

陈国南 张帆 著

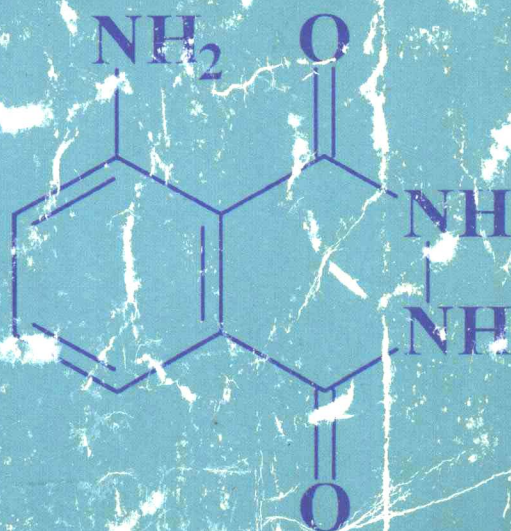
化学发光

与

生物发光——

理论及应用

*Chemiluminescence and
Bioluminescence —
Theory and Application*



福建科学技术出版社

化学发光与生物发光—— 理论及应用

陈国南 张帆 著

福建科学技术出版社

(闽)新登字 03 号

化学发光与生物发光——理论与应用

陈国南 张帆 著

*

福建科学技术出版社出版、发行

(福州市东水路 76 号)

福州大学校办工厂产品经营部排版

福州市屏山印刷厂印刷

开本 787×1092 毫米 1/16 18.75 印张 2 插页 433 千字

1998 年 12 月第 1 版

1998 年 12 月第 1 次印刷

印数:1—1200

ISBN 7—5335—1405×/O·26

定价:25.00 元

书中如有印装质量问题,可直接向承印厂调换



**本书承福建省自然科学著作出版基金赞助出版
国家自然科学基金资助项目(29675003)**

序 言

化学发光与生物化学发光是自然界中普遍存在的现象。虽然某些化学发光和生物发光现象很早就为人们所发现,但是对其反应机理及分析应用方面进行比较深入的研究则始于 60 年代。一方面,由于现代电子技术和高灵敏度的光电传感器的发展,为研究和测量化学发光、生物发光提供了新的有效手段;另一方面,由于生命科学、环境科学和材料科学的兴起,对分析测试手段的需求,也对该研究领域的发展起了重要的推动作用。基于化学发光、生物发光反应建立起来的分析方法,具有优异的灵敏度与选择性,易于实现自动分析控制,已经在环境监测、临床检验、药物分析及医学研究方面得到广泛应用,尤其是在非辐射免疫分析方面的应用潜力,更表现出其强大的生命力,已经越来越引起分析化学家和医学家的关注。

国内开展化学发光、生物发光的研究虽起步较迟,但 80 年代以后,这一方面的研究得到长足的发展。本书作者从 80 年代初期就开始从事这一方面的研究,是国内这一领域较早的开拓者,在化学发光理论、化学发光测试仪器研制、高效化学发光试剂合成、化学发光免疫分析及电致化学发光等方面都作了许多卓有成效的研究工作,取得丰硕的成果。在这一方面,作者集近二十年的教学及研究经验,写成这部专著。本书系统全面地论述了化学发光及生物发光的理论基础、现代测试技术及在医学和生物学方面的应用,不失为一部这一方面优秀的中文专著。目前国内尚未见到这一方面比较全面系统的专著,相信本书的出版,必将对推动化学发光及生物发光研究在我国的发展作出有益的贡献。

中国科学院院士 俞汝勤

1997 年 6 月

引 言

对化学发光现象的认识可以追溯到古代。较明显而简单的例子要算萤火虫和一些海洋生物的发光。实际上,海洋中 90%~95%的生物都能发光。人类在古代就开始对生物发光进行观察和研究,但没有人知道为什么有的生物会发光,有的生物却不会发光。只有到了 19 世纪后半叶,法国生理学家 Dubois 才首次解释了发光的化学机制,把这种发光现象归属于一种相对简单的有机反应。人们把通过化学反应产生的发光现象称为化学发光 (Chemiluminescence, CL),而把生物体内的发光和有酶参与的化学反应产生的光称为生物发光 (Bioluminescence, BL)。从化学角度看,上述的发光都经历了化学反应,因此人们也把生物发光划归为化学发光的一个重要分支。

