

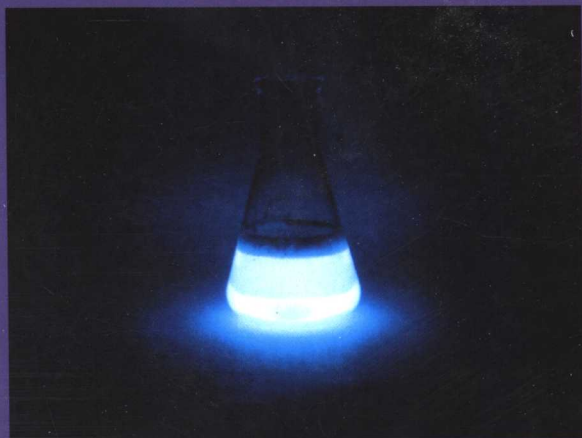


国家自然科学基金资助出版

# 化学发光 基础理论与应用

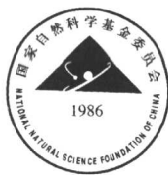
Chemiluminescence—Basic Principles and Applications

林金明 编著



化学工业出版社

化学与应用化学出版中心



国家自然科学基金资助出版

# 化学发光基础理论与应用

Chemiluminescence—Basic Principles  
and Applications

林金明 编著



化学工业出版社  
化学与应用化学出版中心

· 北京 ·

(京) 新登字 039 号

**图书在版编目(CIP)数据**

化学发光基础理论与应用/林金明编著. —北京:  
化学工业出版社, 2004. 4  
ISBN 7-5025-5521-8

I. 化… II. 林… III. 化学发光-基本知识  
IV. 0482. 3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 043843 号

---

**化学发光基础理论与应用**  
**Chemiluminescence—Basic Principles and Applications**

林金明 编著  
责任编辑: 杜进祥 任惠敏  
文字编辑: 林 媛  
责任校对: 陈 静 战河红  
封面设计: 郑小红

\*

化学工业出版社 出版发行  
化学与应用化学出版中心  
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)  
发行电话: (010) 64982530  
<http://www.cip.com.cn>

\*

新华书店北京发行所经销  
北京红光印刷厂印刷  
北京红光印刷厂装订  
开本 850mm×1168mm 1/32 印张 10 字数 269 千字  
2004 年 7 月第 1 版 2004 年 7 月北京第 1 次印刷  
ISBN 7-5025-5521-8/O·51  
定 价: 25.00 元

---

**版权所有 违者必究**

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

## 前 言

笔者自 20 世纪 80 年代中期开始从事于化学发光的仪器研制和化学发光新体系的开发，对这一微弱光测试研究产生极大的兴趣。当时也正是国际上对化学发光免疫分析研究达到最高潮的时期，笔者与这一时期的大多数年轻人一样，怀着对新知识的追求，飘扬过海前往当时国际上最著名的分析化学家、化学发光免疫分析法创始人之一，日本昭和大学药学部部长 Akio Tsuji 教授的实验室从事一年化学发光免疫分析的访问研究，而后转入日本东京都立大学攻读博士学位和留校工作近 10 年。日本先进的仪器设备、方便的试剂来源和大量可供参考的杂志与书籍，为笔者对化学发光反应的深入研究提供了重要的保证。10 多年来，在开展化学发光研究过程中，积累了大量的参考资料，仅仅 20 世纪的最后 10 年，涉及化学发光研究论文和综述文章多达数千篇，各种语言版本的化学发光书籍也有七八册。现有的每一册化学发光书籍虽各有侧重点，但是以化学发光理论研究与应用为主题的各种研究文献的总结，不管是国外还是国内都未见有完整的书籍出版。

