

• 研究论文 •

金纳米粒子催化鲁米诺-异烟肼化学发光反应及其分析应用

陈晓惠 杜建修*

(陕西省生命分析化学重点实验室 陕西师范大学化学与材料科学学院 西安 710062)

摘要 研究发现, 在金纳米粒子存在下, 异烟肼与鲁米诺反应可产生强的化学发光. 采用响应曲面优化法中的 Box-Behnken 设计, 对试剂浓度进行了优化. 在优化的实验条件下, 相对化学发光强度与异烟肼的质量浓度在 $5.0 \times 10^{-9} \sim 3.0 \times 10^{-7}$ g/mL 范围内呈线性关系. 方法的检出限为 4.1×10^{-9} g/mL 异烟肼, 相对标准偏差为 1.3% (1.0×10^{-7} g/mL 异烟肼溶液, $n=11$). 该方法已用于片剂、注射液和人血清中异烟肼含量的测定. 同时, 对化学发光反应的可能机理也进行了讨论.

关键词 异烟肼; 化学发光; 金纳米粒子; 响应曲面优化法

Chemiluminescence of Gold Nanoparticles-catalyzed Luminol-isoniazid Reaction and Its Analytical Application

Chen, Xiaohui Du, Jianxiu*

(Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science of Shaanxi Province, School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

Abstract It was found that strong chemiluminescence (CL) was directly produced by the reaction of isoniazid with luminol in the presence of gold nanoparticles (AuNPs) in an alkaline solution. Based on this finding, a simple and sensitive CL method has been developed for the determination of isoniazid. The reagent concentrations, including luminol concentration, NaOH concentration and AuNPs concentration, were optimized with the aid of Box-Behnken design and response surface methodology. The method allows the measurement of $5.0 \times 10^{-9} \sim 3.0 \times 10^{-7}$ g/mL isoniazid with a detection limit of 4.1×10^{-9} g/mL. The relative standard deviation is 1.3% for 1.0×10^{-7} g/mL isoniazid solution in 11 repeated measurements. The proposed method was applied to the analysis of isoniazid in tablets, injections and in spiked human blood serums. The possible CL reaction mechanism was also discussed by the study of the UV-vis spectrum, the CL spectrum, and the effect of dissolved oxygen and reactive oxygen species scavengers on the reaction.

Keywords isoniazid; chemiluminescence; gold nanoparticles; response surface methodology

异烟肼, 化学名为 4-吡啶甲酰肼, 是临床上应用广泛的抗结核药物. 测定异烟肼的方法主要有滴定法^[1]、光度法^[2]、荧光法^[3]、电化学法^[4]、色谱法^[5,6]、毛细管电泳法^[7]以及化学发光法^[8-14]. 这些化学发光法大致可以分为两类. 一类是基于异烟肼与氧化剂如铁氰化钾^[8]和高碘酸钾^[9]间的直接化学发光反应, 这类化学发光法

的灵敏度相对较低; 另一类是基于异烟肼对鲁米诺-氧化剂体系^[10-13]或光泽精-氧化剂体系^[14]化学发光信号的增强作用. 由于这些氧化剂自身可以氧化鲁米诺或光泽精产生较强的化学发光信号, 这类化学发光法的背景信号较高. 最近, Haghghi 等^[15]基于银纳米粒子对鲁米诺-异烟肼化学发光反应的催化作用, 建立异烟肼新的

* E-mail: jxdu@snnu.edu.cn

Received June 22, 2010; revised September 7, 2010; accepted November 23, 2010.

中央高校基本科研业务费专项资金(No. GK200902012)和陕西师范大学优秀科技预研(No. 200902016)资助项目.

化学发光分析新方法.

近年来,人们开始关注纳米材料在化学发光分析的应用.由于纳米材料独特的光学、电学、磁学、热学性质和催化性能^[16,17],使得它在化学发光反应中表现出一些特异的催化、增强或抑制作用^[18~22],并由此建立了一些物质的化学发光分析方法.关于金纳米粒子(Au Nanoparticles, AuNPs)在化学发光分析中的应用,大致可以分为三类:化学发光反应的催化剂,如可以催化鲁米诺-H₂O₂体系^[19]、鲁米诺-NaIO₄体系^[23]、鲁米诺-AgNO₃体系^[24]、Peroxymonocarbonate体系^[25]以及铈(IV)-亚硫酸钠体系^[26]等;化学发光反应试剂^[27,28]以及化学发光分析用的标记试剂^[29].

