的流路有三通路、四通路等多种形式，各发光试剂以某一恒定流速经蠕动泵驱动，经过进样阀将待测组分与发光试剂混合，在流通池里发生化学发光反应，所产生的光信号被光电倍增管转换并放大，最后由记录仪记录。在 FI-CL 的实验装置中，流通池的设计很关键。由于直管反应器的分散系数较小，试剂分散度不够，导致发光强度较弱。因此一般采用图 6b 所示的平面盘管式反应器。与其它流动光谱检测方法相比（吸收及荧光发射），FI-CL 的流通池体积一般较大，发光截面尽可能大，且同光电倍增管尽可能靠近。这一方面是由于尽

量多的收集发光信号的需要,另一方面是因为 CL 测量中的背景噪音主要来源于化学发光反应试剂中存在的杂质,即所谓的化学空白值。

### 5.1.5. FI-CL 的应用

有关 FI-CL 的应用已有很多的文献及综述报道[200-204],本文仅就近几年来研究按照分析物的类别做一概述。

#### 5.1.5.1. FI-CL 在药物分析中的应用

药物是用来预防、治疗、诊断疾病和帮助机体恢复正常机能的物质。任何药物都必需达到一定的质量标准。药物质量直接影响着治疗和预防的效果,而且密切关系到人民的健康与安全。

药物检测的目的是保证药物的质量和用药的安全有效。在临床中,通过体内(体液和组织)药物的检测,可以了解给药后药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄的情况,为药物的药效、毒副作用的评价及其体内的机制研究提供信息。药物检测一般包括鉴别、检查和含量测定等方面。其中含量测定一般采用化学分析方法或物理化学分析方法,确定药品中有效成分的含量范围,测定方法力求简便快速,易于推广和掌握。常用来测定药物的方法包括容量滴定、紫外-可见分光光度、荧光、原子吸收、气相色谱、高效液相色谱、红外光谱和质谱等方法。药物分析作为化学分析的一个重要领域,不但要求分析结果准确可靠,而且要求方法简便、灵敏度高。

化学发光法作为最灵敏的分析方法之一在药物分析中得到了迅速发展,其分析理论和技术已渗透到药物分析的各个方面,主要包括:

- (1) 应用化学发光理论和技术对中西药有效成分进行定量分析;
- (2) 利用化学发光分析的高灵敏性对药物在动物体内的动态变化进行监测,绘制药时曲线,计算系列药动力学参数,为临床安全、合理、有效用药提供理论依据;
- (3) 进行药物在动物主要脏器中的分布和残留研究,这对于监测一些毒性大的药物损伤脏器造成危害的研究有着重要的价值,能为临床医学提供更有用的用药依据;

(4) 利用化学发光分析法对中草药中所含的生命元素及其吸收代谢进行测定和监测。

随着药物分析的发展,尤其是体内药物分析的发展,要求分析方法灵敏、快速、准确、自动化。原有的一些灵敏度低、操作烦琐的化学分析法将被逐步淘汰,有些大型仪器由于价格昂贵而难以推广,化学发光法与流动注射技术联用,不仅灵敏度高,线性范围宽,而且分析快速、重现性好、自动化程度高,作为一种有效的痕量分析技术,在药物分析中显示了极大的潜力和应用前景。很多研究者对发光分析在临床及药物检测中的应用作了评述[200-202]。

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 化学发光反应体系测定药物近几年来应用较为广泛。如 Thongpoon 等人[205]利用在高氯酸介质中,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-KMnO}_4\text{-CL}$  体系测定了四种头孢菌素,他们[206]还利用在硝酸介质中,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-KMnO}_4\text{-CL}$  体系测定了三种四环素类药物,且  $\text{Mn}^{2+}$ 对该体系具有增敏作用。林金明等人[207]利用在硫酸介质中  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-PbO}_2\text{-CL}$  体系测定了药物奈普生,并结合超滤,研究了奈普生与蛋白质的相互作用,计算了与牛血清白蛋白及与人血清白蛋白的结合常数。Francis 和 Adcock[208]综述并比较了各种用于氧氟沙星测定的化学发光方法,对光产生的途径进行了评价。Tomás Pérez-Ruiz 等人[209]采用在线紫外光分解 N-亚硝基二甲胺及在线光氧化的方法测定了水体及腌肉中 N-亚硝基二甲胺的含量。Gorman 等[210]分别利用  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和酸性  $\text{KMnO}_4$  化学发光体系测定了几种生物碱。Nawal. A. Al-Arfaj[211]使用  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4\text{-CL}$  测定了药片及生物流体中盐酸胃复安的含量。

近年来基于对鲁米诺化学发光体系的增敏或抑制作用进行的药物测定多有报道。如宋正华等[212]基于  $\text{Co}^{2+}$ 对  $\text{Luminol-O}_2\text{-CL}$  体系的增敏作用测定了药物、血清、蛋黄及鱼组织中  $\text{VB}_{12}$  的含量,基于阿齐霉素[213]和利培酮[214]对  $\text{Luminol-H}_2\text{O}_2\text{-CL}$  体系的增敏作用分别测定了阿齐霉素在药物、血清及尿样中的含量及利培酮在药物制剂中的含量,基于葛根素[215]对  $\text{Luminol-KIO}_4\text{-CL}$  体系的增敏作用测定了微量的葛根素,并对其在体内的代谢速率进行了研究,另外还结合控制试剂释放技术,对尿样及药片中 2,5-二羟基苯磺酸的含量测定及药物代谢研究[216]。杜建修等[217]采用肾上腺素印迹分子聚合物作为识别材料,基于鲁米诺化学发光体系测定了血清中肾上腺素的含量,试验结果表明,该法可以明

显提高化学发光法的选择性。二乙基己烯雌酚对 Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-四磺化钴酞菁染料化学发光反应具有明显的增敏作用, 基于此对其进行了测定。机理研究表明, 与其结构相似的烷基酚及雌激素皆可以用本法进行测定[218]。杨季冬等利用反相胶束及离子对复合物溶剂萃取的方法, 结合鲁米诺化学发光的方法, 测定了盐酸氯丙嗪[219]。另外, 基于 Luminol-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-CL 体系, 分别有盐酸多巴酚丁胺及酚妥拉明的测定及有关机理研究方面的报道[220, 221]。Safavi 等人[222]基于异烟肼对碱性介质中 SDCC-TCCA-Luminol-CL 体系的增敏作用进行了测定。基于对鲁米诺化学发光体系的抑制作用进行的药物测定, 近几年报道的有: 盐酸羟甲唑啉[223]、氨基甲基苯甲酸、氨茶碱[224]、甲硫咪唑、甲亢平[225]、吲达帕胺[226]、多巴胺[227]等。

Makoto Tsunoda 与 Kazuhiro Imai[124]综述了从七十年代后期至今, 过氧草酸酯化学发光体系在与高效液相色谱、流动注射分析及毛细管电泳联用在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、荧光物质及其衍生物如氨基酸、儿茶酚胺、多环芳烃等测定方面的应用。

高锰酸钾[228-233]、Ce<sup>4+</sup>[234-236]、NBS[178]、过氧亚硝酸[237, 238]等作氧化剂的化学发光体系在流动注射药物分析中的应用近年来也较常见。章竹君等人[229]结合在线微渗透采样技术进行了硫酸特布它林与牛血清白蛋白的研究, Nicole Anastos 等人[233]比较了可溶性 Mn<sup>4+</sup>与酸性 KMnO<sub>4</sub> 化学发光体系分别采用流动注射与顺序注射方法测定 Vc 药片中抗坏血酸的检测限, 发现 Mn<sup>4+</sup>体系具有更低的检测限。林金明等[239]基于 SDBS 疏水胶束与萘普生的协同作用, 构建了一种简单、快速、灵敏的化学发光方法测定了药物及尿样中萘普生的含量, 并进行了详细的机理研究及药物代谢研究。李保新等[240]利用 ClO<sub>2</sub> 作氧化剂, 构建了在中性及近中性水溶液中的 ClO<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub> 化学发光反应, 基于吡啶酸对发光反应的增敏作用进行了测定。

### 5.1.5.2. FI-CL 在无机物分析中的应用

无机物的化学发光分析在整个化学发光分析的研究及应用中占有较重要的地位。目前可测的金属离子和其它无机组分已经达到 40 多种, 涉及的分析试样非常广泛, 但主要以测定水样、矿石及生物样品中的无机组分为主。所涉及的化学发光体系以鲁米诺发光体系为主, 有一些无机离子可以增强或者抑制鲁米诺发

光体系的化学发光,另有一些无机离子可以直接氧化鲁米诺而产生化学发光,在一定的浓度范围内,发光强度与离子的浓度有线性关系,由此可以进行有关测定。Tortajada-Genaro 等[241, 242]基于金属离子对 luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CL 不同的动力学催化特征,采用偏最小二乘法,不需预先的分离,分别同时测定了水样中的 Cr<sup>3+</sup>/Co<sup>2+</sup>及 Co<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>。Osamu Nozaki and Hiroko Kawamoto[243]用乙烯基尿与尿囊素激活已经失活的辣根过氧化物酶(HRP),并用微流注射 HRP 催化 CL 的方法测定了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。最近 Gary W. Miller 等人[244]分别采用基于一种吡啶羧酸酯三氟甲基磺酸酯的 FIA-化学发光的方法(AE-CL)、对羟基苯乙酸的静态荧光方法(POHPAA)对 108 对有广泛的代表性的海洋水样中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量进行了测定,其中 AE-CL 不受丁基过氧化氢及其他痕量金属离子的干扰,是非常理想的测定自然水体中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量的方法。由于有机过氧化物会干扰 POHPAA 的荧光测定方法,通过与 HPLC 方法的测定结果进行对照,并没有发现显著性差异,因此可以说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是海水中唯一可以测定的过氧化物。Morais 等人[245]构建了一种流通式固相基化学发光光学传感器,用于测定水体中痕量的 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>。Mohammad Yaqoob[246]等人基于酸性条件下,磷钼杂多酸氧化鲁米诺的化学发光反应,测定了淡水中的 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>,检测限可以达到 1.0 nmol。将样品流经亚氨基双乙酸盐螯合柱可以消除阳离子的干扰,加入酒石酸可以掩蔽硅酸盐的干扰,而其他的阴离子不干扰测定。他们最近[247]通过将硅酸盐转化为硅钼杂多酸,然后利用鲁米诺的化学发光反应测定了淡水中的硅酸盐,用阴离子交换微柱消除了 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>的干扰。Pavel Mikuka 和 Zbynk Veeva[248]通过在线光分解,将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>转化为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,基于与鲁米诺的化学发光反应,可以同时测定水体中的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,其中阳离子的干扰可以通过阳离子交换柱而消除,而水中普通的阴离子不会引起干扰。赵慧春等人[249]基于 [Eu(EDTA)]<sup>-</sup>对 NaIO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CL 反应的增敏作用,测定了稀土氧化物样品中 Eu 的含量。章竹君等人[250]构建了一种反应物体积自动控制的微型设备,其中有一个空气驱动流体的控制平台,用于流动注射-化学发光测定全血中的氰化物。设备中包括一个微型蒸馏器用于提取血液中的 CN<sup>-</sup>,其提取效率可以达到 98%以上。Nacapricha 等人[251]介绍了一种 FI-CL 的测定碘化物的方法,先在样品区将碘化物氧化成 I<sub>2</sub>,然后基于 I<sub>2</sub>-Luminol 的化学发光反应测定碘化物。采用一个气体扩散单元可以选择性测定 425nm 的发光强度。实验中还采用了膜控制的方法提高了方法的精密度与灵敏度。Meseguer-Lloret 等人[252]基于过氧草酸的化学发

光反应, 粪卟啉 I 作为荧光物质, 测定了水中的  $\text{Cu}^{2+}$ , 其检测限达到了  $9 \mu\text{g/L}$ , 仅有  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  干扰测定, 且其容忍限度远高于在水体中的正常浓度。另外, 最近有两篇关于磷的测定的综述性文章[253, 254], 介绍并比较了各种测定方法, 其中包括 FI-CL。Pradana Pérez 等[255]报道了在强碱性介质中, V(IV) 可以催化 3, 4- 吡啶二羧酸酰肼/ $\text{H}_2\text{O}_2$  化学发光反应, 基于此建立了测定水样中 V(IV) 的 FI-CL 方法。Tomás Pérez-Ruiz 等[256]基于偶合化学发光反应建立了测定蔬菜中草酸盐的方法。草酸盐可以催化甲基红与重铬酸盐的化学反应, 而生成的  $\text{Cr}^{3+}$  又可以催化 luminol 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  的化学发光反应。Neil W. Barnett 等[257]基于在稀硫酸的六偏磷酸钠介质中, As(III) 与  $\text{KMnO}_4$  的化学发光反应测定了水样中的 As(III), 实验发现介质中可以与  $\text{KMnO}_4$  发生反应的几种离子如  $\text{S}^{2-}$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  有干扰。宋正华等[258]基于  $\text{Co}^{2+}$  对鲁米诺与溶解氧的化学发光反应的明显的催化效果, 测定了蛋黄、鱼肉及人的血清样品中痕量的  $\text{Co}^{2+}$ , 所得结果与放射性免疫测定的结果相吻合。

### 5.1.5.3. FI-CL 在生物医学样品分析中的应用

相当广泛的生物医学样品通过酶转换反应, 生成  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 然后再基于鲁米诺或过氧化草酸酯的化学发光反应进行定量测定。Fletcher 等人[201]对 1995-1999 年间的文献作了较好的综述。Kricka[43]综述了近年来化学发光在常规临床试验及各种临床研究中的应用。在常规临床试验中, 化学发光标记试剂(吡啶酯、吡啶磺胺)以及用于过氧化物酶、碱性磷酸酯酶标记的测定反应, 如鲁米诺、1, 2-二氧杂环丁烷类化学发光反应, 被广泛应用于免疫测定及核酸探针的测定。在临床研究中, 由于化学发光具有高的灵敏度及宽的动力学测定范围, 已经广泛应用于蛋白质与核酸印迹、微阵列碱基测定、监控活性氧种类等, 以及作为检测应用于 HPLC、CE 分离后的物质测定及流动注射的分析手段等。林洁华等[38]介绍了基于电化学及化学发光反应并用于测定肿瘤标记物的免疫传感器近年来的发展、挑战及发展趋势。本文主要就近年来的发展作一简单介绍。

赵慧春等人[259]基于能线性猝灭  $\text{Ce(IV)}-\text{Na}_2\text{SO}_3-\text{Tb(III)}-\text{氟喹诺酮(FLUQ)}$  抗生素体系化学发光强度的现象, 建立了测定 DNA 的 FI-CL 方法。通过光谱研究得出, DNA 能猝灭化学发光的原因是由于其阻碍了一部分能量从 FLUQ 转移



给 Tb(III)的结论,并且认为这与其结构中的碱基及  $\text{PO}_4^{3-}$  结构有关。马永军等[260]基于 DNA 能增敏在稀酸介质中, Ce(IV)/RhB 化学发光强度,测定了超痕量的小牛胸腺 DNA 和鲑鱼精 DNA, DNA 需预先用咪唑/盐酸(pH 7.0)缓冲溶液进行活化。Sariahmetoglu 等[261]基于褪黑激素对鲁米诺化学发光反应的抑制作用,评定了褪黑激素的抗氧化效果。李保新等[262]采用 FI-CL 提出一种自动测定化学需氧量的方法,有机物首先与  $\text{KMnO}_4$  发生反应,产物  $\text{Mn}^{2+}$  被吸附到强酸性阳离子交换小柱上,而反应剩下的  $\text{KMnO}_4$  则不被吸附,然后洗脱  $\text{Mn}^{2+}$  并由 Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  化学发光反应体系进行测定,检测限可以达到 2mg/L。Jason W. Costin[263]等采用酸性  $\text{KMnO}_4$  化学发光反应体系,对葡萄酒中的总酚含量及抗氧化剂水平进行了检测,所得结果与其他方法相比,有很好的相关性,而且发现化学发光法所受的干扰较少。Hsiu-Chen Hong 等[264]基于 HRP 对 Luminol-CL 反应的增强作用,借助尿酸酶-HRP 结合琼脂糖凝胶柱,测定了血清及尿样中的尿酸含量。林洁华等[265]基于 FI-CL 非竞争酶免疫测定的方法对癌胚抗原进行了测定。林金明等[266]基于在胶束介质中,胆红素与在线产生的过氧亚硝酸盐的化学发光反应,测定了血清中的总胆红素,该法克服了 TCPO-CL 法中 TCPO 不溶于水的缺点,且抗干扰能力强,避免了其他氧化剂如次氯酸钠、 $\text{I}_2$  等与胆红素反应的干扰问题。卢建忠等[267]基于碱性条件下, Luminol- $\text{NaIO}_4$ -半胱氨酸的化学发光反应测定了药品中半胱氨酸的含量。Jason W. Costin 等[268]采用  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  CL 体系测定了葡萄酒中的脯氨酸,实验表明,在 pH10 时其它氨基酸及葡萄酒中的共存成分不干扰测定。但对红葡萄酒的测定,需要用固相萃取的方法除去酚类物质,以减少对  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的消耗。Nahid Amini 和 Ian McKelvie[269]介绍了一种测定沉积层孔隙水及沉积层提取物中卵磷脂的方法,试验包括在控制孔径的填充反应柱中,多种酶的共同固定技术,卵磷脂的酶反应的最后产物是过氧化氢,通过  $\text{Co}^{2+}$  催化的鲁米诺化学发光反应进行测定,检测限可以达到 0.14 $\mu\text{M}$ 。黄玉明等[270]采用猪肝作为分子识别单元,尿酸在组织柱中的尿酸盐氧化酶催化下,被氧气氧化,产生过氧化氢,最后基于  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Luminol/ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  化学发光反应被测定。该文将动物组织作为识别单元,构建化学发光传感器,通过偶合化学发光反应测定了血清及尿样中的尿酸含量。谢增鸿等[271]基于酸性高锰酸钾化学发光反应测定了药片及自来水中的三种雌激素。梁耀东等[272]基于色氨酸- $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{NO}_2^-$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$  化学发光反应,构建了测定药片及血清中色氨酸的方法。

Polyxeni Panoutsou[273]采用 FIA/SIA 结合的方法, 基于偶合化学发光反应, 利用可溶性葡萄糖氧化酶建立了快速测定葡萄糖的方法, 用于饮料及蜂蜜中葡萄糖的测定。Jacqui L. Adcock 等[274]使用单柱色谱与酸性高锰酸钾化学发光结合, 不需经过提取步骤, 可以直接测定尿样中的神经传递素代谢物。

#### 5.1.5.4. FI-CL 在农药分析中的应用

农药是指用来防治农林牧业生产的有害生物(包括害虫、害螨、线虫、病原菌、杂草及鼠类)和调节植物生长的化学物质。农业生产中施用农药后, 一部分农药直接或间接残存于谷物、蔬菜、果品、畜禽产品、水产品中以及土壤和水体中的现象, 称为农药残留。我国发生较多的引起农药残留中毒的农药品种主要是有机磷农药和氨基甲酸酯农药。这些农药是通过抑制昆虫中枢神经中的胆碱酯酶使之死亡而发挥杀虫作用的。但这些农药对人体内的胆碱酯酶也有抑制作用, 它能阻断神经递质的传递, 引起肌肉麻痹造成中毒。

随着农药品种和施用量的不断增加, 农药残留问题日益突出。根据中国国家质监总局公布的 2001 年第三季度食品卫生抽样调查结果, 我国 23 个大中城市的 181 种蔬菜中, 有 86 种蔬菜的农药残留量均超出标准限量值, 超标率为 47.5%。2001 年 8 月 9 日的《参考消息》报道, 欧盟委员会宣布: 在欧洲人食用的水果、蔬菜和谷类食品中, 有 1/3 含有杀虫剂, 有 1/2 的农作物杀虫剂含量超标。目前, 农作物农药残留已是世界范围内影响食品安全的主要因素之一。我国已加入世界贸易组织, 农产品对外贸易将日益加大, 国际上对我国农产品的质量要求也越来越高。在世界贸易格局向更自由化方向发展的过程中, 今后国际贸易的保护主义将更多地运用高技术标准措施抵制外国商品的进入, 以环保为名义的绿色壁垒将成为一种最大的、受到保护和鼓励的非关税贸易壁垒。联合国贸易发展会议的一份资料表明中国每年有多达 74 亿美元的出口商品受到绿色壁垒的负面影响, 我国纺织品贸易、茶叶出口已倍受绿色壁垒的打击。因此, 农药残留和检测体系建设工作将成为今后一段时间内我国政府和农业部门工作的热点。

对于农药残留的分析, 目前最广泛使用的是气相色谱法, 液相色谱法, 色谱-质谱联用法, 近年来免疫分析法, 生物传感器等也用于农药残留分析。

由于化学发光方法本身所具有的高灵敏度及便于与流动分析系统结合的特

点,使之非常适合于测定环境及蔬菜食品中农药的残留研究, Laura Gámiz-Gracia 等人[275]对 1991-2003 年间基于直接或间接的各种化学发光反应体系结合流动注射或者 HPLC 在农药分析中的应用进行过综述,其中还包括了化学发光免疫测定技术。

Hiroaki Kubo 等人[276]报道了硫代氨基甲酸酯杀真菌剂在碱性条件下与鲁米诺在催化剂存在时的化学发光现象,  $K_3Fe(CN)_6$  作为氧化剂和共氧化剂、 $K_4Fe(CN)_6$  作为抑制剂用于反应体系中,为了解释该反应机理,进行了电子自旋共振测量,通过使用自旋捕获试剂,发现硫代氨基甲酸酯杀真菌剂在碱性溶液中有羟基自由基生成。Adcock[277]等基于  $Ru(bpy)_3^{2+}$  的化学发光反应,可以无需分离直接选择性测定工业或商品形式中草甘膦单异丙铵盐的含量。Soto-Chinchilla[278, 279]等先将 N-甲基氨基甲酸酯在紫外光照射下,降解生成甲胺,然后用邻苯二甲醛将其衍生为荧光物质,再借助咪唑催化的过氧草酸酯化学发光反应定量测定,采用 SDS 胶束溶液做载流以避免过氧草酸酯在水溶液中的快速降解反应,借此可以测定自然水体及蔬菜样品中的西维因残留及水体中 N-甲基氨基甲酸酯的总量。Huertas-Pérez 等人[280, 281]则基于西维因与克百威两种 N-甲基氨基甲酸酯杀虫剂对碱性介质中 Luminol- $KMnO_4$  化学发光反应的增敏,分别测定了西维因与克百威在蔬菜样品及水体中的残留量,检测限分别达到了 4.9 ng/mL 和 0.02 $\mu$ g/mL。José Antonio Murillo Pulgarín 等人[282]最近基于其与  $Ce(IV)-HNO_3-Rh6G$  的化学发光反应,测定了农药产品中的西维因。实验采用了固相萃取来富集并将其从基体中分离出来,该法选择性好,其它含萘的杀虫剂如安图等均不干扰测定。Ioan M. Ciomasu[283]等人研究了一种用于野外分析的新型的、通用的微型流动注射免疫传感器。其生物识别单元是一种对待分析物有特异性识别作用的抗体,将其固定于单用途可替换芯片内部的锥形结构的金表面。该芯片同时又含有酶结合物及样品池。在最后一步,酶结合物与待分析物因为抗体-抗原结合位点的竞争,产生化学发光信号,且该信号在给定的浓度范围内,与待分析物的浓度有反比关系。该仪器用于硝化芳香烃及杀虫剂的测定。

## 5.2. 化学发光与分子印迹聚合物技术的联用

化学发光分析法,以其简单、快速、灵敏、线性范围宽等优点已经被广泛的

应用于许多有机物和无机物的分析,但是,选择性差却限制了该方法在复杂样品中的应用。为了提高化学发光的选择性,化学研究者主要从两个方面来考虑:一是和免疫技术相结合,取得了一定的成绩,但其中用到的酶试剂不稳定,容易失活。其二是和分离技术相结合,如高效液相色谱,气相色谱,毛细管电泳等,但 these 方法所需仪器昂贵,操作复杂,而且化学发光检测往往是在柱后进行,当分离条件和化学发光条件不相容时,则很难应用化学发光分析法来检测。

分子印迹聚合物(Molecularly Imprinted Polymer, MIP)技术是近年来出现的制备对目标分子具有特异性识别的高分子聚合物的合成技术。在理想状态下,由于印迹聚合物中空腔的空间结构以及空穴中功能基团的种类、数量和位点均与目标分子高度互补,因而它能有效地识别目标分子。其识别目标分子的能力可以和抗体-抗原、酶-底物、受体-激素间的特异性识别相媲美,但却有抗体、酶、受体等生物活性物质所不具备的对环境(高温、高压、强酸、强碱、强离子强度)的耐受性和长寿命。由于分子印迹聚合物这些优良特征,使之成为分子识别材料中的佼佼者。目前,分子印迹技术已在色谱分离、固相萃取、化学仿生传感器、模拟酶催化、药物分析等领域取得一定的进展,并呈现出良好的应用前景。将分子印迹聚合物应用于化学发光分析中,这方面的研究最近几年发展较快,如将 MIP 的细小颗粒填充在流动注射化学发光分析系统的流通池(反应池)中,利用分子印迹聚合物对目标分子特异性识别和捕获能力,使目标分子与样品中的共存物质分离并在填充的分子印迹聚合物上吸附,然后进行化学发光检测,从而能显著地改善化学发光分析的选择性。许多研究者基于该思路作了这一方面的试验探索。

Karsten Haupt[284]利用非相关分子探针,基于分子印迹聚合物构建竞争性平衡键合实验测定 2, 4-二氯苯氧乙酸,测定类似于竞争固相免疫测定,但是用印迹聚合物代替抗体,非相关分子探针代替标记抗原。分别采用荧光、化学发光和电化学进行测定。

林金明等[285]用化学发光的方法研究了  $\text{HSO}_5^-$  在水溶液中的分解机理。荧光有机物质(FOCs)可以增强  $\text{KHSO}_5/\text{Co}^{2+}$  体系弱的化学发光。研究发现, $\text{KHSO}_5/\text{Co}^{2+}$  催化分解的产物单线态氧是该体系的发光体。FOCs 被  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  氧化成小分子而分解同时产生光发射。将该法用于 FOCs 的流动注射化学发光分析,检测限可达  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  M。将丹磺酰-L-苯基丙氨酸(FOCs)作为模板分子合成了印迹分子聚合物。 $\text{HSO}_5^- / \text{Co}^{2+}$  混合溶液流经印迹分子聚合物构建的化学发光流通

池时,模板分子与  $\text{HSO}_5^- / \text{Co}^{2+}$  作用而发光,同时模板分子被分解留下孔穴和特定的形状,待下一次分析测定。他们还基于分子印迹方法合成了一种功能聚合物用于催化化学发光反应,并对 1, 10-邻二氮杂菲具有分子识别能力[286]。将该过渡金属的结构和催化相互作用应用于材料设计。首先合成由 4-乙烯基吡啶、 $\text{Cu(II)}$ 、1, 10-邻二氮杂菲(2: 1: 1)组成的三元配合物,并将其作为一种功能单体,三元配合物中的 1, 10-邻二氮杂菲配体被用作分子印迹聚合物的模板分子。苯乙烯作为另一个功能单体、二乙烯苯作为交联剂,与上述三元配合物共聚合成分子印迹聚合物。该聚合物所包含的三元配合物对于过氧化氢的分解是有效的催化剂。过氧化氢分解时生成过氧化物阴离子自由基,与 1, 10-邻二氮杂菲作用而发光。在化学发光反应的同时,1, 10-邻二氮杂菲的结构被破坏,留下与  $\text{Cu(II)}$  键合的位点。制备的聚合物颗粒填入玻璃管,并装配成分子识别化学发光流通传感器用于 1, 10-邻二氮杂菲的测定,并对该传感器的灵敏度和选择性作了相应的探讨。

Ioana Surugiu 等[287]采用分子印迹聚合物代替抗体,研究了一种类似于竞争免疫测定的成像测定技术。抗原 2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D)用烟草过氧化物酶标记,利用鲁米诺的化学发光反应进行测定。用聚乙烯醇胶水将印迹有 2, 4-D 的聚合物微球涂覆到微滴定盘表面,在竞争模式下,将分析物-过氧化物酶配合物与自由的分析物在微滴定盘内孵育,然后与配合物结合的部分被定量测定。加入化学发光底物后,用高通量照相技术测定化学发光强度。校正曲线的响应范围: 0.01-100 $\mu\text{g/mL}$ 。采用分子印迹聚合物代替抗体,研究了一种类似于酶免疫测定的流动注射竞争测定方法[288]。玻璃毛细管内壁修饰上分子印迹聚合物,2, 4-二氯苯氧乙酸(除草剂)用作模板分子,且预先用烟草过氧化物酶标记,用 PMT 或 CCD 化学发光技术来测定。

Svitel 等[289]研制了一种采用化学发光免疫测定杀虫剂的功能化生物传感器。将抗体固定到右旋糖苷增强的表面,检测限可以达到  $10^{-5} \text{ ng/mL}$ 。使用可逆的血凝素-单糖相互作用,可以得到完全可以更新的表面。采用分子印迹聚合物代替抗体,可以得到良好的稳定性。

章竹君等人[290]基于分子印迹聚合物在线富集纳克级的克伦特罗,采用高锰酸钾-甲醛-多聚磷酸-克伦特罗增强化学发光反应,提出一种新型的流动化学发光克伦特罗传感器。尿样中的克伦特罗被选择性吸附,甲醛、高锰酸钾、多聚磷

酸流经流通池并与预先富集的克伦特罗产生反应,产生强的化学发光。实验结果表明,该传感器是可逆的。检测限是:  $3.0 \times 10^{-10}$  g/mL。对克伦特罗测定的相对标准偏差小于 5% ( $n = 3$ )。该方法具有高的选择性和灵敏度,可以用于动物尿样中痕量(ng/mL)克伦特罗的测定。他们还研究了一种基于芯片上的化学发光微流动-注射分析系统( $\mu$ FIA)[291]。该技术采用激光消融,在聚甲基丙烯酸甲酯芯片上构建微通道。采用三采样结构,包括双 T 采样结构、微阀采样结构和具有精确时间控制的注射泵。微柱采用具有特异性分子识别功能包括分子印迹聚合物、酶和细菌等材料提高选择性。这些微流动-注射分析系统( $\mu$ FIA)已经应用于临床分析、食品安全评价、活体和实时药物测量以及药物代谢动力学研究。采用类似的方法,化学工作者合成了多种以药物为模板分子的分子印迹聚合物,并以此作为识别材料,结合化学发光技术研究了在复方药或复杂基体如尿样中药物含量的测定,从而拓展了该方法在化学发光中的应用,提高了化学发光法的选择性及实用性[292-298]。

### 5.3. 电化学发光

#### 5.3.1. 基本原理

电化学发光(又称电致化学发光, ECL),是指通过电化学的方法在电极表面产生一些特殊的物质,这些物质之间或与体系中其它组分之间通过电子传递形成激发态,由激发态返回到基态产生发光现象,是电化学与化学发光方法相结合的产物,因此具备电化学技术与化学发光分析技术二者共同的优点,如:灵敏度高,选择性好,检出限低,分析应用广,仪器设备简单,操作方便,可以进行连续在线分析,容易实现自动化,可将发光物质固定到电极上,构建电化学发光传感器等。但是,有机离子湮灭反应电化学发光为了避免水和氧对激发态的猝灭,必须在有机溶剂中进行,从而限制了它在分析化学中的广泛应用。对于静态电化学发光过程,其重现性较差,需要经常对电极表面进行清洗,使得程序繁琐,分析速度慢。

目前,多种电化学技术,如线性扫描、正矩形和方波扫描、常规脉冲、差分脉冲、多电位阶跃脉冲、计时电流、电位溶出、化学溶出、控制电位电解、恒电流电解和化学修饰电极等都已应用到包括单重态激发和三重态激发在内的各类

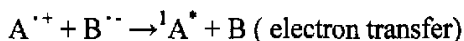
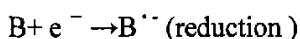
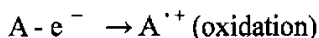
电化学发光体系。

一般按激发态物质的产生历程可以将电化学发光过程分为以下几种类型：

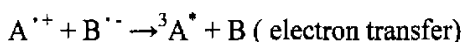
### 1. 湮灭电化学发光：

当对电极施加双阶跃正负脉冲电位时，分子 A 和 B 在电极表面分别被氧化还原为  $A^+$  和  $B^-$ ，这两种物质在电极表面反应生成激发态的  $A^*$ ， $A^*$  返回基态发光。

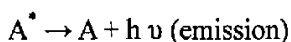
这种反应一般被称作“湮灭”反应，机理如下[299]：



(Energy sufficient system)



(Energydeficient system)



其中 A 和 B 可以是同种反应物分子，也可以不同。 ${}^1A^*$  表示单重激发态分子， ${}^3A^*$  表示三重激发态分子。当电生的氧化剂与还原剂的氧化还原反应能够产生足够的能量以产生激发态分子时，发光反应按照单重激发态途径进行。大多数芳香烃化合物的电化学发光是按照这种机理进行的。反之，如果氧化还原反应产生的能量不足以产生单重激发态分子，就只能按照三重激发态途径进行，单重激发态分子需要通过三重激发态分子之间继续反应来得到。

