

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01110

流动注射化学发光法测定中药材中没食子酸

方卢秋^{*1,2} 李海芳² 郑国金^{2,3}

¹ (长江师范学院化学化工学院, 涪陵 408100) ² (清华大学化学系, 北京 100084)

³ (楚雄医药高等专科学校公共部, 楚雄 675000)

摘 要 建立快速简便的流动注射化学发光分析法,用于中药材中没食子酸含量的测定。利用酸性介质中 $\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}_2$ 体系生成羟基自由基氧化没食子酸产生微弱的化学发光,用罗丹明 6G 来增敏化学发光。研究了影响化学发光的各种因素,探讨了可能的机理。结果表明,0.18 mol/L HCl , 0.04 mol/L FeCl_3 , 1.0 mol/L H_2O_2 与 1.0×10^{-4} mol/L 罗丹明 6G 溶液组成最优的化学发光体系,没食子酸浓度在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ g/L 和 0.01 ~ 1.0 g/L 范围内与化学发光强度呈很好的线性关系, r 分别为 0.9984 和 0.9947,检出限为 3.0×10^{-6} g/L。对 1.0×10^{-4} g/L 没食子酸平行测定 11 次的相对标准偏差为 3.8%。利用本方法成功地测定了中药材诃子和没食子中的没食子酸含量。

关键词 中药材; 没食子酸; 流动注射; 化学发光; 罗丹明 6G

1 引言

没食子酸 (Gallic acid, Gall), 是一种广泛存在于水果和中草药等植物中的天然酚酸类化合物,是中药材没食子、余甘子、藏青果、红景天和诃子等的药效成分,也是一些纯中药制剂的有效成分。没食子酸具有较强的抗氧化性,具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤作用^[1],可用于有机合成、涂料、染料、医药等方面,还可用作食品抗氧化剂、防腐剂等^[2],此外,某些制药工业废水中含有大量的没食子酸会分解产生有机酸、沼气等,消耗水中的溶解氧,致使鱼虾等水生生物缺氧而窒息死亡,造成水质恶化^[3]。因此,建立简便、快速、灵敏的检测方法在食品分析、药物分析、医学研究和环境监测等方面有重要意义。

测定没食子酸多采用高效液相色谱法^[4,5]、光度法^[6]、气相色谱法^[7]、薄层扫描法^[8,9]、毛细管电泳法^[10,11]、振荡化学反应-脉冲扰动法^[12]和化学发光法^[13,14]等。光度法与薄层扫描法的灵敏度较差、线性范围窄;色谱法和毛细管电泳法需要较复杂、昂贵的仪器设备。化学发光法具有灵敏度高、设备简单、成本低等优点,是一种方便实用的分析方法。已报道的测定没食子酸的化学发光体系主要有:鲁米诺-氧化剂体系,铈 () 荧光物质体系,甲醛增敏 H_2O_2 氧化没食子酸的化学发光体系。

实验发现,在酸性条件下, Fe^{3+} 与 H_2O_2 反应产生活性极强的羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$),具有更高的氧化电极电位。 $\cdot\text{OH}$ 是一种强氧化剂^[15,16],氧化没食子酸产生微弱的化学发光信号。荧光物质能强烈增敏该体系的化学发光,因此,本实验选择 $\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}_2$ 罗丹明 6G 化学发光体系,建立了测定没食子酸的流动注射化学发光分析法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

IFM-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); BPCL 型超微弱发光分析仪 (中国科学院生物物理研究所); UV-3010、U-3900 型紫外可见分光光度计和 F-7000 型荧光光谱仪 (日本日立公司)。

5.0 g/L 没食子酸 (遵义市第二化工厂) 储备液; 1.0 mol/L FeCl_3 (成都科龙化工试剂厂) 储备液,加入 0.20 mol/L HCl ; 1.0 mol/L HCl (国营重庆无机化学试剂厂) 储备液; 1.0 mol/L H_2O_2 (重庆无机化学