研究发现,在AuNPs存在条件下,异烟肼与鲁米诺反应可检测到强的化学发光信号.基于此发现,结合流动注射技术,采用响应曲面优化法中的三因素三水平的Box-Behnken(BBD)^[29,30]设计对影响化学发光反应的试剂浓度(AuNPs浓度、NaOH浓度和鲁米诺浓度)进行了优化,建立了测定异烟肼的流动注射化学发光新方法.由于本方法无需外加任何氧化剂,方法的背景信号很低.该方法已被用于片剂、注射液和人血清中异烟肼含量的测定.通过研究反应前后紫外可见吸收光谱、反应的化学发光光谱等其它相关实验,提出了化学发光反应的可能机理.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

IFFM-E型流动注射化学发光分析仪和IFFS-A型多功能化学发光检测器(西安瑞迈分析仪器有限公司);TU-1901型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);干涉滤色片(中国科学院生物物理所);JEM-2100型透射电子显微镜(日本电子公司).

本实验所用试剂除鲁米诺外均为分析纯,水为二次蒸馏水.异烟肼(上海晶纯试剂有限公司);鲁米诺(陕西师范大学分析科学研究所);氯金酸(AuCl₃·HCl·4H₂O,上海试剂一厂);硼氢化钠(NaBH₄,上海三浦化工有限公司);柠檬酸三钠(Na₃C₆H₅O₇·2H₂O,西安化学试剂厂).

异烟肼标准溶液(1.0×10⁻³ g/mL)配制于水中,冰箱中避光保存,使用时用水逐级稀释至所需浓度.鲁米诺储备液(1.0×10⁻² mol/L)参照文献^[11]配制,使用时用0.04 mol/L NaOH溶液稀释至所需浓度.氯金酸溶液(1%)和柠檬酸三钠溶液(0.1%)分别配制于水中.

1.2 AuNPs的制备

粒径为7.4 nm AuNPs用硼氢化钠还原法制备^[31];

粒径为12.5, 15.7和22.2 nm AuNPs用柠檬酸三钠还原法制备^[32].AuNPs的浓度按下式计算^[33]:

$$n = \frac{0.5\pi N_A d_m^3}{3V_m} \quad (1)$$

式中 n 为一个粒径一定的球形纳米粒子中含有的金原子的个数; N_A 为阿伏伽德罗常数; d_m 为AuNPs的粒径; V_m 为固体金的摩尔体积($V_m=10.215$).

1.3 实验设计和统计分析

为获得最大的检测灵敏度,采用响应曲面优化法中的三因素三水平的BBD设计对化学发光反应的试剂浓度进行了优化.这三个因素分别是NaOH浓度(mol/L, X_1), AuNPs浓度(mol/L, X_2)和鲁米诺浓度(mol/L, X_3),相应的实验方案见表1.

采用Design-Expert 7.1.3 Trial (State-Ease, Inc., Minneapolis MN, USA)软件对获得的实验数据进行二次回归拟合,使其符合如下的经验二次多项式模型:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

式中 Y 为相对化学发光强度 ΔI ; X_1 为NaOH浓度; X_2 为AuNPs浓度; X_3 为鲁米诺浓度. β_0 , β_i , β_{ii} 和 β_{ij} 分别是常数项、一次项、二次项和交互项的系数, X_i 和 X_j 为独立变量.

模型的匹配度用相关系数 R^2 进行描述,参数的显著性用 F -检验进行判断.

1.4 实验方法

将鲁米诺溶液、异烟肼溶液以及AuNPs溶液连接相应的管道并泵入流路.异烟肼溶液首先与AuNPs溶液在线混合,待基线稳定后,借助于六通阀将鲁米诺溶液注入上述合并流中,记录产生的化学发光信号,以相对化学发光强度 ΔI ($\Delta I = I - I_0$)对异烟肼进行定量,式中 I 是异烟肼存在时的化学发光信号, I_0 是空白信号.