有机化合物的非酶催化化学发光的现代研究则始于 Radziszewski。他在 1871 年发现洛粉碱(Lophine, 2,4,5-triphenyl imidazole)在碱性介质中为过氧化氢氧化时会发出黄色光。后来 Radziszewski 还发现了大量有机化合物和天然物质,如油类、葡萄糖、印磷脂(Lecithin)等的化学发光现象,并指出了这一发光现象的普遍性。此后, Trautz^[4]也发现了大量这类能发光的物质。联苯三酚(Pyrogallol)早期用作照象显影剂,后来也发现它是一个很好的发光试剂。人们在著名的格林纳(Grignard)试剂中也观察到化学发光现象。但是由于化学发光反应的复杂性,研究起来较为困难,所以在此后的 50 年间在这一方面的研究工作没有多大的进展。直到 1928 年 Albrecht 才发现了鲁米诺(Luminol)在各种条件下的化学发光现象,并且描述了这一反应的机理,而这一反应机理至今仍为人们所承认。鲁米诺化学发光现象的发现,可以说是有机化合物发光研究史上的一个里程碑。由于它有很高的发光效率,结构简单,容易合成,又有较好的水溶性,得到较深入和广泛的研究。同一时期发现的二甲基连吡啶盐,即光泽精(Lucigenin)也是化学发光效率极高的有机化合物。高灵敏的感光材料和光电检测器的发展使许多很弱的化学发光得以发现。在红外、紫外、可见光区均已观察到化学发光光谱。通常把化学发光效率为 $0.1 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ 的发光反应称为强化学发光, $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-15}$ 的发光称为弱化学发光^[1]。

由于受到测试技术的限制,大约在 60 年代以前,化学发光的研究还是小规模。到了 60 年代以后,一方面由于现代电子技术和高灵敏的光电传感器的发展,为研究和测量化学发光提供了新的有效手段;另一方面由于这个时期生命科学、环境科学和材料科学的兴起,对该领域的发展起了重大推动作用。这一时期的研究工作主要集中在以下三个方面:(1)不管是从生物学还是从化学的角度来看,对于生物发光的研究兴趣大大增加了;(2)发现了一大批新

的高效率的化学发光化合物；(3)建立了比较完整的统一的化学发光理论。这一时期在生物发光方面，鉴别各种生物功能，对不同的有机质之间的生物发光体进行分类，解释反应的路径，在临床检验和免疫分析等领域的应用都是研究生物发光的动力^[2-6]。在化学发光方面，发现了许多化学发光材料可作为激光器^[7]，也可作为实用的冷光源^[8,9]。另外，可见区的化学发光能提供许多反应的动力学特性，这些动力学特性是化学反应在基态时所无法得到的，而且从化学发光光谱的测量和分析中可以得到大量信息。因此，有机化合物液相化学发光不仅是有机化学家们^[10-12]，也是生物化学家们^[5,6]所热衷的领域。尤其可贵的是它在分析化学领域中也广泛的应用，其发展前景更为分析化学工作者所关注。已有许多综述性文章对此作了详细的评论^[3,5,13-22]。

国内开展化学发光及生物发光的研究虽然比较迟，但是 80 年代以后这一方面的研究发展得比较快。研究工作主要集中在以下几个方面：一、化学发光新体系的理论和应用研究有了很大的发展；二、在生命科学和生物医学科学的推动下，我国化学发光分析已开始从主要研究对象为无机离子转向主要研究对象为有机物及生物活性物质方面，如各种中西药物的有效成份，氨基酸、蛋白质、维生素、激素、酶、人体内的活性氧、自由基、淋巴细胞、细菌、各种抗原抗体、细胞吞噬功能、肿瘤杀伤细胞免疫活性的测定等等；三、在化学发光检测仪器的研制方面也有一定进展，流动注射化学发光检测系统，化学发光——光导纤维检测及生物传感器等的研制，使得超微弱发光的检测成为可能，促进了生物化学发光及化学发光免疫分析的发展。

在国内，开展化学发光和生物发光研究近 20 年来，尚未见一本比较系统、全面地介绍化学发光和生物发光及其应用的学术专著，只有中国科技大学的陆明刚教授曾于 1986 年编译了《化学发光分析》一书。^[23]在此之前，厦门大学陈国珍教授等人编写的《荧光分析法》一书中曾有一章简要介绍了化学发光分析法。^[24]

基于化学发光反应所建立起来的分析法我们称为化学发光分析 (Chemiluminescence Analysis)。这种分析方法的特点是灵敏度高，仪器设备简单，造价低廉，操作简便，同时又易于实现自动化，而且可以与其他分析方法联合使用，作为其他分析方法的检测手段。尤其是灵敏度高这个优势是其他化学分析方法和简单的仪器分析方法所无法比拟的。酶的催化反应通常是专属的，而不同的反应其化学发光光谱不同，利用简单的滤光片便可大大提高分析有机物的选择性。对无机离子分析来说，正如可供荧光分析和比色分析的体系十分丰富一样，可供开发应用的化学发光体系也十分丰富。人们常常发现，对于某个特定的化学发光体系，在许多无机离子中只有一个或几个离子对该体系有较好的催化活性，其他离子都不催化或催化活性很差，这样该体系对这种有良好催化活性的离子就有较好的选择性。现在，人们已经开始改变过去那种认为化学发光分析无机离子选择性欠佳的想法，而认为有可能成为一种选择性较好的分析方法。

