

二元酚类化合物的流动注射化学发光抑制分析法*

崔 华 孟 荣 姜海燕 赵化章

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

摘要 发现邻苯二酚、对叔丁基邻苯二酚、对苯二酚、3,4-二羟基苯甲酸对 Co^{2+} 催化的鲁米诺-过氧化氢化学发光反应有较强的抑制作用, 在此基础上建立了四种二元酚类化合物的流动注射化学发光抑制分析法. 该法简单、快速、灵敏度高, 可用于皮摩尔水平的二元酚类化合物的检测. 通过对反应条件、化学发光光谱、紫外吸收光谱的研究, 对二元酚类化合物的化学发光抑制作用机理进行了探讨, 提出了抑制反应的可能通道.

关键词 鲁米诺, 邻苯二酚, 对叔丁基邻苯二酚, 对苯二酚, 3,4-二羟基苯甲酸, 流动注射, 化学发光抑制作用

1 引 言

二元酚类化合物是生物和环境的重要化合物. 一些二元酚类化合物以微量的形式存在于植物中, 具有重要的生理功能和药用价值. 二元酚类化合物被用于制革、化妆品、制药等工业, 它们是常见的水源、空气污染物, 对人体具有各种毒害作用. 因此, 发展二元酚类化合物的高灵敏度分析方法, 对环境监测、药物分析及植物生理研究等有着重要的意义.

目前, 紫外可见吸收光谱法^[1,2]、电化学分析法^[3-5]、气相/液相色谱法^[6-9]、色质联用^[10]等分析方法已被用于二元酚类化合物的测定, 这些方法或灵敏度不高或设备昂贵, 使它们的应用范围受到一定的限制.

该文发现二元酚类化合物邻苯二酚、对叔丁基邻苯二酚、对苯二酚、3,4-二羟基苯甲酸对鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 化学发光反应具有强抑制作用. 在此基础上建立了二元酚类化合物的流动注射化学发光抑制分析法, 与文献方法相比^[1-10], 该法简单、快速、灵敏度高, 不需要昂贵的设备. 通过对紫外吸收光谱、化学发光光谱、反应条件的研究, 提出了二元酚类化合物的化学发光抑制作用机理.

2 实验部分

2.1 仪器

用 FIA-2400型流动注射机(中国科学院信通公司)和 RF-540型荧光光度计(日本岛津公司)自行组建了流动注射化学发光分析仪, 该仪器被用于流动注射化学发光分析和化学发光光谱的测定. 用 UV-240型紫外可见分光光度计(日本岛津公司)测定吸收光谱. 用 pHs-2型酸度计(上海仪器分析四厂)测定溶液的 pH 值.

* 中国科学技术大学青年科学基金资助项目

1998年6月17日收到

2.2 试剂与溶液

鲁米诺储备液(1×10^{-2} mol/L): 称取鲁米诺(MERCK, 德国)0.8859克, 氢氧化钠1克于烧杯中, 加二次水溶解定容至500毫升, 避光放置三天后使用. 使用时以 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液稀释至所需浓度.

分别配制 1×10^{-3} mol/L 邻苯二酚(西安化学试剂厂)、对叔丁基邻苯二酚(上海新中化学科技公司)、对苯二酚(华东师范大学化工厂), 3,4-二羟基苯甲酸(上海试剂三厂)储备液, 冰箱保存.

Co^{2+} 储备液(1mg/ml): 称取 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (北京红星化工厂)0.7331克用二次水稀释定容至100毫升, 用时稀释至所需浓度.

过氧化氢溶液(1×10^{-2} mol/L): 使用当日由30%过氧化氢(上海桃浦化工厂)直接稀释.

Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液: 配制0.05mol/L Na_2CO_3 (上海虹光化工厂)和0.1mol/L NaHCO_3 (上海虹光化工厂)溶液, 按不同体积比混和配成缓冲溶液.

实验所用试剂在分析纯以上, 所用水均为二次水.