### 2. 电解产物与共存物质进行二次反应

溶液中存在的另一类物质与电解产物之间发生氧化或还原反应，生成激发态物质，从而产生化学发光。此类电化学发光反应应用范围最广，也可以称其为共反应剂电化学发光反应。

共反应剂是一些在氧化或还原时可以产生具有强还原性或氧化性中间体的物质。产生的中间体能和电化学发光体系的发光体反应生成激发态分子。如三丙胺(TPA)和草酸离子( $C_2O_4^{2-}$ )为吡啶钌电化学发光体系最常用的共反应剂[300, 301]。它们在水溶液中被电化学氧化时产生具有强还原的中间体  $TPA^{\cdot-}$  或  $CO_2^{\cdot-}$  自由基，这些被氧化产生强还原性中间体的共反应剂被称为氧化-还原型共反应剂。

还有一类是被还原后产生具有强氧化性中间体的共反应剂, 被称为还原-氧化型共反应剂[302]。与湮灭电化学发光反应不同, 共反应剂电化学发光反应只需对电极施加单一方向的电位即可。

### 3. 电化学氧化直接发光

电化学氧化一些物质如鲁米诺、维生素 B<sub>1</sub> 等使之生成激发态物质而发光。

### 4. 阴极发光

氧化物覆盖的半导体金属电极在溶液中进行阴极极化时, 可向溶液中注入热电子。由于热电子具有极强的还原能力, 能在半导体表面的特有微环境中与溶液中的氧化组分(如过硫酸盐、氧或过氧化氢等)发生反应, 产生具有化学发光反应活性的强氧化性的自由基, 而这些氧化性的自由基可与溶液中的其他物质进行进一步化学发光反应[303, 304]。

用于此类氧化物覆盖的金属电极一般有: Al, Ta, Mg, Ga, In 等。近年来, 铟锡氧化物 (ITO) 电极的阴极化学发光也受到了人们的重视。Jackson 研究了 ITO 电极的伏安及化学发光特性[305], Sato 等比较了经过 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-链烷硫醇[306]、Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-十三链烷硫醇[307]和 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-11 溴代十一烷基二茂铁[308]等化合物修饰的 ITO 合金电极的阴极发光, 并测定了草酸根离子。利用 ITO 电极表面吸附 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 并产生过氧化物自由基离子, 测定鲁米诺标记的蛋白质等免疫分析方面的应用也有报道[309]。也有利用锡氧化物覆盖的硅电极在阴极脉冲极化时测定一些过渡金属的螯合物的报道[310]。

## 5.3.3. 电化学发光应用

已报道的电化学发光体系有鲁米诺体系、多环芳烃体系、三(2, 2'-联吡啶)钌(III)体系、吡啶酯体系及光泽精体系。这些体系已广泛用于多种无机物、有机物、生物大分子和生物活性物质的测定、功能性分析及免疫分析等。其中研究和应用最多的电化学发光体系为鲁米诺和联吡啶钌体系。

### 5.3.3.1. 鲁米诺电化学发光体系

由于鲁米诺电化学发光体系发光效率高、试剂便宜、氧化电位较低, 在水溶液中, 无需除氧, 已广泛地用于分析测试中。有关鲁米诺电化学发光机理的报道归纳起来, 主要有两种: (1)在电极上产生氧化性物质, 进一步氧化鲁米诺产生化



学发光。在电极上施加一定的电压,从而使溶液中的溶解氧还原成  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  进一步反应产生一些具有强氧化性的氧自由基,这些活性氧氧化鲁米诺产生化学发光;(2)鲁米诺直接接受电极通过的能量生成激发态或自由基离子,从而产生化学发光。

鲁米诺的电化学发光反应不仅可以用来直接测定鲁米诺[311],也可以用来测定鲁米诺标记的物质[312],而且由于  $\text{H}_2\text{O}_2$  的存在能使发光信号极大地增强,因此可以用来测定  $\text{H}_2\text{O}_2$ [313-315]及那些在一定条件下产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  的其它物质,如许多底物和酶[313, 316-320]。一些金属离子[320]和表面活性剂[321]也能催化鲁米诺的电化学发光反应,因而该体系也用于测定这些金属离子和表面活性剂。

Nieman 等人[311]详细考察了溶液的 pH 值、鲁米诺浓度及  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度对鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$ -电化学发光信号的影响,结果表明理想条件是碱性介质(pH 9),但当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度较高时,反应也可以在中性条件下进行。

Kremeskoetter[319]等将葡萄糖氧化酶固定在电极上,插入到一个薄层反应池内,葡萄糖在葡萄糖氧化酶的作用下转化生成  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,然后用鲁米诺的电化学发光反应测定生成的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,实现了对葡萄糖的测定。Laespada[313]等将 FIA 技术引入 ECL 检测,葡萄糖先在其氧化酶的作用下生成  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,再通过定量进样阀注入另一条流路中的鲁米诺缓冲溶液中,进行电化学发光测定。由于酶促反应和电化学发光反应均在各自最佳条件下进行,所以可以实现高灵敏度测定。

方禹之等[322]在偶联活化剂碳二亚胺(EDC)的存在下,以异鲁米诺 ABEI 标记已知序列的寡聚核苷酸片断,成功地制备了 ABEI-DNA ECL 探针,并应用于未知序列 DNA 的识别及含量测定,获得满意结果,对 DNA 的测定达到  $10^{-11}$   $\text{mol/L}$ 。与鲁米诺相比,其衍生物的发光效率虽然较低,但由于其分子结构上含有特殊的基团,使得它们更容易标记生物大分子,而且标记反应会使其发光效率进一步提高,因此,该类物质在生物物质的电化学发光分析,尤其是免疫分析和核酸杂交分析方面会发挥越来越重要的作用。

### 5.3.3.2. 三(2,2'-联吡啶)钌(III)电化学发光体系

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  是研究最多,应用最广的一种电化学发光物质。这是由于  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的电化学发光具有如下特点:

1. 发光反应可以在相对较低的电位(1.2 V)下进行,且发光效率高,试剂可以

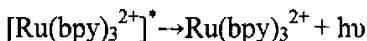
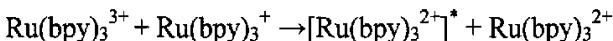
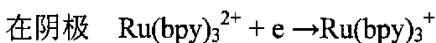
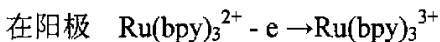
循环使用;

2. 发光反应不仅可以在有机相中进行, 而且可以在中性的水相中进行, 与生理条件相近, 可以方便的用于生物物质的分析;

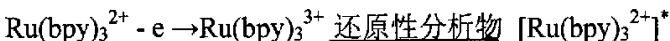
3. 无论是固体物质还是其水溶液都可以长期稳定的保存, 且发光效率不变;

4. 发射波长位于可见光区, 便于观测。

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的电化学发光反应机理如下:



激发态的  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^*$  也可以从其它途径获得:



可以借此类反应测定相关的分析物。如中性胺的自由基具有足够的能量同  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  或  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  反应产生激发态的  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^*$ 。

1987 年 Danielson 等[323]首先报道了  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  与烷基胺的 ECL, 指出 ECL 强度与胺本身的结构有关。对伯仲叔胺而言, 由于它们氨基的第一级电离所需能量为伯>仲>叔胺, 使得它们的 ECL 强度为伯<仲<叔胺。同时他们还发现同一类烷基胺随烷基链的增长, 其 ECL 强度也增强, 这符合烷基胺化合物随烷基链增长而氨基离子化电位减少的规律。1990 年 Leland 等[324]进行了一些含氮有机化合物与  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的 ECL 的研究, 并提出了可能的反应过程。

虽然  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  也可用化学或光化学法氧化  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  得到, 如  $\text{PbO}_2$ 、 $\text{KMnO}_4$ 、铈(IV)等作氧化剂, 但化学氧化法产率低, 难于在反应中供给一个很稳定的试剂源, 且引入杂质。这类电化学发光体系已成功地用于有机酸类、胺类、氨基酸和蛋白质、多种药物分析及免疫分析等[325-331]。目前,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  及其衍生物有机单分子层在电极表面的电化学发光的研究引起了人们很大的兴趣[332], 在这一领域的研究主要由于  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  及其衍生物在金电极表面有特殊的亲和力, 结合显微技术, 可检测小数量的活性分子在单分子层及溶液界面的分布。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  及其衍生物的聚合膜的 ECL 已有报道[333], 这些聚合膜在光发射电子显示器材上的应用有一定的前景。

## 5.4. 化学发光与高效分离技术的联用

化学发光检测器的结构简单,灵敏度高,线性范围宽,近年来颇受重视,在大多数情况下,它的灵敏度为紫外-可见检测器的 2-3 倍,由于它没有光源,不存在散射光引起的背景,用于荧光物质检测时,灵敏度比荧光检测器更高,对某些物质的检测甚至可与激光诱导荧光检测器比美,其弱点是许多化学发光和生物发光体系选择性比较差。如何提高化学发光分析法的选择性,这一直是其发展的重要方向之一。

液相色谱和毛细管电泳具有高效的分离特性,较快的分析速度和较高的灵敏度,已成为一种非常有效的分析复杂样品的技术。液相色谱和毛细管电泳的分析灵敏度决定于它所使用的检测器。常用的有紫外-可见检测器,荧光检测器,化学发光检测器和电化学检测器。将高灵敏度的化学发光检测技术与高效能、高分辨率的高效液相色谱和毛细管电泳技术以适当的方式相结合,可以为人们展示一个分离效能高、检测限低、分析速度快的方法。有关这方面的文献报道及综述也相继出现[231, 334-341]。

### 5.4.1. 化学发光与高效液相色谱技术的联用

液相色谱化学发光检测仪主要包括分离柱、泵系统、混合器和化学发光检测器。柱后的反应和化学发光检测是这一联用方法成功的关键。

液相色谱和化学发光检测理想的结合应该是以恒定的、均匀的流速无脉动输液,流动相对化学发光检测不影响,柱后混合均匀,无死体积,混合与发光检测同时进行,光检测灵敏且无背景干扰,即化学发光和色谱分离均以最优条件结合。然而,这在实际应用中很难实现,由于化学发光的最佳条件,往往并不是分离的最佳条件,反之亦然。例如,离子色谱分离金属离子,常用酸性流动相,而金属离子与鲁米诺的化学发光反应多在  $\text{pH}>10$  时有最强的发光强度;对于泵系统,很难达到真正的无脉动、均匀输液。因此,实际分析中往往要综合考虑各方面因素,既要有利于分离又能保证灵敏、稳定的检测。

要获得好的分离和灵敏的检测,一般要选择下列条件:(1)流动相的选择应与化学发光检测相适应,选择的溶剂既不应增加背景,也不应该熄灭化学发光信

号；此外还要考虑发光试剂在其中的溶解度，以避免生成沉淀。(2)缓冲溶液及其 pH 值的选择。由于 pH 对化学发光反应的发光强度和寿命影响很大，选择合适的 pH 值很重要，加缓冲溶液使流动相和反应试液均可得到缓冲，可控制一定的 pH 值，并且要选择合适的化学发光试剂，以适应不同的 pH 范围。(3)流速的选择要保证能分离完全，并要考虑减小死体积，使混合均匀，获得较强的化学发光信号。(4)发光试剂浓度的选择应有利于提高信噪比。一般浓度大时易获得较强的发光，但较高浓度的化学发光试剂易在与流动相的混合过程中生成沉淀，增加干扰，反而不利于化学发光的检测。(5)所用试剂均应纯化，以减小化学发光背景信号。(6)输液泵的脉动会引起试液浓度的局部变化，提高背景噪音，所以应尽可能保证均匀、恒定、无脉动流速输液。可用注射泵，但其容量小，实际多用往复泵，后加阻尼器，减小脉动。也可用惰性气体压缩输液。(7)化学发光检测器的设计应能检测到最大的发光强度，死体积要小，且价格便宜、仪器简单、易于操作、分析速度快。为此，应使用短的混合反应管和高效光收集装置(如高质量光电倍增管及光子计数器的使用)，并使流通池尽量靠近光电倍增管。

各类主要化学发光反应都已用于液相色谱或毛细管电泳的化学发光检测，其中荧光化合物及其衍生物的检测，多是利用过氧化草酸酯体系，被分离的荧光物质或柱前、柱后衍生的荧光物质，通过化学发光反应过程中的能量转换而发射光子，用光电倍增管进行检测。近年来， $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的化学发光或电化学发光体系、 $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{Ce}(\text{IV})$ 、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 等化学发光体系在液相色谱中的应用也逐渐引起重视。

卢建忠等人[342]采用 4-(1'-氰基异吲哚基)苯基异硫氰酸酯(CIPIC)作化学发光试剂，氨基酸与 CIPIC 偶联反应及环化反应后，生成的乙内酰硫脲衍生物被分离及测定。并用 LC-MS、NMR 对化学发光反应的中间体及发光体的结构进行了研究。

T. Ikehara 等人[343]将  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电化学发光体系与 HPLC 联用，测定了鼠尿样品中的羟基脯氨酸。S. Meseguer-Lloret 等[344]先将铵类物质用丹磺酰氯衍生化，然后采用 HPLC 柱后  $\text{TCPO-H}_2\text{O}_2$  CL 的方法测定了不同水体中的铵类物质，并与克氏定氮法结合测定了水体中氮的总量。

崔华等[345]采用 HPLC 与  $\text{Ce}(\text{IV})\text{-Rh6G-H}_2\text{SO}_4$  化学发光相结合的方法，测定了化妆品洗涤液及食品中的 4 种苯甲酸酯类防腐剂。且 HPLC 所使用的流动相

与化学发光条件相匹配。后来他们还用类似的体系测定了 20 种酚类物质，并用于红葡萄酒中酚的测定[346]。采用等度洗提 HPLC-KMnO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-β 环糊精 CL 法测定了蜂蜜中四环素类药物的残留[347]。

T. Pérez-Ruiz 等人[348]采用自动固相萃取-HPLC，柱后 UV 光降解，将亚硝酸胺降解为胺类物质，然后与在线光氧化产生的 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>，产生化学发光，测定了水体中的亚硝酸胺残留，其灵敏度比 UV 提高了 9-280 倍。

M. Martínez Galera [349] 等用 HPLC 分离，柱后 UV 光辐射进行衍生处理，基于 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/NaOH-乙腈化学发光体系测定了 9 种拟除虫菊酯杀虫剂的光解产物。由于化学发光强度随着乙腈浓度的增大而增大，因此流动相选用高百分率的乙腈，将该法用于番茄中的拟除虫菊酯杀虫剂残留测定。

H. N. Choi 等[350]采用溶胶-凝胶法固定 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>ECL 传感器，用反相 HPLC 测定了人类尿样中的吩噻嗪衍生物及红霉素，具有较好的选择性，可用于生物流体中上述物质的测定。

Hitoshi Kakimoto 等[351]用 HPLC 与荧光或化学发光联用，测定了 7 个城市空气微粒中的多环芳烃及硝基多环芳烃，并对其污染源进行了数据分析。

Hitoshi Kodamatani 等[352]基于 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> CL 与 HPLC 联用，测定了土豆球根中的多种配糖生物碱。他们还研究了 HPLC-光化学降解-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> CL 法测定芳香化合物[353]，研究表明，化学发光强度与芳香环的数目、UV 辐射时间、取代基的类别等有关，将该法用于茶叶中儿茶酚的含量测定。

Jorge J. Soto-Chinchilla 等[354]先用荧光胺衍生化，HPLC 分离，柱后咪唑催化，过氧草酸酯化学发光测定的方法测定了牛奶中低浓度水平的磺胺药物残留。

林金明等[355]基于多酚-酸性 KMnO<sub>4</sub> CL 反应，与 HPLC 联用，可同时测定多种多酚，结合固相萃取，测定了河水中的多酚。

George Z. Tsogas 等人[356]研究了载流溶剂预氧化对连苯三酚氧化 CL 的抑制效果，拓展了 CL 技术的应用。研究表明，响应信号与溶剂、连苯三酚的氧化剂及溶剂的预氧化剂的混合溶液有关，并将其用于 HPLC-CL 联用分析。后来他们[357]又进一步研究了 LC 中的溶剂与直接化学发光反应中常用的氧化剂的兼容性。结果表明，温和的氧化剂，如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IO<sub>4</sub><sup>-</sup>、Ce(IV)、ClO<sup>-</sup>与普通的反相 HPLC 中的溶剂匹配，而酸性 KMnO<sub>4</sub> 可以氧化有机溶剂产生强的化学发光信号。解决的方法是采用温和氧化剂在线柱后预氧化有机溶剂。

Kazuichi Hayakawa 等[358]先将 3 种硝基茈代谢产物经 Pt/Rh 涂层的  $\text{Al}_2\text{O}_3$  还原柱, 将其还原为相应的氨基衍生物, 然后过浓缩柱, 分析物经转换阀进 ODS 分离柱, 最后由 TCPO- $\text{H}_2\text{O}_2$ -CL 系统进行测定。

化学发光和色谱联用, 解决了化学发光选择性差的问题, 在各个方面有较为广阔的应用前景。由于其具有的高灵敏度和分辨率, 今后必将成为非常有效的痕量及超痕量分析的有效手段。但某些化学发光反应体系与色谱体系偶合的条件还需要进一步研究和优化。拓宽分析物的范围、化学衍生、标记及固定化酶技术的深入研究是此类分析方法的重要发展方向。

#### 5.4.2. 化学发光与毛细管电泳技术的联用

近年来, 毛细管电泳 (CE) 研究进展迅速, 被认为是当代分析科学最具活力的前沿研究领域。纵观电泳的发展历史, CE 的成功毫无疑问在很大程度上取决于窄径毛细管的使用。由于毛细管具有良好的散热效率, 允许在其两端加上高至 30 kV 的高压, 因而可实现高效、快速分离。同时, 窄的内径使 CE 具有很低的质量检出限和仅需要少量的样品等优点, 尤其适合于生物样品分析(如单细胞分析等); 但同时, 窄的内径给样品组分的检测带来了困难, 对检测技术提出了较高的要求。如何提高检测的灵敏度, 同时又不造成明显的区带展宽, 一直是 CE 技术发展中的一个关键问题。一个理想的毛细管电泳检测器应具备以下特点: 1、灵敏度高; 2、设计简单; 3、死体积小, 且对柱分离影响不大; 4、价格低廉; 5、应用范围广; 6、直接检测, 无需额外的化学反应; 7、检测不受分离电压的影响。自毛细管电泳诞生之日起, 人们对其检测技术就给予了足够的关注。时至今日, 仍没有一种检测器能同时满足上述要求。如紫外-可见检测通用性好, 仪器便宜且操作简单, 但灵敏度不高。在 CE 的其它类型检测器上, 人们也做了许多努力。电化学检测仪器简单, 灵敏度也较高, 但要求被测组分具有电活性。此外, 分离高电压对检测可能会产生影响, 用于实际样品分析时电极可能也会受到污染。激光诱导荧光(LIF)检测灵敏度很高, 且具有良好的适应性能, 已成功地用于单分子检测。然而, 除了仪器昂贵外, LIF 对非荧光物质还需进行柱前或柱后衍生。除了 LIF 外, 质谱、核磁共振和拉曼(Raman)检测也已应用于 CE 中, 但这些检测方法的仪器不是昂贵就是较为复杂。化学发光(CL)是可选择的另一种检测方法。化学发光光学系统简单、无须外加光源和分光系统, 背景噪音低, 避免了杂

散光和光源不稳定性的影响,因而可提供与 LIF 相当的灵敏度。同时, CL 是实现小体积,在线检测的理想方法,主要是由于它的反应速度快,允许在相对大体积的流动池中快速检测,减小因为体积扩散而带来的影响,使它接近于理想的 CE 检测器。只要 CL 的反应速度足够快,分析物在大量扩散到周围溶剂前使发光快速发生并结束,这样依然能得到相当窄的峰宽。这就是所谓的“化学窄带”效应。将 CE 与 CL 结合,以高效的分离来弥补 CL 选择性差的缺点,以 CL 高的灵敏度来弥补 CE 中样品取样量少,难以检测的缺点,融合了 CE 高分辨率和 CL 高灵敏度的优点,可直接用于复杂样品中微量组分的分离和测定。

近年来,随着研究的不断深入,CE-CL 充分展示了其诱人的发展前景和潜力。1994 年, Baeyens 等人[359]首次评述了化学发光作为检测技术的性能、应用和限制。最近几年研究者们从不同角度对该技术的进展进行了评述[43, 124, 339, 341, 360-365]。其中, X.Y. Huang 等人[341]综述了毛细管电泳及微芯片毛细管电泳化学发光测定的应用,并讨论了其发展前景。Ana M. García-Campaña 等人[364]综述了化学衍生生物分子,然后化学发光与毛细管电泳联用,采用普通的发光系统对生物活性物质及药物进行测定,阐明了直接氧化化学发光、生物发光及基于上述发光原理构建生物芯片的发展潜力。

CE - CL 法的仪器组装相对简单,由于它不需要光源,检测部分一般只需要光电倍增管即可。然而, CE 中的 CL 反应需要在线引进一种或两种发光试剂到反应体系中,这样在 CE-CL 的接口设计中,分析物和 CL 试剂的混合方式和检测池的体积大小是取得良好分离效果和灵敏度的关键。同时 CE 分离的 pH 条件与 CL 反应的 pH 值间的相容性在设计中也需要严格地考虑。基于柱后流体的混合模式不同,接口设计可分为合并流,共轴流和池混合等方法。同时根据检测器的位置分为离柱,在柱和柱端检测等方法。

各种化学发光体系已用于毛细管电泳检测中,其中 luminol 及其衍生物的反应是 CE-CL 检测中应用最为广泛的一类发光反应。

章竹君[366]等人基于氨基酸对 Luminol-BrO<sup>-</sup>-CL 的抑制作用,结合毛细管电泳技术,测定了氨基酸注射液中的 7 种氨基酸。他们还基于 Cr<sup>3+</sup>对 Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CL 的催化作用,在线将 CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 还原为 Cr(III),然后依据不同的迁移时间,同时测定了 CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>和 Cr(III)[367, 368]。Wang[369]等基于毛细管区带电泳-在线化学发光测定的方法分离并测定了 7 种单糖,并将该法用于老鼠脑微

渗析样中葡萄糖的测定。

程介克等[370]将 4 种生物起源的胺, 先用 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺标记, 然后在线化学发光-胶束电动色谱结合进行分离测定。考察了毛细管区带电泳及胶束电动色谱的分离效果。并将该法用于湖水中生物起源的胺的测定。

Jiang 等[371]报道了基于改良的毛细管电泳-间接化学发光法测定烟叶中的绿原酸及芦丁的研究。他们采用高电势缓冲溶液池避免了 Luminol 的电解和 CL 基线的偏移, 采用低电势流通池, 避免电极缓冲溶液被 CL 反应废液所污染。

李华等[372]基于原儿茶醛、原儿茶酸对 Luminol- $K_3Fe(CN)_6$  CL 增敏作用, 结合毛细管电泳分离测定了药品中原儿茶醛、原儿茶酸的含量。Hu[373]等基于酚类物质能够被  $K_3Fe(CN)_6$  氧化, 使儿茶酚胺定量猝灭 Luminol- $K_3Fe(CN)_6$  CL 信号, 采用间接化学发光-毛细管电泳法测定了 4 种儿茶酚胺。Tsukagoshi 等[374]报道了采用异鲁米诺异硫氰酸酯标记, UV/CL 双检测器测定氨基乙酸、双甘氨酸等的方法。Zhao 等人[375, 376]报道了基于扑热息痛对 Luminol- $K_3Fe(CN)_6$  CL 的抑制作用及叶酸对 Luminol- $BrO^-$  CL 的增强作用, 采用毛细管电泳分离, 化学发光检测扑热息痛及叶酸的方法。

汪尔康等[377]基于  $Ru(bpy)_3^{2+}$  电化学发光测定技术与毛细管电泳分离相结合, 测定了苯海拉明, 其中使用铂圆盘电极做工作电极, 考察了电势及缓冲条件的影响, 并用于兔子血浆及尿样的测定。

林金明等[378]基于  $KMnO_4$  CL 反应, 以多巴胺及儿茶酚为模型样品, 构建了 3 通道, 5 液池, 1 个检测池的毛细管电泳微芯片分离与在线 CL 测定的方法。

Tsukagoshi 等[379]设计在毛细管电泳中, 用 3 根不同的毛细管: 普通毛细管、含聚合物的毛细管、含 SDS 的毛细管与化学发光结合, 用于测定  $\alpha$ -氨基酸、蛋白质及酚类物质。由于是在毛细管末端的微空间面积内进行反应和化学发光测定, 因此该系统允许三种不同的分离模式同时进行。

Pan 等[380]基于在毛细管电泳柱端的  $Ru(bpy)_3^{2+}$  电化学发光测定了盐酸地芬尼多片中的有效成分及其与血色素相互作用研究, 并计算了结合位点数及结合常数。

毛细管电泳化学发光检测技术, 以其装置简单、灵敏度高、线性范围宽等优点, 越来越受到重视, 分析对象已涉及到金属离子、小分子和蛋白质等多种物质。然而, 现有的接口只适用于快速动力学的发光反应, 对慢速动力学的反应不能检



测;仪器多为自组装,自动化程度低,性能不能满足方法的需要,这将成为今后研究的重点内容之一。

## 6. 化学发光研究的发展趋势

(1) 开发量子产率高、水溶性好、发光寿命长的新型发光试剂。例如,在荧光物质的基础上开发新型发光试剂,根据荧光和化学发光之间的经验规则,在荧光物质的结构上引入具有选择性的螯合基团,可得到具有较好选择性的化学发光新试剂。有较高荧光量子产率的化合物结构,可望成为鲁米诺类化学发光试剂的骨架结构,这一策略已经被众多研究者运用于某些化学发光化合物和试剂合成的基本设计中。

(2) 拓展化学发光分析法的应用领域。目前,化学发光的研究已经从常规的无机物、有机物的分析,拓展到各种生命物质的分析,而且在生命科学研究中的应用意义及被重视程度已远远超过其在无生命体系中的应用。如化学发光均相核酸探针技术、化学发光异相核酸探针技术、化学发光杂交技术、化学发光蛋白质分析技术等,从简单的在一些已建立的方法中替代放射性同位素和荧光标记,到建立具有化学发光法自身特色的新方法,将纳米技术应用到化学发光分析中,通过研究纳米颗粒对化学发光体系的影响,结合核酸杂交技术,构建新型免疫标记及生物传感器,可以预见,化学发光法在生命科学领域中将有十分广阔的发展空间。

(3) 研究化学发光的联用技术。将化学发光与流动注射、微透析、毛细管电泳、传感器技术和芯片技术等结合起来可以建立很多高灵敏度的、微型化的和高度自动化的分析方法和器件。开发各种接口技术、达到灵敏度与选择性的完美结合是以后联用技术发展的关键。

(4) 试验装置的微型化、集成化和专一化。目前,将化学发光试剂固定,开发专属性很强的化学发光传感器,是化学发光发展的一个重要方向。尤其是化学发光微全分析系统,将试样的采集、预处理、分离、反应和检测集成到芯片上,是化学发光分析最具发展前景的研究方向之一。

(5) 从物质的结构预测其化学发光特性的研究。直接化学发光反应是当前化学发光分析研究的一个重要方向。人们通常通过大量实验筛选氧化反应及反应介

质, 来证明某种有机药物、农药是否具有化学发光特性。这种尝试性的实验筛选过程, 非常费时、费力。最近, Zamora 等人基于物质结构与性质关系, 把拓扑法和组合数学引入, 从化学图论观点出发, 对分子结构进行分析, 提出一个 DF 值, 来预测分子的化学发光特性, 并对酚类、多酚类物质、药物、农药、麦角生物碱及生物胺进行了实验验证, 这一研究成果无疑给人们研究化学发光反应提供了一种新的思路和方法。

(6) 化学发光显微成像技术的研究。仪器分析通常以信号形式提供样品体系的间接信息。而成像技术提供直观图象, 这对生物分析、医学临床诊断等显得更为方便。显微成像技术利用单光子检测, 进一步提高了化学发光检测的灵敏度; 另一方面, 使化学发光检测做到空间分辨, 在不同空间层次或时间过程中所产生的光学图象可以提供有关活体细胞精细的动态信息。这无疑对研究化学发光反应机理提供了新的手段, 拓宽了化学发光分析的应用范围, 如可以研究单个活细胞内的化学发光行为。

## 7. 本论文的目的及意义

化学发光(CL)是指在没有任何光、电、热的作用下, 只是吸收化学反应放出的化学能而激发, 产生光的辐射的发光现象。根据化学发光的发光强度或发光总量来确定反应中相应组分含量的分析方法称为化学发光分析法。其突出优点是不需要任何外来光源, 避免了瑞利散射和拉曼散射等噪音, 没有空白, 因而光电倍增管在高压下工作时具有比荧光法更高的信噪比。

由于化学发光(CL)反应速度通常很快, 在溶液混合的瞬间就产生发光信号, 在几秒内发光强度达到峰值, 而且较易受环境因素的影响, 因此反应过程难于控制, 重现性和选择性较差, 使其在定量分析中受到一定限制。而流动注射分析技术(FIA)是一种在非平衡状态下, 溶液自动处理及分析技术, FIA 能使样品和试剂以高度重现的方式混合, 从混合到检测的时间间隔可以严格控制。因此 FIA 为 CL 提供了一个非常好的控制手段, 在流动过程中, 所有的实验参数, 如试剂体积、保留时间、温度、试剂的混合时间和方式等都能严格的控制并重复操作。因此近年来将 FIA 与 CL 联用, 在很大程度上克服了化学发光分析重现性差、操作费时、不便于实现自动化等缺点, 从而使化学发光作为一种灵敏高效的痕量分

析方法在分析化学领域得到了迅速发展。

随着科学技术的发展和人们生活水平的不断提高,人类生命的质量成为人们最关心的问题之一。一方面,药物作为保障人类健康的重要因素,也就成为人们研究和关注的热点。药物纯度分析、药物成分分析、药物生产质量控制、药物代谢以及临床检验等方面的问题急需解决。另一方面,目前,农作物农药残留已是世界范围内影响食品安全的主要因素之一。我国已加入世界贸易组织,农产品对外贸易日益加大,国际上对我国农产品的质量要求也越来越高,公众对农药残留的关心日益强烈,准确测定水果、蔬菜及相关食品以及环境样品中的农药残留量变得日益重要。因此,从经济发展与保障人民健康两方面考虑,农药残留的检测体系的建立与健全将成为今后一段时间内我国政府和农业部门工作的热点。

本文的目的就是将化学发光与流动注射技术结合研究开发化学发光体系在药物分析及农药残留分析测定中的应用,建立一系列简单、快速、灵敏、可靠的分析方法,从而拓展化学发光分析法的应用领域,希望我们的研究工作能够对 FI-CL 技术及理论的研究有一定的推动作用,为使 FI-CL 这一新技术能够在药物分析与农药残留检测中得到实际应用起到一定的积极作用。论文主要研究内容如下:

1. 基于碱性溶液中,铁氰化钾/亚铁氰化钾催化盐酸多巴酚丁胺与鲁米诺反应的化学发光,建立一种新的测定盐酸多巴酚丁胺的流动注射化学发光方法。考察各种影响因素,确立反应的最佳条件。为建立一种简单、快速、灵敏的盐酸多巴酚丁胺药物有效成分的测定方法及其代谢研究作一些实验上的探索工作。并对其化学发光机理做些初步探讨。

2. 基于美洛昔康与 N-溴代丁二酰亚胺在碱性介质中的化学发光反应,建立一种快速灵敏的流动注射化学发光测定方法。将其用于药品中的美洛昔康含量测定,将测定结果与药典方法进行比较,使该法得到实验认证。并利用光谱数据对发光机理进行初步探讨。

3. 基于酒石酸美托洛尔对酸性条件下 Ce(IV)和 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>的微弱化学发光反应的增敏作用,建立一种简单、快速、灵敏的测定酒石酸美托洛尔的流动注射-化学发光方法,研究各种实验条件对化学发光信号的影响,将该法用于酒石酸美托洛尔片及尿样中的含量测定,并与药典中的标准方法进行比较,同时进行标准加入回收试验,对方法进行验证。

4. 基于磺胺嘧啶对酸性条件下  $\text{KMnO}_4\text{-HCHO}$  化学发光反应的增敏及催化作用, 建立一种选择性测定复方滴鼻液中磺胺嘧啶的流动注射-化学发光分析方法。对影响发光的各种因素进行实验优化, 将其用于处方药复方滴鼻液中磺胺嘧啶的测定, 考察方法的可行性。

5. 基于速灭威的碱性降解产物在罗丹明 6G 存在下, 硝酸酸性介质中, 与  $\text{KMnO}_4$  的化学发光反应, 建立一种用于测定速灭威残留的简单、快速、灵敏的流动注射-化学发光方法。对影响发光的各种因素进行实验优化, 为了验证方法的精密性, 分别测定同一浓度样品的日内及日间相对标准偏差值。并将其用于蔬菜样品中速灭威的残留量测定, 并对回收率进行考察。

### 参考文献

1. B. Radziszewski, Ber. 10 (1877) 321.
2. H.O.Z. Albrecht, Phys.Chem. 136 (1928) 321.
3. K. Glue, Z. Petsch. Angew. Chem. 48 (1935) 57.
4. A.K. Campell, Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine, Horwood, Chichester, 1998.
5. T.A. Nieman, in J.W. Birks (Ed.) Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography, VCH, New York, 1989, Chap. 4.
6. K. Robars. P.J. Worsfold, Anal. Chim. Acta 266 (1992) 147.
7. P.J.M. Kwakman, U.A.T. Brinkman. Anal. Chim. Acta 266 (1992) 175.
8. M.J. Navas, A.M. Jimenez, Food. Chem. 55 (1996) 7.
9. K. Imai, A. Nishitani, H. Akitomo, Y. Tsukamoto, J. Biolumin. Chemilumin. 4 (1989) 422.
10. M.L. Grayeski, Anal. Chem. 59 (1987) 1243A.
11. P.J. Worsfold, A. Nabi, Trends Anal. Chem. 5 (1983) 183.
12. R.W. Wallace, Drug Disc. Today 1 (1996) 496.
13. B.X. Li, Z.J. Zhang, Sensor. Actuators B 74 (2001) 163.
14. J.R. Gord, G. Gorden, Anal. Chem. 60 (1998) 335.
15. T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, J. Martin, Anal. Bioanal. Chem. 377 (2003) 189.