参 考 文 献

1. F. McCapra, *Quart. Rev.*, 20, 485(1966).
2. P. E. Stanley, in "Biolumin, Chemilumin", M. A. Deluca et al. , eds, Academic Press, New York, P275 (1981).
3. L. J. Krica. , *Analyst*, 108, 1274(1983).
4. J. N. Miller, *Analyst*, 109, 19(1984).
5. M. A. Deluca, "Methods Enzymol", Vol. 58, Academic Press, New Yory, (1978).
6. M. A. Deluca. , "Biolumin. Chemilumin", Academic Press New Yory, (1981).
7. L. Wilson. , "Electronic Transition Laser", Mit Press, Cambirdge, MA. , (1977).
8. M. M. Rauhut, *Accounts Chem. Res.*, 2, 80(1969).
9. M. M Rauhut, in "Chemilumin. Biolumin", M. J. Cormier et al. , eds, Plenum Press, New York, p451 (1973).
10. F. McCapra, *Prog. Org. Chem.*, 8, 231(1973).
11. G. B. Schuster. , *Advs. Phys. Org. Chem.*, 18, 187(1982).
12. K. D. Gundermann, *Chemilumin. Org. Verbindungen*, Springer-Verlag, New York(1969).
13. W. R. Seitz. , *Anal. Chem.*, 44, 188A(1974).
14. U. Osacson. , *Anal. Chim. Acta*, 68, 339(1974).
15. W. R. Seitz. , *Comtep. Top. Anal. Clin. Chem.*, 1, 49(1977).
16. G. D. Mendenhall, *Angew. Chem. Int. Ed. (Eng)*, 16, 225(1977).
17. D. B. Paul, *Talanta*, 25, 337(1978).
18. E. L. Wehry, *Anal. Chem.* 52, 75R(1976).
19. E. L. Wehry, *Anal. Chem.* 54, 131R(1982).
20. E. L. Wehry, *Anal. Chem.* 56, 156R(1984).
21. 章竹君, 吕九如, *分析试验室*, 10(4), 102(1991)。
22. 刘长松, 魏雁声, 晋卫军, *分析试验室*, 14(4), 86(1995)。
23. 陆明刚, *化学发光分析*, 安徽科学技术出版社, 合肥, 1986。
24. 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 许金钩, 王尊本, *荧光分析法*, 科学出版社, 北京, 1975。

第一章 化学发光的理论基础

§ 1.1 化学发光的一般概念

§ 1.1.1 分子的激发与去激化

每种物质分子都有一系列紧密相隔的能级，称为电子能级，而每个电子能级又包含一系列的振动能级和转动能级。物质分子吸收了入射光或其他形式的能量，它的某个电子就从原来较低能级的轨道跃迁到先前未被电子占据的较高能级的轨道上去。这个过程进行得很快，大约只需要 10^{-15} 秒。所吸收的能量等于跃迁所涉及的两个能级间的能量差。处于这种激发状态的分子，称为电子激发态分子。被激发的电子有两种状态：在一种状态中，两个电子的自旋是配对的，在另一种状态中，两个电子的自旋不配对。自旋配对的电子的总自旋磁矩为零，称为单重态，用 S 表示。自旋不配对的电子则产生净自旋磁矩，称为三重态，用符号 T 表示。符号 S_0 、 S_1 和 S_2 分别表示分子的基态、第一和第二电子激发单重态； T_1 和 T_2 则分别表示第一和第二电子激发三重态。

处于激发态的分子是不稳定的，它可能通过辐射跃迁和非辐射跃迁等分子内的去激化过程丧失多余的能量而返回基态。辐射跃迁的去激化过程发生光子的发射，伴随着荧光或磷光现象发生；非辐射跃迁的去激化过程使电子激发态的能量转化为振动能或转动能，它包括内转化 (Internal Conversion, ic) 和体系间窜跃 (intersystem crossing, isc)，前一种过程指的是相同多重态的两个电子态间的非辐射跃迁 (例如 $S_1 \rightarrow S_0$, $T_2 \rightarrow T_1$)；后一种过程指的是不同多重态的两个电子态间的辐射跃迁 (例如 $S_1 \rightarrow T_1$, $T_1 \rightarrow S_0$)。图 1.1 表示分子的激发与去激化过程。

假设分子在吸收辐射后被激发到 S_2 以上的某个电子激发单重态的不同振动能级上，处于较高振动能级上的分子，很快地 (约 10^{-12} s ~ 10^{-14} s) 发生振动