2.3 实验方法

自行组建的流动注射式化学发光检测系统如图1所示. 用蠕动泵分别以4.6、4.0、3.2ml/min 的速度泵入鲁米诺、过氧化氢、 Co^{2+} 溶液, 用进样阀分别注入二元酚类化合物或二次水(空白溶液), 进样量为100 μl , 在425nm 波长处分别记录空白信号 I_0 和样品信号 I_s , 化学发光强度降低值用 ΔI 值表示($\Delta I = I_0 - I_s$), 以 ΔI 进行定量.

3 结果与讨论

3.1 二元酚类化合物的化学发光抑制作用

发现二元酚类化合物邻苯二酚、对叔丁基邻苯二酚、对苯二酚、3,4-二羟基苯甲酸对鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 反应体系的化学发光有很强的抑制作用, 其化学发光抑制动力学曲线如图2所示. 当未加入二元酚类化合物时, 鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 反应体系的化学发光强度保持基本不变, 当从进样阀中注

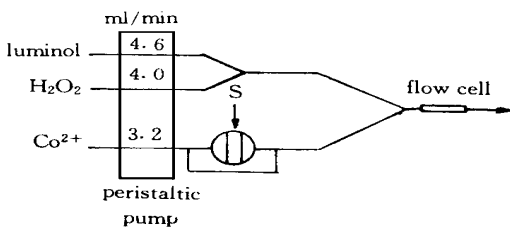


图1 流动注射化学发光检测系统

Fig. 1 Schematic diagram of flow injection system used in CL detection.

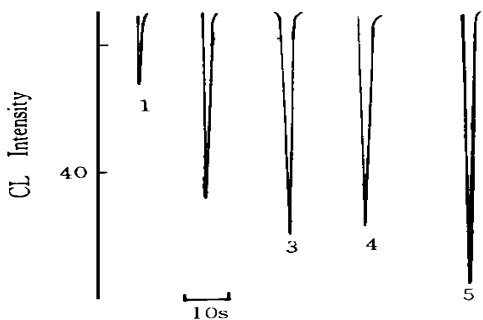


图2 二元酚类化合物抑制鲁米诺化学发光的动力学曲线

Fig. 2 Kinetic characteristics of inhibited CL by polyphenols.

luminol: 2×10^{-4} mol/L,
 H_2O_2 : 1×10^{-2} mol/L, Co^{2+} : $4 \mu\text{g/ml}$
 polyphenol: 5×10^{-6} mol/L
 1 blank, 2 catechol, 3 protocatechuic acid
 4 hydroquinone,
 5 p-t-butyl pyrocatechol

入二元酚类化合物时, 化学发光强度迅速下降. 产生一个倒峰.

3.2 反应条件对抑制信号的影响

3.2.1 介质和 pH 值的影响

试验了 NaOH 和 $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ 两种介质对抑制信号的影响, 结果表明在 $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ 介质中, 抑制信号较强. 在 $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ 缓冲液中, ΔI 值随 pH 值的变化如图3所示. 邻苯二酚、对叔丁基邻苯二酚、对苯二酚、3, 4- 二羟基苯甲酸的最大抑制信号对应的 pH 分别为9.3、9.2、9.3、9.4, 本文选择介质的 pH 为9.3.

3.2.2 鲁米诺浓度的影响

鲁米诺浓度对四种二元酚类化合物化学发光抑制信号的影响如图4所示. 邻苯二酚、对叔丁基邻苯二酚、对苯二酚、3, 4- 二羟基苯甲酸的抑制信号在鲁米诺浓度分别为 3×10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 2.5×10^{-4} mol/L 时为最大, 为减少鲁米诺在反应管壁上吸附的影响, 选取鲁米诺浓度为 2×10^{-4} mol/L.

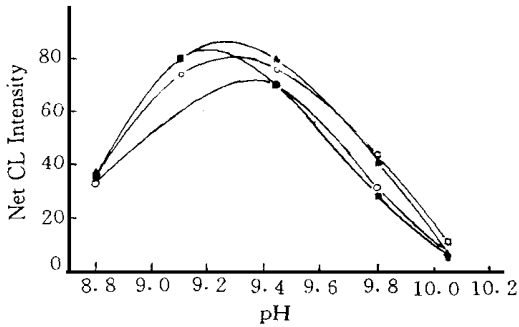


图3 $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ 介质 pH 值对 ΔI 值的影响

Fig. 3 Effect of luminol pH on CL intensity.