16. J. Edwards, R. Sprung, R. Sprague, D. Spence, *Analyst*, 126 (2001) 1257.
17. L.J. Kricka, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 305R.
18. H.Y. Aboul-Enein, R. Stefan, J.F. Van Staden, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29 (1999) 323.
19. X.R. Zhang, W.R.G. Baeyens, A.M. Garcia-Campana, J. Ouyang, *Trends Ana. Chem.*, 18 (1999) 384.
20. A.M. Jimenez, M.J. Navas, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 353
21. R.D. Geraradi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, 378 (1999) 1.
22. 王鹏, 袁艺, 朱果逸, *分析化学*, 27 (1999) 1219.
23. M.M. Nakamura, S.A. Sarava, N. Coichev, *Anal. Lett.*, 33 (2000) 391.
24. H.Y. Aboul-Enein, R. Stefan, J.F. Van Staden, X.R. Zhang, A.M. Garcia-Campana, W.R.G. Baeyens, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 30 (2000) 271.
25. M.J. Navas, A.M. Jimenez, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 30 (2000) 153.
26. A. Roda, P. Pasini, M. Guardigli, M. Baraldini, M. Musiani, M. Mirasoli, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 752.
27. B.J. Hindson, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta*, 445 (2001) 1.
28. K.A. Fährnich, M. Pravda, G.G. Guilbault, *Talanta*, 54 (2001) 531.
29. G. Gübitz, M.G. Schmid, H. Silviaeh, H.Y. Aboul-Enein, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 31 (2001) 141.
30. C. Kuyper, R. Milofsky, *Trends in Anal. Chem.*, 20 (2001) 232.
31. M. Yamaguchi, H. Yoshida, H. Nohta, *J. Chromatogr. A*, 950 (2002) 1.
32. X.J. Huang, Z.L. Fanga, *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 1.
33. W. Adam, D. V. Kazakov, V. P. Kazakov, *Chem. Rev.* 105 (2005) 3371.
34. X.W. Yan, *J. Chromatogr. A*, 976 (2002) 3.
35. Y.M. Liu, J.K. Cheng, *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 1.
36. C.X. Sun, J.H. Yang, L. Li, X. Wu, Y. Liu, S.F. Liu, *J. Chromatogr. B*, 803 (2004) 173
37. I.P.A. Morais, I. V. Tóth, A. O.S.S. Rangel, *Talanta*, 66 (2005) 341.
38. J.H. Lin, H.X. Ju, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 1461.
39. Z.Y. Zhang, S.C. Zhang, X.R. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 37.
40. J.J. Shi, Y.F. Zhu, X.R. Zhang, W. R.G. Baeyens, A.M. García-Campaña, *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2004) 351.
41. M. Elbanowski, B. Makowska, K. Staninski, M. Kaczmarek, *Journal of*

- Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 130 (2000) 75.
42. A.M. Jiménez, M.J. Navas, *Journal of Hazardous Materials* 106A (2004) 1.
43. L.J. Kricka, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 279.
44. J.M. Lin, M. Yamada, *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 99.
45. Z. H. Taha, *Talanta* 61 (2003) 3.
46. C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune, *Talanta* 51 (2000) 415.
47. M. Matsumoto, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 5 (2004) 27.
48. H.R. Schroeder, F.M. Yeager, *Anal. Chem.* 50 (1978) 1114.
49. D.F. Roswell, E.H. White, *Methods Enzymol.* 57 (1978) 409.
50. K. Van Dyke, F. McCapra, I. Behesti, *Bioluminescence and Chemiluminescence, Instruments and Applications*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985.
51. K.D. Gundermann, M. Drawert, *Chem. Ber.* 95 (1962) 2018.
52. H.R. Schroeder, R.C. Boguslaski, R.J. Carrico, R.T. Buckler, *Methods Enzymol.* 57 (1978) 424.
53. E.H. White, D.F. Roswell, O.C. Zafiriou, *J. Org. Chem.*, 34 (1969) 2462.
54. E.H. White, M.M. Bursley, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 2462
55. M.M. Rauhut, A.M. Semsel, B.G. Roberts, *J. Org. Chem.*, 31 (1966) 2431.
56. C.D. Lalkar, M. Arjankwadkar, *Indian J. Pure Appl. Phys.*, 26 (1988) 433.
57. E.H. White, O.C. Zafiriou, H.H. Kagi, J.H.M. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 940.
58. 张小燕, 刘红利, 李绍卿, *分析化学*, 29(2005)116
59. T.P. Whitehead, G.H.G. Thorpe, T.J.N. Carter, C. Croucutt, L.J. Kricka, *Nature* 305 (1983) 158.
60. G.H.G. Thorpe, L.J. Kricka, S.B. Moseley, T.P. Whitehead, *Clin. Chem.* 31 (1985) 1335.
61. G.H.G. Thorpe, L.J. Kricka, *Methods Enzymol.* 133 (1986) 331.
62. L.J. Kricka, X. Jin, *J. Biolumin. Chemilumin.* 10 (1993) 49.
63. J. Ishida, M. Takada, S. Hara, K. Sasamoto, K. Kina, M. Yamaguchi, *Anal. Chim. Acta* 309 (1995) 211.
64. H. Arakawa, J. Ishida, M. Yamaguchi, M. Nakamura, *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 3491.
65. K. Sasamoto, G. Deng, T. Ushijima, Y. Ohkura, K. Ueno, *Analyst* 120 (1995)

1709.

66. T. Sudhaharann, A.R. Reddy, *Anal. Biochem.* 271 (1999) 159.
67. J. Ishida, M. Takada, T. Yakabe, M. Yamaguchi, *Dyes Pigm.* 27 (1995) 1.
68. H. Yoshida, K. Ureshino, J. Ishida, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Dyes Pigm.* 41 (1999) 177.
69. H. Yoshida, R. Nakao, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Dyes Pigm.* 47 (2000) 239.
70. J. Ishida, H. Arakawa, M. Takada, M. Yamaguchi, *Analyst* 120 (1995) 1083.
71. A. Economou, A.K. Clark, P.R. Fielden, *Anal. Commun.* 35 (1998) 389.
72. R. Escobar, Q. Lin, A. Guiraum, F.F. delaRosa, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 61(1995) 169.
73. Z.J. Zhang, W. Qin, S.N. Liu, *Anal. Chim. Acta* 318 (1995) 71.
74. H. Zamzow, K.H. Coale, K.S. Johnson, C.M. Sakamoto, *Anal. Chim. Acta* 377 (1998) 133.
75. A.R. Bowie, E.P. Achterberg, R.F.C. Mantoura, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* 361 (1998) 189.
76. W. Qin, Z.J. Zhang, F.C. Wang, *Fresen J. Anal. Chem.* 360 (1998) 130.
77. U. Quass, D. Klochow, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 60 (1995) 361.
78. A. R. Bowie, P.R. Fielden, R.D. Lowe, R.D. Snook, *Analyst* 120 (1995) 2119.
79. K. Okamura, T. Gamo, H. Obata, E. Nakayama, H. Karatani, Y. Nozaki, *Anal. Chim. Acta* 377(1998) 125
80. A.J.J. Moss, W.A. Nagle, M.L. Baker, *Photobiochem. Photobiphys.* 2 (1981) 271.
81. Y Maeda, K. Aoki, M. Munemori, *Anal. Chem.* 52 (1980) 307.
82. T. Fujiwara, I.U. Mohammadzai, H. Inoue, T. Kumamaru, *Analyst* 125 (2000) 759.
83. W. Qin, Z.J. Zhang, C.T. Zhang, *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 824
84. A.A. Ponomarenko, B.I. Popov, *Zh. Anal. Khim.* 19 (1964) 97.
85. A.A. Ponomarenko, *Zh. Obshch. Khim.* 34 (1964) 4118.
86. N.A. Petrovskaya, J.E. Kalinichenko, *Zh. Anal. Khim.* 37 (1982) 1785.
87. S. Spurlin, M. M. Cooper, *Anal. Lett.* 19 (1986) 2277.
88. J. Ishida, S. Sonezaki, M. Yamaguchi, T. Yoshitake, *Analyst* 117 (1992) 1719.
89. O.M. Steijger, H. Ligeman, U.A.T. Brinkman, J.J. M. Holthuis, A.K. Smilde, D. A. Doornbos, *J. Chromatogr.* 615 (1993) 97
90. R. Maskiewicz, D. Sogah, T.C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5347.

91. J.R. Totter, *Photochem. Photobiol.* 31 (1964) 23.
92. R. Maskiewicz, D. Sogah, T. A. Nieman, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 2077.
93. U.S. Ramelow, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2 (1988) 2092.
94. O.A. Zaporozhets, V.V. Sukhan, N.A. Lipkovska, *Analyst*, 121 (1996) 501.
95. T. Hasseb, T. Kawashima, *Anal. Sci.*, 12 (1996) 773.
96. J. Lin, A. Tsuji, M. Maeda, *Anal. Chim. Acta*, 339 (1997) 139.
97. I. Weeks, I. Beheshti, F. Mccapra, et al, *Clin. Chem.* 29 (1983) 1474.
98. J.M. Lin, Y. Massaki, *J. Microchemical.* 58 (1998) 117.
99. N.C. Nelson, D.L. Kacian, *Anal. Chim. Acta* 194(1990) 73.
100. E.A. Chandross, *Tetrahedron Lett.* 12(1963)761.
101. M.M. Rauhut, L. J. Bollyky, B.G. Roberts, M. Loy, R. H. Whiteman, et al, *J. Am. Chem. Soc.* 89(1967) 6515.
102. K. Nakashima, M. Wada, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Imai, *J. Liq.Chromatogr.* 17 (1994) 2111.
103. G. Gübitz, P. Van Zoonen, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2071.
104. P. Van Zoonen, D.A. Kamminga, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, *Anal. Chim. Acta* 167 (1985) 249.
105. J.R. Poulsen, J.W. Birks, G. Gübitz, P. Van Zoonen, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, *J. Chromatogr.* 360 (1986) 371.
106. J.R. Poulsen, J.W. Birks, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1242.
107. M. Emteborg, K. Irgum, C. Gooijer, U.A.T. Brinkman, *Anal. Chim. Acta* 357 (1997) 111.
108. G. Scott, W.R. Seitz, J. Ambrose, *Anal. Chim. Acta* 115 (1980) 221.
109. H. Jansen, U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, *J. Chromatogr.* 440 (1988) 217.
110. M. Wada, K. Inoue, A. Ihara, N. Kishikawa, K. Nakashima, N.Kuroda, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 189.
111. T. Hasebe, E. Hasegawa, T. Kawashima, *Anal. Sci.* 12 (1996) 881.
112. K. Honda, K. Miyaguchi, H. Nishino, H. Tanaka, T. Yao, K. Imai, *Anal. Biochem.* 153 (1986) 50.
113. P. Van Zoonen, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, J.H. Wolf, J. Gerrits, F. Elentge, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 5 (1987) 485.
114. M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Imai, *J. Chromatogr. B* 678 (1996) 129.



115. S. Kamei, A. Ohkubo, S. Saito, S. Takagi, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1921.
116. M. Wada, N. Kuroda, T. Ikenaga, S. Akiyama, K. Nakashima, *Anal. Sci.* 12 (1996) 807.
117. K.W. Sigvardson, J.W. Birks, *Anal. Chem.* 55 (1983) 432.
118. K.W. Sigvardson, J.M. Kennish, J.W. Birks, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1096.
119. K.W. Sigvardson, J.W. Birks, *J. Chromatogr.* 316 (1984) 507.
120. N. Hanaoka, H. Tanaka, *J. Chromatogr.* 606 (1992) 129.
121. K. Takezawa, M. Tsunoda, K. Murayama, T. Santa, K. Imai, *Analyst* 125 (2000) 293.
122. M. Tod, M. Prevot, M. Poulou, R. Farinotti, J. Chalom, G. Mahuzier, *Anal. Chim. Acta* 223 (1989) 309.
123. V. Z. Piet, D.A. Kamminga, C. Gooijer, et al, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1245.
124. M. Tsunoda, K. Imai, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 13.
125. S.D. Kamtekar, R. Pander, M.S. Ayyagarims, et al, *Anal. Chem.* 68 (1996) 216.
126. I. Takeshi, U. Yohko, T. Ryoh et al, *Tetrahedron Letters* 38 (1997) 841.
127. I. Bronstein, P. McGrath, *Nature* 338 (1989) 599.
128. A. P. Schaap, H. Akhavan, L. J. Romanon, *Clin. Chem.* 35 (1989) 1863.
129. D. M. Hercules, F. E. Lytle, *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 4745
130. R. D. Gerardi, N. W. Barnett, S. W. Lewis. *Anal. Chim. Acta* 378 (1999) 1.
131. M.M. Chang, T. Saji, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 5399
132. F. E. Lytle, D. M. Hercules. *Photochem. Photobiol.* 13 (1971) 123.
133. N. E. Tokel, A. J. Bard. *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 2862.
134. I. Rubinstein, A. J. Bard. *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 512.
135. J.B. Noffsinger, N.D. Danielson, *Anal. Chem.* 59 (1987) 865.
136. L. He, K.A. Cox, N.D. Danielson, *Anal. Lett.* 23 (1990) 195.
137. J.K. Leland, M. J. Powell, *J. Electrochem. Soc.* 137 (1990) 3127.
138. S. N. Brune, D.R. Bobbitt, *Talanta* 38 (1991) 419.
139. S. N. Brune, D.R. Bobbitt, *Anal. Chem.* 64 (1992) 166.
140. X. Chen, L. Jia, X. Wang, G. Hu, *Anal. Sci.* 13 (1997) 71.
141. Z. He, H. Gao, L. Yuan, Q. Luo, Y. Zeng, *Analyst* 122 (1997) 1343.
142. A. W. Knight, G.M. Greenway, *Analyst* 121 (1996) 101R.
143. H. Yoshida, K. Hidaka, J. Ishida, K. Yoshikuni, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Anal. Chim. Acta* 413 (2000) 137.

144. G. M. Greenway, L. J. Nelstrop, S. N. Port, *Anal. Chim. Acta*, 405 (2000) 43.
145. 吉邢虎, 何治柯, 庞代文, 程介克, *高等学校化学学报*, 25 (2004, 增刊) 80.
146. J. M. Lin, F. Qu, M. Yamada, *Anal. Bioanal. Chem.*, 374(2002)1159.
147. H. Y. Wang, G. B. Xu, S. J. Dong, *Anal. Chim. Acta*, 480 (2003), 285.
148. N. Egashira, H. Kumasako, T. Uda, K. Ohga, *Electroanalysis*, 14 (2002) 871.
149. A.A. Grinberg, *J. Russ. Phys. Chem. Soc.*, 52 (1920) 151.
150. N.W. Barnet, B.J. Hindson, P. Jones, T.A. Smith, *Anal. Chim. Acta*, 451(2002) 181.
151. N.W. Barnet., B.J. Hindson, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, 384 (1999) 41.
152. F. Fuster Mestre, L.L.Zamora, J.M. Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 394 (1999) 159.
153. A. Kojto, J. Michalowski, E. Wolinec, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 85.
154. N.T. Deftereos, N. Grekas, A.C. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, 403 (2000) 137.
155. H. Pasekova, M. Polasek, *Talanta*, 52 (2000)67.
156. F.A. Aly, S.A. Ai-Tamimi, A.A. Alwarthan, *J. AOAC Int.*, 83 (2000) 1299.
157. Y. Fuster Mestre, L.L. Zamora, J.M. Calatayud, *J. AOAC Int.*, 84 (2001) 13.
158. W.R. Abbott, A. Townshend, *Analyst* 112 (1987) 397.
159. A. Townshend, W.R. Abbott, *Analyst* 123 (1998) 267.
160. A. Campiglio, *Analyst*, 123(1998)1571.
161. 杨季冬, 黄玉明, 刘绍璞, *西南师范大学学报(自然科学版)*, 26(2001)427.
162. 武亚艳, 张四纯, 赵瑞, 李华, *分析化学*, 28(2000) 318.
163. L.L. Koukli, A. C. Caiokerinos, T. P. Hadjuoannou, *Analyst*, 114(1989) 711.
164. 饶毅, 童彦, 罗国安, 张新荣, *福州大学学报(自然科学版)*, 27(1999)31.
165. L.L. Koukli, A. C. Caiokerinos, *Analyst*, 115(1990) 1553.
166. Y. Rao, *Anal. Lett.*, 33(2000)1117.
167. D. Zhang, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, G.V. Der Weken, *Analyst*, 121(1996), 1569.
168. 范顺利, 吕超, 王军, 周庆祥, *分析实验室*, 20(2001)61.
169. X.R. Zhang, W.R.G. Baeyens, G.V. Der Weken, A.C. Calokerinos, K. Nakashima, *Anal. Chim. Acta*, 303(1995)121.
170. F. A. Aly, N. A. Alarfaj, A.A. Alwarthan, *Anal. Chim. Acta*, 358 (1998) 255.
171. 吴风武, 何治柯, 罗庆尧, 曾云鹦, *武汉大学学报(自然科学版)*, 45 (1999)

829.

172. 罗挽兰, 高华, 何治柯, 罗庆尧, 曾云鹗, 分析科学学报, 12 (1996)142.

173. S.A. Halvatzis, M.M. Timotheou-Potamiaand, A.C. Calokerinos, *Analyst*, 115 (1990) 1229.

174. S.A. Halvatzis, M.M. Timotheou-Potamia, T.P. Hadjiioannou, *Anal. Chim. Acta*, 272 (1993) 251.

175. S.A. Halvatzis, M.M. Timotheou-Potamia, *Talanta*, 40 (1993) 1245

176 Z.P. Wang, Z. J. Zhang, Z.F. Fu, Y. Xiong, X. Zhang, *Anal. Bioanal. Chem.* 377(2003) 660.

177. 方卢秋, 王周平, 付志锋, 罗万芬, 章竹君, 分析测试学报, 22 (2003) 25.

178. H.Y. Liu, L.Zhang, Y.H. Hao, P.G. He, Y.Z. Fang, *Anal. Chim. Acta*, 541 (2005) 187.

179. A. Safavi, M. R. Baezzat, *Anal. Chim. Acta*, 368 (1998) 113

180. Z.P. Wang, Z. J. Zhang, Z.F. Fu, W.F. Luo, X. Zhang, *Anal. Lett.*, 36 (2003) 2683.

181. Z.P. Wang, Z. J. Zhang, Z.F. Fu, L.Q. Fang, X. Zhang, *Anal. Sci.*, 20 (2004) 319

182. 聂峰, 何云华, 赖普辉, 分析化学, 2000, 1187.

183. 王志银, 何云华, 聂峰, 分析实验室, 2000, 19.

184. 聂峰, 何云华, 王志银, 分析实验室, 2000, 19, 56.

185. 聂峰, 王志银, 何云华, 分析化学, 2000, 28, 1516.

186. 邓双, 分析测试学报, 2001, 20, 56.

187. N.P. Evmiridis, A.G. Vlessidis, N.K. Thanasoulas, *Anal. Chim. Acta*, 398 (1999) 191.

188. N.P. Evmiridis, *Talanta*, 36 (1989) 357.

189. Z.He, F. Wu, H. Meng, Q. Luo, Y. Zeng, *Anal. Lett.* 32 (1999) 401.

190. K.Yokota,K.Saito,S.Yamazaki,A.Muromatsu, *Anal. Lett.* 35 (2002) 185.

191. Y. J. Ma, M. Zhou, X.Y. Jin, B.Z. Zhang, H. Chen, N.Y. Guo, *Anal. Chim. Acta* 464 (2002) 289.

192. H. Chen, M. Zhou, X.Y. Jin, Y.M. Song,, Z.Y. Zhang, Y.J. Ma, *Anal. Chim. Acta* 478 (2003) 31.

193. G. Gamborg, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 285 (1994) 3212.

194. 吕九如、杜建修, 世界科技研究与发展, 26 (2004) 127.

195. B.X. Li, Z.J. Zhang, Y. Jin, *Anal. Chim. Acta* 432 (2001) 95.
196. N. Kiba, T. Miwa, M. Tachibana, K. Tani, H. Koizumi, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1269.
197. T. Perez-Ruiz, C. Martine-Lozano, V. Tomas, J. Martin, *Analyst*, 124 (1999)197.
198. V. David, R.M. Marin, J.V. Gateo, J.C. Martinez, *Analyst*, 125 (2000) 1313.
199. T. Perez-Ruiz, C. Martine-Lozano, V. Tomas, J. Martin, *Analyst*, 124 (1999) 1517.
200. Y.F. Mestre, L.L. Zamora, J.M. Calatayud, *luminescence* 16 (2001) 213.
201. P. Fletcher, K. N. Andrew, A. C. Calokerinos, S. Forbes, P. J. Worsfold, *luminescence* 16 (2001) 1.
202. 周延秀, 朱果逸, *分析化学*, 25 (1997) 222.
203. 高嵩, 何广平, 张以河, *化学分析计量*, 13(2004) 55.
204. 刘艳玲, 冯爱霞, 范冬梅, *理化检验- 化学分册* 41(2005) 291.
205. C., B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, R. A. Wheatley and A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 553, (2005) 123.
206. A. Townshend, W. Ruengsitagoon, C. Thongpoon, S. Liawruangrath, *Anal. Chim. Acta*, 541(2005) 103.
207. S. L. Wei, L.X. Zhao, X.L. Cheng and Jin-Ming Lin, *Anal. Chim. Acta*, 545 (2005) 65.
208. P. S. Francis and J. L. Adcock, *Anal. Chim. Acta*, 541(2005)3.
209. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Chim. Acta*, 541(2005) 67.
210. B.A. Gorman, N.W. Barnett, Richard Bos, *Anal. Chim. Acta*, 541(2005), 117.
211. N. A. Al-Arfaj, *Talanta*, 62(2004) 255.
212. Z. H. Song and S. Hou, *Anal. Chim. Acta*, 488 (2003) 71.
213. Z.H. Song, C.N. Wang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(2003) 5375.
214. Z.H. Song, C.N. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (2004) 491.
215. C.N. Wang, Z.H. Song, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(2004) 4127.
216. Z.H. Song, Q.L. Yue, C.N. Wang, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60 (2004) 2377.
217. J.X. Du, L.H. Shen, J.R. Lu, *Anal. Chim. Acta*, 489 (2003)
218. J.Wang, H.Z. Ye, Z. Jiang, N.S. Chen, J.L. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 508 (2004)

- 171.
219. W.B. Shi, J.D. Yang, Y.M. Huang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (2004) 197.
220. H.Y. Liu, L. Zhang, J. Zhou, Y.H. Hao, P.G. He, Y.Z. Fang, *Anal. Chim. Acta*, 541 (2005) 123.
221. Y.M. Huang, W.B. Liu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (2005) 537.
222. A. Safavi, M.A. Karimi, M.R. Hormozi Nezhad, *Il Farmaco*, 59, (2004) 481.
223. A. M. García-Campaña, J.M.B. Sendra, M.P.B. Vargas, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 516 (2004) 245.
224. Z.P. Wang, Z.J. Zhang, Z.F. Fu, W.F. Luo, X. Zhang, *Talanta*, 62 (2004) 611.
225. A. Economou, P.D. Tzanavaras, M. Notou, D.G. Themelis, *Anal. Chim. Acta*, 505 (2004) 129.
226. Z.P. Wang, Z.J. Zhang, X. Zhang, Z.F. Fu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35 (2004) 1.
227. E. Nalewajko, R. B. Ramírez, A. Kojo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (2004) 219.
228. L. Yi, H.C. Zhao, S.L. Chen, L.P. Jin, D.D. Zheng, Z.L. Wu, *Talanta*, 61 (2003) 403.
229. Z.P. Wang, Z.J. Zhang, Z.F. Fu, D.L. Chen, X. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33 (2003) 765.
230. A. Townshend, N. Youngvises, R.A. Wheatley, S. Liawruangrath, *Anal. Chim. Acta*, 499 (2003) 223.
231. Y.F. Zhuang, X.L. Cai, J.S. Yu, H.X. Ju, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 162 (2004) 457.
232. Y.Y. Sun, Y.H. Tang, H. Yao, X.H. Zheng, *Talanta*, 64 (2004) 156.
233. N. Anastos, N.W. Barnett, B.J. Hindson, C.E. Lenehan, S.W. Lewis, *Talanta*, 64 (2004) 130.
234. A. Myint, Q.L. Zhang, L.J. Liu, H. Cui, *Anal. Chim. Acta*, 517 (2004) 119.
235. W.B. Liu, Y.M. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 506 (2004) 183.
236. Q.L. Zhang, A. Myint, L.J. Liu, X.W. Ge, H. Cui, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (2004) 587.
237. Y.D. Liang, J.F. Song, X.F. Yang, W. Guo, *Talanta*, 62 (2004) 757.
238. Y.D. Liang, J.F. Song, X.F. Yang, *Anal. Chim. Acta*, 510 (2004) 21.
239. X.L. Cheng, L.X. Zhao, M.L. Liu, J.M. Lin, *Anal. Chim. Acta*, 558 (2006) 296.
240. B.X. Li, Q.W. Deng, J.G. Lv, Z.J. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 560 (2006) 128.
241. L. A. Tortajada-Genaro, P. Campíns-Falcó and F. Bosch-Reig, *Anal. Chim. Acta*,

- 488 (2003) 243.
242. B.X. Li, D.M. Wang, J.G. Lv, Z.J. Zhang, *Talanta*, 69 (2006) 160.
243. O. Nozaki, H. Kawamoto, *Anal. Chim. Acta*, 495 (2003) 233.
244. G.W. Miller, C.A. Morgan, D.J. Kieber, D.W. King, J.A. Snow, B.G. Heikes, K. Mopper, J.J. Kiddle, *Marine Chemistry*, 97 (2005) 4.
245. I.P.A. Morais, M. Miró, M. Manera, J.M. Estela, V. Cerdà, M.R.S. Souto, A. O.S.S. Rangel, *Anal. Chim. Acta*, 506 (2004) 17.
246. M. Yaqoob, A. Nabi, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 510 (2004) 213.
247. M. Yaqoob, A. Nabi, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 519 (2004) 137.
248. P. Mikuka, Z. Veea, *Anal. Chim. Acta*, 495 (2003) 225.
249. S.L. Chen, H.C. Zhao, X.L. Wang, X. Li, L.P. Jin, *Anal. Chim. Acta*, 506 (2004) 25.
250. J.G. Lv, Z.J. Zhang, J.D. Li, L.R. Luo, *Forensic Sci. Inter.*, 148 (2005) 15.
251. N. Ratanawimarnwong, N. Amornthammarong, N. Choengchan, P. Chaisuwan, M. Amatongchai, P. Wilairat, I.D. McKelvie and D. Nacapricha, *Talanta*, 65 (2005) 756.
252. S. Meseguer-Lloret, P. Campíns-Falcó, S. Cárdenas, M. Gallego and M. Valcárcel, *Talanta*, 64 (2004) 1030.
253. S. Motomizu, Z.H. Li, *Talanta*, 66 (2005) 332.
254. I.P.A. Morais, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, *Talanta*, 66, (2005) 341.
255. J.A. Pradana Pérez, J.S. Durand Alegría, P. Fernández Hernando and A. Narros Sierra, *Anal. Chim. Acta*, 536 (2005) 115.
256. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J.Fenoll, *Anal. Chim. Acta*, 552 (2005) 147.
257. S. Satiemperakul, T.J. Cardwell, S.D. Kolev, C.E. Lenehan, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta*, 554 (2005) 25.
258. Z.H. Song, Q.L. Yue, C.N. Wang, *Food Chemistry*, 94 (2006) 457.
259. L. Yi, H.C. Zhao, C.Y. Sun, S.L. Chen, L.P. Jin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59 (2003) 2541.
260. Y.J. Ma, M. Zhou, X.Y. Jin, Z.Y. Zhang, X.L. Teng, H. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 501 (2004) 25.
261. M. Sariahmetoglu, R.A. Wheatley, Ý. Çakýcý, Ý. Kanzyk, A. Townshend, *Pharmacological Research*, 48 (2003) 361.

262. B.X. Li, Z.J. Zhang, J. Wang, C.L. Xu, *Talanta*, 61 (2003) 651.
263. J. W. Costin, N. W. Barnett, S.W. Lewis, D.J. McGillivray, *Anal. Chim. Acta*, 499 (2003) 47.
264. H.C. Hong, H.J. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 499 (2003) 41.
265. J. Lin, F. Yan, H.X. Ju, *Clinica Chimica Acta*, 341 (2004) 109.
266. C. Lu, J.M. Lin, C.W. Huie, *Talanta*, 63 (2004) 333.
267. C. Lau, X. J. Qin, J. Y. Liang, J.Z. Lu, *Anal. Chim. Acta*, 514 (2004) 45.
268. J.W. Costin, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Talanta*, 64 (2004) 894.
269. N. Amini, I. McKelvie, *Talanta*, 66 (2005) 445.
270. F.Q. Wu, Y.M. Huang, Q. Li, *Anal. Chim. Acta*, 536 (2005) 107.
271. S.L. Liao, X.P. Wu, Z.H. Xie, *Anal. Chim. Acta*, 537 (2005) 189.
272. Y.D. Liang, J.F. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (2005) 100.
273. P. Panoutsou, A. Economou, *Talanta*, 67 (2005) 603.
274. J.L. Adcock, N.W. Barnett, J.W. Costin, P.S. Francis, S.W. Lewis, *Talanta*, 67 (2005) 585.
275. L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, J.J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas-Pérez, A. González-Casado, *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 927.
276. H. Kubo, Y. Tsuda, Y. Yoshimura, H. Homma, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta*, 494 (2003) 49.
277. J.L. Adcock, N.W. Barnett, R.D. Gerardi, C.E. Lenehan, S.W. Lewis, *Talanta*, 64 (2004) 534.
278. J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez, J.L.M. Vidal, *Anal. Chim. Acta*, 524 (2004) 235.
279. J.J. Soto-Chinchilla, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, *Anal. Chim. Acta*, 541 (2005) 111.
280. J.F. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, A. González-Casado, M. del Olmo Iruela, *Anal. Chim. Acta*, 524 (2004) 161.
281. J.F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A. M. García-Campaña, A. González-Casado, J. L. Martínez Vidal, *Talanta*, 65 (2005) 980.
282. J.A.M. Pulgarín, A.A. Molina, P.F. López, *Talanta*, 68 (2006) 586.
283. I.M. Ciomasu, P.M. Krämer, C.M. Weber, G. Kolb, D. Tiemann, S. Windisch, I. Frese, A.A. Kettrup, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2005) 354.

284. Karsten Haupt, *Reactive & Functional Polymers*, 41 (1999) 125.
285. J.M. Lin, M. Yamada, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1148.
286. J.M. Lin, M. Yamada, *Analyst*, 126 (2001) 810.
287. I. Surugiu, B. Danielsson, L. Ye, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 487.
288. I. Surugiu, J. Svitel, L. Ye, K. Haupt, B. Danielsson, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 4388
289. J. Svitel, I. Surugiu, A. Dzgoev, K. Ramanathan, B. Danielsson, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12 (2001) 1075.
290. H.J. Zhou, Z.J. Zhang, D.Y. He, Y.F. Hu, Y. Huang, D.L. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 523 (2004) 237.
291. Z.J. Zhang, D.Y. He, W. Liu, Y. Lv, *Luminescence*, 20 (2005) 377.
292. 张红鸽, 吕九如, 何云华, 杜建修, *化学学报*, 63(2005)210.
293. 何云华, 吕九如, 张红鸽, 杜建修, *高等学校化学学报*, 26(2005) 642.
294. F. Nie, J.R. Lu, W.F. Niu, *Anal. Chim. Acta*, 545 (2005) 129.
295. H.J. Zhou, Z.J. Zhang, D.Y. He, Y. Xiong, *Sensors and Actuators B*, 107 (2005) 798.
296. Y.H. He, J.R. Lu, H.G. Zhang, J.X. Du, *Microchim Acta* 149(2005) 239.
297. M. Liu, J.R. Lu, Y.H. He, J.X. Du, *Anal. Chim. Acta*, 541 (2005) 99.
298. F. Nie, J.R. Lu, Y.H. He, J.X. Du, *Luminescence* 20 (2005) 315.
299. A.W. Knight, G.M. Greenway, *Occurrence, The Analyst*, 119 (1994) 879.
300. I. Rubinstein, A.J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 512.
301. M.M. Richter, *Chem. Rev.* 104 (2004) 3003.
302. H.S. White, A.J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 104(1982) 6895.
303. S. Kulmala, T. Ala-Kleme, L. Vare, M. Helin, T. Lehtinen, *Anal.Chim.Acta*, 398 (1999)41.
304. E .F. Fabrizio, I. Prieto, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc*, 122 (2000), 4996.
305. W. A. Jackson, D. R. Bobbit, *Microchem. J.*, 49 (1994)99.
306. Y. Sato, K. Uosaki, *Denki Kagaku*, 61 (1993) 816.
307. Y. Sato, K. Uosaki, *J. Electroanal. Chem.*, 380(1995) 57.
308. Y. Sato, K. Uosaki, *Denki Kagaku*, 62 (1994) 1269.
309. R. Wilson, J. Kremeskoter, D. J. Schiffrin, J. S. Wilkinson, *Biosens. Bioelectron.*, 11 (1996) 805.