2010-01-27 收稿; 2010-04-24 接受

本文系重庆市教育委员会科学技术研究项目 (No. KJ071304) 基金资助

* E-mail: flq51021519@163.com

试剂厂),现用现配。0.01mol/L 罗丹明 6G(Rhod-6G,美国 Fluka公司)储备液。所有试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

流动注射化学发光流路由四路组成。A 流路为待测样品或者没食子酸标准溶液;B 流路为 1.0×10^{-4} mol/L 罗丹明 6G溶液,作为载流;C流路为 0.18 mol/L HCl,0.04 mol/L FeCl_3 溶液;D 流路为 1.0 mol/L H_2O_2 溶液。首先启动蠕动泵,样品或者没食子酸标准溶液由 A 流路经进样阀按时间进样方式定量并入 B 流路中的载流,并与 C流路和 D流路通过三通混合,混合液进入流通池,经信号检测窗检测化学发光信号,记录化学发光信号强度值,以相对峰高定量。A 流路和 B 流路由一个蠕动泵泵入溶液,C流路和 D流路由另一个蠕动泵泵入溶液。实验参数的设定和数据的处理通过 IFM-D 型流动注射化学发光分析仪的 Remex软件完成。

2.3 样品制备

称取干燥的中药材样品 25.0 g,在植物样品粉碎机中粉碎过 1 mm 筛,储于棕色细口瓶中。准确称取粉碎样品 5.00 g,加甲醇,索氏提取 24 h,冷却过滤,以 4000 r/min 离心 15 min,吸取上清液 5 mL,在沸水浴中蒸干,定容到 50 mL 棕色容量瓶中备用。

3 结果与讨论

3.1 化学发光体系的选择与优化

3.1.1 金属离子的选择 金属离子可以催化 H_2O_2 分解产生自由基,对化学发光性质产生重要影响。考察了 Fe^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 在不同酸碱性条件下对化学发光信号强度的影响,如表 1。结果表明:当没食子酸浓度为 10 mg/L,在 HCl 介质中, Fe^{3+} 与 H_2O_2 反应产生强烈的化学发光信号,信噪比和相对化学发光强度值最高。为此,选择 Fe^{3+} - H_2O_2 罗丹明 6G 构成的化学发光体系进行研究。

表 1 金属离子对 H_2O_2 荧光物质化学发光体系的影响
Table 1 Effect of metal ions in H_2O_2 -fluorescer chemiluminescence system

金属离子/化合物 Metal ions/compounds	酸碱性条件 Acid-base condition	信噪比 Signal-to-noise ratio	相对 CL 值 Relative CL intensity
$\text{Fe}^{3+}/\text{FeCl}_3$ (0.04 mol/L)	0.18 mol/L HCl	14	280
	0.10 mol/L NaOH	3.9	194
$\text{Fe}^{2+}/\text{FeSO}_4$ (0.04 mol/L)	0.09 mol/L H_2SO_4	1.0	22
	0.10 mol/L NaOH	1.8	54
$\text{Co}^{2+}/\text{CoSO}_4$ (0.04 mol/L)	0.09 mol/L H_2SO_4	0	0
	0.10 mol/L NaOH	1.1	22
$\text{Ni}^{2+}/\text{NiSO}_4$ (0.04 mol/L)	0.09 mol/L H_2SO_4	0	0
	0.10 mol/L NaOH	2.3	25
$\text{Cu}^{2+}/\text{CuSO}_4$ (0.04 mol/L)	0.09 mol/L H_2SO_4	0.38	5
	0.10 mol/L NaOH	4.0	12
$\text{Mn}^{2+}/\text{MnSO}_4$ (0.04 mol/L)	0.09 mol/L H_2SO_4	0	0
	0.10 mol/L NaOH	1.8	10
$\text{Zn}^{2+}/\text{ZnSO}_4$ (0.04 mol/L)	0.09 mol/L H_2SO_4	0	0
	0.10 mol/L NaOH	3.8	30