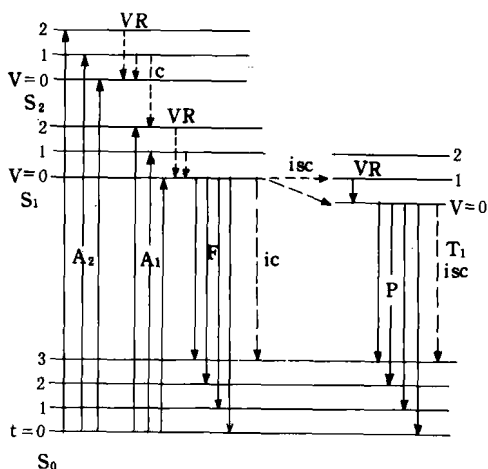


图 1-1 分子的激发与去激化过程

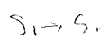
松弛, 将多余的振动能量传递给介质而降落到该电子态的最低振动能级, 此后又经内转化及振动松弛而降落到 S_1 电子态的最低振动能级上。处于 S_1 电子态的激发分子, 其分子内的去激化作用有如下几个途径: (1) 发生 $S_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁而伴随着荧光现象; (2) 发生 $S_1 \rightarrow S_0$ 的内转化过程; (3) 发生 $S_1 \rightarrow T_1$ 的体系间窜跃。而处于 T_1 态的最低振动跃迁能级的激发分子, 则可能发生 $T_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁而伴随着磷光现象, 也可能发生 $T_1 \rightarrow S_0$ 的体系间窜跃。

激发单重态间的内转化速率很快(速率常数约为 $10^{11} \text{s}^{-1} \sim 10^{15} \text{s}^{-1}$), 因而更高激发单重态的寿命通常很短(约 $10^{-11} \sim 10^{-13} \text{s}$), 处于这种电子态的激发分子, 除极少数例外, 在可能发生辐射跃迁之前, 便发生了到达 S_1 电子态的非辐射去激化过程。所以, 所观察到的荧光现象, 在通常情况下是发生自 S_1 态的最低振动能级的辐射跃迁。发生于单重态-三重态之间的体系间窜跃, 由于该过程是自旋禁阻的, 因而其速率常数远小于内转化过程的速率常数(约 $10^2 \text{s}^{-1} \sim 10^6 \text{s}^{-1}$)。

§ 1.1.2 分子发光的类型

分子发光的类型, 可以按两种不同的办法加以分类, 其中一种是按激发的模式(即提供激发能量的方式)加以分类, 另一种是按分子激发态的类型来分类。

按照激发的模式分类时, 如果分子因吸收外来辐射的光子能量而被激发, 所产生的发光现象称为光致发光; 如果分子的激发能量是由反应的化学能或生物体释放出来的能量所提供, 其发光现象分别称这化学发光或生物发光; 由热活化的离子复合激发模式所引起的发光现象称为热致发光; 由电荷注入和摩擦等激发模式所产生的发光, 分别称为场致发光和摩擦发光。本书所要讨论的内容, 主要涉及由化学反应或生物化学反应所引起的分子发光现象, 即化学发光或生物发光。



按分子激发态的类型来划分时, 由第一电子激发单重态所产生的辐射跃迁而伴随的发光现象称为荧光; 由最低的电子激发三重态所产生的辐射跃迁, 其发光现象称为磷光。

§ 1.1.3 化学发光反应与生物化学发光反应

化学反应生成的产物, 其过剩能量通常是通过与环境的碰撞而消耗掉。但有时在强放热反应中, 反应能量可汇集为电子能量, 因而形成一种处于电子激发态的产物。如果这种产物是发荧光的, 那就会产生辐射并观察到发光。这类由化学反应导致的发光称作化学发光。化学发光可以产生在紫外、可见或近红外区。现有已知的化学发光反应主要产生在可见区。

化学发光反应通常经历以下反应历程之一。



在上述反应历程中，反应物 R 经历了化学反应生成处于激发态的产物 P*，激发态产物可以通过光辐射形式失去能量(如反应式 1-1)，或通过热释放形式失去能量(如反应式 1-2)，也可以将能量转移给能量接受体 A，使之处于激发状态 A*，最后 A*再以光(如反应式 1-3)或热(如反应式 1-4)的形式放出能量而去激化。因为化学反应是一个相对比较慢的过程，所以限制了化学发光的速度，其结果是化学发光的发射要比荧光发射慢得多。因此化学发光的测量可以用于进行化学反应的动力学研究。

图 1-2 可以说明化学发光反应的基本过程。图中的曲线代表一个化学反应的路径。对于某些反应来说，反应活化能 E_a 大于或等于产物的激发单重态或激发三重态(图 1-2 中用 S 和 T 表示)的能量。当反应中的能量等于激发单重态或激发三重态的能量时，分子就有可能进入激发状态，接着当分子失去能量后就有可能产生光辐射，如图 1-2 中的垂直箭头所示。

大多数有机分子的最低激发态是三重态，因为跃迁到三重态的机率比跃迁至单重态的机率至少小 100 倍(通常情况下小得更多)，所以跃迁至激发单重态更为有利。另外由于三重态的寿命相对较长，容易产生碰撞猝灭，所以在液相中通常观察不到产生于三重态的发光。

图 1-2 只能应用于双分子反应的情况，对于更复杂的反应来说，势能作为反应坐标的函数要复杂得多。图 1-2 中的曲线就要用一个曲面代替，而激发单重态或三重态的能级与曲面的相交生成一条直线而不是一个点。