310. T. Ala-Kleme, S. Kulmala, M. Latva, *Acta.Chem. Scand.*, 51 (1997) 541.
311. G. P. Jirka, A. F. Martin, T. A. Nieman, *Anal. Chim. Acta*, 284 (1993) 345.
312. C. A. Marquette, L. J. Blum, *Sens. Actuators B*, 51 (1998) 100.
313. M. E. F. Laespada, J. L. P. Pavon, B. M. Cordero, *Anal. Chim. Acta*, 327 (1996) 253.
314. B. Leca, L. J. Blum, *Analyst*, 125 (2000) 789
315. C. A. Marquette, L. J. Blum, *Anal. Chim. Acta*, 381 (1999) 1.
316. L. D. Zhu, Y. X. Li, G. Y. Zhu, *Sens. And Actuators*, B86(2002) 209.
317. V. C. Tsafack, C. A. Marquette, B. Leca, L. J. Blum, *Analyst*, 125(2000) 151.
318. C. A. Marquette, S. Ravaud, L. J. Blum, *Anal. Lett.* 33(2000) 1779.
319. J. Kremeskoter, R. Wilson, D.J. Schiffrin, B.J. Luff, Wilkinson, *Meas. Sci. Technol.*, 6 (1995) 1325.
320. 安镜如, 姚晴, *分析化学*, 18 (1990) 867.
321. J. Lasovsky, F. Grambal, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 48(1983) 477.
322. M.L. Yang, C.Z. Liu, K.J. Qian, P.G. He, Y.Z. Fang, *Analyst*, 127(2002)1267.
323. J. B. Noffsinger, N. D. Danielson, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 865.
324. J. K. Leland, M. J. Powell, *Electrochem. Soc*, 137 (1990) 3127.
325. M. Chiang, C.Whang, *J. Chromatogra. A*, 934 (2001) 59.
326. J. Gonzalez, G. M. Greenway, T. M. Creedy, S. Qijun, *Analyst* 125 (2000) 765.
327. V. Tsafack, C. A. Marquete, B. Leca, L. J. Blum, *Analyst*, 125 (2000) 151.
328. K. Uchikura, *Ana. Sci.*, 15 (1999) 1049.
329. K. Arai, K. Takahashi, F. Kusu, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2237.
330. G. M. Greenway, S. J. L. Dolman, *Analyst*, 124 (1999) 759.
331. X. X u, P. Bard, *Langmuir*, 10 (1994) 2409.
332. W. Lee, *Mikrochim. Acta*, 127 (1997) 19.
333. S. Sakura, *Anal. Chim. Acta*, 262 (1992) 49.
334. X. Yan, *J. Chromatogr. A*, 842 (1999) 267.
335. X. Zhang, W. R. G. Baeyens, A. M. Garcia-Caupana, *Biomed. Chromatorgr.*, 13 (1999)169.
336. K. Hayakawa, R. Kizu, K. Ando, *Chromatograh*y, 20 (1999) 37.
337. X. Chen, *Se pu*, 16 (1998) 301.
338. G. Orosz, R. S. Giuns, R. L. Schowen, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 26 (1996)1.
339. T. Fukushima, N. Usui, T. Santa, K. Imai, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2003)

1655.

340. M. Yamaguchi, H. Yoshida, H. Nohta, *J. Chromatogr. A*, 950 (2002) 1.
341. X.Y. Huang, J.C Ren, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25 (2006) 155.
342. M. Kai, M. Morizono, M. N. Wainaina, T. Kabashima, M.K. Lee, J.Z. Lu, *Anal. Chim. Acta*, 535 (2005) 153.
343. T. Ikehara, N. Habu, I. Nishino, H. Kamimori, *Anal. Chim. Acta*, 536 (2005) 129.
344. S. Meseguer-Lloret, C. Molins-Legua and P. Campíns-Falcó, *Anal. Chim. Acta*, 536 (2005) 121.
345. Q.L. Zhang, M. Lian, L.J. Liu, H. Cui, *Anal. Chim. Acta*, 537 (2005) 31.
346. Q.L. Zhang, H. Cui, A. Myint, M. Lian, L.J. Liu, *J. Chromatogr. A*, 1095 (2005) 94.
347. G.H. Wan, H. Cui, H.S. Zheng, J. Zhou, L.J. Liu, X.F. Yu, *J. Chromatogr. B* 824 (2005) 57.
348. T. P. Ruiz, C. M. Lozano, V. Tomás, J. Martín, *J. Chromatogr. A*, 1077 (2005) 49.
349. M. M. Galera, M.D. Gil García, R. S. Valverde, *J. Chromatogr. A*, 1113 (2006) 191.
350. H. N. Choi, S.H. Cho, Y.J. Park, D.W. Lee, W.Y. Lee, *Anal. Chim. Acta*, 541 (2005) 47.
351. N. Tang, T. Hattori, R. Taga, et al, *Atmospheric Environment*, 39 (2005) 5817.
352. H. Kodamatani, K. Saito, N. Niina, S. Yamazaki, Y. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1100 (2005) 26.
353. H. Kodamatani, H. Shimizu, K. Saito, S. Yamazaki, Y. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1102 (2006) 200.
354. J. J. S. Chinchilla, L.G. Gracia, A.M. G. Campaña, K. Imai, L.E. G. Ayuso, *J. Chromatogr. A*, 1095 (2005) 60.
355. S.L. Fan, L.K. Zhang, J.M. Lin, *Talanta*, 68 (2006) 646.
356. G.Z. Tsogas, D.L. Giokas, A.G. Vlessidis, N.P. Evimirids, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 56.
357. G.Z. Tsogas, D.L. Giokas, A.G. Vlessidis, N.P. Evimirids, *J. Chromatogr. A*, 1107 (2006) 208.
358. K. Hayakawa, C. Lu, S. Mizukami, A. Toriba, N. Tang, *J. Chromatogr. A*, 1107 (2006) 286.
359. W.R.G. Baeyens, B.L. Ling, K. Imai, A.C. Calokerinos, S.G. Schulman, *J. Microcol. Sep.*, 6 (1994) 195.

360. T. Staller, M. J. Sepaniak, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2291.
361. A.M. Garcia-Campana, W.R.G. Baeyens, Y. Zhao, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 83A.
362. X. Huang, Z. Fang, *Anal. Chim. Acta*, 414 (2000) 1.
363. B. M. Simonet, A. Ríos and M. Valcárcel, *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 605.
364. Ana M. García-Campaña, Laura Gámiz-Gracia, Willy R. G Baeyens and Fermín Alés Barrero, *Journal of Chromatogr. B*, 793 (2003) 49.
365. Y. M. Liu, J. K. Cheng, *Journal of Chromatogr. A*, 959 (2002) 1.
366. W.P. Yang, Z.J. Zhang, W. Deng, *Talanta*, 59 (2003) 951.
367. W.P. Yang, Z.J. Zhang, W. Deng, *Anal. Chim. Acta*, 485 (2003) 169.
368. W.P. Yang, Z.J. Zhang, W. Deng, *J. Chromatogr. A*, 1014 (2003) 203.
369. X.Y. Wang, Q. Wang, Y. Chen, H.W. Han, *J. Chromatogr. A*, 992 (2003) 181.
370. Y.M. Liu, J.K. Cheng, *J. Chromatogr. A*, 1003 (2003) 211.
371. H.L. Jiang, Y.Z. He, H.Z. Zhao, Y.Y. Hu, *Anal. Chim. Acta*, 512 (2004) 111.
372. S.Q. Han, E.B. Liu, H. Li, *J. Pharmaceu. Biomed. Anal.*, 37 (2005) 733.
373. Y.G. Hu, X.X. Li, Z.T. Pang, *J. Chromatogr. A*, 1091 (2005) 194.
374. K. Tsukagoshi, K. Sawanoi, R. Nakajima, *Talanta*, 68 (2006) 1071.
375. S.L. Zhao, W.L. Bai, H.Y. Yuan, D. Xiao, *Anal. Chim. Acta*, 559 (2006) 195.
376. S.L. Zhao, H.Y. Yuan, C. Xie, D. Xiao, *J. Chromatogr. A*, 1107 (2006) 290.
377. J.F. Liu, W.D. Cao, X.R. Yang, E.K. Wang, *Talanta*, 59 (2003) 453.
378. R.G. Su, J.M. Lin, F. Qu, Z.F. Chen, H.Y. Gao, M. Yamada, *Anal. Chim. Acta*, 508 (2004) 11.
379. K. Tsukagoshi, T. Tokunaga, R. Nakajima, *J. Chromatogr. A*, 1043 (2004) 333.
380. W. Pan, Y.J. Liu, Y. Huang, S. Z. Yao, *J. Chromatogr. B*, 831 (2006) 17.

## 第二章 流动注射化学发光法测定注射液 中的盐酸多巴酚丁胺

**摘要** 在碱性溶液中，盐酸多巴酚丁胺与鲁米诺反应能够产生微弱的化学发光，铁氰化钾/亚铁氰化钾对该发光反应具有明显的增强作用。基于此，建立了一种新的测定盐酸多巴酚丁胺的流动注射化学发光方法。考察了各种影响因素，确立了反应的最佳条件。在优化的条件下，盐酸多巴酚丁胺在  $1.0 \times 10^{-10} \text{ g mL}^{-1}$  到  $1.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$  范围内与相对化学发光强度有线性关系，检测限为： $2.6 \times 10^{-11} \text{ g mL}^{-1}$  ( $3\sigma$ )。对含量为  $1.0 \times 10^{-8} \text{ g mL}^{-1}$  的标准溶液平行测定 11 次得到的相对标准偏差为 1.23%。该法已成功运用于注射液中的盐酸多巴酚丁胺有效成分含量的测定，得到的结果与药典方法相吻合。并对化学发光反应机理做了简单探讨。

**关键词** 化学发光 流动注射 盐酸多巴酚丁胺 鲁米诺

### 1. 引言

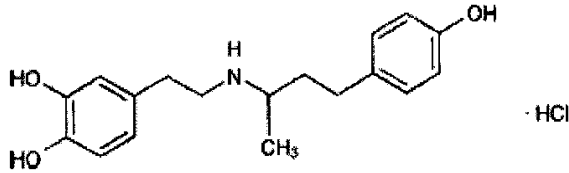


Fig. 1. Chemical structure of dobutamine hydrochloride.

盐酸多巴酚丁胺， $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ ，化学名称为：4-[2-[[1-甲基-3-(4-羟苯基)丙基]氨基]乙基]-1,2-苯二酚盐酸盐，结构式见图 1，本品为多巴胺同系物， $\beta$  肾上腺素受体激动药。主要兴奋  $\beta_1$  肾上腺素受体，有轻微的  $\alpha$  作用，大剂量时有  $\beta_2$  的血管扩张作用，对心肌有正性肌力和较弱的正性频率作用，能激活腺苷环化酶，使 ATP 转化为 c-AMP，促进钙离子进入心脏细胞膜，从而增强心肌收缩力，增加心排血量，降低肺毛细血管楔压。很少增加心肌耗氧量，可降低外周血管阻力，能降低心室充盈压，促进房室结传导。用于治疗各种原因引起的心肌收缩力衰弱的心衰，如冠心病引起的急性心肌梗塞泵衰竭，扩张型心肌病，风湿性瓣膜病引起的心衰，心脏直视手术后所致的低排血量综合症以及难治性心力衰竭，器质性心脏病所发生的心力衰竭、心肌梗塞所致的心源性休克及术后低

血压[1]。

目前, 盐酸多巴酚丁胺测定的方法主要有, 非水滴定法[2], 分光光度法[2], 高效液相色谱法[3], 碳糊电极吸附伏安分析法[4], 多壁碳纳米管修饰玻碳电极电化学分析方法[5]。但这些方法, 手工操作繁琐、费时, 分光光度法通常灵敏度不够高, 色谱法通常要用到挥发性的有机溶剂, 且仪器昂贵不容易普及使用, 电化学的方法通常存在重现性差的缺点, 因此有必要建立一种简单、快速、灵敏的测定方法。

近年来, 化学发光(Chemiluminescence, CL)分析法以其灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单、操作方便、分析快速和容易实现自动化等优点, 而成为分析化学中一个十分活跃的研究热点, 并与众多学科相交叉, 研究和应用领域越来越广泛。流动注射(Flow-Injection, FI) 即在热力学非平衡条件下, 在液流中重现地处理试样或试剂区带的定量流动分析技术, 它具有高效率、高精度和快速分析的特点。将其两者相结合, 可使 FI-CL 分析法同时具有以上优点。FI-CL 的检测限可达  $10^{-9} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 线性范围宽, 反应物发光强度与待测物浓度可在 4~5 个数量级范围内呈线性关系, 有的甚至可达 7 个数量级, 它是一种有效的痕量分析技术。FI-CL 已经成功运用于多种药物的分析测定[6-8]。范顺利[9]等人报道了用酸性高锰酸钾-甲醛化学发光体系测定盐酸多巴酚丁胺的分析方法, 检测限达到  $0.07 \text{ mg/L}$ , 宋凤敏等人基于  $\text{NaIO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{-H}_3\text{PO}_4$  化学发光反应体系, 测定了盐酸多巴酚丁胺, 检测限为  $2.7 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ 。

我们在实验中发现, 盐酸多巴酚丁胺与碱性鲁米诺溶液可以产生微弱的化学发光信号, 该信号可以被铁氰化钾/亚铁氰化钾溶液明显增敏。基于此, 结合流动注射技术, 建立了一种新的流动注射-化学发光方法用于快速测定痕量的盐酸多巴酚丁胺。在优化的条件下, 本法在  $1.0 \times 10^{-10} \text{ g mL}^{-1}$  到  $1.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$  范围内与相对化学发光强度有线性关系, 盐酸多巴酚丁胺测定的检测限为:  $2.6 \times 10^{-11} \text{ g mL}^{-1}$  ( $3\sigma$ )。与已报道的测定盐酸多巴酚丁胺的化学发光方法相比, 该法具有更高的灵敏度和更宽的线性范围, 并且已用于医用注射液中盐酸多巴酚丁胺的含量测定, 将本法与药典方法 [2] 进行比较, 所得结果令人满意。并对可能的反应机理进行了初步探讨。

## 2. 实验部分

## 2.1. 仪器部分

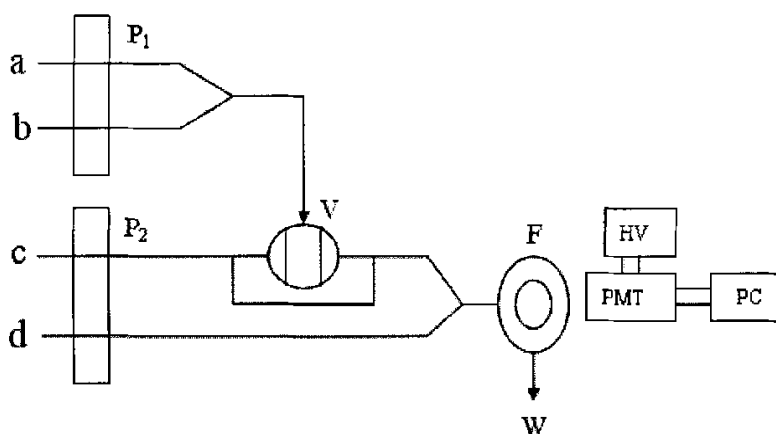


Fig.2. Schematic diagram of the FIA-CL manifold employed for the determination of dobutamine hydrochloride. a, luminol solution; b, standard or sample solution; c, potassium ferrocyanide (contained sodium hydroxide) solution; d, potassium ferricyanide solution; P, peristaltic pump; v, injection valve; F, CL flow cell; PMT, photomultiplier tube; HV, negative high-voltage supply; PC, computer; W, waste solution.

化学发光强度采用 IFFL-D 型流动注射-化学发光分析仪(西安瑞迈电子仪器公司)测定。示意图见图 2。采用双蠕动泵传送系统中的样品及所有试剂溶液,聚四氟乙烯管(0.8 mm 内径)用作流路系统中的连接材料。采用装有样品环的八通注射阀将一部分样品或标准溶液与鲁米诺溶液在线混合,注射到亚铁氰化钾/NaOH 混合溶液载流中,然后与铁氰化钾溶液通过 Y 型管在流通池前混合,最后在流通池中产生化学发光发射。流通池中的化学发光信号被光电倍增管检测、放大并最终由装有 IFFL-D 型流动注射-化学发光分析软件的计算机纪录和处理。

该反应系统的化学发光光谱采用日立 850 型荧光光度计(日本),关闭激发光源后进行研究。

## 2.2. 试剂部分

本实验所使用的试剂均为分析纯,购自上海化学试剂公司,若没有另外说明,溶液均采用二次蒸馏水配置。

盐酸多巴酚丁胺储备溶液(1.0 mg/mL):准确称取 0.0250 g 标准样品(对照品,由上海药检所友情提供),转入 25 mL 棕色容量瓶中,加少量蒸馏水超声溶解后,用蒸馏水定容至刻度线,摇匀后放于 4℃冰箱内避光存放,一般可存放 5 天左右。工作溶液在使用前用蒸馏水适当稀释后使用。

鲁米诺储备液(0.01 mol/L):准确称取 0.1772 g 鲁米诺标准品(Fluka, Biochemika),用少量 0.5 mol/L NaOH 溶液溶解后,转入 100 mL 棕色容量瓶中,用相同浓度的 NaOH 溶液定容到刻度,摇匀后存放于冰箱中备用。

铁氰化钾储备液 (0.01 mol/L): 储存于棕色容量瓶中。

亚铁氰化钾溶液 (0.2 mol/L): 用 0.7 mol/L NaOH 溶液溶解并定容,存放于棕色容量瓶中备用。

实验时,尽量采用最少的稀释步骤来制备溶液。所有化学品未经进一步提纯。

盐酸多巴酚丁胺注射液,购自上海天山中医医院,10 mg/mL。

### 2.3. 实验方法

为了得到良好的稳定性,在第一次正式测量前仪器至少要运行 10min。如图 2 所示,将 a, b, c, d 四条流通管分别插入  $1.5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> 鲁米诺溶液、盐酸多巴酚丁胺的标准或样品溶液、0.20 mol/L 亚铁氰化钾溶液(含 0.7 mol/L NaOH 溶液)、 $6.0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> 铁氰化钾溶液中。开启蠕动泵冲洗整个系统的流路,直至得到一个稳定的空白信号。将 75 μL 鲁米诺与标准或样品的混合溶液通过八通阀注射到载流中,然后与铁氰化钾溶液合并后到达流通池,产生化学发光,记录光信号,样品浓度由相对化学发光强度进行定量测定。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 化学发光反应系统条件优化

### 3.1.1. 鲁米诺浓度的影响

在  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  到  $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  浓度范围内考察了鲁米诺浓度对化学发光强度的影响。实验结果（图 3）表明，当鲁米诺的浓度为  $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  时，信噪比达到一个最大值，且此时相对化学发光强度较大，因此选择  $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  的鲁米诺做后面的实验。

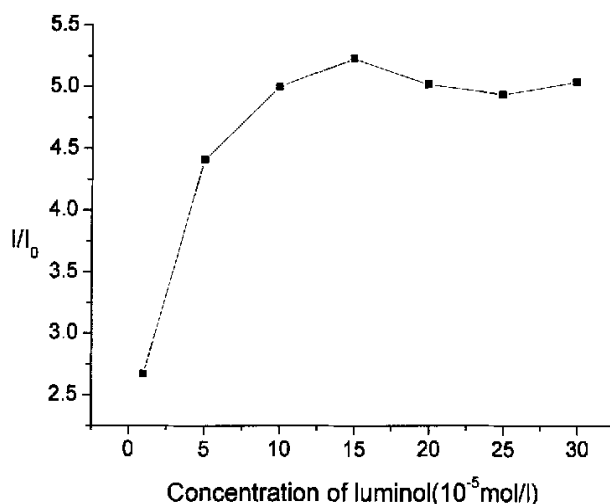


Fig.3. Effect of concentration of luminol on the CL intensity of the system Potassium ferricyanide,  $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ; potassium ferrocyanide,  $0.2 \text{ mol/L}$ ; sodium hydroxide,  $0.5 \text{ mol/L}$ ; dobutamine hydrochloride,  $1 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ ; Negative high-voltage,  $-800 \text{ v}$ ; flow rate,  $3.0 \text{ mL/min}$ .

### 3.1.2. NaOH 浓度的影响

鲁米诺- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  化学发光反应要求在碱性条件下。为了研究反应介质对化学发光的影响，实验中我们考察了载流中 NaOH 溶液浓度对化学发光强度的影响。实验结果（图 4）表明，当载流中 NaOH 溶液浓度为  $0.7 \text{ mol/L}$  时，化学发光强度的信噪比可以达到一个最大值，相对化学发光强度也较大，因此本实验选择的 NaOH 溶液浓度为  $0.7 \text{ mol/L}$ 。



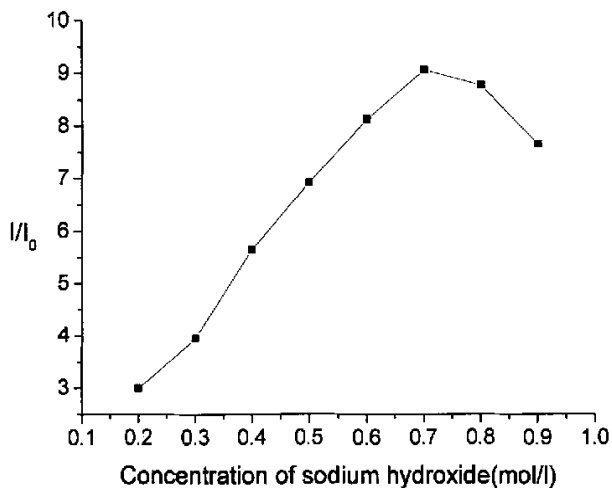


Fig.4. Effect of concentration of sodium hydroxide on the CL intensity  
Potassium ferricyanide,  $6.0 \times 10^{-5}$  mol/L; potassium ferrocyanide, 0.2 mol/L;  
luminol,  $1.5 \times 10^{-4}$  mol/L; dobutamine hydrochloride,  $1 \times 10^{-7}$  g/mL; negative high  
voltage, -800V; flow rate, 3.0 mL/min.

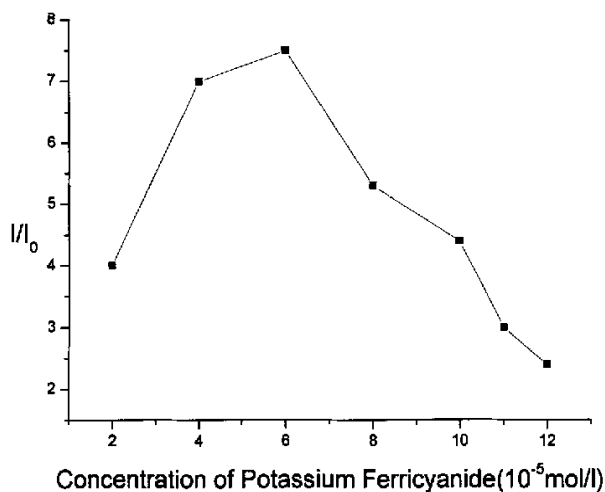


Fig.5. Effect of concentration of potassium ferricyanide on the CL intensity  
Potassium ferrocyanide, 0.2 mol/L; luminol,  $1.5 \times 10^{-4}$  mol/L; sodium hydroxide,  
0.5 mol/L; dobutamine hydrochloride,  $1 \times 10^{-7}$  g/mL; negative high-voltage, -800v;  
flow rate, 3.0 mL/min.

### 3.1.3. 铁氰化钾与亚铁氰化钾浓度的影响

在实验中我们发现, 盐酸多巴酚丁胺可以在碱性介质中与鲁米诺反应, 产生微弱的化学发光信号, 该化学发光反应可以被铁氰化钾所催化, 但是如果不加入亚铁氰化钾, 空白信号也会增大很多, 这是因为在碱性溶液中, 铁氰化钾本身就可以氧化鲁米诺而产生强的发光信号。Shevlin 和 Neufeld [11]曾报道过铁氰化钾与鲁米诺的化学发光反应可以被亚铁氰化钾所抑制。我们推断, 如果在反应体系中, 铁氰化钾/亚铁氰化钾的浓度比合适的话, 不仅可以有效催化鲁米诺与盐酸多巴酚丁胺的化学发光反应, 而且可以极大的抑制由于铁氰化钾与鲁米诺的化学发光反应而产生的背景信号。因此, 我们分别试验了  $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  到  $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  的铁氰化钾 (图 5) 与 0.05 到 0.25 mol/L 的亚铁氰化钾 (图 6) 浓度对化学发光强度的影响。实验结果表明, 最大的信噪比及较大的相对化学发光强度, 在  $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  的铁氰化钾与 0.20 mol/L 的亚铁氰化钾时得到。因此我们分别选用  $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  的铁氰化钾与 0.20 mol/L 的亚铁氰化钾浓度进行实验。

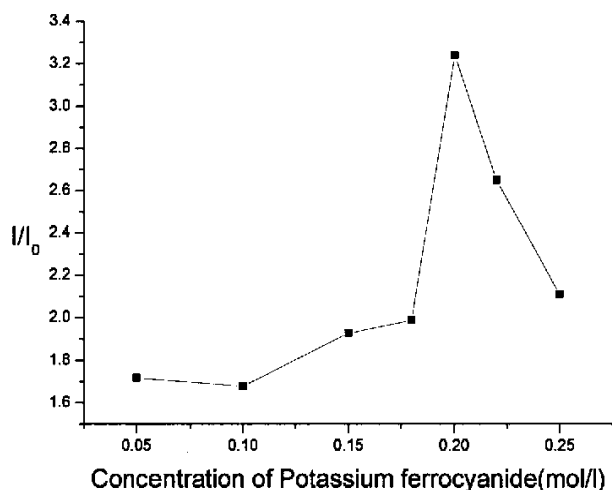


Fig.6. Effect of concentration of potassium ferrocyanide on the CL intensity Potassium ferricyanide,  $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ; luminol,  $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ; sodium hydroxide, 0.5 mol/L; dobutamine hydrochloride,  $1 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ ; negative high-voltage, -800v; flow rate, 3.0 mL/min.

### 3.1.4. 流速的影响

流速在流动注射-化学发光实验系统中, 是一个非常重要的影响因素。为了能在流通池中收集到最佳的化学发光信号, 设置一个最佳的试剂传输速度是非常必要的。本试验考察了 1.0 到 3.5 mL/min 的流速对化学发光强度的影响。结果表明, 信噪比及相对化学发光强度随着流速的增加而增加, 但当流速达到 3.0 mL/min 后, 增幅趋于平缓。考虑到仪器的稳定性、实验的重现性以及试剂的消耗等问题, 我们选择 3.0 mL/min 作为我们实验的优化流速。在该流速下, 一次完整的样品分析, 包括冲洗、采样和测定, 需要 40s, 一小时之内可以完成 90 次样品分析。

### 3.2. 方法的校正曲线、线性范围、检测限及相对标准偏差

在选定的实验条件下, 相对化学发光强度与盐酸多巴酚丁胺的浓度在  $1.0 \times 10^{-10}$  到  $1.0 \times 10^{-7}$  g mL<sup>-1</sup> 范围内有良好的线性关系, 线性回归方程为:  $I = 30.7 + 0.58 \times 10^{10} C$  ( $C$  是盐酸多巴酚丁胺的浓度, g mL<sup>-1</sup>), 相关系数是 0.9977 ( $n = 5$ )。检测限为:  $2.6 \times 10^{-11}$  g mL<sup>-1</sup> ( $3\sigma$ )。对含量为  $1.0 \times 10^{-8}$  g mL<sup>-1</sup> 的标准溶液平行测定 11 次得到的相对标准偏差为 1.23%。与文献报道的化学发光方法相比较, 可以看出本法的检测限较文献报道值低 2-3 个数量级, 且线性范围较宽。

### 3.3. 干扰研究

为了测定药品中盐酸多巴酚丁胺的含量, 实验对在鲁米诺化学发光体系中可能引起干扰的常见离子及商业药品中常见的共存成分考察了对本反应体系的干扰情况。实验以  $5.0 \times 10^{-8}$  g mL<sup>-1</sup> 的盐酸多巴酚丁胺标准溶液为基准, 逐步增加所考察的成分的浓度进行干扰实验, 以所引起的相对化学发光强度的相对偏差不超过  $\pm 5\%$  为标准。实验结果表明, 500 倍的  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $NH_4^+$ ,  $C_2O_4^{2-}$ ,  $SCN^-$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $Na^+$ , 柠檬酸, 200 倍的  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ac^-$ , 苯酚, 150 倍的苯甲酸, 100 倍的二甲胺,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Br^-$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $NO_3^-$ , 75 倍的三乙胺, 5 倍的葡萄糖, 淀粉,  $CO_3^{2-}$ ,  $Fe^{2+}$ , 邻苯二酚和等量的  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , 酒石酸, 间苯二酚, 0.1 倍的尿素都不引起干扰。

由于医用注射液就是盐酸多巴酚丁胺的灭菌水溶液,上述讨论的某些干扰成分或者不存在,或者低于其容忍限度,因此医用注射液可以直接用该法进行测定,而不需要经过任何预先处理。

### 3.4. 应用

准确移取少量盐酸多巴酚丁胺注射液,转入 100mL 棕色容量瓶中,用蒸馏水稀释到刻度,该溶液作为样品溶液待用。取一定体积的上述样品溶液,适当稀释后,按照 2.3 的实验步骤进行化学发光测定,结果见表 1,所得结果与用药典方法所测值相吻合。同时做加标回收率测定,由表 2 可见,结果令人满意。

Table 1

Determination of dobutamine hydrochloride in pharmaceuticals with the proposed CL procedure and official method

Sample	Labeled (ng/mL)	Proposed method		Official method	
		Content* (ng/mL)	RSD (%)	Content* (ng/mL)	RSD (%)
dobutamine	1.0	1.036	1.2	1.022	1.0
hydrochloride	1.0	1.048	1.1	1.028	1.7

\* Average of five determinations

Table 2

The recoveries of standard dobutamine hydrochloride addition in pharmaceutical preparations

Sample	Concentration ( $10^{-9}$ g/mL) *			Recovery (%)
	Content	Added	found	
Dobutamine		1.00	2.081	103.3
hydrochloride	1.048	2.00	3.045	99.8
		3.00	4.078	101.0

\* Average of five determinations

### 3.5. 反应机理讨论

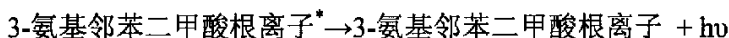
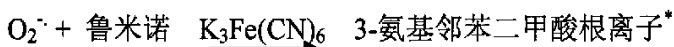
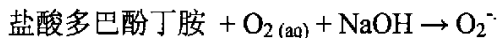
在碱性条件下,铁氰化钾氧化鲁米诺可产生化学发光,Shevlin 和 Neufeld[11]对铁氰化钾氧化鲁米诺化学发光反应机理进行了研究,指出其发光体是 3-氨基邻苯二甲酸根离子,其最大发射波长为 425nm,其发射光谱与预先报道的其它鲁米诺氧化体系的光谱相似[12]。Diza 等[13,14]通过对在苯环上含一个或二个羟基或甲氧基的苯甲酸或苯丙烯酸的多酚物质对发光体系的增强和抑制作用的研究,发现多酚类有机物对该发光体系的增强或抑制作用与有机物的结构和还原性有关,提出多酚类物质影响化学发光的机理。Barnett 等[15]发现  $\alpha$ , 4-二羟基-3-甲氧基苯乙酸(VMA)对发光体系有增强作用,而结构相似的 4-羟基-3-甲氧基苯乙酸(-COOH 的  $\alpha$  位上少一个-OH) (HVA)对发光体系具有抑制作用,指出了有机物的基团性质的不同对发光的不同影响,发展了用增强法测定  $\alpha$ , 4-二羟基-3-甲氧基苯乙酸(VMA)的方法。崔华[16]等发现绿原酸、芸香苷、邻苯二酚、对苯二酚等二酚类化合物等对鲁米诺- $K_3Fe(CN)_6$  发光体系具有抑制作用,结合 HPLC 利用抑制法分析了上述物质,崔华[17]等认为其抑制作用是由于还原性有机物与鲁米诺竞争氧化剂  $K_3Fe(CN)_6$  导致的。

本文为了对发光机理进行解释,采用荧光光度计,关闭激发光源,分别测定了在盐酸多巴酚丁胺存在和不存在的两种情况下,本发光体系的化学发光光谱。实验结果表明,二者的最大发射光强度均出现在 425nm 处,只是在有盐酸多巴酚丁胺的体系里发光强度被大大增强了。这说明本文所提出的鲁米诺-铁氰化钾/亚铁氰化钾-盐酸多巴酚丁胺化学发光反应体系的发光体仍然是 3-氨基邻苯二甲酸根离子,即发光体仍然是鲁米诺的氧化产物。

另一方面,当我们将标准溶液、鲁米诺溶液、铁氰化钾溶液、亚铁氰化钾溶液全部通  $N_2$  5 分钟,用于清除溶液中的溶解氧后,此时所测得的化学发光强度约降低了 27%,这说明该发光反应是需要溶解氧的参与的。

已有研究[18-23]表明,在碱性溶液中,超氧阴离子自由基可以氧化鲁米诺产生化学发光,而在碱性溶液中,还原剂可以将溶解氧还原成超氧阴离子自由基中间产物,生成的超氧阴离子自由基再与鲁米诺作用,通过一个不稳定的过氧化物,转化为激发态的 3-氨基邻苯二甲酸根离子,从而产生光发射。在盐酸多巴酚丁胺的分子结构中,有多个可以被氧化的酚羟基结构,而溶液中的铁氰化钾又可以催化超氧阴离子自由基与鲁米诺在碱性溶液中的化学发光反应。

基于上述讨论,可能的化学发光反应机理推断如下:



#### 4. 结论

本文提出了一种简单、快速、高灵敏度的流动注射-化学发光方法用于测定盐酸多巴酚丁胺。方法具有较宽的线性范围,适用于自动连续的分析测定,不需要经过任何预处理,就可以运用于盐酸多巴酚丁胺注射液中有有效成分的测定,结果令人满意。

#### References

- [1] Committee of Chinese Pharmacopoeia. Chinese Pharmacopoeia exegesis (Part II), Chemical industry Press, Beijing, 1990, 423.
- [2] Committee of Chinese Pharmacopoeia. Chinese Pharmacopoeia (Part II), Chemical industry Press, Beijing, 1990, 473.
- [3] H. Husseini, V. Mitrovic, M. Schlepfer, J. Chromatogr. Biomed. Appl. 620 (1993) 164.
- [4] G. Yang, L. Jin, Chem. J. Chin. Univ. 19 (1998) 1574.
- [5] W. Qu, Sh. Zhang, Ch. Yang, J. Chin. Anal. Sci. 19 (2003) 343.
- [6] J. Du, L. Shen, J. Lu, Anal. Chim. Acta 489 (2003) 183.
- [7] Z. Song, T. Zhao, L. Wang, Z. Xiao, Bioorg. Med. Chem. 9 (2001) 1701.
- [8] B. Li, Z. Zhang, Sensors and Actuators B 69 (2000) 70.
- [9] S. Fan, Z. Wu, L. Zhang, C. Lv, J. Lin, Chin. J. Instr. Anal. 22(2003) 87.
- [10] F. Song, S. Hu, Y. Huang, Huaxue Fenxi Jiliang 12(2003) 26.
- [11] P.B. Shevlin, H.A. Neufeld, J. Org. Chem. 35 (1970) 2178.
- [12] G. Chen, F. Zhang, Chemiluminescence and Bioluminescence, Theory and Application, Fujian Science and Technology Press, Fuzhou, China, 1998, 83.
- [13] A.N Diaz, J.A.G. Garcia, Anal.Chem., 66 (1994) 988.
- [14] A.N.Diaz, F.G. Sanchez, J.A.G. Garcia, J. Biolumi. Chemilumin., 175(1995)175.
- [15] N.W. Barnett, P.S. Francis, S.W. Lewis, K.F.Lim. Anal. Commun., 36 (1999) 131.