化学发光分析法具有灵敏度高、仪器设备简单、操作方便等特点，广泛地应用于环境化学、临床检验、药物分析和工业分析等领域。纳米材料的应用、生物芯片以及微全分析技术的发展，促进了化学发光研究的深入开展。特别是在我国，由于化学发光仪器国产化程度的不断提高，为广大化学发光研究人员提供了廉价、性能可靠的化学发光仪器。许多高等院校、科研机构都具备开展化学发光研究的条件，研究水平也逐渐接近国际先进水平，国际著名的分析化学杂志，如 *Anal. Chim. Acta*, *Analyst*, *Anal. Lett.*, *Talanta*

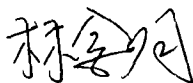
等，几乎每期都有我国学者发表的化学发光论文。更可喜的是，由于化学发光研究的普及，一批年轻的学生和研究者对这一研究产生了兴趣。进一步促进我国年轻一代的研究者向化学发光研究的深度进发，是笔者的愿望，为此，本人以自己 10 多年来的化学发光研究成果为主轴，结合手头上掌握的去 5 年来国内外发表的最新研究成果，编辑一本以化学发光基础理论研究和应用为主要内容的参考书。

本书共有 11 章，侧重于总结化学发光的理论研究，主要包括：总论；鲁米诺、过氧化草酸酯、高锰酸钾和四价铈等四种最常用化学发光试剂的化学发光研究与应用概况；活性氧的化学发光研究；微观非均相化学发光反应；液相色谱柱后化学发光检测技术；毛细管电泳-化学发光联用技术；微流控芯片的化学发光检测系统；中国化学发光研究概况等。本书的内容以每个章节为独立单元，以正在从事博士论文和硕士论文研究的研究生为对象，尽最大可能地收集与每一章节有关的参考文献。

由于本书的主要内容贯穿了笔者过去 10 多年化学发光的研究成果，为了使编写的内容能够得到更多著名学者的审查和指导，笔者考虑再三，于 2002 年 3 月申请了国家自然科学基金研究成果专著出版基金，经同行专家的评议、评审，本项成果专著获得了国家自然科学基金委员会的资助（项目批准号：B0224012）。在此，笔者衷心地感谢国家自然科学基金和国家杰出青年科学基金（项目批准号：20125514）的资助。在申请国家自然科学基金出版基金资助之前，清华大学化学系副主任、教授张新荣博士和中国科学院生态环境研究中心单孝全研究员对撰写本书做了推荐和指导。笔者还大胆地提出了 5 名本书审稿人的建议，这 5 名建议审稿人都是备受笔者尊重的我国著名学者，相信是他们给予申请材料的良好评价才使得本书有机会获得基金的资助，鼓励了笔者认真地写好本书的每一章节。在此，笔者对他们表示衷心的感谢，同时也感谢化学工业出

版社杜进祥编辑对本书的一些内容和写法提出了宝贵的建议。

最后，笔者还要以最深切的心情感谢本书中所有被引用论文的作者，他们的原创性研究是构成本书的主要内容，也是推动化学发光研究与应用发展的原动力。但是，由于笔者水平有限，编写此书的时间也很仓促，书中难免出现错误和引用不妥之处，望读者和被引用论文作者见谅。



2004年2月 北京

## 内 容 提 要

化学发光分析法具有灵敏度高、仪器设备简单、操作方便等特点,广泛地应用于环境化学、临床检验、药物分析和工业分析等领域。本书共有 11 章,侧重于总结化学发光的理论研究,内容包括:总论;鲁米诺、过氧化草酸酯、高锰酸钾和四价铈等四种最常用化学发光试剂的化学发光研究与应用概况;活性氧的化学发光研究;微观非均相化学发光反应;液相色谱柱后化学发光检测技术;毛细管电泳-化学发光联用技术;微流控芯片的化学发光检测系统;中国化学发光研究概况等。