仪器参数 (Instrumental parameters): 负高压 (Negative high-voltage) 1.2 kV,测量间隔时间 (Measurement interval) 0.1 s, H_2O_2 , 1.0 mol/L; 罗丹明 6G(Rhodamine 6G, Rhod-6G), 1.0×10^{-4} mol/L。没食子酸每次的进样量 (Injection volume of gallic acid, Gall): 50 μL 。

在化学发光体系中, Fe^{3+} 作为催化剂参加化学反应, Fe^{3+} 的浓度与羟基自由基的浓度密切相关。考察了相同浓度的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 及它们的混合溶液对化学发光信号的影响。实验表明, FeCl_3 溶液产生的发光信号最高,化学发光迅速。研究了 0.005 ~ 0.06 mol/L Fe^{3+} 对化学发光强度的影响。当 Fe^{3+} 浓度达到 0.04 mol/L 时,化学发光强度值最大,基线稳定,重复性良好。因此,选择 Fe^{3+} 浓度为 0.04 mol/L。

采用静态化学发光法和流动注射化学发光法研究了体系的发光光谱。静态法 (图 1A) 研究表明, FeCl_3 溶于 HCl 介质,加入 H_2O_2 产生微弱的化学发光信号,加入罗丹明 6G 后,化学发光信号有较大增加,加入 10 mg/L 没食子酸溶液,化学发光信号增加显著。动态法 (图 1B) 研究表明,不同浓度的没食子

酸与产生的化学发光信号存在线性关系。

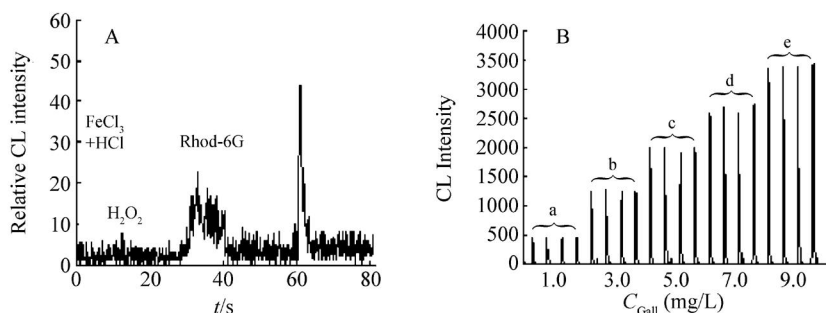


图 1 Fe^{3+} - H_2O_2 荧光物质体系的静态法 (A) 和动态法 (B) 的化学发光光谱图

Fig 1 Chemiluminescence spectrogram of Fe^{3+} - H_2O_2 -fluorescer system

0.04 mol/L FeCl_3 + 0.18 mol/L HCl ; 1.0 mol/L H_2O_2 ; 1.0×10^{-4} mol/L Rhod-6G; A: Gall, 1.0×10^{-4} g/L;

B: Gall(a-e), 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 mg/L.

3.1.2 酸及酸浓度的选择 Fe^{3+} 在不同酸碱性条件下的化学形态不同,催化活性差异较大,影响化学发光特性。考察了提供 H^+ 以相同物质的量浓度的常见强酸,如 HCl , HNO_3 和 H_2SO_4 对化学发光的影响。结果表明, HCl 对化学发光信号的影响最强。当溶液 $\text{pH} > 3.0$ 时, Fe^{3+} 发生水解,如果 pH 值太低,过多的 H^+ 猝灭化学发光反应过程中产生的自由基。在 FeCl_3 溶液中,考察 $0.10 \sim 0.25$ mol/L HCl 对化学发光信号的影响。当 HCl 浓度为 0.18 mol/L 时,化学发光信号最高。