- [16] H. Cui, C.X. He, G. W. Zhao, *J. Chromatogr. A*, 855(1999)171.
- [17] C.X. He, H. Cui, G. W. Zhao, *Anal. Chim. Acta*, 351 (1997)241.
- [18] Y.X. Li, R.Z. Fang, *Prog. Biochem. Biophys.* 10 (1983) 59.
- [19] A.A. Alwarthan, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta* 196 (1987) 135.
- [20] J.R. Lu, X.R. Zhang, Z.J. Zhu, Z.J. Zhang, M.Q. Li, *Chem. J. Chin. Univ.* 12 (1991) 1595.
- [21] H. Kubo, A. Toriba, *Anal. Chim. Acta* 353 (1997) 345.
- [22] J. Du, Y. Li, J. Lu, *Talanta* 55 (2001) 1055.
- [23] J. Du, Y. Li, J. Lu, *Luminescence* 17 (2002) 165.

## 第三章 采用流动注射 N-溴代丁二酰亚胺化学发光体系 测定美洛昔康

**摘要:** 本文基于美洛昔康与 N-溴代丁二酰亚胺在碱性介质中的反应, 首次提出一种快速灵敏的流动注射化学发光测定方法。在优化的实验条件下, 在  $2.2 \times 10^{-7} \sim 2.8 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内美洛昔康浓度的对数值与相对化学发光强度的对数值呈线性关系, 检测限达到  $7.7 \times 10^{-8}$  mol/L, 对浓度为  $2.8 \times 10^{-6}$  mol/L 的美洛昔康标准样品溶液平行测定 11 次, 计算得到相对标准偏差为: 2.14%。该方法成功运用于药品中的美洛昔康含量测定, 测定结果与药典方法相吻合。并利用光谱数据对发光机理进行了初步探讨。

**关键词:** 化学发光; 流动注射; N-溴代丁二酰亚胺; 美洛昔康

### 1. 引言

美洛昔康 (meloxicam) 是一种新型非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 化学名为 4-羟基 2-甲基-N-(5-甲基-2-噻唑基)-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺-1,1 二氧化物, 结构式见图 1。该品化学性质稳定, 不吸湿, 对光不敏感, 难溶于水, 溶解度与 pH 值有关, 其溶解度在 pH4 时最低, 随着 pH 值升高而升高[1~3]。

美洛昔康为镇痛、抗炎的非甾体抗炎药新品种, 主治风湿性、类风湿性关节炎、骨关节炎及各种急慢性炎症和疼痛。其镇痛作用与其他非甾体抗炎药无显著性差异; 抗炎作用优于其它非甾体抗炎药。

美洛昔康最突出的临床优势, 在于对胃肠道的刺激作用明显小于其他非甾体抗炎药。这一优势的机理在于: 非甾体抗炎药是通过抑制花生四烯酸转化为前列腺素 (PG) 的环氧合酶 (COX), 减少 PG 生成而发挥镇痛、抗炎作用的。近年来发现, COX 分为 COX-1 和 COX-2 两种不同的空间构象。其中 COX-1 可作用生成介导胃粘膜保护和肾灌注的 PG; COX-2 可作用生成介导炎症反应的 PG。美洛昔康可以高度选择性地抑制 COX-2, 对 COX-1 的作用很弱, 因此具有较强的抗炎、镇痛效果, 而对胃肠道和肾脏的不良反应轻微[4]。其他非甾体抗炎药对 COX-1 和 COX-2 的抑制缺乏选择性, 因而人体耐受性差, 治疗过程中因



引起胃肠道溃疡、出血等副作用而导致被迫停药的现象屡见不鲜。

文献报道可以用紫外分光及荧光等光度方法[5~9]、电化学方法[10~14]、毛细管区带电泳[15]、HPLC 法[7, 16~20]等测定药品及血浆中美洛昔康的含量。但是这些方法有的需要昂贵的仪器设备, 有的存在灵敏度低、重复性较差、操作繁琐等不足。

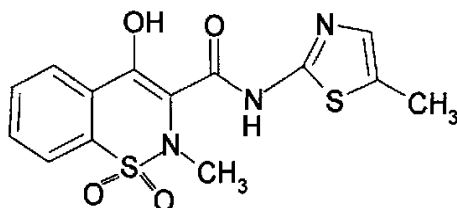


Fig. 1. Chemical structure of meloxicam

流动注射-化学发光法具有仪器设备简单、灵敏度高、线性范围宽、快速、重复性好、自动化程度高等特点, 受到人们的普遍关注, 已经广泛应用于药品质量监测及血浆样品的测定[21~27]。然而, 就我们所知, 至今未见到有关化学发光法测定美洛昔康的文献报道。

本文介绍了一种简单、快速、灵敏的流动注射-化学发光测定美洛昔康的方法。我们发现在荧光素存在的条件下, 美洛昔康与 N-溴代丁二酰亚胺(NBS)在碱性介质中混合后会有很强的化学发光信号产生, 而且该化学发光强度与美洛昔康的浓度在一定的范围内有比例关系, 基于此建立了 NBS-荧光素-美洛昔康体系流动注射-化学发光法测定药品中美洛昔康的方法。

## 2. 实验部分

### 2.1. 仪器与试剂

IFFL-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈电子科技有限公司); 日立 850 荧光光度计(日本); Cary 50 紫外可见分光光度计(美国瓦立安公司)。

美洛昔康标准品(含量为 99.8%, 由上海市药检所友情提供)储备液(1mg/mL): 用 0.01mol/L 的 NaOH 溶液每天新鲜配制, 并于 4℃冰箱内避光存放。工作溶液用相同浓度的氢氧化钠溶液在使用前稀释使用。NBS 储备溶液(0.04 mol/L): 称取 0.712g NBS(上海化学试剂公司, 中国)溶于少量水中, 转入 100mL

棕色容量瓶中，定容，每天新鲜配置，使用时稀释。荧光素储备溶液 (2mmol/L): 称取 0.0665g 荧光素 (上海化学试剂公司，中国) 用 0.01mol/L 的 NaOH 溶液配制，转入 100mL 棕色容量瓶中，定容。

所用试剂均为分析纯或优级纯，水为二次蒸馏水。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1. 流动注射-化学发光试验

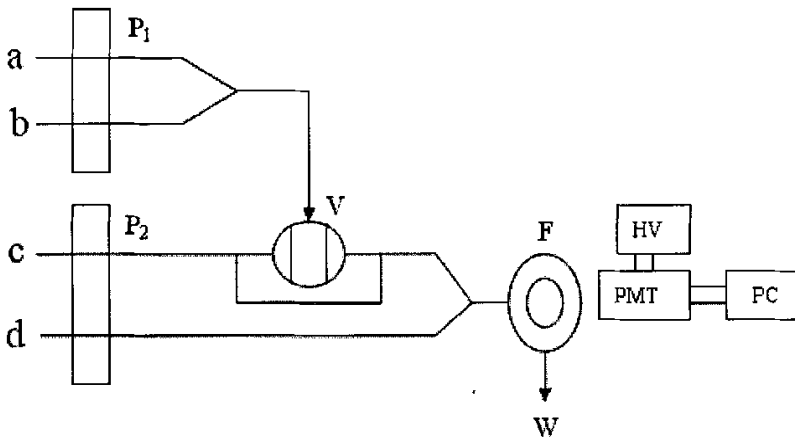


Fig.2. Schematic diagram of the FIA-chemiluminescence manifold employed for the determination of meloxicam.

a, fluorescein solution; b, standard or sample solution; c, sodium hydroxide solution as carrier stream; d, NBS solution; p, peristaltic pump; v, injection valve; F, chemiluminescence flow cell; PMT, photomultiplier tube; HV, negative high-voltage supply; PC, computer; W, waste solution.

按图 2 所示流路进行化学发光测定，以峰高定量。采用双蠕动泵，传送所有流路的溶液，流通管采用 0.8mm 内径的聚四氟乙烯管，美洛昔康的样品或工作溶液与荧光素溶液在线经 Y 型混合单元合并后，通过八通进样阀采集于载流溶液并与 NBS 溶液在进入平面盘管式化学发光流通池之前混合，进入化学发光池后产生光发射。流通池中的化学发光信号由 R456 型光电倍增管进行无波长分辨的强度测量，并由计算机采用 IFFL-D 型流动注射化学发光分析系统软件进行记

录。

### 2.2.2. 静态化学发光实验

化学发光反应的动力学特征测量体系由无色玻璃烧杯及 IFFL-D 型超微弱化学发光分析仪构成。将玻璃烧杯直接放置于化学发光分析仪暗室内的光电倍增管光窗玻璃上进行测量。烧杯中预先加入 1.50 mL  $1.00 \times 10^{-5}$  g/mL 样品溶液、1.50 mL 1mmol/L 荧光素溶液，然后将 100  $\mu$ L 4 mmol/L NBS 溶液从进样口注入上述玻璃烧杯中，同时记录化学发光信号。

### 2.2.3. 化学发光光谱实验

反应体系的化学发光光谱用日立 850 型荧光光度计，将激发光源关闭，出射狭缝宽度设置在 20nm 完成。

在实验中，首先在石英比色皿中分别加入 0.5 mL  $1.00 \times 10^{-5}$  g/mL 美洛昔康溶液及 0.50 mL 1mmol/L 荧光素溶液，然后通过流通管快速注射 0.5mL 0.4 mmol/L NBS 溶液至同一比色皿中，同时通过连续扫描模式记录化学发光光谱。

### 2.2.4. 紫外光谱实验

加入 NBS 溶液前后美洛昔康紫外光谱图的变化，采用 Cary 50 紫外可见光谱仪进行测量。为了便于比较，也测定了 NBS 溶液的紫外光谱图。

### 2.2.5. 样品处理

取 20 片美洛昔康片，精确称重，求得每片的平均质量，然后将其研磨成均匀粉末，并彻底混匀。准确称取一部分细粉，置于 100mL 棕色容量瓶中，加入适量 0.01mol/L NaOH 溶液，超声震荡 15min，然后用相同浓度的 NaOH 溶液定容。用干燥滤纸过滤，弃去最初滤液，取滤液适量，进一步用相同浓度的 NaOH 溶液稀释后，待测。

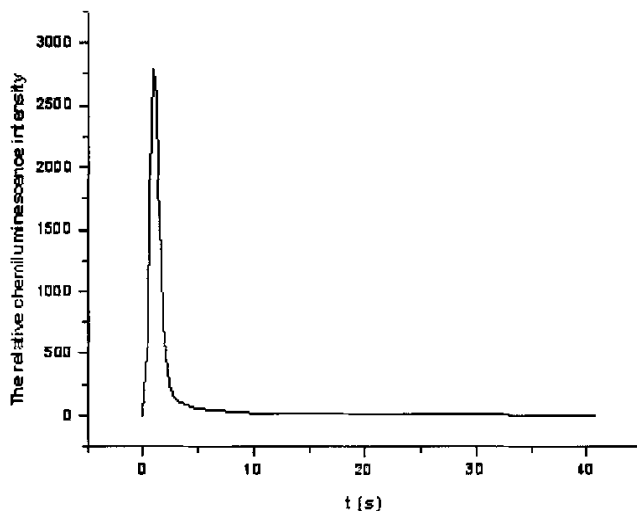


Fig. 3. Kinetic curve of chemiluminescence.

Conditions: 100  $\mu\text{l}$  of 4 mmol/L NBS was injected into a mixture solution of 1.5 mL of 1.0 mmol/L fluorescein and 1.5 mL of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  meloxicam, High voltage: -600 V.

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 化学发光反应的动力学特征

为了确定本体系化学发光反应的动力学特征,采用静态方法测定了本体系化学发光强度随时间变化的动力学特征图。图3是由5次平行实验取其平均值得到的化学发光强度-时间图,由图可见本化学发光反应是快速发光,开始反应后,在不到1秒的时间内,化学发光强度达到最大值,然后快速衰减。由此可见,采用流动注射分析将有利于提高方法的重现性、准确度和灵敏度,而且较快的载流速度将导致较大的化学发光信号强度。

#### 3.2. 化学发光反应系统的条件优化

##### 3.2.1. NBS 浓度的影响

NBS 作为氧化剂用于化学发光反应,一方面比直接使用  $\text{HBrO}$  更加稳定、方便和简单;另一方面和其它无机氧化剂如高锰酸钾、铁氰化钾、溴水等相比,该

试剂的一大优点是没有颜色,对光的自吸收很微弱,有利于灵敏度的提高,因此近几年来被广泛用作化学发光反应的氧化剂[26-38],有关光产生的途径及反应机理也有相关的研究报道[26-34]。在我们的实验中,通过对不同氧化剂的比较,包括铁氰化钾、高锰酸钾、高碘酸钾、过氧化氢等,发现 NBS 是本体系最合适的氧化剂,当加入荧光素后,在 NBS 体系中可以得到最强的化学发光信号,因此 NBS 被选作本体系的氧化剂。

实验考察了 NBS 浓度在  $1.0 \times 10^{-5}$  到  $1.2 \times 10^{-3}$  mol/L 范围内对化学发光强度的影响,结果表明,当 NBS 浓度为  $4.0 \times 10^{-4}$  mol/L 时可以得到最强的化学发光强度,因此后面的实验都采用  $4.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的 NBS 作为氧化剂。

### 3.2.2. 荧光物质的影响及反应机理探讨

在本实验中,考察了罗丹明 B、罗丹明 6G、荧光素、二氯荧光素、核黄素、8-羟基喹啉等荧光物质对化学发光信号强度的影响。结果表明,采用荧光素时可以看到最强的化学发光信号。实验考察了  $4.0 \times 10^{-4}$  到  $1.4 \times 10^{-3}$  mol/L 范围内荧光素对化学发光强度的影响。当荧光素浓度达到  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 时,化学发光信号最强。因此选用荧光素浓度为  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L。

为了解释化学发光反应系统的机理,分别测定了美洛昔康、NBS 及二者混合溶液的紫外可见吸收光谱图(图 4),另外对荧光素溶液的荧光光谱图及美洛昔康-荧光素-NBS 反应系统的化学发光光谱图(图 5)做了对照比较。由图 4 可见,美洛昔康在 362 nm (图 4 a)处有一个特征吸收峰,而 NBS 的碱性溶液在 212.5 nm (图 4 b)处有一个特征吸收峰,然而当将 NBS 加到美洛昔康溶液中后,美洛昔康的特征吸收峰消失了,而 NBS 的特征吸收峰依然存在。由此结果可以说明当将 NBS 加到美洛昔康溶液中后,美洛昔康被氧化并转化成它的氧化形式。

由图 5 可见,美洛昔康-荧光素-NBS 碱性反应系统的化学发光光谱图与荧光素的荧光发射光谱图最大发射波长相同,谱图相似。由上述光谱证据可以说明,在 NBS 氧化美洛昔康时,产生激发态的中间体,然后将反应产生的能量转移给荧光素,从而产生化学发光。这与已报道的以 NBS 作氧化剂的其它几个化学发光体系中的发光机理相吻合[27-34]。

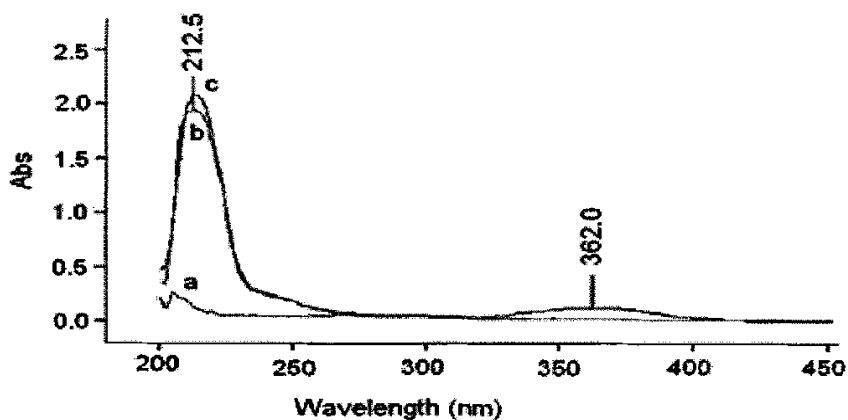


Fig. 4. The UV spectra of meloxicam before and after chemiluminescence reaction in 0.01 mol/L NaOH solution. a,  $1.00 \times 10^{-5}$  g/mL meloxicam; b, 0.4 mmol/L NBS; c, the mixture solution of  $1.00 \times 10^{-5}$  g/mL meloxicam and 0.4 mmol/L NBS.

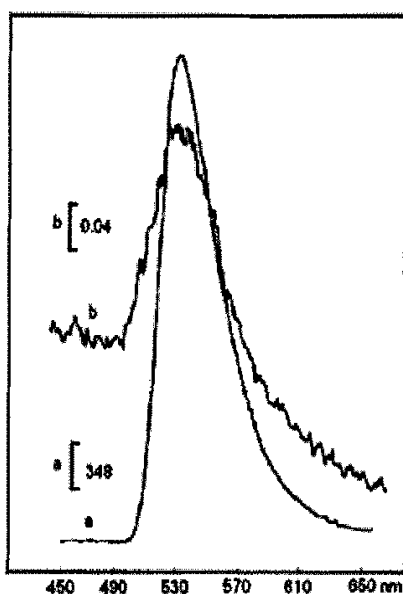


Fig.5 The comparison of chemiluminescence spectrum and fluorescence spectrum. a, fluorescence spectrum of fluorescein, Ex: 355nm; b, chemiluminescence spectrum of meloxicam- fluorescein- NBS.

### 3.2.3. NaOH 浓度的影响

由于本系统仅在碱性体系中可以观察到化学发光,因此采用 NaOH 溶液作载流。实验研究了 NaOH 溶液浓度在 0.002 到 0.06mol/L 范围内变化时对化学发光强度的影响。结果表明最大化学发光强度在 NaOH 溶液浓度为 0.01mol/L 时得到。

因此在后面的实验中选择 0.01mol/LNaOH 溶液作载流。

### 3.2.4. 流速的影响

在流动注射-化学发光分析系统中，流速是一个重要的影响因子。根据动力学曲线（图 3），本反应系统的化学发光属于快速发光，因此较快地将激发产物转移到流通池将有助于收集到最大的化学发光。实验了每一条流路的流速在 2.0-4.0 mL/min 范围内对化学发光强度的影响。结果表明化学发光强度随流速的增加而增大。最后，从化学发光强度和重现性两方面考虑，选择流速为 3.5mL/min 较为合适。在此流速下，包括管路冲洗和采样，一次完整的分析仅需要 25s，1 h 可以完成 144 次分析。

### 3.2.5. 采样体积的影响

分别试验了采样体积为 50、75、100、150、200 $\mu$ L 时对化学发光强度的影响。在 75 $\mu$ L 之前，随着采样体积的增大，可以观察到化学发光信号增强的趋势，但是大于 75 $\mu$ L 后，化学发光信号会出现双峰的现象。这是由于在样品体积过大时，其中间区域和边界区域可能会产生不同的反应速度而导致的[39]。因此可以认为在本实验体系中，采样的最佳体积为 75 $\mu$ L。

## 3.3. 标准曲线、检测限及精密度

按实验方法，在优化条件下，该体系的相对化学发光强度的对数值与美洛昔康溶液浓度的对数值在  $2.2 \times 10^{-7}$  到  $2.8 \times 10^{-5}$  mol/L 范围内成正比，方法检出限为  $7.7 \times 10^{-8}$  mol/L ( $3\sigma$ )。所得到的回归方程为： $\log(\Delta I) = 0.752 + 0.454 \log(10^7 C)$ ，C 是美洛昔康溶液的浓度(mol/L)，( $r^2 = 0.9993$ )，对  $2.8 \times 10^{-6}$  mol/L 的美洛昔康溶液平行测定 11 次，所得到的相对标准偏差为 2.14%。

## 3.4. 干扰研究

为了测定美洛昔康在药品制剂中的含量，采用  $2.8 \times 10^{-6}$  mol/L 的美洛昔康溶液为标准溶液，研究了常见离子及普通的药品赋形剂对测定的干扰。以相对误差

在±5%之内为限度，测定结果列于表1。

Table 1

Effect of other species on the determination of  $2.8 \times 10^{-6}$  mol/L meloxicam

Interferants	Maximum tolerated concentration ( $10^{-6}$ mol/L)
Starch, lactose, Citrate, EDTA, $\text{CO}_3^-$ , $\text{Na}^+$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Br}^-$ , $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,	>50
Glucose, $\text{NO}_3^-$ , $^a\text{SO}_4^{2-}$	50
Polyvinylpyrrolidone	40
$\text{HCO}_3^-$	30
Ascorbic acid	20
Citric acid, $\text{Al}^{3+}$ , $^a\text{Fe}^{2+}$ , $^a\text{Fe}^{3+}$	10
$\text{Ca}^{2+}$	2
Urea, $\text{Ni}^{2+}$ , $^a\text{Cr}^{3+}$	1
$\text{Mg}^{2+}$	0.5
$\text{S}^{2-}$ , $\text{HSO}_3^-$	0.2
$\text{Cu}^{2+}$	0.1
$\text{Mn}^{2+}$	0.05
$\text{Co}^{2+}$	0.01
$\text{NH}_4^+$	0.005

<sup>a</sup> Caused increase in emission intensity.

结果表明， $\text{Mg}^{2+}$ ， $\text{S}^{2-}$ ， $\text{HSO}_3^-$ ， $\text{Cu}^{2+}$ ， $\text{Mn}^{2+}$ ， $\text{Co}^{2+}$ ， $\text{NH}_4^+$ ，Urea， $\text{Ni}^{2+}$ ， $\text{Cr}^{3+}$ 将会在一一定的浓度范围内对美洛昔康的测定产生干扰。有一些离子的干扰可能是由于在化学发光反应前的碱性介质中产生沉淀而导致的，这些离子的干扰可以预先通过一个离子交换柱来予以消除。然而由于美洛昔康药片的主要赋形剂是淀粉、柠檬酸钠、乳糖、聚乙烯吡咯烷酮等，因此测定美洛昔康在药片中的含量几乎没有干扰。过滤后不需要其它预处理就可以测定美洛昔康在药片中的含量。

### 3.5. 样品分析



根据在实验部分描述的步骤, 本方法被应用到商业药品中美洛昔康的含量测定。结果列于表2。所得结果与按照药典规定的光度法[40]的测量结果很吻合。回收率的实验结果见表3。由表3可见, 回收率的实验结果令人满意。

Table 2

Determination of meloxicam in pharmaceutical preparations with the proposed chemiluminescence procedure and spectrophotometry

Sample	Concentration (mg/mL) <sup>a</sup>			Relative error
	Labeled	Proposed method	Spectrophotometry <sup>b</sup>	
No. 1	7.5	7.56	7.54	+0.02
No.2	7.5	7.51	7.52	-0.01

<sup>a</sup> Average of five determinations.

<sup>b</sup> Standard method.

Table 3

Recoveries of meloxicam in pharmaceutical preparations

Sample	Concentration <sup>a</sup> ( $\mu$ g/mL)			Recovery (%)
	Initially presented <sup>b</sup>	Added	Found <sup>b</sup>	
Meloxicam	0.194	0.3	0.488	98.0
		0.5	0.687	98.6
		0.7	0.871	96.7
		0.9	1.095	100.1

<sup>a</sup> Mean of five measurements.

<sup>b</sup> Measured with the proposed method.

## 5. 结论

本文基于美洛昔康在碱性条件下与NBS及荧光素反应, 可以产生强的化学发光信号, 提出了一种简单快速灵敏的流动注射-化学发光方法用于测定美洛昔康在药片中的含量。本法不需要特殊的试剂及仪器设备, 且具有较宽的线性范围和较低检测限, 将其用于药片中美洛昔康的含量测定获得了满意的结果。本文还

利用紫外吸收光谱、荧光光谱、化学发光光谱等光谱实验的结果对该化学发光反应的机理进行了解释。

## References

- [1] A. Schneider, S. Harendza, G. Zahner, et al, *Kidney Int.* 55 (1999) 430.
- [2] P.J.R. Bevis, H.A. Bird, G. Lapham, *Br. J. Rheumatol* 35 (1996) 56.
- [3] J.M.A. Laird, J.F. Herrero, P. Garcia de la Rubia, F. Cervero, *Inflamm. Res.* 46 (1996) 203.
- [4] S. Nobel, J. A. Balfour, *Drugs*, 51 (1996) 424.
- [5] M.S. Garcia, C.S. Pedreno, M.I. Albero, J. Marti, *Eur. J. Pharm. Sci.* 9 (2000) 311.
- [6] L.I. Bebawy, *Spectros. Lett.* 31 (1998) 797.
- [7] J. Joseph-Charles, M. Bertucat, *Anal. Lett.* 32 (1999) 2051.
- [8] E. M. Hassan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 771.
- [9] E. Sener, G. Altioikka, Z. Atkosar, M. Tuncel, *Die Pharmazie* 56 (2001) 186.
- [10] G. Altioikka, Z. Atkosar, M. Tuncel, *Die Pharmazie* 56 (2001) 184.
- [11] A.M. Beltagi, M.M. Ghoneim, A. Radi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 795.
- [12] S. Altýnüz, E. Nemutlu, S. Kýr, *Il Farmaco* 57 (2002) 463.
- [13] H. Huang, G. Hongyan, Z. Yonghuai, *Acta Pharm. Sinica Chin.* 35 (2000) 696.
- [14] A.E. Radi, M. Ghoneim, A. Beltagi, *Chem. Pharm. Bull.* 49 (2001) 1257.
- [15] E. Nemutlu, S. Kir, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 393.
- [16] T. Velpandian, J. Jaiswal, R.K. Bhardwaj, S.K. Gupta, *J. Chromatogr. B* 738 (2000) 431.
- [17] W.R.G. Baeyens, G. V. Weken, E. D'haeninck, et al, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 839.
- [18] N.H. Zawilla, M. A. Mohammad, N.M. El kousy, S.M. El-Moghazy Aly, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1135.
- [19] B. Dasandi, S. H. Saroj, K.M. Bhat, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 999.
- [20] J.L. Wiesner, A.D. de Jager, F.C.W. Sutherland, et al, *J. Chromatogr. B* 785 (2003) 115.
- [21] B.J. Hindson, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 1.
- [22] P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, et al, *Luminescence* 16 (2001) 1.
- [23] F.Z. Yang, C. Zhang, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30

(2002) 473.

[24] M. Catalá Icardo, M. Misiewicz, A. Ciucu, J. V. García Mateo and J. Martínez Calatayud, *Talanta* 60 (2003) 405.

[25] A. Townshend, J.A. Murillo Pulgar'yn, M.T. Alañón Pardo, *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 81.

[26] P. S. Francis, N. W. Barnett, S. W. Lewis, K. F. Lim, *Talanta* 64 (2004) 283

[27] P. S. Francis, N. W. Barnett, S. W. Lewis, K. F. Lim, *Luminescence* 19 (2004) 94

[28] Z. Wang, Z. Zhang, Z. Fu, W. Luo, X. Zhang, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2683

[29] 方卢秋, 王周平, 付志锋, 罗万芬, 章竹君, *西安师范大学学报(自然科学版)* 28 (2003) 603

[30] B. Li, Z. Zhang, Y. Jin, *Anal. Lett.* 34 (2001) 2141

[31] 罗万芬, 章竹君, 王周平, 付志锋, 方卢秋, *分析科学学报*, 20 (2004) 248

[32] 方卢秋, 李晓燕, 杨季冬, *分析测试学报*, 23 (2004) 20

[33] A. Safavi A, M. R. Baezzat, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 121

[34] S. A. Halvatzis, M. M. Timotheou-Potamia, *Talanta* 40 (1993); 1245

[35] 方卢秋, 王周平, 付志锋, 罗万芬, 章竹君, *分析测试学报*, 22 (2003) 25

[36] 方卢秋, *理化检验化学分册*, 39 (2003) 512

[37] M. Yamada, T. Nakada, S. Suzuki, *Anal. Chem. Acta* 147 (1987) 401

[38] A. Safavi, M. A. Karimi, *Talanta* 57 (2002) 491

[39] J. Michalowski, P. Halaburda, A. Kojlo, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 143

[40] 中国国家食品与药物监督管理局, 国家药物标准, WS<sub>1</sub>-(X-332)-2003Z, 45.