本书内容新颖,资料翔实,可供化学、化工、医药卫生、商品检验等领域从事分析测试的人员,以及大专院校分析化学专业的师生参考。

# 目 录

<b>第 1 章 总论</b> .....	1
1.1 化学发光研究的历史 .....	1
1.2 化学发光基本概念 .....	3
1.3 气相化学发光反应 .....	8
1.4 液相化学发光反应 .....	17
1.5 非均相化学发光反应 .....	28
1.6 固相反应 .....	29
1.7 色谱柱后-化学发光检测技术 .....	29
参考文献 .....	30
<b>第 2 章 鲁米诺化学发光反应</b> .....	33
2.1 鲁米诺及其衍生物的化学发光特性 .....	33
2.2 反应机理 .....	41
2.3 应用 .....	48
参考文献 .....	59
<b>第 3 章 过氧化草酸酯化学发光反应</b> .....	64
3.1 引言 .....	64
3.2 发光机理 .....	65
3.3 草酸酯的种类 .....	77
3.4 荧光剂的选择 .....	84
3.5 实际应用 .....	85
参考文献 .....	88
<b>第 4 章 酸性高锰酸钾化学发光体系</b> .....	91
4.1 引言 .....	91
4.2 我国学者的研究 .....	92
4.3 化学发光机理研究 .....	98



4.4 应用 .....	101
参考文献 .....	115
<b>第 5 章 四价铈化学发光体系 .....</b>	<b>121</b>
5.1 引言 .....	121
5.2 Ce(IV)-待测物直接氧化还原反应 .....	122
5.3 Ce(IV)-SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 化学发光体系 .....	124
5.4 Ce(IV)-还原性待测物-荧光物质体系 .....	131
5.5 Ce(IV)-Ru(phen) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> 体系 .....	135
参考文献 .....	144
<b>第 6 章 活性氧的化学发光研究 .....</b>	<b>147</b>
6.1 活性氧 .....	147
6.2 活性氧的鲁米诺检测体系 .....	151
6.3 光泽精化学发光法 .....	152
6.4 甲壳动物荧光素 .....	153
6.5 <sup>1</sup> O <sub>2</sub> 的发光直接检测法 .....	155
6.6 其他化学发光检测法 .....	155
参考文献 .....	157
<b>第 7 章 微观非均相化学发光体系 .....</b>	<b>161</b>
7.1 引言 .....	161
7.2 微观非均相体系对化学发光反应的影响 .....	164
7.3 正相胶束 .....	167
7.4 反相胶束 .....	173
7.5 微乳液 .....	176
7.6 单分子构成的微观非均相体系 .....	177
参考文献 .....	180
<b>第 8 章 液相色谱柱后化学发光检测技术 .....</b>	<b>184</b>
8.1 引言 .....	184
8.2 液相色谱柱后检测系统 .....	184
8.3 过氧化草酸酯化学发光体系的柱后检测 .....	186
8.4 鲁米诺及其衍生物化学发光体系的柱后检测 .....	191
8.5 离子色谱柱后检测 .....	194

8.6 其他化学发光体系的柱后检测 .....	195
参考文献 .....	196
<b>第9章 毛细管电泳分离在线化学发光检测技术 .....</b>	<b>200</b>
9.1 引言 .....	200
9.2 CE-CL 接口技术 .....	201
9.3 应用 .....	210
参考文献 .....	220
<b>第10章 芯片毛细管电泳及其化学发光检测技术 .....</b>	<b>224</b>
10.1 引言 .....	224
10.2 芯片制作方法 .....	227
10.3 芯片的设计 .....	232
10.4 芯片材料的选择 .....	233
10.5 进样技术 .....	234
10.6 化学发光检测技术及其应用 .....	236
参考文献 .....	244
<b>第11章 中国化学发光研究概况 .....</b>	<b>248</b>
11.1 引言 .....	248
11.2 化学发光仪器 .....	252
11.3 化学发光试剂 .....	282
11.4 应用和化学发光机理研究 .....	283
参考文献 .....	283
<b>附录 .....</b>	<b>295</b>