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

2.1.1 单因素法

研究试剂流速(0.34~1.70 mL/min), AuNPs粒径及浓度(1.02×10⁻¹⁰~1.02×10⁻⁹ mol/L), 鲁米诺浓度(1.0×10⁻⁶~1.0×10⁻⁵ mol/L)和NaOH浓度(0.008~0.05 mol/L)对化学发光反应的影响.结果表明,当试剂流速为0.85 mL/min, AuNPs粒径及浓度分别为15.7 nm和4.02×10⁻¹⁰ mol/L, 鲁米诺浓度和NaOH浓度分别为

8.0×10^{-6} 和 0.03 mol/L 时, 反应有最大的相对化学发光强度.

2.1.2 响应曲面优化法

在单因素实验的基础上, 采用响应曲面优化法中的三因素三水平的 BBD 设计对化学发光反应的试剂浓度, NaOH 浓度, AuNPs 浓度和鲁米诺浓度进一步进行了优化, 实验结果列于表 1.

用 Design-Expert7.1.3 Trial 软件对表 1 中的实验结果进行二次回归拟合, 得到的数学模型为:

$$\begin{aligned} \Delta I = & 37.16 + 1.28X_1 + 4.76X_2 + 1.14X_3 - \\ & 5.70X_1X_2 - 1.85X_1X_3 + 1.78X_2X_3 - \\ & 0.34X_1^2 - 9.72X_2^2 - 1.27X_3^2 \end{aligned} \quad (3)$$

利用最小二乘法对模型的各个参数的回归系数进行方差分析和统计性检验的结果列于表 2. 由表 2 可以看出, AuNPs 浓度、AuNPs 浓度和 NaOH 浓度间的交互作用对相对化学发光强度有着显著的影响 (P 值小于 0.05), 其它参数对相对化学发光强度的影响均不显著 (P 值大于 0.1). 这表明 AuNPs 浓度是影响化学发光反应的最主要因素. R^2 值为 0.9459 表明相对化学发光强度的实测值 (ΔI) 与预测值之间具有较好的拟合度, 该模型可用于预测相对化学发光强度的实际情况. 失拟检验表明模型的失拟度不显著 (P 值大于 0.05).

根据回归分析结果绘制了响应曲面图, 如图 1. 由

图 1 得到的最佳实验条件为: 0.04 mol/L NaOH, $4.24 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ AuNPs 和 $8.32 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 鲁米诺. 在此实验条件下进行实验, 相对化学发光强度的实验值为 38.8 ($n=5$). 这一实验值与通过模型计算得到的理论值 (37.8) 在 95% 置信水平上无显著性差异, 这说明了所建模型的有效性.

2.2 线性范围、精密度和检出限

在优化的实验条件下, 异烟肼的质量浓度在 $5.0 \times 10^{-9} \sim 3.0 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ 范围内与相对化学发光强度具有良好的线性关系, 线性回归方程为 $\Delta I = 1.72 + 0.26\rho$ (ρ : 10^{-9} g/mL), 相关系数为 0.9966. 对浓度为 $1.0 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ 异烟肼溶液进行 11 次平行测定的相对标准偏差为 1.3%. 根据 IUPAC 建议, 测得方法的检出限为 $4.1 \times 10^{-9} \text{ g/mL}$ 异烟肼. 该方法的检出限比文献报道的光度法^[2]、荧光法^[3]、电化学法^[4]、色谱法^[5,6]、毛细管电泳法^[7]以及直接氧化化学发光法^[8,9]的检出限低 1~3 个数量级; 与增强化学发光法^[10-14]具有相当的灵敏度, 但该方法的背景信号较低.

2.3 干扰研究

对一些常见的无机离子、药物添加剂和赋形剂进行了干扰试验. 实验表明, 对 $1.0 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ 异烟肼溶液, 在保持相对测量误差在 $\pm 5\%$ 范围内, 1000 倍的果糖, NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Na^+ , K^+ ; 500 倍的酒石酸, Cl^- ;