3.1.3 荧光素种类及其浓度的优化 比较了几种常用荧光物质,如荧光素、荧光素钠、二氯荧光素、罗丹明 6G 和罗丹明 B 溶液增敏化学发光反应的情况。研究表明,以罗丹明 6G 产生的化学发光信号最高,稳定且峰形好。因此选用罗丹明 6G 增敏体系。考察了 $6.0 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-4}$ mol/L 罗丹明 6G 对化学发光的增强。当罗丹明 6G 浓度高于 1.0×10^{-4} mol/L,对化学发光增强最显著。因此,实验选用 1.0×10^{-4} mol/L 罗丹明 6G 溶液。

3.1.4 H_2O_2 浓度的优化 H_2O_2 分解产生强氧化活性的羟基自由基,其浓度直接影响体系的化学发光强度。研究了 0.20 ~ 1.5 mol/L H_2O_2 对体系产生化学发光信号的影响。结果显示,化学发光强度随 H_2O_2 浓度的增加而迅速增大,当 H_2O_2 浓度达到 1.0 mol/L 时,化学发光信号达到最大值,故本实验中 H_2O_2 的最佳浓度为 1.0 mol/L。

3.2 工作曲线、检出限和精密度

在选定的最佳实验条件下,对不同浓度没食子酸溶液的化学发光强度进行了测定,并绘制工作曲线。结果表明:没食子酸浓度在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ g/L 和 0.01 ~ 1.0 g/L 范围内与化学发光强度呈良好的线性关系,回归方程分别为 $\Delta I = 47.648C (10^{-4} \text{ g/L}) + 243.88 (r = 0.9984)$, $\Delta I = 46.762C (10^{-2} \text{ g/L}) + 537.11 (r = 0.9947)$, 其中, ΔI 是相对化学发光强度, C 是没食子酸的浓度;负高压分别为 850 和 550 V,转速为 30 r/min,液体流速为 1.8 mL/min。对 1.0×10^{-4} g/L 没食子酸平行测定 11 次的相对标准偏差为 3.8%,检出限 (3σ) 为 3×10^{-6} g/L。

3.3 干扰实验

在选择的最优实验条件下,对 0.1 mg/L 没食子酸溶液的抗常见物质分子及离子干扰能力考察,如表 2 所示,在高浓度的物质干扰下,对没食子酸的测定相对误差在 $\pm 5\%$ 范围内,说明建立的化学发光测定体系的抗干扰能力较强。

3.4 样品测定及回收率

按照上述实验方法,进行了样

表 2 干扰实验结果

Table 2 Interfering species for gallic acid

干扰物质种类 Interfering substances	允许干扰倍数 Allow interference multiple	干扰物质种类 Interfering substances	允许干扰倍数 Allow interference multiple
柠檬酸 Citric acid	10	酒石酸 Tartaric acid	10
草酸钠 Sodium oxalate	10	EDTA	10
蔗糖 Sucrose	500	Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Fe^{3+}	10
可溶性淀粉 Starch	500	Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}	100
麦芽糖 Maltose	100	Al^{3+}	1000
草酸 Oxalic acid	100	NH_4^+	250
维生素 C Vitamin C	100	Pb^{2+}	1
葡萄糖 Glucose	400		

品中没食子酸含量的测定及加标回收实验,结果列于表 3。

表 3 中药样品中没食子酸含量测定及加标回收实验

Table 3 Determination results of gallic acid in samples and recoveries experiment

样品 Samples	本法测定值 Found by this method (g/g)	紫外法测定值 Found by UV spectrophotometry (g/g)	初始浓度 Original concentration (mg/L)	加入浓度 Added concentration (mg/L)	测得浓度 Measured concentration (mg/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%, n = 7)
诃子 Myrobalan	0.112	0.114	2.94	3.000	5.94	100.1	3.4
			6.03	6.000	11.98	99.1	2.9
没食子 Gallic	0.0353	0.0369	0.966	1.000	2.01	104.8	4.1
			1.95	2.000	3.90	97.4	3.7