# 第 1 章 总 论

## 1.1 化学发光研究的历史

最早发现的化学发光现象发生在生物体内，如萤火虫，现在称之为生物发光 (bioluminescence)，是由生物体发出的可见光而得名。发光生物体广泛存在于自然界，大约有 13 大类近千种。据调查表明，在海洋环境中，位于 200~1200m 海洋中部的昏暗区域，95% 的鱼类、86% 的虾类和蜗牛有生物发光现象，而在地表水中不到 10%，在深海区有生物发光现象的生物体不到 25%。从古代人们就已经知道了生物发光现象，公元前 384~322 年亚里士多德在《De Anima》一书中描述了真菌类和死鱼的发光现象。1668 年，罗伯特·波义耳证实生物发光需要氧气的参与。19 世纪 80 年代末，Dubois 使用荧光甲壳虫素的冷热水提取物进行了实验，结果发现在氧存在的条件下，热水提取物和冷水提取物混合时会发生发光现象。他将这种热不稳定的冷水提取物和热稳定的热水提取物分别命名为荧光素酶和荧光素。这些名称已逐步用于生物发光反应的酶（荧光素酶）和底物（荧光素）。到了 19 世纪后期，人们发现简单的非生物有机化合物也能产生化学发光现象。1877 年，Radziszewski<sup>[1]</sup>发现洛汾碱（2,4,5-三苯基咪唑）在碱性介质中被过氧化氢等试剂氧化发出绿色的光，这种试剂至今仍然普遍得到使用。

广泛用于血迹鉴定的鲁米诺（3-氨基苯二甲酰肼）发光试剂早在 100 多年前的 1902 年由 Schmitz 合成而得，1928 年 Albrecht<sup>[2]</sup>观察到鲁米诺在碱性介质中的化学发光行为，这一试剂的合成和发光现象的发现，对于化学发光发展成一种分析化学重要手段起到重要的作用。当前化学发光分析法已在生物体的组织成分、临床药

物、环境污染物等微量分析中显示出极大的作用。1935年, Gleu和 Petsch<sup>[3]</sup>第一次报道了光泽精(*N,N*-二甲基二吡啶硝酸盐)与过氧化氢反应产生化学发光现象, 在以葡萄糖测定为典型例子的许多还原性物质测定中获得应用。此后吡啶盐化学发光现象的发现、化学发光标记试剂的合成和化学发光免疫分析成为20世纪80年代的一个热门研究内容, 促进了这一类分析方法在人体成分分析中的应用。

但是, 由于大多数化学发光非常微弱, 且稍纵即逝, 早期的化学发光研究进展一直比较缓慢, 几乎没有获得实质性的应用。1945年光电倍增管出现, 1950年出现商品化的化学发光测试装置。到了20世纪60年代, 过去难以测试的微弱光的检测成为可能, 化学发光迈进定量分析研究的时代。以自由基为初始反应物的碳水化合物的自动氧化发光, 荧光素、曙红等具有荧光特性的染料与过氧化氢反应产生的化学发光等新体系, 过氧化草酸酯的过氧化氢体系等化学新方法的出现, 对于测定超微量的氨基酸、儿茶酚胺、甾族类等化合物的高灵敏度检测发挥着重要的作用。国外化学发光分析方面的研究在20世纪六七十年代得到迅速发展, 直至现在, 化学发光分析的研究和应用仍然是痕量分析领域的一个十分重要的研究方向。我国的化学发光研究工作起步比较晚, 到20世纪70年代后期才有介绍文章<sup>[4]</sup>, 80年代才有原始性的研究报道。笔者等人于1990年底初发表了我国第一篇用英文撰写的化学发光<sup>[5]</sup>和电致化学发光<sup>[6]</sup>研究论文, 为我国的化学发光研究走向世界迈出第一步。20世纪的最后20年, 陕西师范大学章竹君教授和福州大学张帆教授领导的研究小组在化学发光试剂, 如鲁米诺、异鲁米诺、吡啶盐等的合成和化学发光仪器的研制方面取得突破性的进展。廉价的化学发光仪器和相对比较方便的试剂来源, 促进了我国化学发光研究的进展, 短短10多年, 化学发光分析的研究和应用在我国得到普及, 全国数百家科研院校、医院和企事业单位正在使用和不断研究化学发光分析新方法。他们对鲁米诺化学发光反应的研究、偶合化学发光反应的研究都比较细致深入。