luminol: 1×10^{-4} mol/L,

Co(): $4 \mu\text{g}/\text{ml}$

H_2O_2 : 1×10^{-2} mol/L

polyphenol: 5×10^{-6} mol/L

Medium: $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$

catechol, p-t-butyl pyrocatechol,

hydroquinone, protocatechuic acid

3.2.3 钴(II)浓度的影响

四种二元酚类化合物的抑制信号随钴()浓度的变化如图5所示. 除3, 4- 二羟基苯甲酸在钴()浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时 ΔI 最大外, 其它二元酚类化合物在钴()浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时 ΔI 达到最大值. 选择 Co^{2+} 浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$.

3.2.4 过氧化氢浓度的影响

图6显示了过氧化氢浓度对四种二元酚类化合物的抑制信号 ΔI 值的影响. 由此可见, ΔI 值对过氧化氢浓度的变化很敏感. 在 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2}$ mol/L 过氧化氢浓度范围内, ΔI 值随过氧化氢浓度的增加迅速增加, 且在过氧化氢浓度为 1×10^{-2} mol/L 时达到

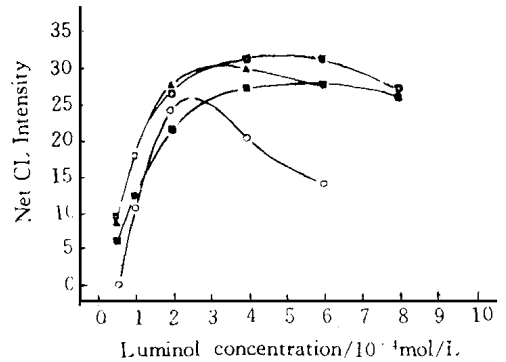


图4 鲁米诺浓度对 ΔI 值的影响

Fig. 4 Effect of luminol concentration on CL intensity.

Co(): $4 \mu\text{g}/\text{ml}$, H_2O_2 : 1×10^{-2} mol/L,

polyphenol: 5×10^{-6} mol/L

(1×10^{-5} mol/L for catechol)

Medium: $\text{Na}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ (pH 9.3)

catechol, p-t-butyl pyrocatechol,

hydroquinone, protocatechuic acid

最大值, 然后 ΔI 值随过氧化氢浓度的增加迅速下降. 最佳 H_2O_2 浓度为 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$.

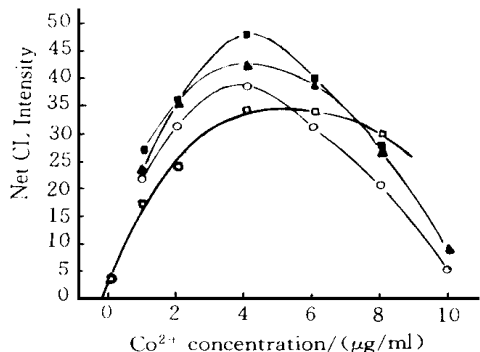


图5 钴()浓度对 ΔI 值的影响

Fig. 5 Effect of Co^{2+} concentration on CL intensity.

lumionol: $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (pH 9.3)
 H_2O_2 : $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$
 catechol: $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$
 p-t-butyl pyrocatechol: $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$
 hydroquinone: $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$
 protocatechuic acid: $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

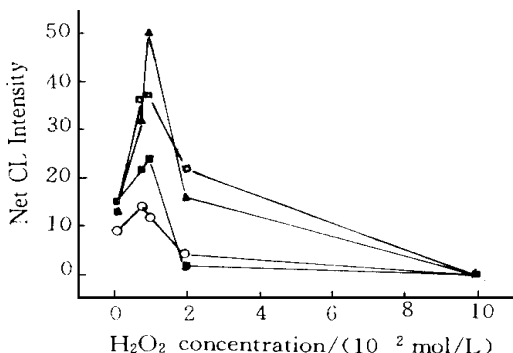


图6 过氧化氢浓度对 ΔI 值的影响

Fig. 6 Effect of H_2O_2 concentration on CL intensity.

lumionol: $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (pH 9.3)
 $\text{Co}(\text{ })$: $4 \mu\text{g/ml}$
 polyphenol: $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$
 : catechol, : p-t-butyl pyrocatechol
 : hydroquinone,
 : protocatechuic acid

3.3 测定的线性范围和检测限

在最佳反应条件下, 绘制了四种二元酚类化合物的工作曲线. 发现邻苯二酚、对叔丁基邻苯二酚、对苯二酚、3, 4-二羟基苯甲酸的浓度分别在 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围内与发光强度的降低值具有良好的线性关系, 其相关系数如表1所示.