表 1 Box-Behnken 实验设计方案及实验结果

Table 1 Box-Behnken design and the corresponding response

Run	Independent variable			Response (ΔI)
	X_1 (NaOH concentration)	X_2 (AuNPs concentration)	X_3 (Luminol concentration)	
1	+1 (0.05 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	-1 ($6.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	39.6
2	+1 (0.05 mol/L)	+1 ($6.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	25.0
3	-1 (0.01 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	+1 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)	35.2
4	0 (0.03 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	34.0
5	0 (0.03 mol/L)	+1 ($6.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	+1 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)	35.6
6	0 (0.03 mol/L)	-1 ($2.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	-1 ($6.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	20.3
7	+1 (0.05 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	+1 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)	36.8
8	0 (0.03 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	36.6
9	0 (0.03 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	38.0
10	-1 (0.01 mol/L)	+1 ($6.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	36.6
11	0 (0.03 mol/L)	+1 ($6.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	-1 ($6.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	28.4
12	-1 (0.01 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	-1 ($6.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	30.6
13	-1 (0.01 mol/L)	-1 ($2.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	17.8
14	0 (0.03 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	37.8
15	0 (0.03 mol/L)	0 ($4.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	39.4
16	0 (0.03 mol/L)	-1 ($2.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	+1 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)	20.4
17	+1 (0.05 mol/L)	-1 ($2.02 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$)	0 ($8.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)	29.0

表2 方差分析和模型回归系数的统计性检验

Table 2 Variance analysis and statistical significance test of estimated regression coefficients for the quadratic polynomial model

Parameter	Estimated coefficient	Standard error	Degrees freedom	Sum of squares	F value	P value
β_0	37.16	1.13	1	Model	13.60	0.0012
β_1	1.28	0.89	1	13.00	2.05	0.1951
β_2	4.76	0.89	1	181.45	28.63	0.0011
β_3	1.14	0.89	1	10.35	1.63	0.2420
β_{12}	-5.70	1.26	1	129.96	20.50	0.0027
β_{13}	-1.85	1.26	1	13.69	2.16	0.1851
β_{23}	1.78	1.26	1	12.60	1.99	0.2014
β_{11}	-0.34	1.23	1	0.49	0.078	0.7882
β_{22}	-9.72	1.23	1	397.60	62.73	<0.0001
β_{33}	-1.27	1.23	1	6.76	1.02	0.3359
Lack of fit	—	—	—	27.94	2.27	0.2228
Pure error	—	—	—	16.43	—	—
R^2	0.9459	—	—	C.V.%	7.91	—
Adjusted R^2	0.8764	—	—	PRESS	472.67	—

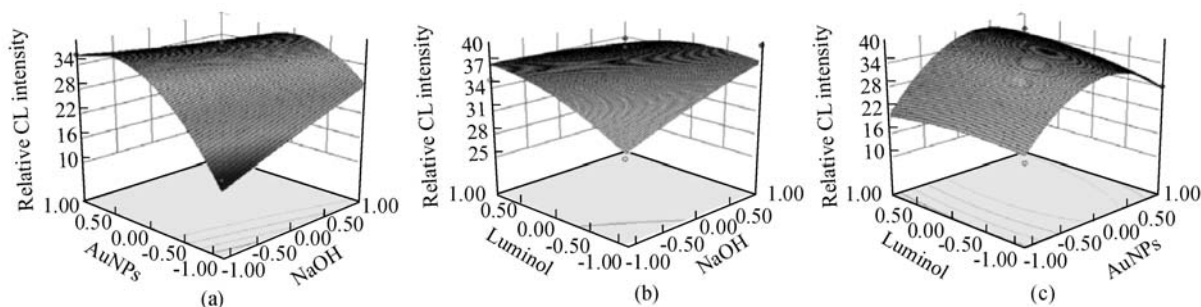


图1 AuNPs 浓度, luminol 浓度和 NaOH 浓度对相对化学发光强度响应点的影响

Figure 1 Effect of AuNPs concentration, luminol concentration and NaOH concentration on the response surface plot of relative CL intensity

(a) 8.0×10^{-6} mol/L luminol; (b) 4.02×10^{-10} mol/L AuNPs and (c) 0.03 mol/L NaOH

100 倍的淀粉, PO_4^{3-} , NH_4^+ ; 50 倍的蔗糖, 乳糖, Mg^{2+} , Ca^{2+} ; 10 倍的脲, 葡萄糖; 5 倍的 β -环糊精; 同倍的谷胱甘肽, *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸, Au^{3+} 和 Ba^{2+} 对测定均不产生干扰. 同倍量的 *L*-半胱氨酸, 尿酸, 抗坏血酸和 Cu^{2+} 对测定产生负干扰; 而同倍量的 Fe^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 和 Fe^{2+} 对测定产生正干扰.