所谓的生物发光就是产生于生物体系的化学发光。生物发光是一种普遍存在的自然现象。萤火虫的发光是人们最常见的生物发光。生活在海洋中的某些鱼类的体表发光是细菌系统的生物发光。虽然在古代就已经观察到生物发光的现象，但真正对它进行研究是从 1885 年 Dubois 开始的。他首先提出了荧光素(Luciferin)、荧光素酶

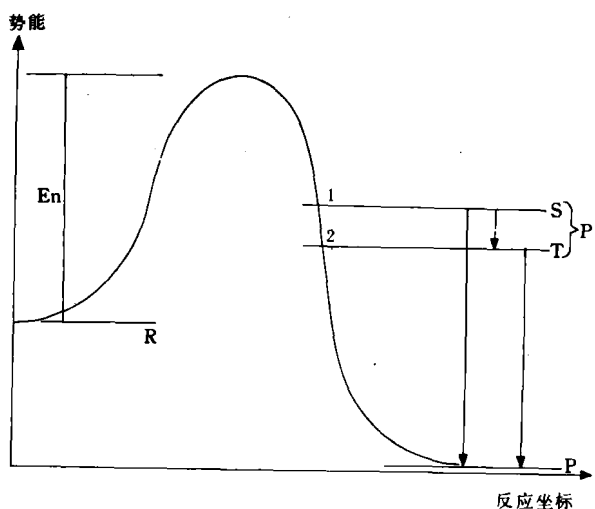


图 1-2 化学发光反应的基本过程

S. 产物的激发单重态; T. 产物的激发三重态; R. 反应物;
P*. 激发态产物 P. 基态产物

(Luciferase) 等概念，指出所谓生物发光反应只是化学发光反应为酶催化所致。这种酶被称为荧光素酶。事实上已经有好几种荧光素酶已经从它们各自的有机体中分离出来，并已经用作分析试剂。例如一些昆虫、细菌、水母、海蜗牛、蛤、真菌及甲壳动物的荧光素酶已经被发现并分离出来。1913 年 Harrey 第一次发表了生物发光的专著，论述了他对动物发光性质的研究结果。其后，MeElroy 等人对萤火虫荧光素的发光过程做了大量的研究工作，提出此过程除了有荧光素、荧光素酶外，还必须有 ATP 参与才能发光。他们从萤火虫中提纯得到萤火虫荧光

素、荧光素酶的结晶，并合成了荧光素。对发光过程中的化学反应，酶的作用机制以及动力学进行了深入的探讨。此外，对细菌荧光素酶催化的发光反应动力学过程和发光机制也有许多作者进行了研究和评论^[1]。

随着以上两个系统发光机制的研究，弄清了每一反应中酶、底物以及参与反应的物质之间化学量的关系，因而有可能通过测量反应所产生的光强来定量测定参与反应的酶、底物及反应物。这就是生物发光分析法的根据。生物发光分析与化学发光分析一样具有灵敏度高的优点，一般可达到 10^{-12} mol 的水平。如果结合免疫分析，形成所谓生物发光免疫分析法，则灵敏度可达到 10^{-15} mol，可以与放射免疫分析法相媲美。其次生物发光分析过程较快，不需要更复杂的仪器设备。因此近年来生物发光分析已经逐渐应用于生物学和医学方面的研究^[2]。

§ 1.2 化学发光反应的机理

§ 1.2.1 化学发光反应的效率

任何一个化学发光反应都应包括两个关键步骤，即化学激活(可以是单分子，也可以是双分子)和发光两个过程。如(1-5)式所示，



那么就是：

$$\Phi_{CL} = \Phi_{CE} \cdot \Phi_{EM} \quad (1-6)$$

式中， Φ_{CL} 为化学发光效率， Φ_{CE} 为生成激发态分子的效率， Φ_{EM} 为激发态的发光效率。 Φ_{CE} 和 Φ_{EM} 分别定义为：

$$\Phi_{CE} = \frac{\text{生成激发态的分子数}}{\text{参加反应的分子数}} \quad (1-7)$$

$$\Phi_{EM} = \frac{\text{发光的分子数}}{\text{生成激发态的分子数}} \quad (1-8)$$

实际上， Φ_{CL} 等价于生成荧光或磷光的量子效率。从(1-6)、(1-7)、(1-8) 式得化学发光的效率为：

$$\Phi_{CL} = \frac{\text{发光的分子数}}{\text{参加反应的分子数}} \quad (1-9)$$

显然，一个化学反应要成为化学发光反应必须满足下面几个要求：

(1) 化学反应要提供足够的能量生成激发态产物，也就是要有足够的激活能 ΔE^* 。激活能的主要来源是反应焓 ΔHr 。大多数的化学发光反应实例中，观察到的光子能量均比 ΔHr 大。如图 1-3 所示，在 $\Delta Hr < \Delta E^*$ 的条件下，将要由反应的活化焓 ΔH 来提供这种附加的

