

基于鲁米诺电生化学发光的液相色谱间接测定法

王玉文

Edward S. Yeung

(河北省科学院地理研究所, 石家庄, 050011) (美国依阿华州立大学化学系)

化学发光 (CL) 分析灵敏度高、仪器设备简单, 已得到越来越多的应用⁽¹⁻²⁾。由于 CL 选择性差, R. L. Veazey 等人⁽³⁻⁴⁾将其引入高效液相色谱 (HPLC)。但缺乏可行的检测物, 使该法的应用受到限制。本工作利用样品在柱床替换 (Replacement) 鲁米诺及鲁米诺电生化学发光原理, 发展了 ECL 间接测定法, 使无 CL 性质的样品得以检测。

实验部分

(一) 仪器与试剂

自制电解流动池, 该池体由两片 Kel-F 中间夹一厚度为 0.4mm 的特氟龙片组成。其中一块 Kel-F 体嵌有两片直径为 4mm 的铂电极; 另一块 Kel-F 体嵌有石英窗, 石英窗面对铂阴极。池子的有效体积约 8 μ l。

恒流泵, 314 型注射泵 (ISCO, Lincoln, NB)。毫微微安电流计, 417 型 (Keithley Instruments)。高压发生器, 242 型 (Keithley Instruments)。光电倍增管, Hamatsu R928。记录器, 5000 型 (Fisher Recordall)。仪器流程图见图 1。

鲁米诺 (Aldrich)、硝酸钴 (Fisher)、氯化钠 (Fisher)、双氧水 (30%)、苯甲醛 (Aldrich)、硝基苯 (Aldrich)、苯甲酸 (Aldrich)。所有试剂均为分析纯。

(二) 实验条件

色谱柱 ALLTECK ODS-C₁₈ (250 \times 4.6 mm); 流动相, 甲醇-水 (60:40, V/V) 含有 3.2mmol/L H₂O₂, 0.1mmol/L 鲁米诺; 0.1mol/L NaCl 和 0.05mmol/L Co(NO₃)₂·6H₂O, 使用前静置 50 小时, 过 0.2 μ m 尼龙薄

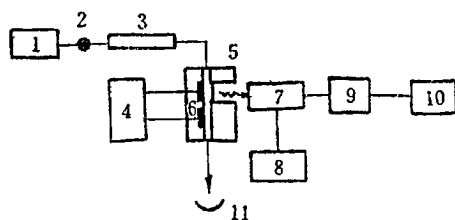


图 1 液相色谱-电生化学发光检测装置流程图

1. 泵, 2. 进样阀, 3. 色谱柱, 4. 恒电流源, 5. 电解流动池, 6. 铂电极, 7. 光电倍增管, 8. 高压发生器, 9. 毫微微安表, 10. 记录器, 11. 废液池

膜, 流速 1.5ml/min。电解流动池电流 40 μ A。光电倍增管, -400V。

结果与讨论

(一) 文献报道 CL 系统以柱后反应为多, 但经我们试验, 该系统噪声较大, Dynamic Reserve (定义为背景信号比噪声) 仅为 300。本文使用 ECL, 使 Dynamic Reserve 提高到 500, 提高了检测灵敏度。