2.4 样品分析

2.4.1 片剂和注射液中异烟肼含量的测定

取两种不同厂家的异烟肼片剂各 5 片 (No. 1: 山西临汾云鹏药业有限公司, 标示量为 50 mg/片; No. 2: 西安利君制药股份有限公司, 标示量为 100 mg/片), 准确称重后, 研细, 混匀, 从中称取适量粉末, 用水溶解后, 过滤, 滤液加水定容于 100 mL 容量瓶中. 滤液经适当稀释后, 按实验步骤进行测定, 计算片剂中异烟肼的含

量, 测定结果列于表 3.

表3 片剂和注射液中异烟肼的测定结果

Table 3 Results for determination of isoniazid in tablets and injections

Sample	This method	R.S.D (n=5)	Pharmacopoeia methods ^[1]
No. 1	48.9 mg/tablet	2.6%	48.3 mg/tablet
No. 2	99.4 mg/tablet	3.6%	101.3 mg/tablet
No. 3	101.6 mg/injection	1.7%	104.4 mg/injection

异烟肼注射液 (No. 3: 天津金耀氨基酸有限公司, 标示量为 100 mg/支) 直接用水稀释至线性范围内, 按实验步骤进行测定, 计算注射液中异烟肼的含量, 测定结果列于表 3.

对本方法的测定结果与药典方法^[1]的测定结果进行

了 t 检验, 结果表明, 在 95% 的置信水平上, 两种方法的测定结果无显著性差异。

2.4.2 血清中异烟肼的含量测定

血清样品由陕西师范大学校医院提供. 于 0.30 mL 血清中加入 0.20 mL 异烟肼标准溶液, 摇匀后加入 10% 三氯乙酸溶液 1.00 mL, 在 10000 r/min 转速下离心 15 min. 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后, 移取 0.50 mL 滤液至烧杯中, 加热除去过量的三氯乙酸, 冷却至室温后, 加水至 50 mL. 同时进行空白实验, 结果列于表 4. 经 t 检验, 在 95% 置信水平上测得的回收率与在 100% 置信水平上测得的回收率无显著性差异。

表 4 血清中异烟肼的测定结果

Table 4 Results for determination of isoniazid in human serum samples

Sample	Added/ ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Found/ ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	R.S.D/ (%, $n=5$)	Recovery/%
No. 1	0.0	0.0	—	—
No. 2	1.0×10^{-8}	0.92×10^{-8}	1.7%	92.0%
No. 3	3.0×10^{-8}	2.9×10^{-8}	2.9%	95.3%
No. 4	5.0×10^{-8}	4.9×10^{-8}	3.8%	97.4%

2.5 机理讨论

实验表明, 异烟肼或 AuNPs 单独与碱性鲁米诺溶液混合时, 均不产生化学发光. 当异烟肼, AuNPs 和碱性鲁米诺三者混合时, 可检测到强的化学发光信号. 当以离心法除去 AuNPs 的上清液代替 AuNPs 溶液进行实验时, 未检测到化学发光信号. 将制备 AuNPs 时的氯金酸溶液同等稀释后代替 AuNPs 进行实验 (5×10^{-5} mol/L), 结果表明, 氯金酸对鲁米诺-异烟肼化学发光体系没有催化作用. 以上实验表明在该化学发光体系中起作用的是 AuNPs.