从 20 世纪 60 年代的气相色谱、70 年代的液相色谱、80 年代的毛细管电泳到 90 年代的微流控芯片等分离技术的出现，为化学发光这一高灵敏度检测技术提供用武之地。近年来，高效液相色谱化学发光检测的分析方法、化学发光成像技术、化学发光免疫分析法和生物的超微弱发光在生命科学、临床医学和环境化学等许多领域的应用都已成为研究的热点。

## 1.2 化学发光基本概念

化学发光 (chemiluminescence) 是指某些化学反应中发出可见光的现象。其发光机理是：反应体系中的某些物质分子，如反应物、中间体或者荧光物质吸收了反应释放的能量而由基态跃迁至激发态，然后再从激发态返回基态，同时将能量以光辐射的形式释放出来，产生化学发光，其过程主要有图 1.1 所示的两种可能：①物质 A 和 B 反应，产生激发态  $C^*$ ， $C^*$  为发光物质直接发出可以测量的光；②物质 A 和 B 反应，同样产生中间体  $C^*$ ，当体系中存在另一种易于接受能量的荧光物质 F 时， $C^*$  把能量转移给荧光体，使得荧光物质接受了能量由基态跃迁至激发态，当激发态分子返回基态时，产生发光现象，其发光体为荧光物质，发光波长与荧光物质的荧光发射波长相一致。

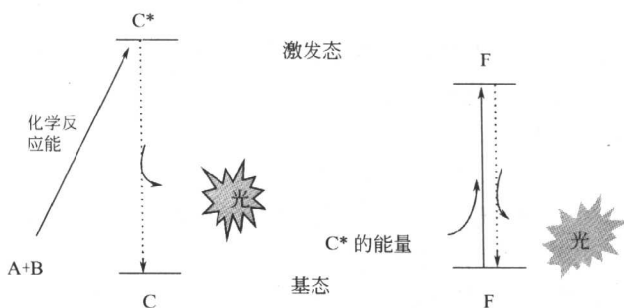


图 1.1 化学发光发生的反应过程



或者



广义的化学发光也包括电致化学发光。根据以上的反应过程，一个化学反应要产生化学发光现象，必须满足以下三个条件：第一，反应中可提供足够的激发能，并由某一步骤单独提供，因为前一反应释放的能量将因振动弛豫消失在溶液中而不能发光；第二，有有利的反应过程，使化学反应的能量至少能被一种物质所接受并生成激发态；第三，激发态分子具有一定的化学发光量子效率释放出光子，或者能够转移它的能量给另一个分子使之进入激发态并释放出光子。

化学发光反应所以能够用于分析测定，是因为化学发光强度与化学发光速率相关联，因而一切影响反应速率的因素都可以作为建立测定方法的依据。既包括一个发光过程也包括了一个化学发光反应的过程。所以，化学发光强度 ( $I_{CL}$ ) 取决于化学反应的速率、激发态产物的效率和激发态物质的发光效率。