能量。因此，若要满足热力学第一定律，就必须有，

$$\Delta H_r + \Delta H \geq \Delta E^* \quad (1-10)$$

但是满足(1-10)式只是满足产生化学发光的必要条件而不是充分条件。有机发色基团激发态的能量 ΔE^* 通常在 50kcal/mol ~ 102kcal/mol (对应于 570nm ~ 760nm) 范围。对于整个可见紫外区(760nm ~ 280nm)，则 ΔE^* 处在 38kcal/mol ~ 102kcal/mol 之间。这个能量要求由化学反应供给。

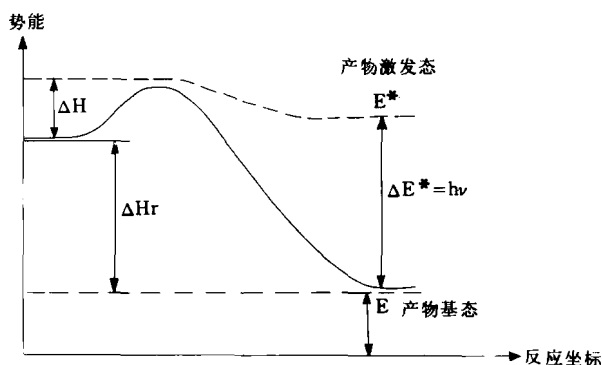


图 1-3 化学发光反应势能图

(2) 在多步骤反应中，由于化学激发的瞬时性，这个能量必须由某一步骤单独提供。因为前一步反应释放的能量将因振动松弛消失在溶液中而不遗留至下一步骤。

(3) 至少要有有一个物种能够接受化学反应提供的能量并生成激发态产物。换句话说，就是要有足够的激活效率 Φ_{CE} 。对于有机物分子的液相化学发光来说，从能量上看，容易生成激发态产物的常是芳香族化合物和羰基化合物。

(4) 要观察到化学发光，就必须在反应条件下激发态分子能够以辐射光子的形式释放能量回到基态。若 Φ_{EM} 很低，由(1-6)式可知，即使化学激活效率 Φ_{CE} 很高，总效率 Φ_{CL} 也是低的。这种情况下，若加入适当高效率的光接受体，使能量转移到接受体上而发光，会大大提高发光效率，我们称为敏化化学发光或增强化学发光，而在计算这类化学发光反应的效率时，就要加入一项能量转移效率 Φ_{ET} 。

§ 1.2.2 激发态的形成

目前我们对化学发光机理的理解已经达到这样一种程度，即通过观察各种化合物的结构类型即可以预测化学反应产生发光的可能性。但是导致生成电子激发态的基本物理过程仍然需要我们深入研究。因此我们不能简单地回答“什么是控制激发态生成的因素”这个问题。然而就一般情况来说，有以下几个影响因素。

1. 分子的几何构形

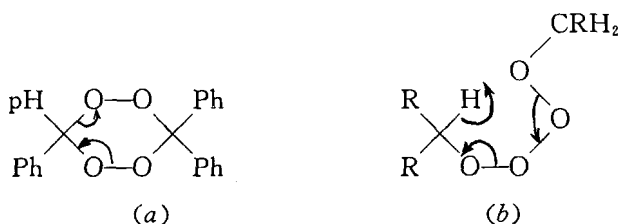
在激发态形成的瞬间，反应物的几何构形不会产生变化。如果反应物与激发态产物之间的过渡状态物质的原子构形与激发态产物的原子构形相近，那么就很容易发生化学发光，一般认为产生小分子的放热反应比较有利于激发态的形成。

2. 自旋约束

一种最有效的用于预测激发态产物存在的方法就是自旋守恒法^[3]。虽然对于稳定分子来

说,这一概念通常只应用于氧或亚硝基化合物(已知亚硝基化合物不产生化学发光反应),但是对于反应碎片与不稳定中间产物之间的反应来说这一概念也是十分重要的(dioxetans 和 hyponitric esters 体系的反应就是一个例子)。事实上产生于各种各样单线态产物母体的单线态 O_2 会产生激发态^[4],因为基态氧是三线态的。其他产生 NO_2 和 SO_2 的小分子气相反应也证明了这一概念的重要性。

产生 O_2 的协同有机反应往往也会被氧的基态的唯一多重性所控制。例如下面两种过氧化物 (a) 和 (b), 必然会产生激发单线态 O_2 或激发三线态羰基化合物, 这样才符合自旋规则。



3. 对称性约束

对于轨道对称性的要求通常也会影响产生激发态的机率。激发态 SO_2 和 NO_2 的形成就是一个很好的例子。虽然人们进行了许多计算以证实这个观点^[5-9], 但是仍然比较困难得到有力证据以说明上述例子中的对称性规则。另外,关于 dioxerons 的对称性影响的讨论将更为复杂。

