

荧光化学 传感器

YINGGUANG GUANGHUAXUE CHUANGANQI

焦晨旭 编著

山西出版集团
山西科学技术出版社

荧光光化学传感器

焦晨旭 编著



山西出版集团
山西科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

荧光光化学传感器/焦晨旭编著. —太原:山西科学技术出版社,2008. 1

ISBN 978 - 7 - 5377 - 3139 - 3

I. 荧… II. 焦… III. 荧光—光化学—化学传感器
IV. TP212. 2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 001325 号

荧光光化学传感器

焦晨旭 编著

出 版 山西出版集团·山西科学技术出版社
(太原建设南路 21 号 邮编:030012)

发 行 山西出版集团·山西科学技术出版社(电话:0351—4922121)

印 刷 山西省建筑科学研究所印刷厂

开 本 850 × 1168 1/32

印 张 5.5

字 数 122 千字

版 次 2008 年 1 月第 1 版

印 次 2008 年 1 月太原第 1 次印刷

书 号 ISBN 978 - 7 - 5377 - 3139 - 3

定 价 18.00 元

如发现印、装质量问题,影响阅读,请与发行部联系调换。

内容提要

荧光光化学传感器是以荧光信号选择性表达检测体系中化学组分实时信息的装置。它是伴随光学波导器件的进步而迅速发展起来的分析化学前沿研究领域之一。本书系统综述了荧光光化学传感器的发展概况,详细讨论了涉及荧光光化学传感器的荧光光谱学基础理论与光学波导基础理论,介绍了构造荧光光化学传感器量测体系的各单元组件与组装方法,荧光传感器荧光猝灭的原理,荧光光化学传感器的响应原理、设计思想与方法及其应用,并对荧光光化学传感器的试剂固定化技术以及传感器特征也予以重点介绍。

这本关于系统介绍荧光光化学传感器理论与方法的编著,不仅可作为研究生教材使用,而且是从事传感技术研究应用的科技工作者、大专院校师生有价值的参考书。

前 言

生命科学、环境科学、材料科学以及其他学科的发展,对化学传感技术提出了新的挑战:更高的灵敏度和更低的检测限;更好的选择性和更少的物质干扰;更高的准确度和更好的精密度;更完善可信的形态分析;更高的分析速度和自动化程度;更小的样品量、微损或无损分析;原位、活体、实时、在线分析;分析器件小型化、微型化和智能化等。光化学传感器在化学传感器家族中,它具有很多特殊的优点:光学波导易于加工成小巧、轻便和空间适应性好的探头;光化学传感器具有很强的抗电磁干扰能力,对电化学传感器有较大影响的静电和强磁场对光学信号不干扰;光化学传感器所涉及的许多光学信号测量可以通过自身参比方式获得,无须如电化学传感器中需要另外的参比装置;由于光纤通信技术的高度发展,光化学传感器获取的光学信号传输损耗低、容量大。

在光化学传感器的研究中,虽然可以检测的信号有吸收、反射、荧光或化学发光、散射、折射和偏振光等光学性质,但比较常见的是吸收和荧光。吸收与荧光相比较,吸收信号测定的是一个强信号减弱的程度,灵敏度较低,选择性一般较差。荧光信号是在暗背景下测定一个发光信号的大小,其灵敏度高,选择性常较好。因此,近年来

得到较大的发展,已成为光化学传感器研究领域的一个热点。

本书是作者在多年的科研中,通过大量的实验和文献的查阅编写而成的,可供科研和生产部门的有关科学技术人员参考。

本书系统综述了荧光光化学传感器的发展概况,详细讨论了涉及荧光光化学传感器的荧光光谱学基础理论与光学波导基础理论,介绍了构造荧光光化学传感器量测体系的各单元组件与组装方法,荧光传感器荧光猝灭的原理,荧光光化学传感器的响应原理、设计思想与方法及其应用,荧光光化学传感器的试剂固定化技术以及传感器的特征。

在本书的整理工作中,作者工作单位的许多同志,对本书的部分内容提出了许多宝贵意见,我的爱人耿绍玮先生在书稿的打印、插图的清绘方面付出了艰辛的劳动,谨此表示衷心的感谢。