分别对 $4 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 邻苯二酚、对叔丁基邻苯二酚、 $6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 对苯二酚、 $8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 3, 4-二羟基苯甲酸连续测定11次, 相对标准偏差分别为1.2%、2.3%、1.6%、2.3%. 若定义空白信号平均值加上其标准偏差的三倍所对应的浓度为检测限, 则它们的检测限分别为 4.9×10^{-8} 、 8.4×10^{-8} 、 3.9×10^{-8} 、 $2.7 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$.

表1 二元酚类化合物的线性回归方程及其参数

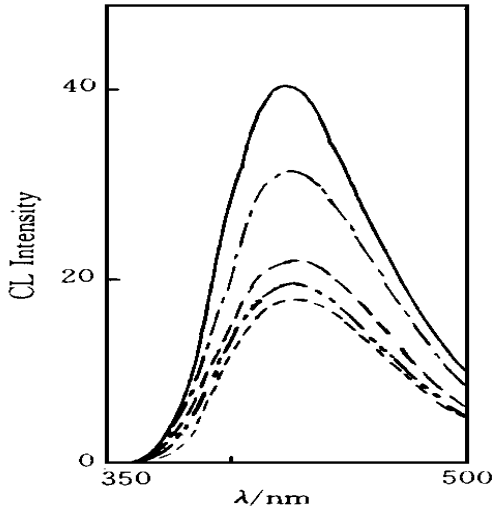
Table 1 Parameter of regression equation for polyphenols.

| 化合物 | 线性范围 mol/L | 线性回归方程 $\Delta I = aX + b$ | 相关系数 |
|-------------|--|------------------------------------|-------|
| 邻苯二酚 | $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6}$ | $\Delta I = 34.98 + 1.756C$ | 0.997 |
| | $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ | $\Delta I = 10.77 + 8.51C$ | 0.998 |
| 对叔丁邻苯二酚 | $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6}$ | $\Delta I = 30.24 + 2.01C$ | 0.998 |
| 对苯二酚 | $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5}$ | $\Delta I = 2.75 + 3.636C$ | 0.998 |
| | $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ | $\Delta I = 439.27 + 70.43 \log C$ | 0.999 |
| 3, 4-二羟基苯甲酸 | $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ | $\Delta I = 20.99 + 5.356C$ | 0.999 |

3.4 抑制作用机理的初步探讨

大量的实验证明: 鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 化学发光体系的发光体为3-氨基邻苯二甲酸根离子, 最大发射波长为425nm. 图7显示了鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 和鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} - 二元酚化学发光体系的化学发光光谱. 由此可见, 加入二元酚类化合物后, 发射的最大波长仍为425nm, 说明该体系的发光体仍为3-氨基邻苯二甲酸根离子.

紫外可见吸收光谱(见图8)表明: 在 pH 9.3 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 介质中, 对苯二酚在242nm 有一吸收峰, 鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 反应体系分别在300nm 和346nm 有两个吸



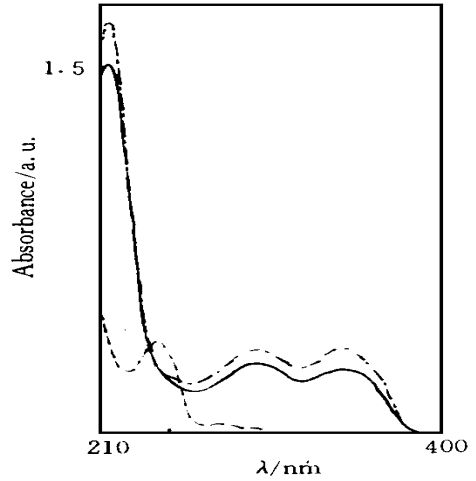
1—鲁米诺+ H_2O_2 , 2—1+ 邻苯二酚,
3—1+ 对叔丁基邻苯二酚,
4—1+ 对苯二酚, 5—1+ 3,4- 二羟基苯甲酸