扫描了 AuNPs 溶液、异烟肼溶液、碱性鲁米诺溶液、异烟肼和碱性鲁米诺混合液及反应混合液的紫外可见吸收光谱, 结果如图 2 所示. 异烟肼溶液的吸收峰位于 263.0 nm 处(曲线 a), 碱性鲁米诺溶液的两个吸收峰分别位于 346.0 和 302.0 nm 处(曲线 b), AuNPs 溶液的吸收峰位于 520.0 nm 处(曲线 c). 对于异烟肼和碱性鲁米诺混合液, 异烟肼溶液位于 263.0 nm 处的吸收峰和鲁米诺溶液位于 346.0 和 302.0 nm 的吸收峰消失, 出现了两个新的吸收峰, 分别位于 273.0 和 299.0 nm 处(曲线 d). 这表明异烟肼和碱性鲁米诺间发生了化学反应. 反应混合液的紫外可见吸收光谱包含三个吸收峰, 分别位于 273.0, 299.0 和 520.0 nm 处(曲线 e). 反应混合液位于 273.0 和 299.0 nm 处的吸收峰与异烟肼和碱性鲁米诺混合液的吸收峰的位置完全一致, 但吸光度显著增大; 位于 520.0 nm 的吸收峰与 AuNPs 溶液的吸收峰的位置与

吸光度的大小均无显著性差异. 这表明反应前后 AuNPs 结构上并没有发生变化, 其存在加速了异烟肼和碱性鲁米诺间的化学反应, 起着催化剂的作用。

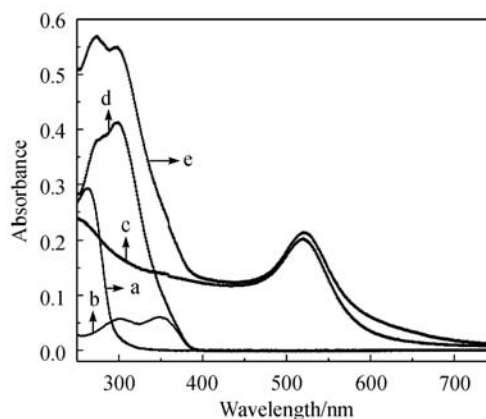


图 2 紫外可见吸收光谱图

Figure 2 UV-visible spectra

(a) 1.0×10^{-5} g/mL isoniazid solution; (b) 8.32×10^{-6} mol/L luminol solution; (c) 4.02×10^{-10} mol/L AuNPs solution; (d) the mixed solution of 1.0×10^{-5} g/mL isoniazid + 8.32×10^{-6} mol/L luminol and (e) the reaction mixture of 1.0×10^{-5} g/mL isoniazid + 8.32×10^{-6} mol/L luminol + 4.02×10^{-10} mol/L AuNP

借助于干涉滤色片, 绘制了鲁米诺-AuNPs-异烟肼反应的化学发光光谱, 结果见图 3. 该反应的化学发光光谱最大发射波长位于 425 nm, 与文献[35]报道的鲁米诺反应的发光体——激发态的 3-氨基邻苯二甲酸根离子的最大发射波长相吻合. 这表明该化学发光反应的发光体仍为 3-氨基邻苯二甲酸根离子。

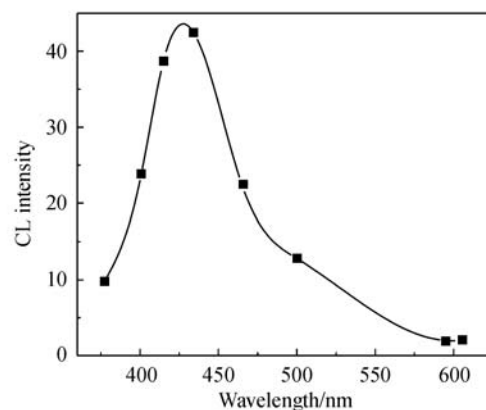


图 3 鲁米诺-AuNPs-异烟肼反应的化学发光光谱

Figure 3 CL spectrum of luminol-AuNPs-isoniazid reaction 8.32×10^{-6} mol/L Luminol, 4.24×10^{-10} g/mL AuNPs and 1.0×10^{-5} g/mL isoniazid