## 第四章 流动注射-化学发光法测定药片 及尿样中的酒石酸美托洛尔

**摘要** 本文基于酒石酸美托洛尔对酸性条件下  $\text{Ce(IV)}$  和  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  的微弱化学发光反应的增敏作用, 建立了一种简单、快速、灵敏的测定酒石酸美托洛尔的流动注射-化学发光方法, 研究了各种实验条件对化学发光信号的影响, 在优化条件下, 相对化学发光强度与酒石酸美托洛尔的浓度在  $1.5 \times 10^{-8} \sim 7.3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  范围内呈现良好的线性关系。根据 IUPAC 规定, 以空白值的标准偏差的 3 倍为标准, 计算方法的检测限为  $4.7 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ , 对含量为  $7.3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  的标准溶液平行测定 11 次得到的相对标准偏差为 2.20%。将该法用于酒石酸美托洛尔片及其在尿样中的含量测定, 并将测定结果与药典中的标准方法进行比较, 同时进行标准加入回收试验, 结果令人满意。

**关键词** 流动注射; 化学发光; 酒石酸美托洛尔;  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ;  $\text{Ce(IV)}$

### 1. 引言

酒石酸美托洛尔的化学分子式为  $(\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_3)_2\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ , 分子结构式如图 1 所示, 属于  $\beta$  肾上腺素受体阻滞药(心脏选择性  $\beta$  受体阻滞药)。对  $\beta_1$  受体有选择性阻滞作用, 无部分激动活性, 无膜稳定作用。用于治疗高血压、心绞痛、心肌梗死、肥厚型心肌病、主动脉夹层、心律失常、甲状腺机能亢进、心脏神经官能症等。近年来在有经验的医师指导下尚可用于心力衰竭的治疗。对于高血压患者, 能显著降低血压, 但并不引起直立性低血压和电解质紊乱; 对心绞痛患者, 可减少发作次数并提高运动耐量, 长期服用可减少心肌梗死的发生率, 用作心肌梗死后治疗可减少再梗死的发生率, 降低心肌梗死后的死亡率, 由于能拮抗儿茶酚胺效应, 可治疗甲状腺功能亢进引起的心律失常[1-3]。该药非常灵敏, 即使较小的口服剂量, 也会引起足够的阻滞作用。另一方面, 近年来,  $\beta$ -受体阻滞药常常被发现作为兴奋剂而在部分运动员中引起滥用, 所以被国际奥委会列入了运动员禁用药的名单[4]。

到目前为止, 已报道的测定酒石酸美托洛尔的方法较多, 主要包括气相色谱法[5,6], 采用紫外检测器的高效液相色谱法(HPLC) [7-9], 荧光法[10-12], 电化学

方法[13-15]和质谱的方法[16]。还有两篇报道是有关柱后化学发光检测的 HPLC 方法。其中一篇是采用  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  电化学发光测定[17]，另一篇是基于荧光试剂标记过氧草酸酯化学发光测定的方法[18]。虽然以上方法都能成功用于酒石酸美托洛尔的含量测定，但是它们大多存在着试样的预处理时间长且操作繁琐的不足，因此寻找一种简单、快速、灵敏的测定药片及尿样中的酒石酸美托洛尔的含量方法具有非常重要的意义。

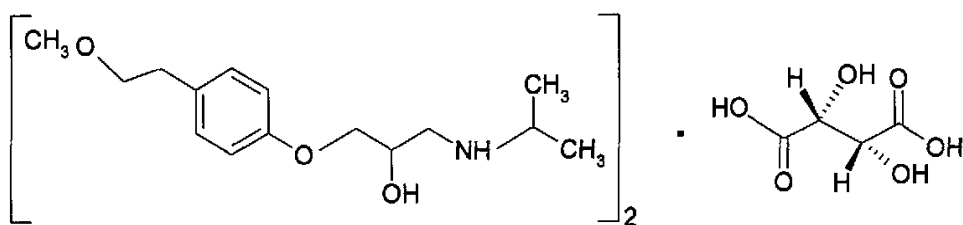


Fig. 1 Chemical structure of metoprolol tartrate

近年来，化学发光(Chemiluminescence, CL)分析法因为不需要任何外来光源，没有在分光光度法和荧光法中经常遇到的高的背景值，因而降低了噪音，提高了检测灵敏度，以其灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单、操作方便、分析快速和容易实现自动化等优点，而成为分析化学中一个十分活跃的研究热点。但是，由于化学发光现象一般比较短暂且随时间变化较大，若使用间歇式手工操作较难取得良好的精度。

流动注射分析技术(Flow Injection Analysis, FIA)，是一种在非平衡状态下，溶液自动处理及分析技术，FIA 能使样品和试剂以高度重现的方式混合，从混合到检测的时间间隔可以严格控制。因此 FIA 为 CL 提供了一个非常好的控制手段，在流动过程中，所有的实验参数，如试剂体积、保留时间、温度、试剂的混合时间和方式等都能严格的控制并重复操作。因此近年来将 FIA 与化学发光分析联用，在很大程度上克服了化学发光分析重现性差、操作费时、不便于实现自动化等缺点，从而使化学发光作为一种灵敏高效的痕量分析方法在分析化学领域得到了迅速发展。FIA-CL 提供了一种多功能、简单快速、高灵敏度、宽线性范围、重现性好、适合于自动分析的测定多种物质的方法 [19-25]。

本文基于酒石酸美托洛尔对酸性条件下  $\text{Ce}(\text{IV})$  和  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  的微弱化学发光反应的增敏作用，建立了一种简单、快速、灵敏的测定酒石酸美托洛尔流动注射-

化学发光方法。在实验中，我们发现，Ce (IV)和 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 在酸性条件下有微弱的化学发光，而酒石酸美托洛尔的加入，可以极大地增强该化学发光强度，且由此而产生的相对化学发光强度与酒石酸美托洛尔的浓度在一个较宽的范围内有良好的线性关系。基于上述实验现象，我们建立了一种简单、快速、灵敏的流动注射化学发光方法，并对药片及尿液中的酒石酸美托洛尔的含量进行了测定。

## 2. 实验部分

### 2.1. 仪器与试剂

IFFL-D 型流动注射化学发光分析仪（西安瑞科电子设备有限公司）

Cary 50 型紫外-可见分光光度计（美国瓦里安公司）

850 型荧光分光光度计（日本日立公司）

PT-101 超声清洗仪（BRANSON 德国）

酒石酸美托洛尔(对照品，纯度≥99.8%，上海市药检所友情提供)标准储备液 ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l)，置于 4℃冰箱中避光保存。

Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (上海化学试剂公司)储备液 (0.1000 mol/l)：每天新鲜配置。

Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (上海化学试剂公司) 储备液 (0.0250 mol/l)：溶解于 1.0 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (上海化学试剂公司) 溶液中，每天新鲜配置。

以上试剂除特别注明外均为分析纯，试验用水均为二次蒸馏水。

实验时，以上试剂均按需要用二次水稀释至所需浓度。

### 2.2. 实验方法

#### 2.2.1. 流动注射分析方法

化学发光强度采用 IFFL-D 型流动注射-化学发光分析仪（西安瑞迈电子仪器公司）测定。示意图见图 2。采用双蠕动泵传送系统中的样品及所有试剂溶液，聚四氟乙烯管（0.8 mm 内径）用作流路系统中的连接材料。开启蠕动泵冲洗整个系统的流路，直至得到一个稳定的空白信号。为了得到良好的稳定性，在第一次正式测量前仪器至少要运行 10min。采用装有样品环的八通注射阀将 100μL 样

品或标准溶液注射到  $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  载流溶液中, 然后与  $3.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (含 0.7 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 酸性溶液通过 Y 型管在流通池前混合, 最后在流通池中产生化学发光发射。流通池中的化学发光信号被光电倍增管检测、放大并最终由装有 IFFL-D 型流动注射-化学发光分析软件的计算机纪录和处理。样品浓度由相对化学发光强度进行定量测定。

### 2.2.2. 化学发光及紫外光谱测定

酒石酸美托的荧光光谱图及反应体系的化学发光光谱均采用日立 850 型荧光光度计测量, 只是后者在测量时将激发光源关闭, 出射狭缝宽度设置在 20nm。化学发光反应前后酒石酸美托的紫外光谱图, 采用 Cary 50 紫外可见光谱仪进行测量。

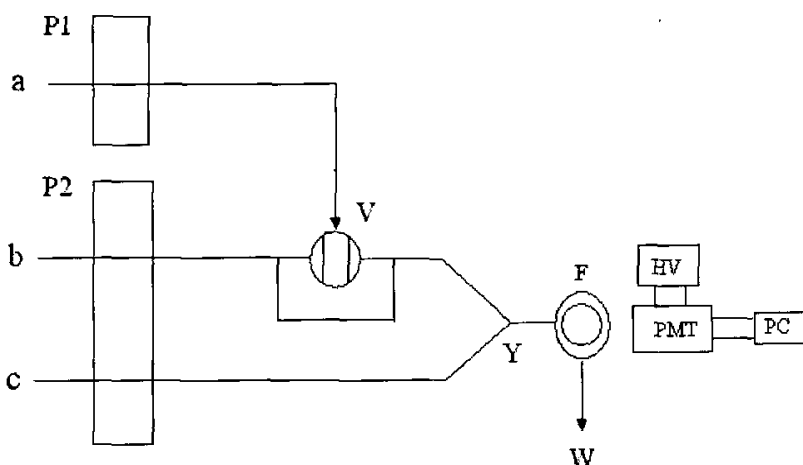


Fig. 2. Schematic diagram of the flow-injection chemiluminescence manifold.

a, sample solution; b,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  carrier stream solution; c,  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  acidic solution; P1 and P2, peristaltic pump; V, eight-way injection valve; Y, Y-shaped mixing element, F, chemiluminescence flow cell; PMT, photomultiplier tube; HV, negative high-voltage supply; PC, computer; W, waste solution.

### 2.2.3. 药品测定方法

准确称量20片酒石酸美托洛尔药片(购自当地药店, 0.050 g/片), 计算出每片的平均质量; 全部研细混匀, 然后准确称取相当于一片药片质量的粉末样品, 将

其转移到50.0 mL的棕色容量瓶中，用适量蒸馏水溶解，超声至少15min 助溶，待充分溶解后，蒸馏水稀释到刻度，过滤，取部分滤液进一步稀释，使稀释后的溶液浓度处于本实验的线性范围之内，最后按照2.2.1的分析方法进行含量测定。

#### 2.2.4. 尿样测定方法

两名健康志愿者，清晨空腹服用200 mg酒石酸美托洛尔药片，4 h后收集健康志愿者的尿样，1 mL尿样中加入0.5 mL乙腈，混匀后，在离心机上以3000 r/min的转速离心5min，移取上清液，并用N<sub>2</sub>将剩余的乙腈缓慢吹干，最后，一部分用蒸馏水稀释后直接进行测定，另一部分用标准加入法进行回收率测定。样品采集后处理及测定均立即进行。同时，按照相同的分析步骤，对空白尿样进行分析测定得到空白值。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 化学发光反应的动力学特征

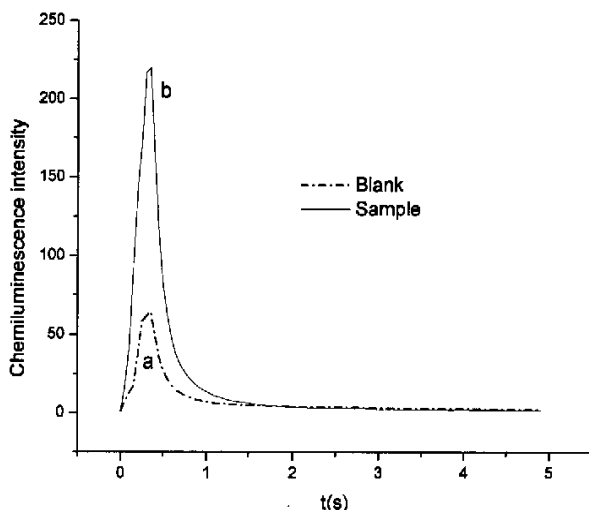


Fig. 3. The characteristics of flow-injection chemiluminescence reaction  
a, Chemiluminescence intensity in the absence of metoprolol tartrate  
b, Chemiluminescence intensity in the presence of metoprolol tartrate ( $2.4 \times 10^{-6}$  mol/L)



图 3 是采用静态系统测定的酒石酸美托洛尔/ $\text{SO}_3^{2-}$ / $\text{Ce(IV)}$ 酸性化学发光反应系统的动力学特征图。由图可见,  $\text{SO}_3^{2-}$ 同  $\text{Ce(IV)}$ 在酸性条件下发生氧化还原反应可以产生一个弱的化学发光信号(图 3 曲线 a)。然而在该化学发光反应系统中, 加入酒石酸美托洛尔, 发光信号会极大地增强(图 3 曲线 b)。两个反应的发光速度都非常快。

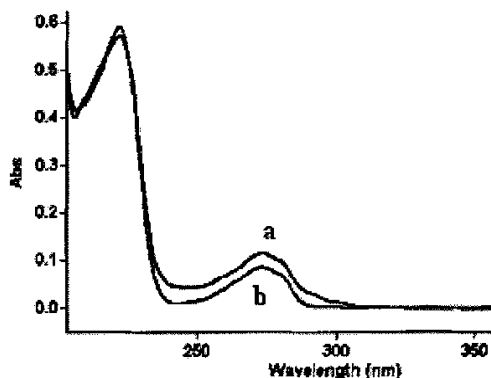


Fig. 4. The UV spectra of metoprolol tartrate.

a.  $2.9 \times 10^{-5}$  mol/L of metoprolol tartrate solution

b.  $2.9 \times 10^{-5}$  mol/L of metoprolol tartrate solution containing  $2.0 \times 10^{-3}$  mol/L of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  and  $1.2 \times 10^{-4}$  mol/L of  $\text{Ce(SO}_4)_2$  solution.

有文献报道表明, 在化学发光反应中,  $\text{SO}_3^{2-}$ 可以作为化学发光的发光体[26-28], 在 $\text{Ce(IV)}-\text{SO}_3^{2-}$ 体系中,  $\text{Ce(IV)}$ 在酸性条件下将 $\text{SO}_3^{2-}$ 氧化成 $\text{HSO}_3^{\cdot}$ , 两分子 $\text{HSO}_3^{\cdot}$ 结合形成 $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ 分解产生激发态 $\text{SO}_2^*$ 而发光, 发光波长在300~450nm[29], 另外也可以将反应产生的能量转移给反应体系中的荧光化合物[30-33], 后者吸收该化学反应能后, 被激发至激发态, 从激发态回到基态时产生光发射。为了考察本文中的化学发光机理, 我们比较了化学发光反应对酒石酸美托洛尔紫外吸收光谱图的影响, 以期得到化学发光反应是否引起其结构变化的有关信息, 另外我们还研究了酒石酸美托洛尔的荧光及化学发光光谱图。

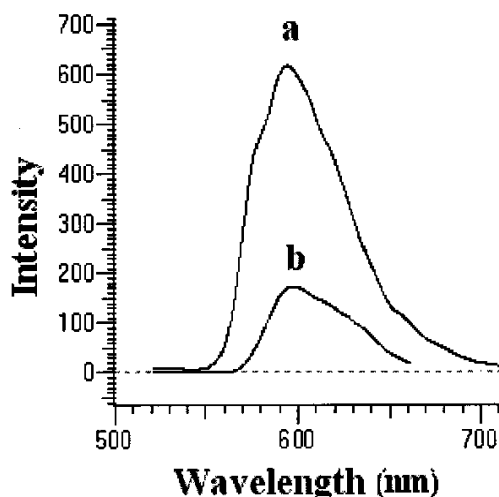


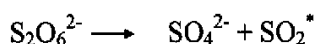
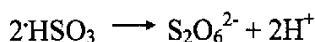
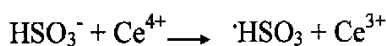
Fig. 5. The comparison of chemiluminescence spectrum and fluorescence spectrum

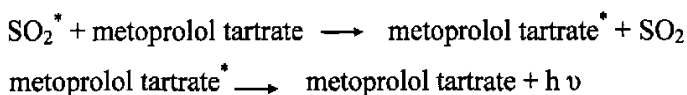
a, chemiluminescence spectrum of metoprolol tartrate/Ce(4+)/SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>

b, fluorescence spectrum of metoprolol tartrate, Ex: 224.7 nm

由图 4 我们可以清楚地看到, 加入化学发光试剂前后, 酒石酸美托洛尔的紫外吸收光谱图是非常相似的, 由此我们可以推断, 化学发光反应前后, 酒石酸美托洛尔的化学结构没有变化。

另一方面, 酒石酸美托洛尔本身属于荧光化合物, 在 224.7 nm 激发光照射下, 它能够产生较强的荧光发射, 其荧光光谱图见图 5 (Fig. 5a), 因此若有合适的化学反应发生, 并且该反应的反应途径能够提供足够的能量, 那么我们可以推测, 此时它也能吸收化学反应能而被激发, 回到基态时产生光发射。由图 5, 我们可以看到, 酒石酸美托洛尔/SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/Ce(IV)酸性体系的化学发光光谱(Fig. 5b)与酒石酸美托洛尔本身的荧光光谱图, 峰形相似, 且具有相同的最大发射峰位。因此我们有理由相信, 该化学发光体系的发光体有着与荧光光谱相同的发光体, 即都是激发态的酒石酸美托洛尔。因此结合文献报道及上述光谱实验的结果, 本化学发光反应体系的化学发光反应过程可以假定如下:





### 3.2. 实验条件的优化

#### 3.2.1 酸性介质的选择及浓度优化

Ce(IV)易溶于酸性溶液, 实验发现, 在反应系统中采用不同种类及浓度的酸会对发光强度产生较大的影响。因此, 分别考察了HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 和H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>四种不同的酸在0.05–2.40 mol/L浓度范围内对发光的影响。实验结果表明, 在H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>介质中可以得到最好的发光信号, 而且当Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>中的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浓度在0.6–0.8mol/L时可以得到最高的化学发光强度。选择Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>中的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浓度为0.7mol/L, 然后再考察Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>溶液中H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浓度变化对发光的影响, 结果表明Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>溶液中H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浓度在0.01到0.3 mol/L范围内对发光强度影响都不大, 因此本实验选择Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>溶液中H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浓度为0.2mol/L, Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>中的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>浓度为0.7mol/L。

#### 3.2.2. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 溶液浓度的影响

Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>的浓度变化对化学发光强度信号及背景的影响见图6, 由图可见, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>的浓度变化对本化学发光体系的背景值影响甚微, 但随着Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>浓度的增大, 化学发光信号强度增加非常明显, 在 $5.0 \times 10^{-3}$  -  $6.0 \times 10^{-3}$  mol/L之间可以得到最强的化学发光信号, 随后又开始降低。因此实验选择 $5.0 \times 10^{-3}$  mol/L的Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>继续后面的实验。

#### 3.2.3. Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>溶液浓度的影响

实验考察了Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>浓度在 $1.0 \times 10^{-4}$ 到  $9.0 \times 10^{-4}$  mol/L范围内对化学发光强度的影响。由图7可见, Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>浓度在 $1.0 \times 10^{-4}$  -  $3.0 \times 10^{-4}$  mol/L之间变化时, 化学发光强度随着Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>浓度的增加而增大, 但是当Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>浓度大于 $3.0 \times 10^{-4}$  mol/L时, 化学发光强度开始下降, 这可能是因为Ce(IV)本身为有色溶液, 浓度越大颜色越深, 当浓度过高时, 会因为对发射光的吸收而导致发光强度降低[34]。因此, 本实验选择Ce(IV)的浓度为 $3.0 \times 10^{-4}$  mol/L。

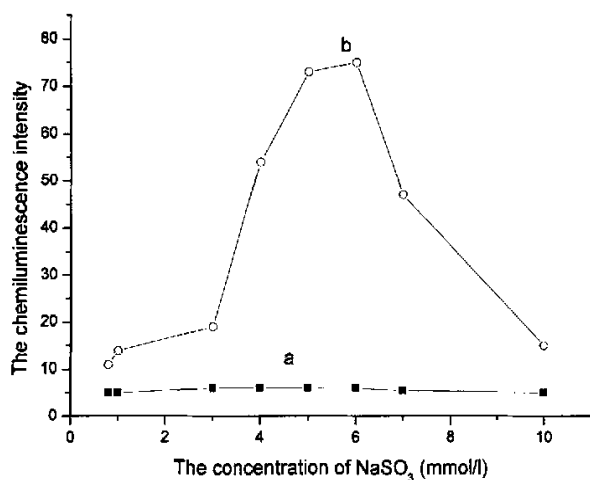


Fig. 6. The effect of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  solution concentration in the absence (a) and presence (b) of  $4.3 \times 10^{-6}$  mol/L metoprolol tartrate.

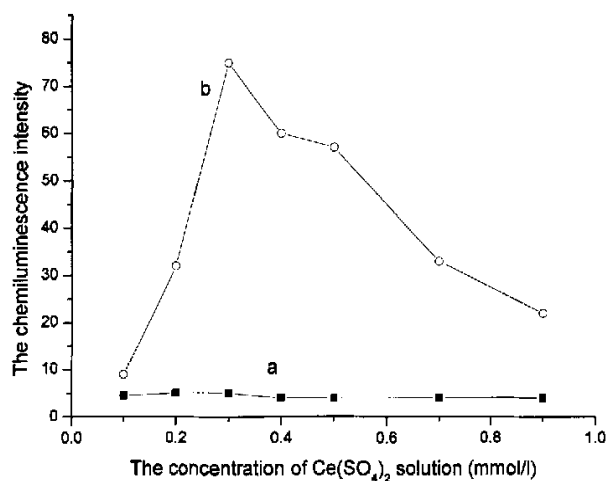


Fig. 7. The effect of  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  solution concentration in the absence (a) and presence (b) of  $4.3 \times 10^{-6}$  mol/L of metoprolol tartrate

### 3.2.4. 流速的影响

由于该化学发光反应为快速发光，为了能在流通池中测得最大的化学发光，首先将Y型混合单元与流通池之间的距离设置为仪器所允许的最短距离，其次通过逐渐增加主泵 (P2) 的转速来增加样品与试剂混合后传送到流通池的速度，实验结果表明，当b, c两条流路(Fig. 2)的流速在 1.0 - 4.0 mL/min之间变化时，化学

发光强度及信噪比先是随着流速的增加而增大(1.0 - 3.5 mL/min),但是当流速超过3.5 mL/min时,化学发光信号的重现性和峰形都开始变差,信噪比开始降低,且甬管磨损较快。因此综合考虑上述因素,实验选择3.5 mL/min为本测量系统的最佳流速。在该流速下,单次样品测量包括采样及管路冲洗可以在20s内完成,因此可以计算出样品的测量频率为180样/小时,考虑到P1的流速为2.0mL/min, P2的流速为3.5 mL/min,单次样品测量的试剂消耗小于3.0mL。

### 3.2.5 采样体积和光电倍增管负高压的影响

分别试验了50, 75, 85, 100和 125  $\mu\text{L}$ 的采样体积对化学发光强度的影响,当采样体积为85 $\mu\text{L}$ 和100  $\mu\text{L}$ 时,可以得到最大的化学发光强度及信噪比。

分别采用 85 $\mu\text{L}$  和 100  $\mu\text{L}$  的采样体积,试验了光电倍增管的负高压从-600V到-800V变化对化学发光强度的影响。实验结果表明,当采样体积为 100  $\mu\text{L}$ ,光电倍增管的负高压为-725V时,化学发光强度及信噪比最大。因此本实验采用光电倍增管的负高压为 -725 v, 采样体积为 100 $\mu\text{L}$ 。

### 3.3. 方法的校正曲线、线性范围、检测限及相对标准偏差

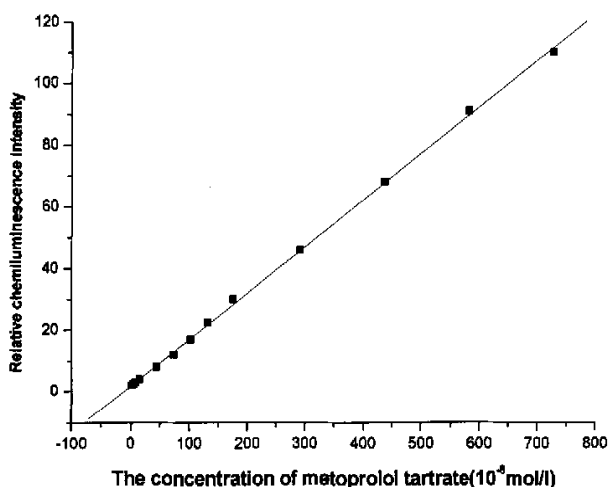


Fig. 8. The calibration curve of metoprolol tartrate

$\text{Na}_2\text{SO}_3$ :  $5.0 \times 10^{-3}$  mol/l in 0.20 mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ :  $3.0 \times 10^{-4}$  mol/l in 0.70 mol/l  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; Flow rate: 3.5mL/min; Sample volume: 100  $\mu\text{l}$ ; Negative high-voltage, -725v

在选定的实验条件下，相对化学发光强度与酒石酸美托洛尔的浓度在  $1.5 \times 10^{-8}$  到  $7.3 \times 10^{-6}$  mol/L 范围内有良好的线性关系，校正曲线见图 8。线性回归方程为： $\Delta I = 2.00 + 0.15 \times 10^8 C$  ( $C$  是酒石酸美托洛尔的浓度, mol/L)，相关系数是 0.9997。按照 IUPAC 组织的规定，以空白值的标准偏差的 3 倍，计算方法的检测限为： $4.7 \times 10^{-9}$  mol/L ( $3\sigma$ )。对含量为  $7.3 \times 10^{-7}$  mol/L 的标准溶液平行测定 11 次得到的相对标准偏差为 2.20%。

### 3.4. 干扰研究

Table 1

Tolerable limit of some foreign substances on the determination of metoprolol tartrate

Substance	Concentration ratio to metoprolol tartrate
$K^+$ , $Na^+$ , $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Fe^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $NH_4^+$ , $Ba^{2+}$ , $Cl^-$ , $C_2O_4^{2-}$ , $PO_4^{3-}$ , $Ac^-$ , $Br^-$ , $NO_3^-$ , $CO_3^{2-}$ , Urine, tartaric acid, Dimethylamine	$\geq 200$
Uric acid	150
Starch	50
Polyvinyl Alcohol	40
B-Cyclodextrin, Ascorbic acid	30
Sucrose, lactose, glucose	20
Glutin	10
Ethanol, maltose	5
Galactose.	2
	1

考虑到要将所建立的方法用于药品及尿样的测量，本文评价了常见离子、药品中的常见赋形剂及尿样中的普通共存组分等对该化学发光反应体系的干扰情况。实验以  $3.6 \times 10^{-7}$  mol/L 的酒石酸美托洛尔标准溶液为基准，进行干扰实验，容忍限度以测定值的相对偏差不超过  $\pm 5\%$  为评价标准。所得结果列于表 1，由表 1 可以看出，在优化的实验条件下，几种常见的药品赋形剂及尿样中的常见成分，

并不影响酒石酸美托洛尔的化学发光测定。因此所建立的方法可以直接用于药片及尿样稀释后的直接测定，而不需要经过其它的预处理步骤。

### 3.5. 酒石酸美托洛尔药片的测定

将本文建立的方法，按照2.2.3的步骤，用于药片中酒石酸美托洛尔的含量测定，并采用标准加入的方法进行了回收率测定。由表2可以看出，测定结果与药典规定的滴定方法的结果相吻合，回收率结果也令人满意。

Table 2

Determination of metoprolol tartrate(MT) in tablets

Sample	MT supplement ( $10^{-7}$ mol/L)	Proposed method <sup>a</sup>			R.S.D%	Content (g/tablet)	Pharmacopoeia method <sup>a, b</sup> (g/tablet)
		Found ( $10^{-7}$ mol/L)	Recovery (%)	Found			
1	0	5.0			2.3	0.0511	0.0518
	5.0	10.1	102.0				
2	0	4.7			2.2	0.0501	0.0496
	5.0	9.7	100.0				
3	0	4.8			2.0	0.0489	0.0499
	5.0	9.7	98.0				

<sup>a</sup> Average of five measurements.

<sup>b</sup> Nonaqueous titration method.

### 3.6. 尿样中酒石酸美托洛尔含量的测定

考虑到  $\beta$ -阻滞剂在体育运动中有滥用的现象，且被国际奥委会组织列为禁用药物，而本文所建立的方法又具有较高的测定灵敏度，因此将其用于检测尿液中酒石酸美托洛尔的含量。由表3可见，尿样中回收率的测定结果令人满意。

Table 3

Recoveries of metoprolol tartrate in human urine samples

Human urine sample	Concentration* ( $10^{-7}$ mol/L)			Recovery (%)
	Content	Added	Found	
No. 1	5.1	5.0	9.9	96.0
No. 2	7.2	5.0	12.6	108.0

\* Mean of five measurements

#### 4. 结论

基于酒石酸美托洛尔对Ce(IV)和 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 在硫酸介质中微弱化学发光极大的增敏现象,建立了一种直接测定酒石酸美托洛尔的新的流动注射化学发光方法。该法简单、快速、灵敏,已将其用于药片与尿样中微量酒石酸美托洛尔的含量测定,结果满意,并对其可能的发光机理进行了实验探讨。

#### 参考文献

- [1] British Pharmacopoeia Commission, British Pharmacopoeia, 34<sup>th</sup> ed., Pharmaceutical Press, London, 2005
- [2] The United States Pharmacopoeial Convention, USP28-NF23 Page 1281
- [3] Committee of Chinese Pharmacopoeia. Chinese Pharmacopoeia (Part II), Chemical industry Press, Beijing, 2005, 638.
- [4] C. Ceniceros, M.I. Maguregui, R.M. Jimenez, R.M. Alonso, J. Chromatogr. B 705 (1998) 97-103.
- [5] B. Flouvat, M. Bazin, M. Lusko, A. Roux, J. Guedon, Ann. Bio. Clin. 36 (1978) 339-345.
- [6] L. Offerhaus, J.R. Van der Vecht, J. Clin. Pharmacol. 3 (1976) 1061-1068.
- [7] A. Sioufi, D. Colussi, P. Mangoni, J. Chromatogr. 278 (1983) 185-191.
- [8] T. Alebic-Kolbah, F. Plavsic, A. Wolf-Coporda, J. Pharm. Biomed. Anal. 7 (1989) 1777-1784.
- [9] P. Lukkari, H. Siren, M. Pantsar, M.-L. Riekkola, J. Chromatogr. 632 (1993)



143-148.

- [10] R.B. Miller, J. Liquid Chromatogr. 15 (1992) 3233-3245.
- [11] V.L. Herring, J.A. Johnson, J. Chromatogr. 612 (1993) 215-220.
- [12] R. Ghanem, M.A. Bello, M. Callejon, A. Guiraum, J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1996) 383-388.
- [13] D.R. Abernethy, F.L. Todd, J.L. Egan, G. Carrum, J. Liquid Chromatogr. 9 (1986) 2153-2158.
- [14] J. Wang, M. Bonakdar, B.K. Deshmukh, J. Chromatogr. 344 (1985) 412-416.
- [15] C. Ceniceros, M.I. Maguregui, R.M. Jimenez, R.M. Alonso, J. Chromatogr. B 705 (1998) 97-103.
- [16] M.S. Lant, J. Oxford, J. Chromatogr. 394 (1987) 223-230.
- [17] Y. J. Park, D. W. Lee, W. Y. Lee, Anal. Chim. Acta 471 (2002) 51-59.
- [18] U. Sonoko, I. Kazuhiro, Analyst 116 (1991) 1353-1357
- [19] H. Y. Liu, P. G. He, Y. Z. fang, et al, Anal Chim Acta 541 (2005) 187-192
- [20] H. Y. Liu, P. G. He, Y. Z. fang, et al, Anal Chim Acta 541 (2005) 125-129
- [21] B.J. Hindson, N.W. Barnett, Anal. Chim. Acta 445 (2001) 1-19.
- [22] P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, et al, Luminescence 16 (2001) 1-23.
- [23] F.Z. Yang, C. Zhang, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 473-477.
- [24] M. Catalá Icardo, M. Misiewicz, A. Ciucu, J. V. García Mateo and J. Martínez Calatayud, Talanta 60 (2003) 405-414.
- [25] A. Townshend, J.A. Murillo Pulgarín, M.T. Alañón Pardo, Anal. Chim. Acta 488 (2003) 81-88.
- [26] I.I. Koukli, E.G. Sarantonis, A.C. Calokerinos, Analyst 113 (1988) 603-608.
- [27] K. Takeuchi, T. Ibusuki, Anal. Chim. Acta 174 (1985) 359-363.
- [28] J.M. Lin, T. Hobo, Anal. Chim. Acta 323 (1996) 69-73.
- [29] R.W.B. Pearse, A.G. Gaydon, the Identification of Molecular Spectra, Chapman and Hall, London, 1976, 297.
- [30] I.I. Koukli, A. Calokerinos, Anal. Chim. Acta 236 (1990) 463-468.
- [31] I.I. Koukli, A. Calokerinos, Analyst 115 (1990) 1553-1557.
- [32] I.M. Psarellis, N.T. Deftereos, E.G. Sarantonis, A.C. Calokerinos, Anal. Chim. Acta 294 (1994) 27-34.
- [33] F. A. Aly, N. Alarfaj, Talanta 54 (2001) 715-725
- [34] D.A. Paulls, A. Townshend, Analyst 120 (1995) 467-469.