§ 1. 2. 3 裂解和重排放能机理

图 1-4 表示一高能反应分子经历了放能反应(尤其是裂解或重排反应)生成一种电子激活态的产物分子。如果初始激活态能辐射光量子, 就是直接化学发光,

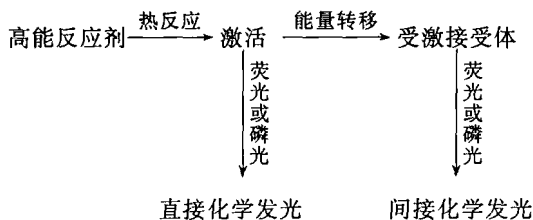


图 1-4 裂解和重排放能机理

若初始形成的激发态把能量转移给一种适当的能量受体分子, 使能量受体处于激发态而辐射光量子, 这样产生的发光就是间接化学发光。这类化学发光反应最多。例如 1, 2 - 二氧杂

环丁烷(1,2-dioxerane)的单分子裂解化学发光反应, Dewar 提出的苯的重排化学发光反应以及经典的鲁米诺化学发光反应等都遵循这个机理。

§ 1.2.4 电子转移反应

荧光有机分子之间强烈的电子转移放热反应是化学发光最为常见的机理之一。大约在 60 年代中期,人们发现了这一类化学发光反应^[10-12]。在所有化学发光反应中这种机制是最简单的,已经有理论对这种反应进行解释。反应中自由基阴离子失去一个电子或加一个电子到自由基阳离子上,导致直接生成母体多核碳氢化合物的激发态。图 1-5 表示电子转移化学发光的自由基湮灭图,其中一个电子从自由基阴离子 $D^{\cdot -}$ 转移到自由基阳离子 $A^{\cdot +}$ 上,

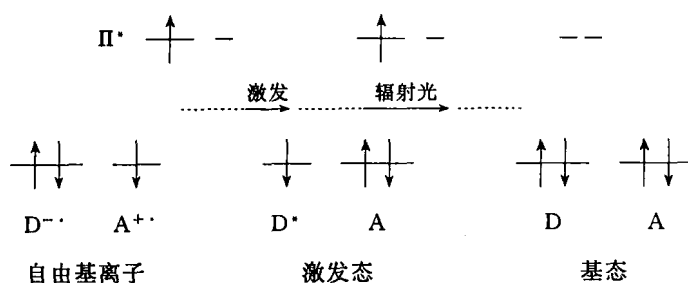
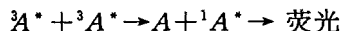


图 1-5 电子转移化学发光 - 自由基湮灭

导致化学激发,而这种激发态可直接辐射光子。图 1-5 只画出单重态的情形,实际上三重态也易生成。这种情况下,最后所观察到的荧光(单重态)则是由两个三重态相互碰撞产生的,叫做三重态-三重态湮灭,



尽管其他单电子转移反应也有化学发光产生,但是带相反电荷的芳香自由基离子的电荷湮灭具有代表性,并得到广泛深入的研究^[13]。其主要原因可能是用电化学手段制备自由基离子较为方便,研究反机理较成熟和便利,以及具有芳香性的产物分子有着很高的荧光效率。这种利用电化学手段产生的化学发光称为电致化学发光(Electrogenerated Chemiluminescence, ECL)。关于电致化学发光的原理及应用我们将在第五章中作专门讨论。

§ 1.2.5 单重态氧 O_2 机制

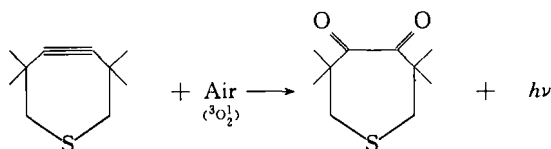
氧分子的最低激活态是单重态 ${}^1\Delta_g$ 和 ${}^1\Sigma_g$ (甚至是三重态),这两种激发态能量分别为 22 kcal. mol⁻¹(${}^1\Delta_g$)和 37.8 kcal. mol⁻¹(${}^1\Sigma_g$),处在辐射光谱的红区。早期的研究工作已经表明,在碱性介质中 $Cl_2-H_2O_2$ 反应所观察到的红光(635nm)可能是两个激发态(${}^1\Delta_g$)氧分子的复合物产生的,因为 ${}^1\Delta_g$ 的二聚体的能量为 44 kcal. mol⁻¹,恰好是 640 nm,而 478nm 处的一个

谱带能量为 $59.8 \text{ kcal. mol}^{-1}$ ，估计是由 $^1\Delta_g$ 与 $^1\Sigma_g$ 复合而得到的。Khan 等人^[14]提出一个化学发光的一般理论，认为能量转移到适当的荧光物质上后，可以使产生单重态氧的体系出现化学发光。

很多化学发光反应都是氧化还原反应，它们所涉及的氧化剂通常为分子氧、过氧化氢或其他的过氧化物、次卤酸盐等。至少在某些情况下单线态氧非常明显地在化学发光反应的过程中存在。例如，在所谓的 Trautz-Schorigin 反应及烃类、羰基衍生物和酯类化合物的自氧化反应中都包含了单线态氧。这种化学发光反应机理认为单线态氧是反应的最初激发态产物^[14]，它可以单分子或双分子的形式存在，后者可能是两个 O_2 分子碰撞产生的配合物^[15]。化学发光是由于单线态氧将其能量转移给一个合适的受体而产生的，例如，将能量转移给一种荧光反应产物。