异烟肼分子结构中含有肼基, 具有强的还原性, 在碱性介质中可将溶解氧还原为 H_2O_2 ^[11-14] (类似于肼与

溶解氧之间的反应^[36,37]). 在没有 AuNPs 时, 这一反应进行的程度较低, 生成的 H_2O_2 量很少. 因此异烟肼单独与碱性鲁米诺混合时, 未检测到明显的化学发光信号. AuNPs 的存在不仅加速了异烟肼与溶解氧间的反应, 增加了生成 H_2O_2 的量; 而且催化了后续的鲁米诺- H_2O_2 化学发光反应^[19]. 据文献报道, 在 AuNPs 参与的催化反应中, 常常伴随着氧自由基(超氧阴离子自由基, $\cdot\text{O}_2^-$ 和羟基自由基, $\cdot\text{OH}$)的生成^[19,38]. 这些自由基在鲁米诺化学发光反应起着非常重要的作用^[39]. 为了验证上述自由基是否参与了化学发光反应, 我们做了以下两个实验. 实验一: 向所有溶液中通入 N_2 以驱除溶液中的溶解氧. 结果表明, 通入 N_2 1 h 后, 测得的化学发光信号明显降低, 约为通 N_2 前化学发光信号的 52%. 这说明溶解氧确实参与了化学发光反应. 实验二: 当向反应体系中加入超氧阴离子自由基的清除剂抗坏血酸(3×10^{-5} g/mL)时, 体系的化学发光信号完全被抑制; 加入羟基自由基的清除剂甘露醇(1×10^{-3} g/mL)时, 体系的化学发光信号显著降低, 约为未加清除剂的 31%. 这说明在反应中确实涉及到氧自由基.

根据以上实验事实和讨论, 我们提出了以下可能的化学发光反应机理, 如图 4 所示: AuNPs 的存在加速了异烟肼与溶解氧反应生成 H_2O_2 的速度. 生成的 H_2O_2 进一步在 AuNPs 表面被催化分解为羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ ^[19]. $\cdot\text{OH}$ 进一步与 H_2O_2 反应生成 $\cdot\text{O}_2^-$. $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 在碱性溶液中氧化鲁米诺生成激发态的 3-氨基邻苯二甲酸根离子, 当激发态的 3-氨基邻苯二甲酸根离子返回到基态时产生光辐射.

3 结论

发现了金纳米粒子对鲁米诺-异烟肼化学发光反应的催化作用, 借助于响应曲面优化法中的 Box-Behnken 设计, 对试剂浓度进行了优化, 建立了测定异烟肼的流动注射化学发光新方法. 所建方法简单、灵敏, 已被用于片剂、注射液和血浆中异烟肼含量的测定. 通过研究反应前后紫外可见吸收光谱、反应的化学发光光谱等其它相关实验, 提出了化学发光反应的可能机理.