由于作者缺乏经验,知识的局限性,很可能难以达到出版本书的初衷。另外,本书错误在所难免,幸望识者赐教。

目 录

第 1 章 绪论	1
§ 1.1 荧光光化学传感器的发展概况	1
§ 1.2 荧光光化学传感器的特点	5
§ 1.3 荧光光化学传感器量测体系	8
第 2 章 荧光光化学传感器的荧光光谱的基本原理	10
§ 2.1 荧光分析	10
§ 2.2 荧光与分子结构的关系	23
第 3 章 荧光光化学传感器的光学波导基础	55
§ 3.1 概述	55
§ 3.2 全内反射	55
§ 3.3 消失波	57
§ 3.4 光学波导构型	59
§ 3.5 光学波导损耗	65
§ 3.6 光学波导色散	68
第 4 章 荧光光化学传感器测量仪器及配件	72
§ 4.1 概述	72
§ 4.2 荧光仪器组件	74
§ 4.3 荧光分光光度计	83
§ 4.4 光极探头设计	88
§ 4.5 荧光光化学传感器测量仪器的组装	95

§ 4.6 适于基础研究的流通测量池·····	96
第 5 章 传感器荧光的猝灭 ·····	99
§ 5.1 荧光猝灭作用·····	99
§ 5.2 动态猝灭 ·····	101
§ 5.3 静态猝灭 ·····	105
§ 5.4 动态和静态的联合猝灭 ·····	107
§ 5.5 电荷转移猝灭 ·····	108
§ 5.6 能量转移猝灭 ·····	110
§ 5.7 光化学反应猝灭 ·····	120
第 6 章 荧光光化学传感器的识别原理 ·····	122
§ 6.1 概述 ·····	122
§ 6.2 络合物体系 ·····	128
§ 6.3 离子交换体系 ·····	130
§ 6.4 离子共萃取体系 ·····	132
第 7 章 荧光敏感试剂固定化方法 ·····	134
§ 7.1 概述 ·····	134
§ 7.2 敏感层支持体材料 ·····	135
§ 7.3 机械固定法 ·····	137
§ 7.4 电价固定法 ·····	140
§ 7.5 共价固定法 ·····	141
第 8 章 荧光光化学传感器特征 ·····	145
§ 8.1 概述 ·····	145
§ 8.2 选择性 ·····	145
§ 8.3 灵敏度、测量范围和检出限·····	148

§ 8.4 响应时间	152
§ 8.5 使用寿命	154
§ 8.6 稳定性、可逆性	155
参考文献	157

第1章 绪论

§ 1.1 荧光化学传感器的发展概况

分析化学最重要的任务之一就是要选择性获取物质的化学信息。通常的做法是将分析样品带到实验室,通过气相色谱(GC)或液相色谱(LC)与红外光谱(IR)、质谱(MS)或其他灵敏分析技术的结合使用,使分析工作者具有极大的能力来解决非常复杂的分析难题。随着分析仪器的飞速发展,这种能力还会进一步加强,获得的信息也会更趋丰富。然而,社会的发展也越来越迫切地要求分析实验室能进入分析样品产生的现场。在线(on line)分析、线内(in line)分析和体内(in vivo)分析等单词频繁地出现在当今的分析化学文献中。不难想象,在医院的临床监护、工厂的化学过程控制、人类工作与生活环境的监测与保护等领域是多么需要实时的化学信息。另一方面,在那些难于采样的危险场所,化学信息的获取也是十分棘手的。为了解决这些问题,在分析仪器与分析样品之间显然需要存在一个实时且选择性传递信息的“界面”(interface)。

化学传感器(Chemical Sensors)正是这样的在分析仪器与分析样品之间实时传递选择性信息的界面。进一步说,化学传感器实际上是一类能选择性地将分析对象的化学信息,例如化学组成与浓度等,连续转变为分析仪器易测量的物理信号的装置。由于这里存在化学量与物理量之间的变换,有人又称这类装置为换能器(Transducer)。为避免与电子装置中常用的换能器一词混淆,

在本书中将使用更为通用的传感器一词。在各种类型的化学传感器中,电化学传感器(Electrochemical Sensors)与光化学传感器(Optical Chemical Sensors)是最大的两个分支。20世纪初出现的玻璃 pH 电极至今仍广为使用,而近年发展的微电极伏安技术、化学修饰电极等则得益于现代尖端科学技术而充满活力。电化学传感器是建立在电化学与电量测技术基础上的将分析对象的化学信息以电位、电流和电导等电学量表达的传感装置。相对而言,光化学传感器则是化学传感器中的新成员。它的蓬勃发展始于 20 世纪 80 年代,短短二十余年的努力就取得了引人注目的成绩,迅速崛起成为现代分析化学的前沿研究领域之一,被誉为分析化学的一项重大发展。光化学传感器是建立在光谱化学和光学波导与量测技术基础上的将分析对象的化学信息以吸收、反射、荧光或化学发光、散射、折射和偏振光等光学性质表达的传感装置。从这个意义上讲,pH 试纸可看作最早的光化学传感装置。实际上,它是现代光化学传感器的雏形。在 pH 试纸中,具有化学识别功能的酸碱指示剂固定于纤维素上,将溶液中氢离子浓度的变化表现为试纸颜色即吸收性质的变化,只不过这一光学信号的检测不是通过电子仪器完成,而是依赖人们的眼睛识别的。