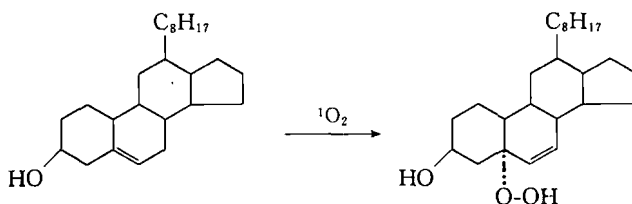
虽然说还没有足够的实验事实证实上述的理论，但是在某些特殊的化学发光反应中单线态氧的确切作用已经是很明显的。例如，某些芳香族内过氧化物的分解所产生的化学发光便是一个典型例子。通常的三线态氧在自氧化化学发光反应中起着重要的作用，这将在以后的有关章节中作详细讨论。

最近发现了一种特别的三线态氧的直接相互作用，即应变炔(Strained alkynes)与基态氧之间的反应(估计是通过二氧杂环丁烷发光的)，其反应式如下所示，



在这一反应中由三重键生成的三线态碰撞配合物转变成一个弱键的单线态碰撞配合物，而游离单线态氧可能通过这一碰撞配合物的分解而产生。

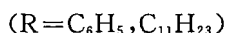
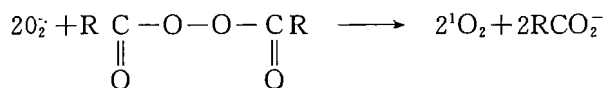
鉴于单线态氧参与的某些生物学反应的重要性，例如光敏反应、光致癌作用、光化学烟雾的形成等等，有必要强调从胆固醇或其他一些类固醇生成的配向性(regiospecific) 氢过氧化物是区别单线态氧和其他氧的有效方法^[16,17]，其反应式可表示如下，



该反应产生的过氧化物不同于基态氧产生的产物，并且很容易用纸层析法分离出来。

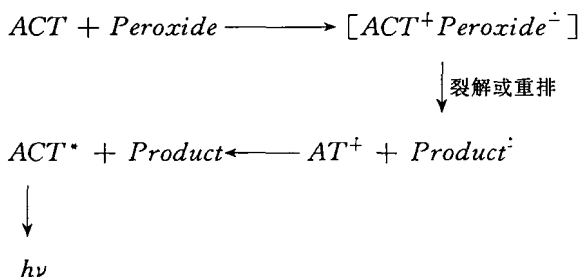
虽然从理论上很难解释，但事实上在自氧化化学发光过程中及微弱的生物化学发光过程中确实存在单线态氧，而单线态氧发光的测量是鉴别的主要障碍。一般来说，鉴别活性氧的种类是很困难的，而且三线态氧、过氧化物离子、单线态氧与化学发光之间的关系是非常复杂的，有时只能观察到一些表面现象。例如，当叔丁氧化物(t-butoxide)溶于二甲基磺基氧化物时，其溶液中的三线态 O_2 非常明显地会产生过氧化物自由基阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 。该转变的产率不高，如果需要一定量的过氧化物，最好使用电化学还原的方法^[18]。 O_2 的电子亲合能为 $0.43\text{eV} \sim 0.44\text{eV}$ ，并且还原剂是在强碱性介质中形成。由于这些情况在研究化学发光化合物(如鲁米诺)时经常遇到，所以应该考虑过氧化物的介入。

单线态氧 O_2 可以通过使用一种合适的氧化剂而得到，例如二茂铁使过氧化物自由基离子进行自由基湮灭而产生单线态氧^[19]。用另外一种方法也可以产生单线态氧，即在苯溶液中，在 18-冠醚存在下，通过 $O_2^{\cdot-}$ 与二酰基过氧化物，如二苯甲酰过氧化物或二月桂酰过氧化物的反应而生成单线态氧^[20]，其反应式如下所示，



§ 1.2.6 化学诱导电子交换发光机理

在 70 年代初期，人们通常都认为溶液中有机物的化学发光遵循上述三个机制。直到 1979 年 Schuster^[21] 提出所谓“化学诱导电子交换发光”(Chemically initiated electron exchange luminescence, CIEEL) 作为第四个机理，才使得有关机理的研究工作又深入一步。Schuster 提出的液相有机化学发光的化学诱导电子交换发光机理的基本思想，就是把电子转移和裂解重排机理进行如下组合，



简而言之，首先从一个电子给予体(活化剂 ACT) 把一个电子转移到高能量的有机分子(通常是过氧化物)，随后重排或失去中性碎片(例如 CO_2)，过氧化物以阴离子形式转变成具有高还原性的中间体，接着电荷湮灭产生活化剂 ACT 的激发态 ACT^* ，最后激发态 ACT^* 辐