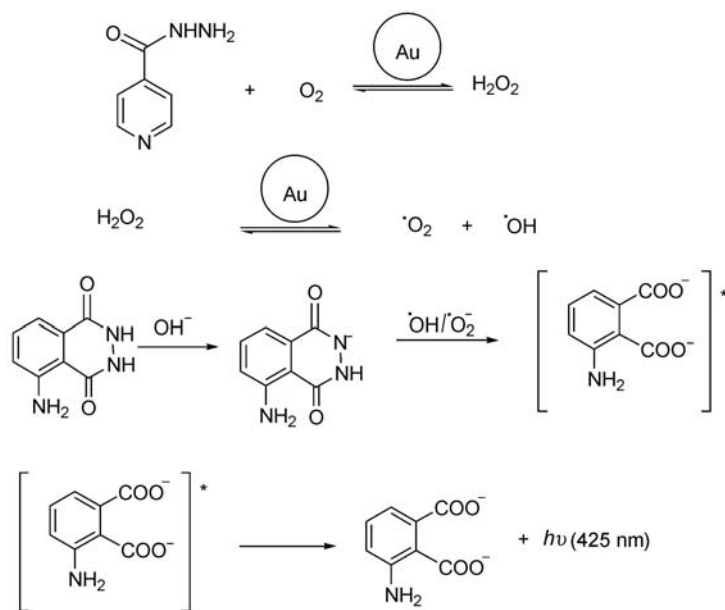


图 4 化学发光反应的可能机理

Figure 4 Possible CL reaction mechanism

References

- China Pharmacopoeias Committee, *Chinese Pharmacopoeia*, Vol. II, Chemical Industry Press, Beijing, **2005**, p. 217 (in Chinese). (中国药典委员会, 中国药典, 二部, 化学工业出版社, 北京, **2005**, p. 217.)
- Zhang, H.; Wu, L.; Li, Q.; Du, X. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 628, 67.
- Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Santos, J. L. M. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 419, 17.
- Bergamini, M. F.; Santos, D. P.; Zanoni, M. V. B. *Bioelectrochemistry* **2010**, 77, 133.
- Hang, J.-Y.; Zhou, Z.-M.; Zhao, D.-Y.; Yang, M.-M. *Chin. J. Anal. Chem.* **2009**, 37, 845 (in Chinese). (杭菊英, 周智明, 赵道远, 杨明敏, 分析化学, **2009**, 37, 845.)
- Khuhawar, M. Y.; Zardari, L. A. *Anal. Sci.* **2008**, 24, 1493.
- Zhang, X.; Xuan, Y.; Sun, A.; Lü, Y.; Hou, X. *Luminescence* **2009**, 24, 243.

- 8 Yang, W.-P.; Zhang, Y.-T.; Zhang, Z.-J. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*, 303 (in Chinese).
(杨维平, 张琰图, 章竹君, 化学学报, **2003**, *61*, 303.)
- 9 Li, B.; Zhang, Z.; Liu, W. *Talanta* **2001**, *54*, 697.
- 10 Yang, C.-Y.; Zhang, Z.-J.; Wang, J.-L. *Microchim. Acta* **2009**, *167*, 91.
- 11 Du, J.-X.; Lu, J.-R. *Luminescence* **2004**, *19*, 328.
- 12 Safavi, A.; Karimi, M. A.; Nezhad, M. R. H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *30*, 1499.
- 13 Zhang, S.; Li, H. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *444*, 287.
- 14 Du, J.-X.; Lu, J.-R. *Luminescence* **2006**, *21*, 26.
- 15 Haghghi, B.; Bozorgzadeh, S. *Microchem. J.* **2010**, *95*, 192.
- 16 Cao, Y. W. C.; Jin, R.; Mirkin, C. A. *Science* **2002**, *297*, 1536.
- 17 Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 12663.
- 18 Zhu, Y.-F.; Shi, J.-J.; Zhang, Z.-Y.; Zhang, C.; Zhang, X. R. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 120.
- 19 Zhang, Z.-F.; Cui, H.; Lai, C.-Z.; Liu, L.-J. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3324.
- 20 Chen, H.; Gao, F.; He, R.; Cui, D.-X. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *315*, 158.
- 21 Zhou, K.-W.; Zhou, Y.; Sun, Y.; Tian, X.-J. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 943 (in Chinese).
(周考文, 周宇, 孙月, 田雪娇, 化学学报, **2008**, *66*, 943.)
- 22 Wang, Z.-P.; Li, J.; Liu, B.; Li, J.-H. *Talanta* **2009**, *77*, 1050.
- 23 Li, S.-F.; Li, X.-Z.; Xu, J.; Wei, X.W. *Talanta* **2008**, *75*, 32.
- 24 Cui, H.; Guo, J.-Z.; Li, N.; Liu, L.-J. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 11319.
- 25 Lin, J.-M.; Liu, M.-L. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 7850.
- 26 Yu, X.-J.; Bao, J.-F. *J. Lumin.* **2009**, *129*, 973.
- 27 Cui, H.; Zhang, Z.-F.; Shi, M.-J. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3099.
- 28 Zhang, Z.-F.; Cui, H.; Shi, M.-J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 1017.
- 29 Fan, A. P.; Lau, C.; Lu, J.-Z. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3238.
- 30 Box, G. E. P.; Wilson, K. G. *J. Royal Stat. Soc.* **1951**, *13*, 1.
- 31 Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escalera, L. A. *Talanta* **2008**, *76*, 965.
- 32 Brown, K. R.; Fox, A. P.; Natan, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1154.
- 33 Frens, G. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20.
- 34 Cumberland, S. L.; Strouse, G. F. *Langmuir* **2002**, *18*, 269.
- 35 White, E. H.; Bursey, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 941.
- 36 Pilipenko, A. T. *Zh. Anal. Khim.* **1973**, *28*, 1135.
- 37 Safavi, A.; Absalana, G.; Bamdad, F. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *610*, 243.
- 38 Liu, H.; Kozlov, A. I.; Kozlova, A. P.; Shidoo, T.; Asakura, K.; Iwasawa, Y. A. *J. Catal.* **1999**, *185*, 252.
- 39 Merenyi, G.; Lind, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5830.

(A1006221 Sun, H.)