荧光光化学传感器的真正历史,也是光化学传感器的发展历史,可以追溯到 20 世纪 30 年代 Kautsky 和 Hirsch 所做的工作。他们发现吸附于硅胶上的吖啶黄或荧光素的磷光可被低浓度的三重态氧熄灭。基于这一原理,他们设计了一个可连续检测光合成过程中产生的微量氧的传感装置。由于测量条件较为苛刻,这一成果并未引起人们重视。1968 年,Bergman 在国际著名的学术杂志《Nature》上发表了“基于荧光熄灭快速测定氧气的检测器”的文章。他们提出的紫外光源、浸渍有荧蒽的聚乙烯敏感层、流通测量池和光电池位置等设计思想至今仍被频频采用。1975 年,Lubbers 和 Opitz 采用 Bergman 的设计思想,基于更加灵敏的荧光试剂茚丁

二酸研制出灵敏的氧传感器。这种氧敏感荧光染料至今仍在许多生物荧光光化学传感器中作为内传感体系。他们还基于离子选择性气敏电极的原理,用碳酸盐作内参比溶液,用 pH 指示剂构造内光化学敏感层,同样用聚四氟乙烯作为透气膜材料,研制成功气敏光化学传感器。最有意义的是,他们为这类新型的传感装置创造了两个新名词,其一是“Optode”,作者解释源于希腊语“οπτικοσδοσ”,意思是光学测量途径。其二是“Optrode”,源于“Optical electrode”。从构词学的角度看,前者更为严谨,因而在欧洲大陆趋于流行。而在美国则乐于使用后者。在国内目前均译成“光极”。最早将光化学传感器或光极与光导纤维联系起来的工作是由 Hesse 完成的。在他的专利中,荧光熄灭仍用作氧和碘的传感信号,对单根光纤和光纤束的使用情况也进行了讨论。1975 年 Hardy 提出了一个全新的构思,将光导纤维纤芯外壁的涂层与保护层剥去,直接涂覆一层敏感指示剂。由于光线能多次全反射通过试剂层,则使吸收测量灵敏度显著提高。虽然这些光化学传感器的早期研究工作对于光化学传感器的发展有相当影响,但是,直到 1980 年 Peterson 等人详细描述光纤 pH 传感器的构造并成功应用于体内与体外血液 pH 值测量的工作发表以前,所有关于光化学传感器的研究仍然是零星的、不系统的工作。类似于 Frand 发明氟化镧单晶氟离子电极对离子选择性电极研究的推动, Peterson 等人的工作在光化学传感器的发展历史上亦具有里程碑式的意义。

实际上, Peterson 等人的工作带动的光化学传感器研究的热潮,并不完全归功于他们工作的完美,在很大程度上也应当归功于现代通信技术迅猛发展伴随而来的光学硬件的完善与价廉。今天,人们并不陌生的光导纤维在二十多年前却处在问世前的痛苦挣扎之中。历史上,光学比电磁学发展得早,而且在信息传输上利用光也比利用电要早得多。最早利用光学符号形式传递信息,可