$$I_{CL} = \Phi_{CL} dc/dt = \Phi_{EX} \Phi_{EM} dc/dt \quad (1.6)$$

式中  $I_{CL}$ ——化学发光强度 (每秒发射的光子数)；

$dc/dt$ ——化学反应速率 (每秒的反应分子数)；

$\Phi_{CL}$ ——化学发光量子产率 (每一个参加反应的分子发射的光子数)；

$\Phi_{EX}$ ——激发态量子产率 (每一个参加反应的分子产生的激发态)；

$\Phi_{EM}$ ——发光量子产率 (每一个激发态产生的光子数)。

对于一定的化学发光反应， $\Phi_{CL}$  为一定值。通常，可以用于分析化学的化学发光系统的  $\Phi_{CL}$  值在 0.01~0.20 之间。化学发光测定易受化学反应条件，如 pH 值、离子强度、溶液组成、温度等的影响，影响反应速率或任意一个量子效率的因素都会改变发光强度。因此，在一定化学反应条件下，通过测定化学发光强度就可以

测定反应体系中某种物质的浓度。原则上讲，对于任何化学发光反应，只要反应是一级或假一级反应，都可以通过式 (1.6) 进行化学发光定量分析。例如，在上述化学发光反应式 (1.1) 中，如果反应物 B 保持恒定，而物质 A 的浓度变化可视为一级或者假一级反应，则

$$I_{CL} = \int I_{CL}(t) dt = \int \Phi_{CL} [dA(t)/dt] dt = \Phi_{CL} \cdot c_A \quad (1.7)$$

即化学发光强度  $I_{CL}$  与 A 的浓度成正比。

化学发光分析测定的物质可以分为三类：第一类物质是化学发光反应的反应物；第二类物质是化学发光反应中的催化剂、增敏剂或者抑制剂；第三类物质是偶合反应中的反应物、催化剂或者增敏剂等。通过标记方式利用这三类物质还可以测定人们感兴趣的其他物质，进一步扩大化学发光分析的应用范围。

然而，当一个化学发光反应进行时，反应物是被消耗的。除非使用一些方法来维持这些物质的浓度在一个观测点常数上，否则反应速率将会降低，发光强度将会减弱。这就意味着化学发光的发光强度本身就是短暂的。图 1.2 表示在反应物部分混合了以后，发光强度  $I_{CL}$  随时间的变化曲线，也就是所谓的化学发光反应动力学曲线，它对于研究化学发光的反应机理、反应物的混合顺序和流动注射分析的流路设计等都非常重要。总体反应时间范围与具体反应有关，有时还与反应物的浓度有关，可以在短暂的小于 1s 的一闪到持续发光几分钟甚至几小时之间变化。

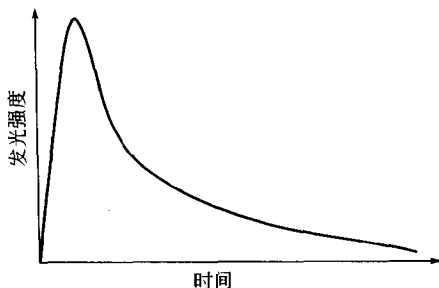


图 1.2 化学发光反应动力学曲线

化学发光过程中产生电子激发态的能量来自于化学反应，对于在可见光区的发光，反应需要放出至少 168~294kJ/mol 的热量。通常具有这种能量的反应是氧化反应，这些能量的释放必须来自键断裂时电子的转移。所以，化学发光分析也是氧化还原反应过程的能量转移的测定，这是化学发光分析区别于其他光学测定法的重要标记和特征之一。如鲁米诺或过氧草酸盐等键断裂的化学发光反应体系中，化学反应的分子只能使用一次而破坏。而对于一些电子转移的反应，如红荧烯、邻苯醌和钌(II)的联吡啶配合物等，其自由基或者激发态的产物不会发生键断裂或重排，所以这些系统可以循环使用，这样的反应常见于一些电致化学发光类型。