3 5 化学发光机理的探讨

通过静态注射化学发光实验研究可能的化学发光机理,采用添加带通滤光片的方法测定化学发光体系的发光波长。分别使用 400, 425, 440, 460, 490, 535, 555, 575, 620 和 640 nm 系列带通滤光片进行实验。结果显示:体系的化学发光经 490, 535, 555 和 575 nm 带通滤光片滤光后仍可以观察到较强的化学发光信号,且经 555 nm 带通滤光片后的化学发光最强,说明化学发光波长在 555 nm 处(图 2),与罗丹明 6G 的最大荧光发射波长 552 nm 相近。Fe³⁺-H₂O₂ 没食子酸体系化学发光十分微弱,但当罗丹明 6G 存在时,在 552 nm 处有较大荧光信号,表明化学发光体系中发光体是罗丹明 6G。紫外光谱研究表明:罗丹明 6G 在 526 nm 处存在强烈的可见吸收,化学发光体系中存在荧光物质时,在相同波长处有减弱的可见吸收,说明罗丹明 6G 在化学发光反应中没有发生分子改变,可能是受化学能激发而释放出化学发光信号,可见吸收略有减弱。Fe³⁺-H₂O₂ 是能够产生羟基自由基的体系,羟基自由基可与没食子酸反应。可以初步推断,在化学发光体系中,荧光体是罗丹明 6G,获得了羟基自由基氧化没食子酸产生的化学能而被激发,回到基态,释放出光子,产生化学发光信号。结合 Fenton 反应的机理^[15],推测 Fe³⁺-H₂O₂ 没食子酸化学发光体系的可能机理如下:

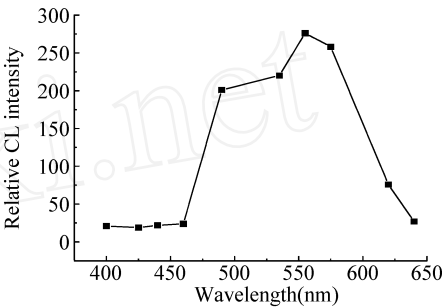
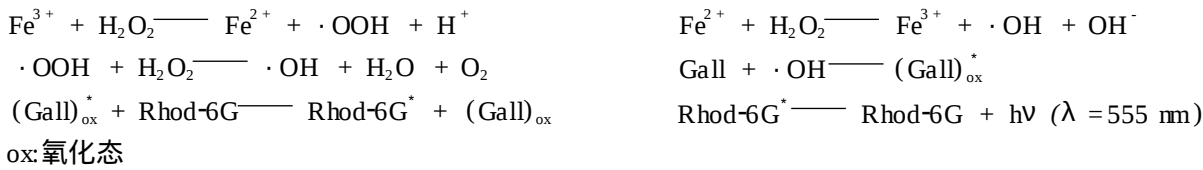


图 2 化学发光体系的发光光谱图
Fig 2 Luminescence spectrogram of chemiluminescence system
0.18 mol/L HCl; 1.0 mol/L H₂O₂; FeCl₃: 0.04 mol/L;
Rhod-6G: 1.0 ×10⁻⁴ mol/L, Gall: 0.2 g/L.

References

1 XIE Cheng-Gen(谢成根), CUI Hua(崔 华), LIN Xiang-Qin(林祥钦). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2002**, 30(11): 1316 ~ 1318

2 WANG Xiao-Xia(王晓霞), WANG Jing-Wu(汪敬武). *Journal of Analytical Science* (分析科学学报), **2005**, 21(1): 72 ~ 74

3 RAO Zhi-Ming(饶志明), ZHUO Jing(卓 婧). *Journal of Zhangzhou Normal University (Natural Science)* (漳州师范学院学报(自然科学版)), **2008**, (4): 78 ~ 81