## 第五章 流动注射-化学发光法选择性测定 复方滴鼻液中的磺胺嘧啶

**摘要** 本文基于磺胺嘧啶对酸性条件下  $\text{KMnO}_4\text{-HCHO}$  化学发光反应的增敏及催化作用,建立了一种选择性测定复方滴鼻液中磺胺嘧啶的流动注射-化学发光分析方法。对影响发光的各种因素进行了实验优化,在所选择的实验条件下,磺胺嘧啶的浓度与化学发光强度在  $8.0 \times 10^{-7}$  到  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 范围内有线性关系,按照 IUPAC 组织的规定,以空白值的标准偏差的 3 倍,计算方法的检测限为:  $2.0 \times 10^{-7}$  mol/L ( $3\sigma$ )。对  $5.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的磺胺嘧啶标准溶液平行测定 11 次,计算测量的相对标准偏差为 2.53%。本法用于处方药复方滴鼻液中磺胺嘧啶的测定,结果满意。

**关键词:** 流动注射, 化学发光, 高锰酸钾, 复方药测定, 磺胺嘧啶

### 1. 引言

磺胺类药是三十年代发现的能有效防治全身性细菌感染的第一类化疗药物。在临床上现已大部分被抗生素及喹诺酮类药取代,但由于磺胺药对某些感染性疾病(如流脑、鼠疫)具有疗效良好,使用方便、性质稳定、价格低廉等优点,故在抗感染的药物中仍然占有一定的地位。

磺胺嘧啶麻黄碱滴鼻液为医院制剂;处方为磺胺嘧啶 50 g, 盐酸麻黄碱 10 g, 氯化钠 6 g, 羧甲基纤维素钠 5 g, 苯甲酸钠 3g, 注射用水加至 1000mL。盐酸麻黄碱(结构式见图 1a)为拟肾上腺素药,可使皮肤、黏膜以及内脏血管收缩;磺胺嘧啶(结构式见图 1b)为治疗全身感染的中效磺胺,抗菌谱广。口服易吸收,给药后 3~4 h,血药浓度达峰值,血浆  $t_{1/2}$  为 10~13 h。抗菌力强,血浆蛋白结合率最低约 25%,易透过血脑屏障,脑脊液浓度可达血浆浓度的 40%~80%。是治疗流行性脑脊髓膜炎的首选药物,也适用于治疗尿路感染。有关磺胺嘧啶的测定方法,药典规定用亚硝酸钠滴定液滴定的方法进行测定[1]。文献报道可以采用分光光度法和高效液相色谱法单独测定磺胺嘧啶[2, 3]。上述方法,有的操作繁琐,有的灵敏度不够高,有的需要昂贵的仪器。

化学发光分析法具有灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单等优点,将其与流动注射的快速分析与高精度相结合而形成的流动注射-化学发光(FI-CL)分析

法具有分析速度快、精度高、易实现自动化等优点，其研究和应用越来越广泛，已经被成功地运用于多种药物的测定[4-6]。Paseková 等人[7]报道了一种基于在线光化学反应的流动注射-化学发光法测定单独磺胺类药的方法，其中磺胺嘧啶的检测限为  $80 \mu\text{g/L}$ ，检测频率为  $60/\text{h}$ 。吕九如等人[8]曾经报道用高效液相色谱分离，结合基于  $\text{KMnO}_4$ -多聚磷酸- $\beta$  环糊精的化学发光体系检测药物中的麻黄碱类生物碱物质，其中麻黄碱的检测限为  $1.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ 。

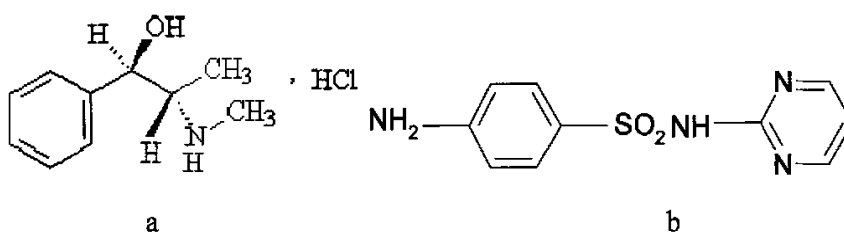


Fig. 1 The structures of sulfadiazine and ephedrine hydrochloride

但是通常由于选择性差的问题限制了化学发光分析法在实际样品中的应用。如何提高化学发光分析法的选择性，使其真正应用于实际样品的测试，这一直是化学发光分析发展的一个重要方向之一。我们在实验中发现磺胺嘧啶在多聚磷酸- $\text{KMnO}_4$ - $\text{HCHO}$  体系中可以产生较强的化学发光，而上述滴鼻液中包括麻黄碱在内的其它共存组分皆不干扰测定，基于此建立了一种简单、快速、灵敏的流动注射-化学发光方法，并将其用于选择性测定滴鼻液中的磺胺嘧啶。在优化的试验条件下，磺胺嘧啶与相对化学发光强度在  $8.0 \times 10^{-7}$  到  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  范围内有良好的线性关系，检测限达到  $2.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ，测定频率为  $120/\text{h}$ ，将其用于医院处方复方滴鼻液中磺胺嘧啶的含量测定及加标回收率实验，所得结果令人满意。

## 2. 实验部分

### 2.1. 试剂

本实验所使用的试剂均为分析纯，购自上海化学试剂公司，若没有另外说明，溶液均采用二次蒸馏水配置。

磺胺嘧啶 ( $\geq 99.5\%$ ，由上海药检所友情提供) 储备溶液 ( $1.0 \text{ mg/mL}$ ): 准

确称取 0.0050 g 磺胺嘧啶对照品, 先加入适量 1.0 mol/L 的 HCl 溶液, 超声助溶后, 最后在 5 mL 棕色容量瓶中用蒸馏水定容, 在 4℃ 冰箱中存放备用。工作溶液在使用前用二次蒸馏水适当稀释后使用。KMnO<sub>4</sub> 储备溶液 (0.05 mol/L): 将 3.951 g KMnO<sub>4</sub> 溶解在 500 mL 蒸馏水中, 将溶液加热至沸, 保持微沸约 1 h, 放置 2-3 天, 用玻璃纤维过滤除去沉淀, 储存于棕色试剂瓶中, 置于暗处待用。甲醛溶液 (0.56 mol/L) 每天用蒸馏水新鲜配置。硝酸、磷酸、硫酸、多聚磷酸、盐酸分别配置 1.0 - 5.0 mol/L 的储备溶液待用。磺胺嘧啶麻黄碱滴鼻液, 从当地医院购买。

## 2.2. 仪器

化学发光强度采用 IFFL-D 型流动注射-化学发光分析仪 (西安瑞迈电子仪器公司) 测定, 流动注射-化学发光分析流路示意图见图 2。采用双蠕动泵传送系统中的样品及所有试剂溶液, 聚四氟乙烯管 (0.8 mm 内径) 用作流路系统中的连接材料。采用装有样品环的八通注射阀将一部分样品或磺胺嘧啶标准溶液注射到甲醛载流中, 然后与 KMnO<sub>4</sub> 和多聚磷酸的混合溶液在流通池前混合, 最后在流通池中产生化学发光发射。流通池中的化学发光信号被光电倍增管检测、放大并最终由装有 IFFL-D 型流动注射-化学发光分析仪的分析软件的计算机纪录和处理。

测定化学发光反应的动力学特征的静态试验, 采用一个 1.0 mL 平底无色石英比色皿, 在 IFFL-D 型超微弱化学发光分析仪上完成。预先将磺胺嘧啶溶液、甲醛溶液、多聚磷酸溶液各 100 μL 分别加到无色石英比色皿中, 直接放置于暗室内的光电倍增管的光窗上, 然后通过进样口将 100 μL 的 KMnO<sub>4</sub> 溶液注射到此比色皿中, 同时记录化学发光强度信号, 运用 IFFL-D 型化学发光分析软件进行数据收集及处理, 可以得到反映化学发光强度随反应时间变化的动力学特征曲线。

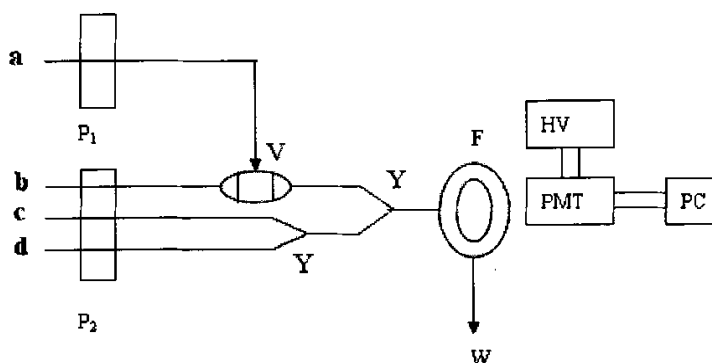


Fig. 2. Schematic diagram of the flow-injection CL system for the determination of sulfadiazine: a, sample solution; b, HCHO carrier stream solution; c, Polyphosphoric solution; d,  $\text{KMnO}_4$ ; P1 and P2, peristaltic pump; V, eight-way injection valve; Y, Y-shaped mixing element, F, CL flow cell; PMT, photomultiplier tube; HV, negative high-voltage supply; PC, computer; W, waste solution.

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. 流动注射-化学发光试验

为了得到良好的稳定性,在第一次正式测量前仪器至少要运行 10 min。将流通管分别插入蒸馏水、0.56 mol/L 甲醛溶液、0.5 mmol/L  $\text{KMnO}_4$  溶液与 0.7 mol/L 多聚磷酸中,将流路 a 的流速设置为 2.0 mL/min,蠕动泵 P2 驱动的所有流路的流速设置为 2.5 mL/min。开启蠕动泵冲洗整个系统的流路,直至得到一个稳定的空白信号,然后将 100  $\mu\text{L}$  磺胺嘧啶溶液经流路 a 由八通阀注射到载流中, $\text{KMnO}_4$  与多聚磷酸通过 Y 型混合器混合后,与载流溶液合并,进入化学发光流通池进行发光测量。磺胺嘧啶的浓度用相对化学发光强度进行定量。

### 2.3.2 滴鼻液中磺胺嘧啶含量的测定方法

由于磺胺嘧啶不溶于水,磺胺嘧啶麻黄碱滴鼻液为悬浊液,将一整瓶滴鼻液 (10 mL) 全部转入 100 mL 棕色容量瓶中,加 1.0 mol/L 的盐酸溶液超声溶解,加水稀释到刻度,摇匀后,即为分析试液,放入冰箱中避光保存。定量移取部分试液进一步稀释,使其稀释后的浓度在本实验的线性范围之内,最后按照 2.3.1 的分析方法进行分析检测。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 化学发光反应的动力学特征

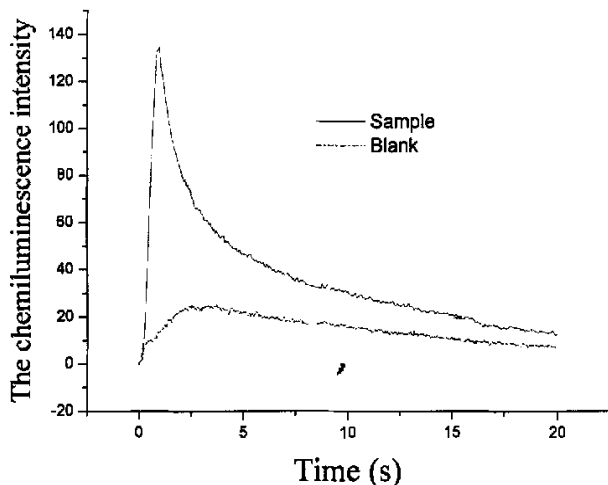


Fig. 3. The characteristics of flow-injection CL reaction

a, CL intensity in the absence of sulfadiazine

b, CL intensity in the presence of sulfadiazine ( $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L)

在初步试验中, 我们发现在  $\text{KMnO}_4$  的酸性溶液中, 单独加入磺胺嘧啶或者甲醛, 都可以产生较微弱的化学发光信号, 但若将二者同时加入, 则可以极大地增敏该发光信号, 说明磺胺嘧啶与甲醛对酸性  $\text{KMnO}_4$  的化学发光现象有协同增敏作用, 且在甲醛浓度不变时, 相对化学发光强度随着磺胺嘧啶浓度的增大而增大。图 3 是由静态实验得到的本反应体系的化学发光动力学特征图。我们可以清楚地看到, 磺胺嘧啶能极大地增敏酸性高锰酸钾与甲醛的弱的化学发光信号, 另外磺胺嘧啶对本体系的发光不但有增敏作用, 而且还使发光速度明显加快, 这说明磺胺嘧啶对该发光体系有明显的催化作用。由于该发光反应为快速反应, 因此采用流动注射-化学发光的方法将有助于提高方法的精密度与重现性。

#### 3.2. 流动注射-化学发光反应系统条件优化

##### 3.2.1. 流路系统优化

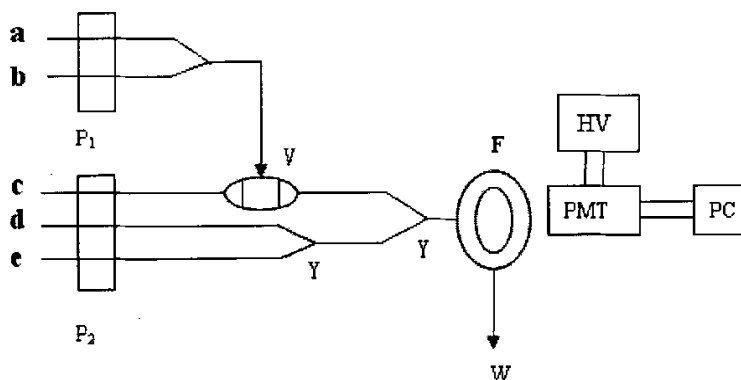


Fig. 4. Schematic diagram of the flow-injection CL system 3

a.sample, b.HCHO, c. Water, d. acid, e.  $\text{KMnO}_4$ 

实验发现, 采用不同的流动注射-化学发光反应流路系统, 化学发光强度及背景值有较大的变化。系统1、2的流路图见图2, 但系统2是将样品做载流, 甲醛经采样阀注入, 系统3的流路图见图4, 将光电倍增管的负高压设置为-750V, 分别采用1.0 mol/L的多聚磷酸、1.12 mol/L的HCHO、0.5 mmol/L  $\text{KMnO}_4$ 、 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L的磺胺嘧啶进行试验, 结果见表1。由表1可以看出, 采用系统1可以得到最高的信号、较低的背景及最好的信噪比, 因此本实验采用流路系统1进行化学发光测量。

Table 1.

The effect of system on the CL signal

System	$I_0$	I	$I - I_0$	$I/I_0$
1	16	122	106	7.6
2	17	120	103	7.1
3	10	45	35	4.5

为了进一步提高信/噪比及方法的灵敏度, 将磺胺嘧啶溶液浓度恒定为 $5.0 \times 10^{-5}$  mol/L, 光电倍增管的负高压为-750 V, 采用单因子实验设计的方法, 依次考察了酸种类及浓度、 $\text{KMnO}_4$ 及甲醛浓度以及一些流动注射系统的物理参数, 如流速、采样体积等对化学发光相对强度及信/噪比的影响。

### 3.2.2. 酸介质的选择及浓度优化

酸的种类及浓度对本反应体系的化学发光强度有很大的影响,因此实验考察了 HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 和 H<sub>6</sub>P<sub>4</sub>O<sub>13</sub> 在一定的浓度范围内对本体系化学发光相对强度及信/噪比的影响。由表 2 的结果可见,在 0.7 mol/L 的 H<sub>6</sub>P<sub>4</sub>O<sub>13</sub> 介质中,反应可以给出最高的信号及信/噪比。因此实验中选择 0.7 mol/L 的 H<sub>6</sub>P<sub>4</sub>O<sub>13</sub> 作为反应介质。

Table 2.

The effect of acid medium and concentration on CL

Acid kinds	Concentration range tested (mol/L)	Optimum concentration (mol/L)	I - I <sub>0</sub>	I/I <sub>0</sub>
HCl	0.2-1.0	0.5	23	4.8
HNO <sub>3</sub>	0.2-1.5	1.2	20	5
HS <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.2-1.0	0.5	11	3.2
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.5-5.0	2.0	34	12.3
H <sub>6</sub> P <sub>4</sub> O <sub>13</sub>	0.2-1.0	0.7	71	18.8

### 3.2.3. 甲醛浓度优化

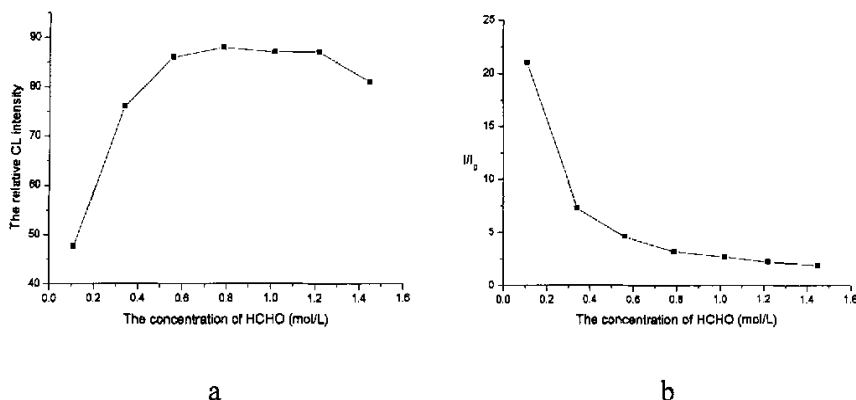


Fig. 5 The effect of HCHO concentration on CL

Conditions: KMnO<sub>4</sub>, 0.5 mmol/L; H<sub>6</sub>P<sub>4</sub>O<sub>13</sub>, 0.7 mol/L

实验考察了多种增敏剂及表面活性剂对该体系化学发光强度及信噪比的影响,结果表明甲醛的增敏效果较明显,且由图 5 可以看出,甲醛在 0.56 到 1.22



mol/L 的范围内可以得到较高的相对化学发光强度,但从图 5b 可以看出,随着甲醛浓度的增大,由于空白值也增大,信噪比逐渐降低,因此综合考虑,本实验选择 0.56 mol/L 的甲醛作为反应的增敏剂。

### 3.2.4. $\text{KMnO}_4$ 浓度的影响

在该化学发光反应体系中,  $\text{KMnO}_4$  是氧化剂,它的浓度直接影响化学发光强度及信/噪比的大小。实验考察了 0.1 到 0.9 mmol/L 的  $\text{KMnO}_4$  对化学发光强度的影响。实验结果表明,随着  $\text{KMnO}_4$  浓度的增大,化学发光信号及背景值皆增大,导致在实验的区间内,信噪比变化不大,但实验也发现,当  $\text{KMnO}_4$  的浓度在 0.5 ~ 0.9 mmol/L 的范围内,相对化学发光强度(图 6)增大到一个较稳定的值,因此本文选择 0.5 mmol/L 的  $\text{KMnO}_4$  用于后面的实验中。

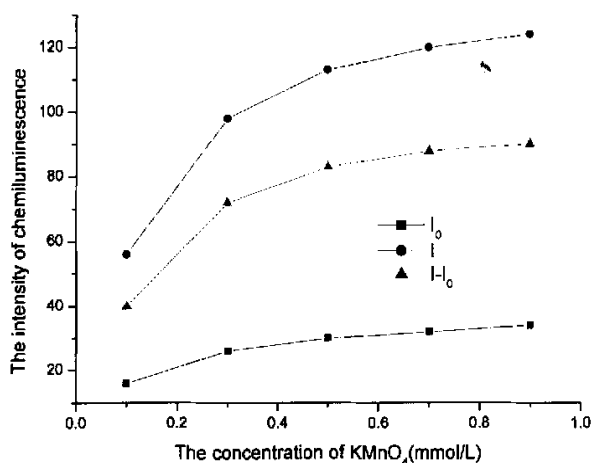


Fig. 6. The effect of  $\text{KMnO}_4$  concentration on CL intensity

Conditions: HCHO, 0.56 mol/L;  $\text{H}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$ , 0.7 mol/L

### 3.2.5. 流动注射系统的物理参数的影响

流速和采样体积对化学发光的影响很大,不仅能影响化学发光强度、精密度,同时流速还会决定样品的分析速度。由于本化学发光反应速度较快,因此本实验采用了仪器所能允许的最短的注射阀与流通池之间的距离(6cm)。另外分别考察了 1.5 到 3.5 mL/min 的流速与 55 到 150  $\mu\text{L}$  的采样体积对化学发光信号的影响。结果表明,采用 2.5mL/min 的流速与 100  $\mu\text{L}$  的采样体积时可以得到较大的

相对化学发光强度、信/噪比和较好的重现性。光电倍增管负高压在-600~-900V之间,随着负高压的增大,空白与信号都增大,而对信噪比的影响不大,因此2.5 mL/min的流速、100  $\mu$ L的采样体积及-750V的光电倍增管负高压,被我们在后面的实验中分别予以采用。

### 3.3.方法的校正曲线、线性范围、检测限及相对标准偏差

实验证明,在上述优化的实验条件下,实验所记录的化学发光强度与磺胺嘧啶的浓度在  $8.0 \times 10^{-7}$  到  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 范围内有良好的线性关系,按照 IUPAC 组织的规定,以空白值的标准偏差的 3 倍,计算方法的检测限为:  $2.0 \times 10^{-7}$  mol/L ( $3\sigma$ )。线性回归方程为:  $I = 29.13 + 0.074 \times 10^7 C$  ( $C$  是磺胺嘧啶的浓度, mol/L), 相关系数为: 0.99856, 对  $5.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的磺胺嘧啶标准溶液平行测定 11 次, 计算得到测量的相对标准偏差为: 2.53%。

### 3.4.干扰研究

Table 3

Tolerance limit of some foreign substances on the determination of sulfadiazine

Substance	Concentration ratio to Sulfadiazine
Lactose, glucose, starch, citrate, PVP, $K^+$ , $Na^+$ , $Zn^{2+}$ , $NH_4^+$ , $Ni^{2+}$ , $Cr^{3+}$ , $Ca^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Cl^-$ , $C_2O_4^{2-}$	$\geq 200$
Maltose, galactose, cyclodextrin, carboxymethyl cellulose, ephedrine hydrochloride*, $Cu^{2+}$	50
Benzoic sodium*	10
Sucrose, riboflavin	5

\* The biggest times tested.

考虑到要将所建立的方法用于药品的测量, 试验评价了常见离子、药品中常见的共存组分对该化学发光反应体系的干扰情况。实验以  $5.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的磺胺

嘧啶标准溶液为基准,进行干扰实验,容忍限度以所实验的干扰成分引起化学发光强度信号的相对偏差不超过 $\pm 5\%$ 为标准。将所得结果列于表3。由表3可以看出,在优化的实验条件下,常见离子及本处方药的几种共存组分,均不影响磺胺嘧啶的化学发光测定。因此所建立的方法可以直接用于测定复方滴鼻液中磺胺嘧啶的含量测定,而不需要经过其它的预处理步骤。

### 3.5. 样品分析

Table 4

Determination of sulphadiazine in compound naristillae

Sample	Sulphadiazine supplement ( $10^{-5}$ mol/L)	Proposed method <sup>a</sup>			Content (g/L)	Content Labeled (g/L)
		Found ( $10^{-5}$ mol/L)	Recovery (%)	R.S.D%		
1	0	4.06			50.75	50
	4.0	8.09	100.8	2.3		
2	0	6.61			49.10	50
	6.0	12.5	98.2	2.2		
3	0	8.04			50.25	50
	8.0	16.25	102.6	2.0		

<sup>a</sup> Average of five measurements.

按照 2.3.2 的方法不需要分离,选择性地测定了磺胺嘧啶麻黄碱滴鼻液中磺胺嘧啶的含量。表4是含量测定结果,可以看出,测定结果与标示量吻合,且回收率试验结果令人满意。

### 4. 结论

本文建立了一种简单、灵敏并具有一定选择性的测定磺胺嘧啶的流动注射-化学发光分析方法。在优化的实验条件下,磺胺嘧啶的浓度与化学发光强度在  $8.0 \times 10^{-7}$  到  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 范围内有线性关系,方法的检测限为:  $2.0 \times 10^{-7}$  mol/L ( $3\sigma$ )。对  $5.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的磺胺嘧啶标准溶液平行测定 11 次,测量的相对标准偏

差为 2.53%。本法用于处方药复方滴鼻液中磺胺嘧啶的测定，结果满意。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会编，中华人民共和国药典，2005年版，二部，北京：化学工业出版社，2005，859
- [2] R. Metz, P. Muth, M. Ferger, et al, *J. Chromatogr. A*, 729 (1996)243.
- [3] A. M. Galvez, P. Wassink, P. De Backer, et al, *Anal. Chim. Acta*, 473 (2002) 183.
- [4] H.Y. Liu, P. G. He, Y.Z. Fang, et al, *Anal. Chim. Acta*, 541 (2005) 125.
- [5] H.Y. Liu, P. G. He, Y.Z. Fang, et al, *Anal. Chim. Acta*, 541 (2005) 187.
- [6] P.S. Francis, N.W. Barnett, S.W. Lewis, K.F. Lim, *Talanta*, 64 (2004) 283.
- [7] M. Catalá. Icardo, J.V. García Mateo, M. Fernández Lozano, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 499 (2003) 57.
- [8] 朱龙，封满良，万秀琴，吕九如，高等学校化学学报，17 (1996) 1693.

## 第六章 流动注射化学发光法测定蔬菜样品中速灭威残留量的研究

**摘要** 本文基于速灭威的碱性降解产物在罗丹明 6G 存在下,在硝酸酸性介质中,与  $\text{KMnO}_4$  的化学发光反应,建立了一种用于测定速灭威的简单、快速、灵敏的流动注射-化学发光方法。实验优化了化学发发光反应的实验条件及流动注射的各实验参数,在所优化的条件下,反应所产生的相对化学发光强度在  $2.0 \times 10^{-9}$  到  $2.0 \times 10^{-7}$  g/mL 范围内与速灭威的浓度成正比,按照 IUPAC 组织的规定,计算方法的检测限是:  $6.6 \times 10^{-10}$  g/mL ( $3\sigma$ ),为了验证方法的精密度,分别研究了同一浓度样品测定的日内及日间相对标准偏差值。对  $2.0 \times 10^{-8}$  g/mL 的速灭威平行测定 11 次得到的日内测定的相对标准偏差为 2.28%;每天测定 5 次,连续测定 5 天得到的日间测定的相对标准偏差为 4.85%。本法已用于蔬菜样品中速灭威的残留量测定,所得到的回收率结果令人满意。

**关键词:** 流动注射; 化学发光; 速灭威; 氨基甲酸酯; 农药残留

### 1. 引言

速灭威,化学名称为间-甲苯基-N-甲基-氨基甲酸酯,是一种常用的酚氧型 N-甲基氨基甲酸酯杀虫剂,其结构式列于图 1。速灭威是一种广谱的杀虫剂,具有强烈的触杀作用,击倒力强,并有一定内吸和熏蒸作用,属于高效、低毒、低残留杀虫剂。对水稻叶蝉、飞虱、蓟马等有特效,尤其对马拉硫磷有抗性的叶蝉、飞虱具有突出的效果,对果树、蔬菜、茶叶、棉花的蚜虫、棉红铃虫、红蜘蛛、茶小绿叶蝉、长白蚧、龟甲蚧有良好的防治效果。

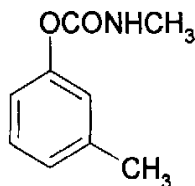


Fig. 1 The chemical structure of tsumacide

N-甲基-氨基甲酸酯在二十世纪五十年代早期就被引入杀虫剂的应用之中,氨基甲酸酯杀虫剂是在研究毒扁豆碱生物活性与化学结构关系的基础上发展起来的。毒扁豆碱含在毒扁豆中,所以说氨基甲酸酯杀虫剂从来源上划分属于植物

源杀虫剂。20世纪60年代以来,此类杀虫剂进入高速发展时期,新品种不断出现,在全世界得到广泛应用,成为继有机磷杀虫剂之后又一重要杀虫剂,大多数品种的速效性好,持效期短,选择性强,对害虫的作用机理是抑制胆碱酯酶的活性,阻断正常神经传导,引起整个生理生化过程的失调,使害虫中毒死亡[1-3]。这与有机磷杀虫剂相类似,但也有不同。有机磷杀虫剂对胆碱酯酶的抑制是不可逆的,而氨基甲酸酯杀虫剂对胆碱酯酶的抑制是可逆的。氨基甲酸酯杀虫剂的毒性差异大,多数品种如异丙威、仲丁威、混灭威、速灭威等的毒性低。由于分子结构接近天然有机物,在自然界易被分解,残留量低。少数品种毒性高,如克百威、涕灭威等,但可加工成使用安全的剂型,如颗粒剂。氨基甲酸酯杀虫剂增效性能多样。拟除虫菊酯杀虫剂用的增效剂,如芝麻油、芝麻素、氧化胡椒基丁醚等,对氨基甲酸酯杀虫剂,亦有增效作用。不同结构类型的氨基甲酸酯杀虫剂的品种间混合使用,对抗药性害虫有增效作用。氨基甲酸酯杀虫剂也可作为某些有机磷杀虫剂的增效剂。

目前,氨基甲酸酯农药以高活性、低毒及容易分解的特性成为全球范围内广泛使用的高效杀虫剂,在水果、水体及蔬菜上常常会有杀虫剂残留,由于对胆碱酯酶的抑制作用从而对人类健康产生危害。有一些氨基甲酸酯杀虫剂不仅有毒,而且还被怀疑有致畸及致癌的作用[4]。因此,建立灵敏、快速及可信的测定这些化合物残留的方法对保护环境及人类健康是非常有意义的。国际组织规定氨基甲酸酯农药的最大残留限量是:0.02-7.00  $\mu\text{g/g}$  [5]。这一严格的限制,加上氨基甲酸酯杀虫剂所处的基体的复杂性,促使研究者们开发灵敏及特效的分析测定目标化合物的方法。

由于氨基甲酸酯类杀虫剂的热不稳定性,因此它们不适合用气相色谱法来分析测定[6]。氨基甲酸酯类杀虫剂对热非常敏感,受热极易分解生成甲基异氰酸酯和酚类物质,因此高效液相色谱法为分析氨基甲酸酯的传统方法[7],通常采用紫外[8]或者柱后衍生荧光测定[9]的方法,但UV检测器不够灵敏;柱后衍生及荧光检测器的HPLC系统,操作较为繁琐,我国《生活饮用水卫生规范》2001年版[10]及美国国家环保局EPA Method 531.2[11]中均采用该方法。从二十世纪八十年代早期,人们越来越多地采用联用技术GC/MS [12-14]和HPLC/MS [15-18]来进行氨基甲酸酯类杀虫剂的直接或者衍生分析测定研究。由于色谱与质谱的联用技术可以提供很好的选择性和灵敏度,目前,在农药残留的测定应用方

面, 仍被广泛的采用。然而质谱仪器价格昂贵, 而且操作人员需要经过培训才能正确的操作, 并对结果进行正确的解释。因此, 对于极大地依赖于农业的发展中国家的分析实验室, 这种色谱与质谱的联用技术目前还难以普及。

化学发光分析法具有灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单等优点, 将其与流动注射的快速分析与高精度相结合而形成的流动注射-化学发光(FI-CL)分析法具有分析速度快、精度高、易实现自动化等优点, 其研究和应用越来越广泛, 已经被成功地运用于有机磷[19-20]、有机氯[21-22]和氨基甲酸酯类[23-32]杀虫剂的分析测定。然而, 目前已经报道的测定氨基甲酸酯类杀虫剂的化学发光方法, 有的包括复杂的水解、光解、衍生或相对较贵的酶类试剂的预处理[23-29], 有的尽管采用直接化学发光反应, 但灵敏度还不够高[30-32]。因此, 研究开发新的简单、灵敏的流动注射化学发光方法用于测定氨基甲酸酯类杀虫剂是非常有意义的。

就我们所知, 目前还没有发现采用酸性高锰酸钾直接化学发光体系测定氨基甲酸酯类杀虫剂的文献报道。在实验中, 我们发现, 速灭威的碱性降解产物在罗丹明 6G 存在下, 与酸性  $\text{KMnO}_4$  的化学反应, 能够产生分析上有用的光发射信号。在优化的实验条件下, 采用本流动注射-化学发光方法, 实验所产生的相对化学发光强度与速灭威的浓度在  $2.0 \times 10^{-9}$  到  $2.0 \times 10^{-7}$  g/mL 范围内成正比的关系, 方法的检测限是:  $6.6 \times 10^{-10}$  g/mL ( $3\sigma$ )。我们已将本法用于蔬菜叶子上速灭威残留量的研究, 并比较了放置不同时间和采用不同的冲洗步骤后对其残留量的影响。

## 2. 实验部分

### 2.1. 试剂

本实验所使用的试剂均为分析纯, 购自上海化学试剂公司, 若没有另外说明, 溶液均采用二次蒸馏水配置。

速灭威 ( $\geq 99.5\%$ ) 储备溶液 (0.5 mg/mL) 先用适量 1.0 mol/L KOH 溶液进行水解, 15min 后用盐酸溶液进行酸化, 最后在容量瓶中定容, 在 4℃ 冰箱中存放备用, 每天新鲜配置。工作溶液在使用前用二次蒸馏水适当稀释后使用。

$\text{KMnO}_4$  储备溶液 (0.05 mol/L): 将 3.951 g  $\text{KMnO}_4$  溶解在 500 mL 蒸馏水中, 将溶液加热至沸, 保持微沸约 1 h, 放置 2-3 天, 用玻璃纤维过滤除去沉淀, 储存于棕色试剂瓶中置于暗处待用。罗丹明 6G 储备溶液 (0.5 mmol/L) 每天用蒸馏水新鲜配置。硝酸、硫酸、多聚磷酸、盐酸、甲酸分别配置 1.0 mol/L 的储备溶液待用。

## 2.2. 仪器

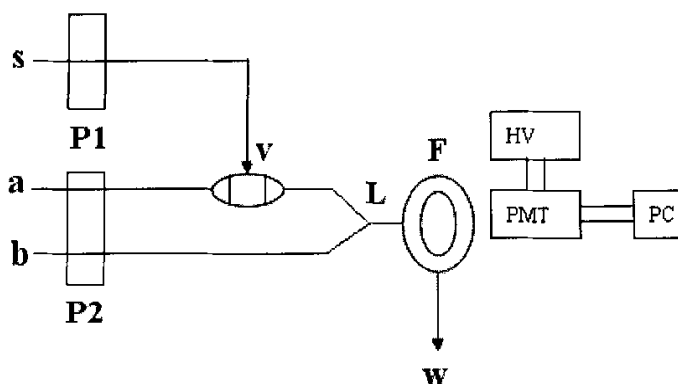


Fig.2. Schematic diagram of the FI-CL manifold

a, Rhodamine 6G solution; b,  $\text{KMnO}_4$  solution in  $\text{HNO}_3$  medium; s, the alkaline degradation solution of tsumacide; P, peristaltic pump; v, injection valve; L, the spot of reagent mixing; F, CL flow cell; PMT, photomultiplier tube; HV, negative high-voltage supply; PC, computer; W, waste solution; the distance from L to F is 6 cm.