图7 化学发光光谱

Fig. 7 Chemiluminescent spectra.
luminol(pH9.3): 2×10^{-4} mol/L
 H_2O_2 : 10^{-2} mol/L, Co^{2+} : $4 \mu\text{g}/\text{mL}$
catechol: 1×10^{-6} mol/L
p-t-butyl pyrocatechol: 6×10^{-6} mol/L
hydroquinone: 5×10^{-6} mol/L
protocatechuic acid: 5×10^{-6} mol/L
1. luminol+ H_2O_2 + CO^{2+} 2. 1+ catechol
3. 1+ p-t-butyl pyrocatechol,
4. 1+ hydroquinone,
5. 1+ protocatechuic acid

与鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 反应体系中某种物质反应生成了新的产物. 其它二元酚类化合物的吸收光谱显示了同样的结果.

下面以邻苯二酚为模型化合物讨论二元酚类化合物的化学发光抑制作用机理. K^+



1—鲁米诺+ H_2O_2 + Co^{2+} , 2—1+ 对苯二酚,
3—对苯二酚

图8 紫外吸收光谱

Fig. 8 Absorption spectra.

luminol(pH9.3): 5×10^{-5} mol/L

H_2O_2 : 10^{-3} mol/L, Co^{2+} : $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$

hydroquinone: 2×10^{-5} mol/L

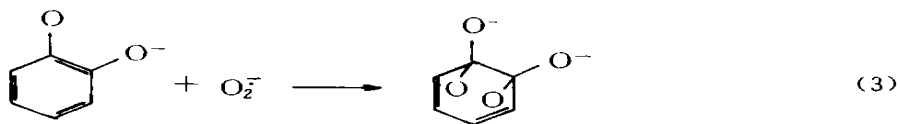
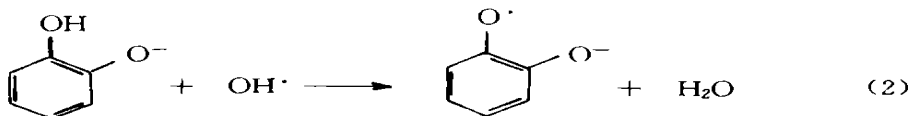
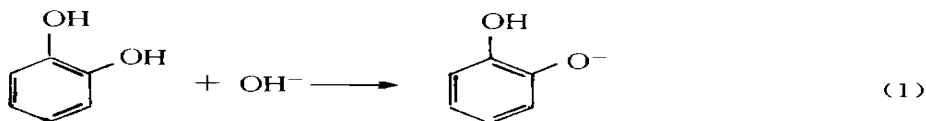
1 luminol+ H_2O_2 + Co^{2+} , 2 1+ hydroquinone, 3 hydroquinone

收峰. 当对苯二酚存在于鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 反应体系中时, 对苯二酚在242nm 处的吸收峰消失, 而体系在300nm 和346nm 处的吸收峰增加, 并且在346nm 处, 鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} - 对苯二酚体系的吸收值不等于对苯二酚和鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 反应体系吸收值的加和. 由此说明: 对苯二酚可能

erner 等人^[11]曾观察到邻苯二酚对鲁米诺- H_2O_2 - Cu^{2+} 反应体系的化学发光有较强的抑制作用, 他们认为邻苯二酚的化学发光抑制作用可能是它与 Cu^{2+} 的络合反应所致. 但研究表明, 这些酚类化合物的化学发光抑制作用似乎与它们的络合性能无关. 如邻苯二酚对 Co^{2+} 的络合能力强于对苯二酚, 但它的化学发光抑制作用弱于对苯二酚.