4 Sheng Y X, Li L, Wang Q, Guo H Z, Guo D A. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, 37(4): 805 ~ 810

5 Shahrzad S, Bitsch I J. *Chromatogr. A*, **1996**, 741(2): 223 ~ 231

6 Dmitrienko S G, Medvedeva O M, Ivanov A A, Shpigun O A, Zolotov Y A. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 469(2): 295 ~ 301

7 Pan Z F, Wang L L, Mo W M, Wang C, Hu W, Zhang J J. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 545(2): 218 ~ 223

- 8 XU Qian-Li(许乾丽), MAO Xiang-Jun(茅向军), XDNG Hui-Lin(熊慧林). *Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences)* (贵州师范大学学报(自然科学版)), **2001**, 19(3): 59~61
- 9 LIAI Qun(李爱群), CAI Kui-Hua(蔡葵花), LIN Li(林励). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), **1999**, 18(1): 64~65
- 10 ZHA I Hai-Yun(翟海云), YANG Bing-Yi(杨冰仪), HUANG Qing-Hua(黄庆华), CHEN Zuan-Guang(陈缵光). *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析试验室), **2007**, 26(11): 35~37
- 11 Heo Y J, Lee K J. *J. Pharm. Biomed Anal*, **1998**, 17(8): 1371~1379
- 12 Jim éez-Prieto R, Silva M, P éez-Bendito D. *Anal Chim. Acta*, **1996**, 321(1): 53~60
- 13 XIE Qiang(谢强), WANG Jing-Wu(汪敬武). *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析试验室), **2005**, 24(4): 70~72
- 14 Wang X X, Wang J W, Yang N J. *Food Chemistry*, **2007**, 105(1): 340~345
- 15 SUN De-Zhi(孙德智). *The Advanced Oxidation Technology in Environmental Engineering* (环境工程中的高级氧化技术). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), **2002**
- 16 HE Chao(何超), HE De-Yong(何德勇), ZHANG Zhu-Jun(章竹君). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(2): 216~218

Determination of Gallic Acid in Chinese Herbal Medicine with Flow Injection Chemiluminescence Method

FANG Lu-Qiu^{*1,2}, LI Hai-Fang², ZHENG Guo-Jin^{2,3}

¹ (Department of Chemical Engineering and Chemistry, Yangtze Normal University, Fuling 408100)

² (Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

³ (Common Course Department, Chuxiong Medical College, Chuxiong 675000)

Abstract The rapid and easy flow injection chemiluminescence method was established to measure the content of gallic acid in the chinese herbal medicines. It was based on the enhanced chemiluminescent emitted during the oxidation of gallic acid by producing of hydroxy free radical with chemical reaction between Fe^{3+} and H_2O_2 solution in HCl medium condition in the presence of rhodamine 6G as energy transfer in chemiluminescence system, in which various factors influenced the chemiluminescence system were investigated carefully. The possible mechanism of the proposed method was also studied preliminarily. The results showed that 0.18 mol/L hydrochloric acid solution, ferric chloride concentration of 0.04 mol/L, hydrogen peroxide 1.0 mol/L, and 1.0×10^{-4} mol/L rhodamine 6G solution was the chemical composition of the optimal chemiluminescence system. The detection limit is 3×10^{-6} g/L (3σ), the linear range of determination was from 1.0×10^{-5} - 1×10^{-2} g/L and 0.01 - 1.0 g/L, $r=0.9984$ and 0.9947, the relative standard deviation was 3.8% (1×10^{-4} g/L, $n=11$). This method is proved to be of high sensitivity, low detection limit, simple operation and inexpensive devices. The recommended method has been successfully used for the analysis of gallic acid in chinese herbal medicine of gallnut and medicine terminalia fruit.

Keywords Chinese herbal medicine; Gallic acid; Flow injection; Chemiluminescence; Rhodamine 6G

(Received 27 January 2010; accepted 24 April 2010)