化学发光强度采用 IFFL-D 型流动注射-化学发光分析仪(西安瑞迈电子仪器公司)测定。分析采用的流路示意图见图 2。采用双蠕动泵传送系统中的样品及所有试剂溶液, 聚四氟乙烯管 (0.8 mm 内径) 用作流路系统中的连接材料。采用装有样品环的八通注射阀将一部分样品或速灭威标准的碱性降解溶液注射到载流中, 然后与  $\text{KMnO}_4$  和硝酸的混合溶液在流通池前混合, 最后在流通池中产生化学发光发射。流通池中的化学发光信号被光电倍增管检测、放大并最终由装有 IFFL-D 型流动注射-化学发光分析仪分析软件的计算机纪录和处理。

测定化学发光反应的动力学特征的静态试验, 采用一个 2 mL 平底无色玻璃



烧杯，在 IFFL-D 型超微弱化学发光分析仪上完成。预先将速灭威的碱性降解溶液与罗丹明 6G 溶液分别加到无色玻璃烧杯中，直接放置于光电倍增管的光窗上，然后通过暗室的进样口将  $\text{KMnO}_4$  与硝酸的混合溶液注射到此烧杯中，同时记录化学发光强度信号，运用 IFFL-D 型化学发光分析软件进行数据收集及处理，可以得到反映化学发光强度随反应时间变化的动力学特征曲线。

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. 流动注射试验

为了得到良好的稳定性，在第一次正式测量前仪器至少要运行 10min。将流通管分别插入蒸馏水、0.05mmol/L 罗丹明 6G 溶液、0.05mmol/L  $\text{KMnO}_4$  酸性溶液（含 0.25mol/L 硝酸）中。所有流路的流速均设置为 3.0 mL/min。开启蠕动泵冲洗整个系统，直至得到一个稳定的空白信号。将 100  $\mu\text{L}$  速灭威的碱性降解溶液注入到载流中，与  $\text{KMnO}_4$  与硝酸的混合溶液合并，进入化学发光流通池进行发光测量。溶液中速灭威的浓度用相对化学发光强度进行定量。

### 2.3.2. 发光光谱试验

本反应系统的化学发光光谱用日立 850 型荧光光度计（Hitachi, Japan）测量，关闭激发光源，出射狭缝设置在 20 nm。

实验中，先将 0.25 mL 罗丹明 6G 溶液 (0.05 mmol/L) 和 1.0 mL 速灭威的碱性降解溶液 ( $3 \times 10^{-4}$  mol/L) 分别加到专用的石英比色皿中；然后将 1.0 mL  $\text{KMnO}_4$  (0.05 mmol/L) 与硝酸 (0.25 mol/L) 的混合溶液通过流通管快速注射到同一比色皿中，注射的同时开启连续扫描程序，记录本反应体系的化学发光光谱。

## 2.4. 蔬菜中速灭威残留的测定

为了评价不同的冲洗步骤与放置时间对速灭威残留量的影响，我们从当地市场购买部分小青菜，取新鲜的叶子部分 120 g，擦去表面泥沙，均匀喷洒 60 mL 浓度为  $2.0 \times 10^{-4}$  g/mL 的速灭威甲醇标准溶液，置于通风橱中放置 30 min，以除去表面上的溶剂，以此来模拟青菜叶上的速灭威残留进行定量分析。

喷洒过速灭威标准溶液的样品，每份约 10 g 被准确称重，按照不同的清洗步骤进行清洗，或者在室温下放置 24 h，最后都用甲醇进行洗脱。所有的甲醇洗脱溶液分别收集并定容至 100 mL。取适量洗脱溶液用 1.0 mol/L KOH 溶液水解 15 min 后，用盐酸溶液酸化并进一步稀释后，按照 2.3.1.的分析步骤进行定量测定。

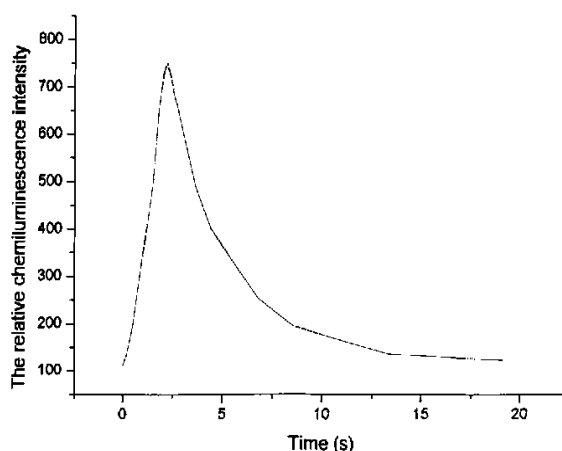


Fig. 3. Kinetic curve of chemiluminescence.

Conditions: 100  $\mu$ l of acidic  $\text{KMnO}_4$  solution (0.1 mmol/L including 0.5 mol/L nitric acid) was injected into a mixture solution of 25  $\mu$ l of 0.05 mmol/L rhodamine 6G and 100  $\mu$ l of alkaline degradation solution of tsumacide ( $3 \times 10^{-4}$  mol/L), High voltage: -800 V.

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 化学发光反应特征

采用静态化学发光反应系统研究了化学发光反应的动力学特征。如图 3 所示，化学发光的强度对时间图表明本化学发光反应是一种快速反应。化学发光强度在起始反应后的 2.2s 时间之内就可以达到最大值，之后化学发光强度快速衰减。

由图 4 速灭威的碱性水解反应平衡方程式可见，间甲酚作为速灭威碱解反应的主要产物，其结构中苯环上的酚羟基及甲基，在酸性高锰酸钾条件下都很容易

被氧化。

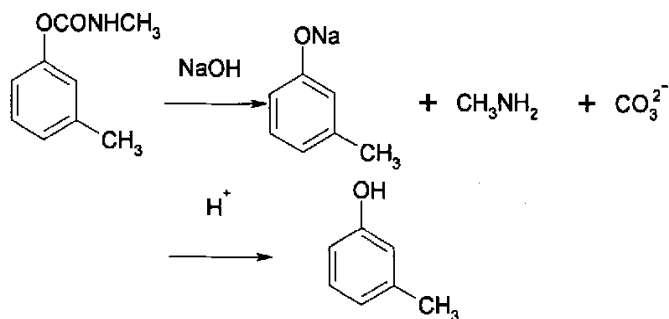


Fig. 4. The equation of alkaline degradation reaction of tsumacide

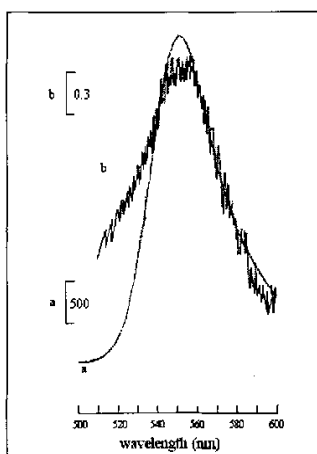


Fig. 5. The comparison of chemiluminescence spectrum and fluorescence spectrum.

a, fluorescence spectrum of Rhodamine 6G, Ex: 253nm; b, chemiluminescence spectrum of the alkaline degradation solution of tsumacide/Rhodamine 6G//KMnO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub> reaction system.

图5是罗丹明6G的荧光光谱图(5a)和本反应体系的化学发光光谱图(5b)。比较图5中的曲线a和曲线b,可以发现,在罗丹明6G的荧光光谱和本反应体系的化学发光光谱之间,有着相似的发射光谱特征,这使我们有理由相信,本化学发光反应体系的发光体是由于罗丹明6G被激发而产生的。因此我们可以将本化学发光反应过程解释为:酸性条件下,高锰酸钾氧化速灭威的碱解产物—间甲酚,将反应产生的能量转移给罗丹明6G,接受能量后的罗丹明6G被激发到激发态,回到基态时,产生光发射。

### 3.2. 化学发光反应系统条件优化

在我们的初步试验中，当溶液中有罗丹明 6G 存在时，速灭威的碱性降解溶液与酸性  $\text{KMnO}_4$  反应，能够发射出分析上可用的化学发光信号。我们首先对速灭威碱性降解的实验条件进行了验证。结果表明在  $1.0 \text{ mol/L KOH}$  溶液中反应  $15 \text{ min}$  后的速灭威溶液，与相同浓度的间甲酚所得到的化学发光强度没有区别，因此该碱性降解条件被采用。为了提高测定的灵敏度和好的信/噪比，恒定速灭威的碱性降解溶液浓度为  $5.0 \times 10^{-8} \text{ g/mL}$ ，光电倍增管负高压为  $-800 \text{ V}$ ，采用单因子实验设计的方法，依次考察了酸、增敏剂的种类、 $\text{KMnO}_4$ 、酸、增敏剂浓度以及一些流动注射系统的物理参数，如流速、采样体积等对化学发光强度及信/噪比的影响。

#### 3.2.1. 酸介质的选择及浓度优化

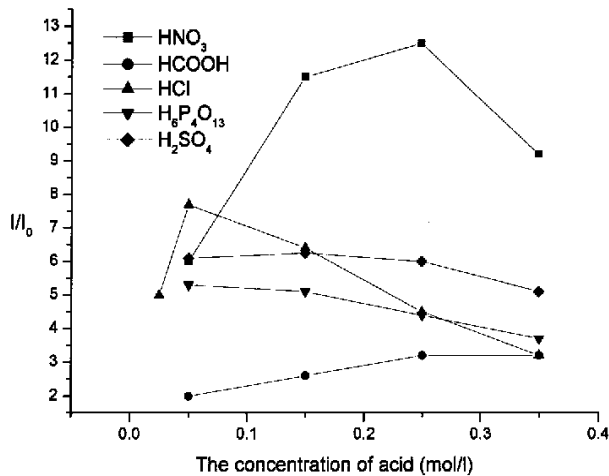


Fig. 6. Effect of different acid on the signal/blank ratio

Conditions:  $\text{KMnO}_4$ ,  $0.25 \text{ mmol/L}$ ; Rhodamine 6G,  $0.1 \text{ mmol/L}$ ; tsumacide:  $5.0 \times 10^{-8} \text{ g/mL}$

酸的种类及浓度对本反应体系的化学发光强度有很大的影响，因此实验考察了  $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCOOH}$  及  $\text{H}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$  几种常用酸在  $0.025\text{-}0.35 \text{ mol/L}$  浓度范围内对本化学发光体系信/噪比的影响。由图 6 的结果可见，不同种类的酸，浓

度变化所引起的化学发光强度与噪音的比值的变化的规律是不同的, 其中在  $\text{HNO}_3$  介质中可以得到较好的信噪比。由表 1 我们可以清楚地看到, 在  $0.25 \text{ mol/L}$  的  $\text{HNO}_3$  介质中, 体系可以给出最高的相对化学发光强度及信/噪比。因此实验中选择  $0.25 \text{ mol/L}$  的  $\text{HNO}_3$  作为反应介质。

Table 1.

The effect of acid medium and concentration on CL

Acid	Concentration range tested (mol/L)	Optimum concentration (mol/L)	$I - I_0$	$I/I_0$
$\text{HNO}_3$	0.05-0.35	0.25	69	12.5
HCl	0.025-0.35	0.05	40	7.7
$\text{HS}_2\text{O}_4$	0.05-0.35	0.15	42	6.25
$\text{H}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$	0.05-0.35	0.15	33	5.1
HCOOH	0.05-0.35	0.25	11	3.2

### 3.2.2. 增敏剂的选择及浓度优化

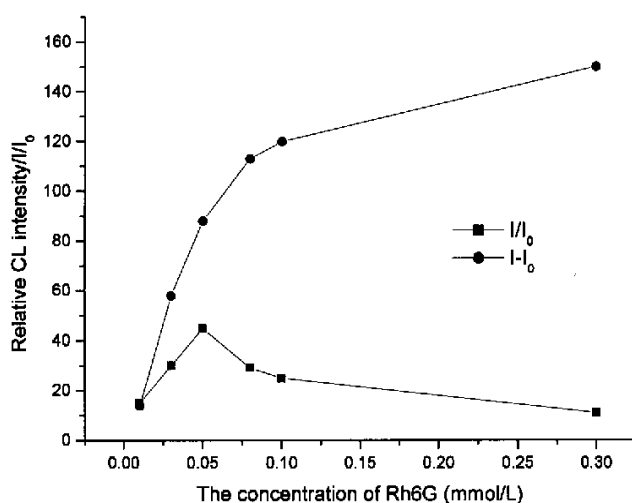


Fig. 7 The effect of Rh 6G concentration on CL

Conditions:  $\text{HNO}_3$ ,  $0.25 \text{ mol/L}$ ;  $\text{KMnO}_4$ ,  $0.25 \text{ mmol/L}$ ; tsumacide:  $5.0 \times 10^{-8} \text{ g/mL}$ .

实验分别考察了在酸性  $\text{KMnO}_4$  化学发光反应体系中常用的几种增敏剂包括罗丹明 B、罗丹明 6G、甲醛、乙醛、戊二醛、乙二醛等对化学发光的影响。结

果表明, 罗丹明 6G 对本反应体系有最明显的增敏效果, 由图 7 可以看到, 随着载流中罗丹明 6G 溶液浓度的增大, 相对化学发光强度逐渐增大, 且在罗丹明 6G 溶液浓度为 0.05 mmol/L 时可以获得最大的信/噪比及较高的化学发光相对强度。因此本实验选择 0.05 mmol/L 的罗丹明 6G 作为反应的增敏剂。

### 3.2.3. $\text{KMnO}_4$ 浓度的影响

在该化学发光反应体系中,  $\text{KMnO}_4$  是氧化剂, 它的浓度直接影响化学发光强度及信/噪比的大小。实验考察了 0.025 到 0.35 mmol/L 的  $\text{KMnO}_4$  对化学发光强度的影响。实验结果表明, 在  $\text{KMnO}_4$  的浓度为 0.05 mmol/L 时可以达到最大的相对化学发光强度及信/噪比。再继续增大  $\text{KMnO}_4$  的浓度, 反而引起化学发光强度的降低, 这是由于  $\text{KMnO}_4$  浓度增大, 颜色加深, 本身会对发射光产生吸收所导致的[33, 34]。因此 0.05 mmol/L 的  $\text{KMnO}_4$  被应用于后面的实验工作中。

### 3.2.4. 流动注射系统的物理参数的影响

流速和采样体积对化学发光的影响很大, 不仅能影响化学发光强度、精密度, 同时流速还会决定样品的分析速度。由于本化学发光反应是快速发光, 因此本实验采用了仪器所能允许的最短的产品、试剂混合点与流通池之间的距离 (6cm)。另外分别考察了 1.5 到 3.5 mL/min 的流速与 55 到 150  $\mu\text{L}$  的采样体积对化学发光的影响。结果表明, 随着流速的增大, 化学发光信号会明显增大, 但超过 3.0 mL/min 后会使甬管磨损加快, 信号的重现性变差; 另外, 采样体积增大, 发光信号增大较为缓慢, 且会出现双峰的现象。这是由于在样品体积过大时, 其中间区域和边界区域可能会产生不同的反应速度而导致的。综合考虑各因素, 采用 3.0 mL/min 的流速与 100  $\mu\text{L}$  的采样体积时可以得到较高的化学发光信号强度、信/噪比和较好的重现性。因此 3.0 mL/min 的流速与 100  $\mu\text{L}$  的采样体积, 被我们在后面的实验中分别予以采用。

## 3.3. 方法的校正曲线、线性范围、检测限及相对标准偏差

实验证明, 在上述优化的实验条件下, 实验所记录的化学发光强度与速灭威的浓度在  $2.0 \times 10^{-9}$  到  $2.0 \times 10^{-7}$  g/mL 范围内有线性关系, 按照 IUPAC 组织的规定,

以空白测定值的标准偏差的 3 倍, 计算方法的检测限是:  $6.6 \times 10^{-10}$  g/mL ( $3\sigma$ )。线性回归方程为:  $\Delta I = 3.18 + 6.41 \times 10^8 C$  ( $C$  是速灭威的浓度, g/mL), 相关系数为: 0.9998, 对  $2.0 \times 10^{-8}$  g/mL 的速灭威标准溶液测量的相对标准偏差: 2.28% (日内) 和 4.85% (日间)。一天之内, 平行注射 11 次  $2.0 \times 10^{-8}$  g/mL 的速灭威碱性降解溶液, 计算日内测量的精密度; 每天平行测量 5 次, 连续测量 5 天得到日间精密度。由日内和日间测得的相对标准偏差均小于 5% 可见, 本法的精密度令人满意, 从而使本法得到了精密度方面的确认。

### 3.4. 干扰研究

对于  $2.0 \times 10^{-8}$  g/mL 的速灭威标准溶液, 考察了一些常见组分对本化学发光体系测定速灭威的影响。容忍限度以引起的相对标准偏差小于 5% 为参考标准。实验结果表明, 100 倍的  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $NO_2^-$ ,  $C_2O_4^{2-}$ , 抗芽威, 甲醇, 丙酮, 40 倍的抗坏血酸, 10 倍的对苯二酚, 5 倍的邻苯二酚, 苯酚, 和 1 倍西维因不干扰测定, 然而, 20 倍的对苯二酚, 10 倍的邻苯二酚, 苯酚, 5 倍的间苯二酚, 1 倍西维因, 1-萘酚, 2-萘酚可以引起化学发光的正干扰, 这是由于这些干扰物质与速灭威的碱解产物间甲酚有着相似的结构所致。总的来说, 本化学发光反应体系对常见的金属离子有着好的抗干扰能力, 但一些与间甲酚有着相似结构的有机化合物会干扰速灭威的测定。

另一方面, 考虑到氨基甲酸酯类杀虫剂在环境条件下, 极容易发生光降解, 我们使用一只 8W 的紫外灯, 模拟光降解条件, 考察了光降解对化学发光的影响。由图 8 可见, 随着光降解的进行, 化学发光强度衰减很快。紫外灯光照射 5 h 以后, 化学发光强度降低到可以忽略不计的程度。由此我们可以推断, 速灭威的光降解产物不会影响本反应的化学发光测量。

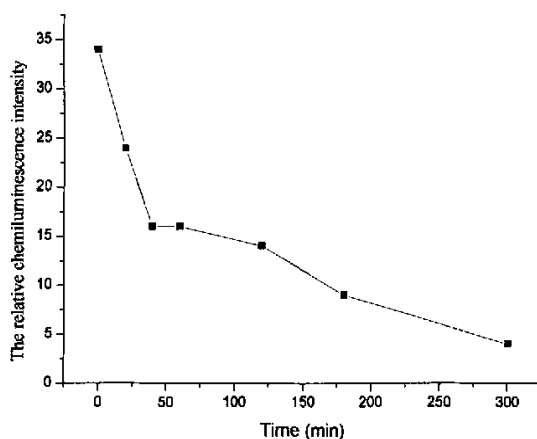


Fig. 8 Effect of tsumacide photodegradation

Conditions:  $\text{HNO}_3$ , 0.25 mol/L;  $\text{KMnO}_4$ , 0.05 mmol/L; tsumacide:  $5.0 \times 10^{-8}$  g/mL; Rhodamine 6G, 0.05 mmol/L.

### 3.5. 不同的冲洗步骤及放置时间对速灭威在蔬菜上残留量的影响

由于速灭威在自然环境条件下, 容易发生光降解, 因此被认为是高效、低毒、低残留和相对安全的杀虫剂。我们试图通过模拟试验, 按照 2.4. 描述的实验步骤, 直接测定甲醇洗脱溶液中速灭威的浓度, 来评价不同的冲洗步骤及放置时间对速灭威在蔬菜上残留量的影响。

Table 2

The amount of tsumacide residue on cole leaves after different pretreatment

Sample	Placing Time	Soaked*	Washed**	Found( $\mu\text{g/g}$ )
1	1 h	no	no	7.8
2	24 h	no	no	5.0
3	1 h	no	yes	5.0
4	1 h	yes	yes	3.0

Mean of three determinations

\*: Before methanol elution, the sample was soaked in 200 mL water 30 min.

\*\* : Before methanol elution, the sample was washed with water 3 times, 200 mL/time.



表 2 的结果表明, 将喷洒过速灭威的青菜叶, 在空气中放置 1h, 速灭威在青菜叶上的残留量由原来喷洒时的  $10.0 \mu\text{g/g}$  降到了  $7.8 \mu\text{g/g}$  (样品 1), 在空气中放置 24 h 后 (样品 2), 青菜叶上的速灭威残留量又由  $7.8 \mu\text{g/g}$  降到了  $5.0 \mu\text{g/g}$ 。这说明, 喷洒在蔬菜上的速灭威在空气中放置一定时间, 由于光降解等使其残留量减少。样品 3、4 都是将喷洒过速灭威的青菜叶, 在空气中经过 1h 的放置时间, 样品 3 不经浸泡, 直接用定量的水冲洗 3 次, 测得速灭威的残留量为  $5.0 \mu\text{g/g}$ 。样品 4 先在水中浸泡 30 min, 然后再用定量的水冲洗 3 次, 就使速灭威的残留量降到了  $3.0 \mu\text{g/g}$ 。这一事实说明, 如果我们将被速灭威污染的蔬菜先在水中浸泡足够长的时间, 然后再清洗, 将对清除蔬菜上的速灭威残留非常有帮助。

为了证明本方法的可靠性, 我们根据速灭威加入的时间的不同, 考察了两种回收率试验的结果。一种是表观回收率( $R^a$ ): 在用甲醇开始洗脱之前, 将准确计量的速灭威甲醇溶液喷洒到青菜叶上, 表观回收率与整个分析过程引起的全部系统误差有关; 另一种称为校正回收率( $R^c$ ), 速灭威是在化学发光测量之前加入到样品溶液中, 校正回收率仅与基体效应引起的系统误差有关。结果列于表 3。

首先在实验中, 运用该方法在所实验的清洁、新鲜的蔬菜样品上未发现有速灭威残留。其次, 表 3 的结果表明, 得到的两种回收率均令人满意。因此我们可以得出结论, 甲醇可以洗脱蔬菜表面上的速灭威残留, 并且该方法可以成功运用于测定蔬菜上的速灭威残留。

Table 3  
Determination of tsumacide in cole and recoveries

Sample	Added ( $10^{-8}$ g/mL)	$R^a$ (%)	$R^c$ (%)
1	5.0	$94.6 \pm 3.0$	$95.6 \pm 2.5$
2	6.0	$95.8 \pm 2.6$	$98.2 \pm 2.1$
3	8.0	$98.0 \pm 3.5$	$96.5 \pm 1.7$

Mean of three determinations  $\pm$  standard deviation

#### 4. 结论

本文基于在溶液中有罗丹明 6G 存在时, 速灭威的碱性降解产物与酸性  $\text{KMnO}_4$  的化学发光反应, 提出了一种简单、快速、灵敏的流动注射-化学发光方

法用于速灭威的测定。该法具有宽的线性响应范围,且已经成功运用于测定经过不同的清洗步骤及放置时间之后,蔬菜叶上速灭威残留量的比较研究。

本法的另外一个可能的应用,是作为高效液相色谱或毛细管电泳的灵敏的检测系统,用于酚氧型氨基甲酸酯农药的分离与分析测定。

### 参考文献

- [1] S. Sole, A. Merkoci, S. Alegret, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33 (2003) 89.
- [2] K.A. Hassal, *The Chemistry of Pesticides: Their Metabolism Mode of Action and Uses in Crop Protection*, McMillan, New York, 1983.
- [3] S. Y. Jin, Z. C. Xu, J. P. Chen, et al, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 117.
- [4] Q.X. Li, B.D. Hammock, J.N. Seiber, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 1537.
- [5] Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR), [www.fao.org](http://www.fao.org)
- [6] S. Rossi, A.P. Dalpero, S. Ghini, R. Colombo, et al, *J. Chromatogr. A* 905 (2001) 223.
- [7] DuanWenzhong(段文仲), Hao Dongsheng(郝冬生), *Journal of Pesticides (农药)*, 1998, 37 (8) : 20~23
- [8] B. D. McGarvey, *J. Chromatogr.* 642 (1993) 89.
- [9] C. Sanchez-Brunete, A. Rodriguez, J. L. Tadeo *J. Chromatogr A* 1007 (2003) 85.
- [10] Ministry of Health of People' s Republic of China (中华人民共和国卫生部). *Santitory Standard for Drinking Water in 2001 No. 161 (生活饮用水卫生规范. 卫法监 20012161)*
- [11] Bassett M V, Munch D J , Henry J. *Water Quality Analysis in Ground Water and Drinking Water*. Cincinnati: U. S. Environmental Protection Agency, 531(2001) 1.
- [12] M. Kochman, A. Gordin, P. Goldshlag, et al, A. Amirav, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 185.
- [13] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, et al, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 665.
- [14] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 78 (1995) 1252.
- [15] J. Wu, C. Tragas, H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 357.
- [16] T. Gota, Y. Ito, H. Oka, et al, *Anal. Chim. Acta* 531 (2005) 79.
- [17] Wang N, Budde W L. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 997.

- [18] M. Takino, K. Yamaguchi, T. Nakahara *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 727.
- [19] J. M. Wang, C. Zhang, H. X. Wang, et al, *Talanta* 54 (2001) 1185.
- [20] Z. H. Song, S. Hou, N. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4468.
- [21] A. E. Botchkareva, F. Fini, S. Eremin, et al, *Anal. Chim. Acta* 453(2002) 43.
- [22] X. Y Liu, J. X. Du, J. R. Lu, *Luminescence* 18 (2003) 245.
- [23] E. Orejuela, M. Silva *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 197.
- [24] J. J. Soto-Chinchilla, A. M. García-Campaña, et al, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 235.
- [25] J. J. Soto-Chinchilla, L. Gámiz-Gracia, et al, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 113.
- [26] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Analyst* 127 (2002) 1526.
- [27] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Chim. Acta* 476 (2003) 141.
- [28] M. Palomeque, J. A. García Bautista, M. Catalá Icardo, et al, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 149.
- [29] P. Moris, I. Alexandre, M. Roger, et al, *Anal. Chim. Acta* 302 (1995) 53.
- [30] Z. H. Xie, G. N. Chen, et al, *Luminescence* 20 (2005) 226.
- [31] J. F. Huertas-Pérez, A. M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, A. González-Casado, M. del Olmo Iruela, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 161.
- [32] J. F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A. M. García-Campaña, A. González-Casado, M. del Olmo Iruela, J. L. Martínez Vidal, *Talanta* 65 (2005) 980.
- [33] A. Campiglio, *Analyst* 123 (1998)1053.
- [34] J.L. Lopez Paz, A. Townshend, *Anal. Commun.* 33 (1996)31.

## 附 录 博士研究生期间完成和发表的论文

1. Flow injection chemiluminescence determination of dobutamine hydrochloride injection using luminol-ferricyanide/ferrocyanide system  
*Analytica Chimica Acta*, 2005, 541(1-2), 125-129  
**Haiyan Liu**, Ling Zhang, Jingming Zhou, Yuhong Hao, Pingang He, Yuzhi Fang
2. Flow injection - chemiluminescence determination of meloxicam by oxidation with N-bromosuccinimide  
*Analytica Chimica Acta*, 2005, 541(1-2), 187-192  
**Haiyan Liu**, Ling Zhang, Yuhong Hao, Qingjiang Wang, Pingang He, Yuzhi Fang
3. Determination of metoprolol tartrate in drugs and human urine using flow-injection chemiluminescence method  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, In press  
**Haiyan Liu**, Juanjuan Ren, Yuhong Hao, Hongchun Ding, Pingang He, Yuzhi Fang
4. Determination of tsumacide residues in vegetable samples using a flow-injection chemiluminescence method  
*Chinese Journal of Chemistry*, Accepted  
**Haiyan Liu**, Yuhong Hao, Juanjuan Ren, Pingang He, Yuzhi Fang
5. Study on selective determination of sulfadiazine in compound naristillae using flow injection-chemiluminescence  
*Talanta*, Submitted  
**Haiyan Liu**, Juanjuan Ren, Yuhong Hao, Pingang He, Yuzhi Fang,
6. Relationship between the morphological structure and mechanical properties of copper-in-hydrophilic polymer gradient composite films  
*Journal of Applied Polymer Science* , 2005, 95(3), 539-545  
Tang, Jianguo; Che, Yanke; **Liu, Haiyan**; Wang, Yao.
7. Influences of co-monomers and electrolyte acidity on morphological structure of copper-in-copolymer gradient film  
*Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 92(1) 373-380  
Tang, Jianguo; Chen, Qiang; **Liu, Haiyan**; Wang, Yao.
8. Effects of organic nucleating agents and zinc oxide nanoparticles on isotactic polypropylene crystallization

- Polymer*, 2004, 45(7), 2081-2091  
Tang, Jianguo; Wang, Yao; Liu, Haiyan; Belfiore, Laurence A.
9. **Effect of processing on morphological structure of polyacrylonitrile matrix Nano-ZnO composites.**  
*Journal of Applied Polymer Science*, 2003, 90(4), 1053-1057.  
Tang, Jianguo; Wang, Yao; Liu, Haiyan; Xia, Yanzhi; Schneider, Bernd.
10. 流动注射化学发光法测定氢溴酸右美沙芬  
理化检验-化学分册, 已接受  
郝玉红, 刘海燕, 任娟娟, 何品刚, 方禹之
11. 聚合物基金属梯度复合膜合成中的电化学行为  
高分子材料科学与工程, 2003, 19 (5) 76-79  
刘海燕, 唐建国
12. 溶液还原法合成聚合物基金属梯度复合膜反应机理的探讨  
化学世界, 2003, 44(4) 191-193  
刘海燕, 唐建国
13. 刘海燕, 唐建国, 聚合物基金属梯度复合膜的电化学合成研究, 全国高分子  
论文报告会(中国化学会), 杭州, 2003.10

## 致 谢

本论文是在恩师方禹之教授和何品刚教授悉心指导下完成的。感谢方先生三年来对我的谆谆教诲及严格要求，先生渊博的学识，高尚的道德风范，严谨的治学态度，忘我的工作作风和超群的人格魅力使我永生难忘，终身受益。感谢何老师对我的悉心指导，每一次讨论都能从他那里得到灵感与启迪，何老师在科研上勇于创新的精神及忘我的工作态度，值得我终生学习。从选题到脱稿成文，点点滴滴都得到两位恩师的悉心关怀与指导，他们不仅在学业和科研方法上，给予我教诲，而且在生活上给予我无微不至的关怀，我会在今后的人生道路上，以恩师为楷模，严谨求实，积极奋进，绝不让恩师失望。在此我谨向两位恩师表示我最衷心的感谢和最崇高的敬意！

同时我还要感谢金利通教授、叶建农教授、陆嘉星教授、张以群教授的热情帮助和指导。

感谢程圭芳、王清江、张文、杜冉老师三年来给予的大力支持与帮助。感谢丁先泉、庄荣华、谢美然、张贵荣等老师给予的热情帮助。感谢郝玉红、任娟娟、张玲、周景明、向美云等同学在实验中的不懈努力与通力合作。感谢汪洁、祝宁宁、徐颖、常竹、赵琨、杨琳、郑静、王莉清、唐祝兴、王晓英、王爱芳、郭喜凤、刘燕、徐风铃、戴晴、叶晓燕、宋海燕、徒永华、吕金、周韵、林莉等师兄师姐师弟师妹们在实验与论文写作过程中给予的热情帮助。

感谢青岛大学化工学院的领导与同事们，特别是唐建国教授、王瑶师妹及好友王正彦等在我攻读博士学位期间所给予的支持与帮助。

特别感谢我的父母及所有亲人。三年来，丈夫给予我体贴、支持与关爱，在自己工作任务重、压力大的情况下，主动分担了很多家务，他是我的坚强后盾。女儿尽管年幼，但聪明懂事，善解人意，经常用她的进步来激励我，逗我开心，使我能放心地投入更多的精力到学业上。

最后，感谢三年来给予我无私的关注与支持的所有人，我的博士论文能够如期完成，离不开你们的帮助，谢谢！

刘海燕

2006年4月