以追溯到古代的烽火台。但是,后来电获得了急速的发展。光的传输由于没有具备像电那样低损耗的传输线路而发展缓慢。虽然1951年就发明了医疗用玻璃光纤,但直到70年代,光纤传输光的损耗仍然十分严重,其损耗值在 $100 \sim 1000\text{dB/km}$ 之间徘徊。在1970年前后,由于采用了一种称为气相沉积法的新光纤制造工艺,光纤的损耗发生了十分明显的下降。目前,最好的高纯石英光纤的损耗仅为 0.2dB/km ,取得这样的成绩是令人骄傲的。因为日常生活中所用的窗玻璃的损耗为数千分贝/千米,就连望远镜等仪器上使用的高级光学玻璃其损耗也大于 500dB/km ,而载频通信用的同轴电缆其损耗亦达 10dB/km 。光纤制造技术的进步使通信技术发生了革命性的变化。光纤通信技术较之原来的电信技术,通信系统容量显著增加,而单位信道成本明显降低。可以认为纤维光学通信技术是当之无愧的20世纪最重要的科学工程成就之一。纤维光学通信技术的发展反过来又促进了各种光学波导、光源与光检测器等光学与光电子元件的迅猛发展。仅从市场价格来看,最近30年内就发生了明显的变化。以波导材料为例,单根单模光纤在70年代价格高达数百美元/m,而且在实验室规模生产,很难得到;到了80年代,价格降至 $5 \sim 10$ 美元/m,已达到工业化生产规模,较易得到;90年代,价格低至 0.1 美元/m,且已成为随处可见的通信技术中的标准件。光纤传感技术最先在物理参数上实现突破,各种各样的声音、流速、加速度、电场和磁场等物理量光纤传感器得到了迅速发展。光纤物理传感器主要利用物理参量对光学波导传光性质的影响提取信息。例如基于法拉第效应的磁场、电压、电流的传感。在各种光学硬件变得易得和价廉的80年代,通过将光纤端部修饰一层化学识别敏感层,使光纤传感进入分子、离子的识别领域,变得流行起来。也是从这时起,传统的光谱化学与纤维光学结合使光化学传感器的研究真正取得了突破性的发展。

继 Peterson 后,国际上逐渐形成了多个连续、系统地研究光化学传感器的研究小组,其中美国新罕布什尔大学的 W. R. Seitz 研究组着重研究光化学传感器的结构、试剂固定方法、各种离子传感方法和化学发光方法;美国衣阿华大学的 M. A. Arnold 研究组着重研究各种生物光化学传感器;奥地利卡尔弗兰兹大学的 O. S. Wolfbeis 研究组着重研究各种基于荧光信息的光化学传感器;瑞士苏黎士联邦高等理工学院的 W. Simon 研究组着重研究基于中性载体选择性识别的光化学传感器。这些研究均取得重要进展。他们的工作带动了世界范围的光化学传感器研究热潮。除了常规的光谱信息外,诸如二次谐波、光致发光、相分辨荧光光谱、等离子体共振谱等新技术均推广用于光化学传感器。在应用方面也有了很大的突破,例如以光化学传感器为探头的血气分析仪,其商品已发展到第四代。该仪器能自动、连续地显示 9 个血气参数,已成功应用于心肺外科手术监护。现在,从光化学传感器所能检测的分析对象看,包罗的范围之广,涉及的分析领域之多是许多传统的传感技术所难以比拟的。可见,光化学传感器这一年轻的传感新技术,已经在短时间内迅速发展成为化学传感技术中最活跃和最重要的研究领域之一。

§ 1.2 荧光光化学传感器的特点

荧光光化学传感器的迅速发展与它在以下几个方面的突出优点关系密切:

1. 光学波导易于加工成小巧、轻便和空间适应性好的探头。以光导纤维为例,采用一般的玻璃微吸管拉制器可以将 $100\mu\text{m}$ 大小的普通光纤拉制出 $0.1\mu\text{m}$ 甚至更细的探针。由其制备的亚微米光导纤维传感器已在胚胎 pH 活体连续监测中发挥作用。另一方面,各种电光、光电元件的小型化和廉价易得,使分析仪器更加

荧光光化学传感器

小型轻便成为可能。例如基于发光二极管、光电二极管和集成化的信号放大器可制成轻巧、紧凑的光化学传感装置。今后,临床检验从医院分散出来进入病人家中的趋势,使各种小型检测仪器具有很大的市场。光化学传感器在这方面具有较大的优势。

2. 光化学传感器具有很强的抗电磁干扰能力。对电化学传感器有较大影响的静电、表面电位、强磁场等,均不干扰光学信号。同时,由于探头与样品之间没有直接的电接触,在临床检验,特别是体内连续监测时,较为安全,也不会因为电刺激而影响测量环境的真实性。另一方面,荧光光化学传感器的环境适应能力也很强,在温差变化大、腐蚀性样品、强辐射场等恶劣环境中均能使用。许多光化学传感器,例如氧, pH, CO₂ 光极,能耐受多次高温消毒处理,在发酵过程控制中有较大的应用潜力。

3. 荧光光化学传感器涉及的许多光学信号测量可以通过自身参比方式获得,因而不像电化学传感器中那样需要另外的参比装置。实际上,电化学传感器中的参比装置的液接电位常常是较严重的误差源。另一方面,荧光光化学传感器的内参比效应使其能获得较稳定的光学信号,漂移现象得到极大地抑制。