(二) 池内 pH 值不仅与池电流有关, 同时与 H₂O₂ 浓度及流动相流速有关, 从图 2

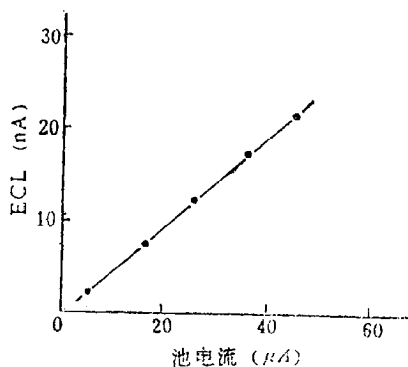


图 2 池电流对 ECL 的影响

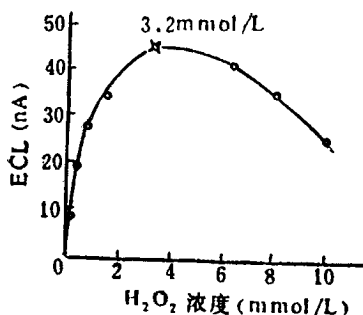


图3 H₂O₂浓度对ECL的影响

可见,池电流为 50μA 时, ECL 仍随电流成线性增加。但实验观察到此时已有气泡从电极表面逸出, 增大了本底噪声, 所以方法使用 40μA 电流。

文献报道⁽⁴⁾, 鲁米诺 CL 系统 H₂O₂ 对鲁米诺最佳浓度比为 2:1。在本 ECL 系统中, 由于部分 H₂O₂ 转化为 OH⁻, 其最佳浓度比为 32:1 (3.2mmol/L/0.1mmol/L, 见图3)。

流动相在 0.66ml/min 时 ECL 值达到最大。

(三) 在该 ECL 系统中注入 100μl 浓度分别为 200mg/L 的非 CL 混合标准样, 所得色谱图见图 4。以 2.5 倍信噪比计算检出限, 从 J.A.Doiani 提供的方法⁽⁵⁾ 计算替换比 (定义为每一克分子样品替换出的鲁米诺克分子数), 以进不同量的混合标准样测线性范围, 所得结果见表 1。

表 1 样品的最小检出量、线性范围及替换比

化合物	苯甲醛	硝基苯	甲基苯甲酸
最小检出量 (nmol)	20	11	53
线性范围 (μmol)	0.02—3.5	0.011—1.3	0.058—3.1
替换比	2×10 ⁻²	8×10 ⁻²	9×10 ⁻³

(四) 本间接测定法是根据样品分子在柱床中替换流动相中的鲁米诺, 使其在某一区间减少, 导致发光强度减弱而设计的。样品的最小检出量 m_t 符合下述关系式:

$$m_t \propto \frac{1}{D \times R}$$

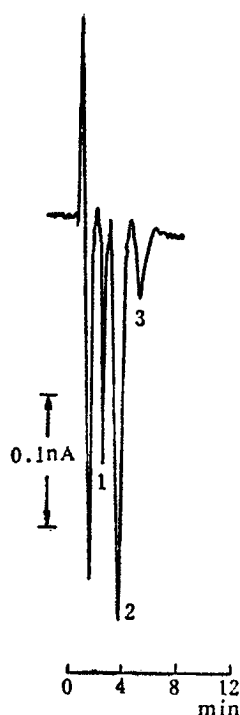


图 4 间接 ECL 色谱图

1. 苯甲醛, 2. 硝基苯, 3. 甲基苯甲酸。

其中 D 为 Dynamic Reserve, R 为替换比。通过增大 D 值即提高发光强度, 减小噪声, 增加替换比, 样品的检测限还可降低。

参 考 文 献

- (1) W. R. Seitz, CRC CRIT. Rev. Anal. Chem., 13, 1(1981).
- (2) R. E. Majors, H. G. Barth, C. H. Lochmüller, Anal. Chem., 56, 300R(1984).
- (3) R. L. Veazey, T. A. Nieman, J. Chromatogr., 200, 153(1980).
- (4) A. MacDonald, T. A. Nieman, Anal. Chem., 57, 936(1985).
- (5) J. A. Doiani, Anal. Chem., 59, 2583 (1987).

(收稿日期: 1989年3月20日)

Indirect Detection Method Based on Electrogenerated Luminol Chemiluminescence in Liquid Chromatography
Wang Yuwen, The Institute of Geophys., Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, 050011; Edward S. Yeung, Department of Chemistry, Iowa State University, Ames, Iowa

An indirect electrogenerated luminol chemiluminescence detection method is described. The OH⁻ which is a reactant in luminol chemiluminescence system is produced by the reduction of H₂O₂ in an electrolysis flow cell. Other reactants and supporting electrolyte are contained in the eluent. By the replacement of the reactants in the column the samples give negative peaks. The technique is found to have detection limits of 11-53 nmol depending on sample type.