研究的二元酚类化合物均为强还原剂, 它们可能与反应体系中的氧化剂过氧化氢反应, 从而消耗掉部分氧化剂, 使化学发光反应受到抑制. 但实验结果表明: 在过氧化氢过量的条件下, 甚至较低浓度的二元酚类化合物仍对鲁米诺化学发光反应有抑制作用. 这说明它们对鲁米诺化学发光反应的抑制作用不是由于它们与氧化剂过氧化氢直接反应所致.

一般认为, 在水溶液中鲁米诺氧化反应的最终产物为3-氨基邻苯二甲酸根离子. 从鲁米诺到3-氨基邻苯二甲酸根的形成, Merenyi 等人^[12]认为在此过程中形成了一系列中间产物如 OH^- 、 O_2^- 等, 由于这些中间产物为氧化性自由基, 因此它们可能与还原性的酚类化合物作用形成了不发光的产物, 使激发态的3-氨基邻苯二甲酸根离子的数目减少, 从而使鲁米诺化学发光反应受到抑制. 抑制反应的通道可能为:



3.5 结 论

发现四种二元酚类化合物对鲁米诺- H_2O_2 - Co^{2+} 反应的化学发光具有较强的抑制作用, 其抑制作用的机理可能为二元酚类化合物与鲁米诺化学发光反应形成的中间产物 OH^- 、 O_2^- 反应所致. 基于二元酚类化合物的化学发光抑制作用, 建立了二元酚类化合物的流动注射化学发光抑制分析法, 该法简单、快速、灵敏度高, 适用于皮摩尔水平的二元酚类化合物的检测. 由于所研究的四种二元酚类化合物具有相似的化学发光抑制行为, 导致了它们具有相近的最佳测试条件, 因此提出的方法对四种二元酚类化合物不具有选择性. 若需对其中某种二元酚类化合物进行测定, 其它化合物将产生严重的干扰, 预分离工作将是必要的. 可是二元酚类化合物相似的化学发光抑制特性使之非常适合于发展成为同时测定多种二元酚类化合物的高效液相色谱化学发光检测法, 此项工作目前已取得了重要的进展.

参 考 文 献

- [1] Korenman Ya I, Ermolaeva T N. *Khim. Teknol Vody.*, 1987, **9**(5): 427.
[2] Brune M, Hallberg L, Skaanberg Ann B. *J. Food Sci.*, 1991, **56**(1): 12.
[3] Canofeni S *et al.* *Anal. Lett.*, 1994, **27**(9): 1659.
[4] Grabaric B S *et al.* *Prehrambeno-Tehnol. Biotechnol. Rev.*, 1993, **31**(4): 131.
[5] Gao Z Q, Ivaska A. *Anal. Chim. Acta.*, 1993, **284**: 393.
[6] Gagliadi L, Cimorelli A, Cavazzutti G *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1989, **466**: 433.
[7] Juewrgen M, Helga B, Georg S. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1991, **340**(7): 426.
[8] Tudos A J, Ozinga W J J, Kok W T. *J. Chromatogr.*, 1991, **547**: 1.
[9] Minero C, Vicenti M, Lago S *et al.*, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1994, **350**(6): 403.
[10] Minero C, Vincerti M, Lago S *et al.*, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1994, **350**(6): 403.
[11] Koerner Jr P J, Nieman T A. *Microchim. Acta.*, 1987, : 79.
[12] Merenyi G, Lind J S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**: 5830.

FLOW INJECTION ANALYSIS OF POLYPHENOLS WITH INHIBITED CHEMILUMINESCENCE DETECTION

Cui Hua Meng Rong Jiang Haiyan Zhao Huazhang

(*Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026*)

Abstract

It was found that catechol, p-t-butylpyrocatechol, hydroquinone and protocatechuic acid inhibited chemiluminescence from luminol-H₂O₂-Co²⁺ reaction. On this basis, a flow injection procedure combined with inhibited chemiluminescence detection was developed for the determination of these compounds. The method is fast, simple and sensitive. These polyphenols were detectable at picomolar levels. Furthermore, the mechanism of chemiluminescence inhibition by polyphenols was proposed to be due to the reaction between polyphenol and radical intermediates of chemiluminescent reaction.

Key words catechol, p-t-butylpyrocatechol, hydroquinone, protocatechuic acid, inhibited chemiluminescence, flow injection analysis