4. 荧光光学方法长期以来在分析化学中占有重要位置。各种荧光试剂已经获得了充分的发展。通过适当的修饰方法,可为荧光光化学传感器所利用,能极大地丰富现有传感器的测试对象。例如许多电化学传感器不能直接检测的中性分子,光化学传感器均能直接检测。特别是平面波导消逝波技术的利用,使非放射性标记免疫分析进入了新的境界。

5. 在光纤通信技术高度发展的今天,荧光光化学传感器获取的光学信息传输损耗最低,传输容量最大。目前最好的光导纤维的传输损耗已降至 0.2dB/km,已接近理论极限值,光学信号在这样的光导纤维中传输 15km 之遥,光能也只损耗二分之一。这使远距离遥测技术真正进入了实用阶段。光导纤维还能传输巨大的

信息容量。例如一条通信光频通路上同时可容纳几十亿人通话。这一特点对于构成实用的光化学传感器阵列特别有益。事实上,单一的传感器对于复杂混合物中的特定分析对象的检测有时是无能为力的。将多个传感器构成传感器阵列提供复杂样品的多维信息,借助化学计量学的方法使传感体系智能化,是传感装置研究的最高目标。由于许多光谱技术能提供二维以上的数据,基于这些光谱技术的光化学传感器构成的阵列将能提供三维以上的数据,这是目前其他传感体系所不具备的优势。

处在发展阶段的光化学传感器也有一些不足之处,归纳起来有以下几个方面的问题:

1. 环境光干扰问题。一般情况下,光化学传感器的探头部分应置于避光环境中。有时为了消除自然光、背景光的干扰,可以对光学信号予以编码。最简单的编码方法是将探测光以某种约定的频率脉冲送出,相应的检测单元则只检测约定频率探测光的信号光。光电子元器件的进步当能使这种编码操作变得简单。

2. 试剂光分解与洗脱问题。许多指示剂受光照射后将产生光分解而颜色减退或荧光强度下降等,故这一现象又称为光漂白。当探测光强度较大时,例如采用激光光源时,光漂白现象更为严重。另一方面,由于光化学传感器响应平衡与传质平衡有关,因而敏感层通常很薄以避免响应时间太长。当很薄的敏感层与样品长期接触时,试剂将被逐渐从敏感层洗脱下来随样品带走。虽然许多光化学传感器因获取相对信号,在短期应用中响应信号不会随试剂的漂白与流失而漂移,但使用寿命则受到严重影响。因此合成光学稳定性好的试剂,改善试剂的固定方法对于提高光化学传感器的使用寿命有十分重要的意义。

3. 许多以强度为检测信号的传感器,响应平衡服从质量作用定律。因此,当响应曲线以检测信号相对对数浓度作图时,其响应曲线不像离子选择性电极所具有的能斯特(Nernst)线性响应,而

呈 S 函数型,因此这些光化学传感器的检测范围相对较窄。

荧光光化学传感器的蓬勃发展尚只有二十余年的历史,仍然是一种发展与成熟中的年轻技术。荧光光化学传感器的响应机理仍有待完善和深入,由传质过程及试剂相固定化技术引起的传感器在响应时间、稳定性及寿命等方面的问题均有待深入探索,对特定物质具有选择性响应的试剂与新的传感模式有待发现。另一方面,光学波导技术在化学中的应用尚处在幼年期,一些重要的光谱技术例如圆二色谱等尚未利用,各种波导诸如偏振光纤、对偶光纤等均有待开发。仅仅由分析化学家来研究与探索光化学传感器这一新兴分支是远远不够的。毫无疑问,我们所面临的是一个分析化学、有机合成化学、聚合物化学乃至光学波导技术、微电子技术交织的分支领域,激动人心的光化学传感器研究新成果会更多地涌现在它们的结合部。

§ 1.3 荧光光化学传感器量测体系

荧光光化学传感器量测体系可以方框图表示,如图 1-1 所示。该量测体系由光源发出探测光,经光学波导到达与样品接触的探头部分,经与样品相互作用后产生可量测的光谱信号,再经光波导将该信号光传回检测器。要了解图中所示量测体系的原理与方法,首先要具备荧光光谱学与光学波导技术方面的基础知识,然后了解仪器与探头的设计方法,在此基础上才能从化学传感的角度探讨化学信息与光学信息量的转换,并设计出新的光化学传感器量测体系。

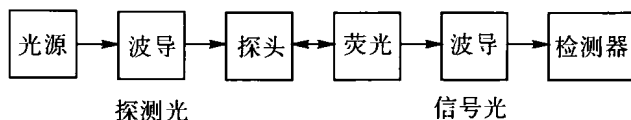


图 1-1 荧光光化学传感器测量体系示意图