化学发光按其反应介质的状态，主要有气相和液相两大类<sup>[7]</sup>，如用于大气污染物 NO、NO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub> 等测定的化学发光体系属气相化学发光，而用于过氧化氢、金属离子以及大量的有机化合物测定用的鲁米诺、光泽精等化学发光体系属于液相化学发光。表 1.1 中列出一些重要的化学发光反应体系<sup>[7]</sup>，图 1.3 中的物质结构为常用比较有代表性的化学发光试剂，其中鲁米诺、光泽精、吡啶酯、咯酚和过氧草酸酯的合成技术已经比较成熟。部分化学发光试剂，如鲁米诺及其衍生物、吡啶酯等我国已经能够自行合成，但是至今没有国产的试剂正式销售。螺旋金刚烷的合成方法长期以来受到专利的保护，研究这一试剂的合成报道在我国杂志上尚未出现，这一试剂已有多种衍生化产物，发光稳定，广泛应用于临床检验。

表 1.1 一些重要的化学发光反应体系

状 态	待 测 物	化学发光试剂
气相	O <sub>3</sub>	乙烯
气相	烃类化合物	O <sub>3</sub>
气相	NO	O <sub>3</sub>
气相	亚硝酸胺,总氮	转换为氮氧化物后与 O <sub>3</sub> 反应
气相	硫化化合物	氢焰
气相	硫化化合物	O <sub>3</sub> 氧化后氢焰反应
液相	荧光性有机化合物	过氧草酸酯
液相	过氧化氢	鲁米诺



续表

状态	待测物	化学发光试剂
液相	过渡金属离子 过氧化物酶	鲁米诺
液相	可被氧化的有机化合物	KMnO <sub>4</sub> , Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 等强氧化剂
液相	α-氨基酸, 胺等	Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>3+</sup>
液相	化学发光试剂标记物	吖啶酯 二氧杂环丁烷(dioxetanes) 鲁米诺衍生物 Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup>
固相	高聚物	氧气及加热

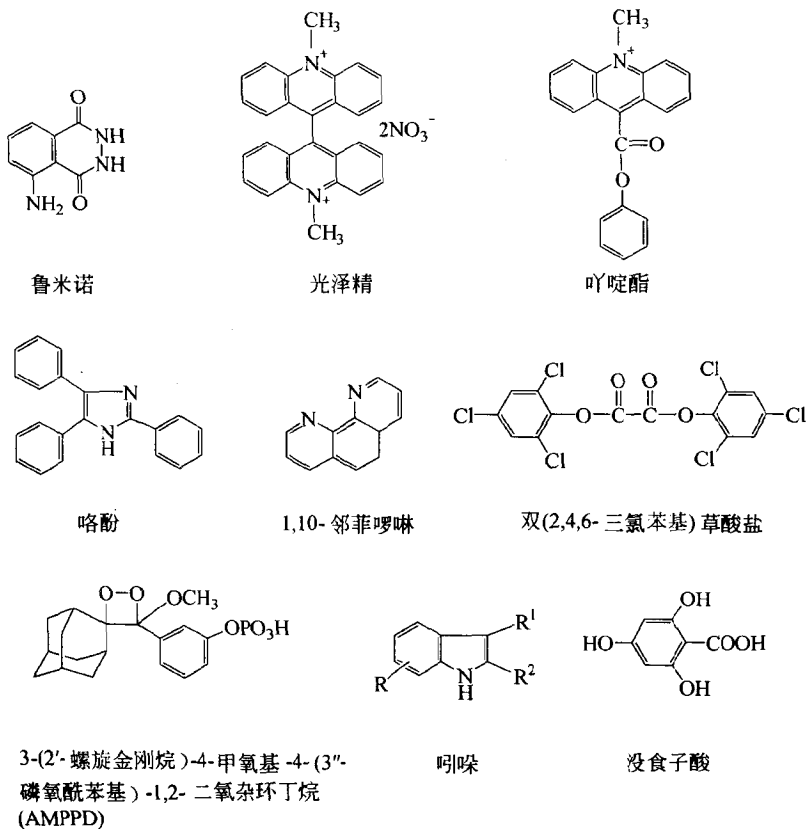


图 1.3 几种有代表性常用化学发光试剂