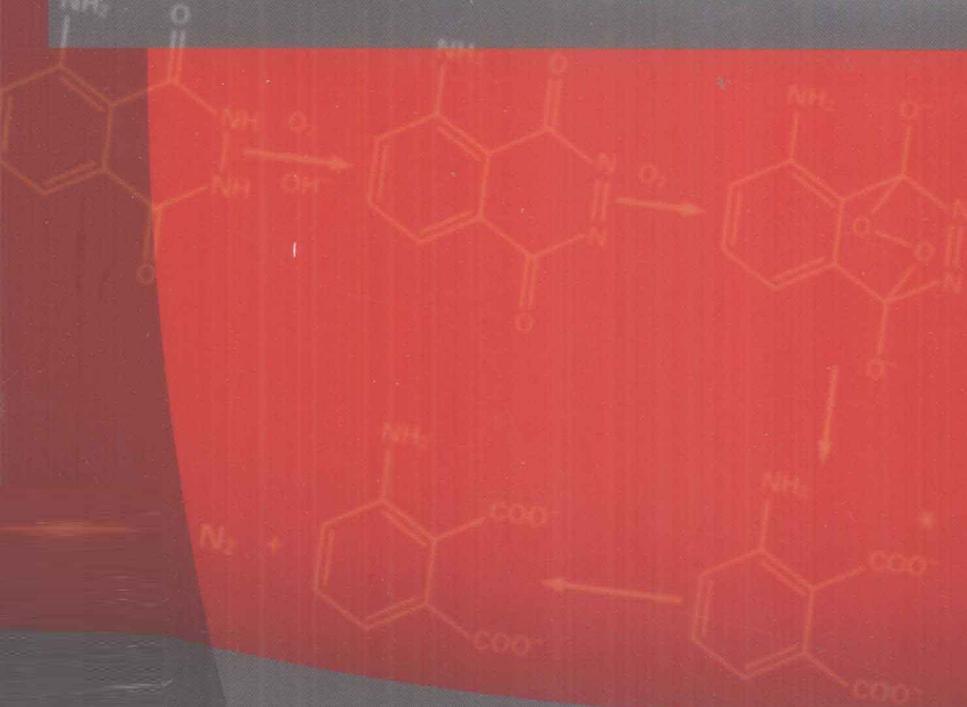
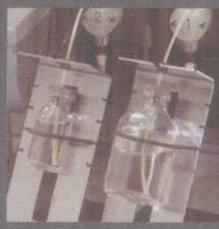


化学发光分析技术 及其在药品食品分析中的应用

屈凌波 吴拥军 等编著



化学工业出版社

化学发光分析技术 及其在药品食品分析中的应用

屈凌波、吴拥军、等编著



化学工业出版社

· 北京 ·

本书简要介绍了化学发光分析技术的发展、特点及其应用。其中包括传统化学发光分析、化学发光免疫分析、电化学发光免疫分析、毛细管电致化学发光分析等的基本原理与特点，常见化学发光体系的反应机理与应用以及几种目前使用较为广泛的化学发光分析仪器的操作原理和性能。在此基础上，介绍了一些与化学发光分析有关的实验技术，如样品处理技术、化学发光信号处理技术以及常用的数学处理方法等。在阐述清楚各种化学发光方法基本理论与实验技术的前提下，重点介绍化学发光分析在药品、食品分析中的应用现状与实例，这些实例大多来自于编者近年来的研究成果，内容反映了编写人员在化学发光研究方面的实际工作体会。

本书的特点是实用性强，既可作为分析化学、药物分析和其他相关专业本科生和研究生的教学用书，也可作为从事化学发光技术研究和应用人员的参考书。

图书在版编目（CIP）数据

化学发光分析技术及其在药品食品分析中的应用/
屈凌波、吴拥军等编著. —北京：化学工业出版社，
2012. 4

ISBN 978-7-122-13456-1

I. 化… II. ①屈…②吴… III. ①化学发光分析
②化学发光分析-应用-药物分析③化学发光分析-应用-
食品分析 IV. ①O657. 39②R917③TS207. 3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 021416 号

责任编辑：宋林青

文字编辑：杨欣欣

责任校对：陈 静

装帧设计：关 飞

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011）

印 刷：北京永鑫印刷有限责任公司

装 订：三河市万龙印装有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张 13½ 字数 298 千字 2012 年 5 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询：010-64518888（传真：010-64519686） 售后服务：010-64518899

网 址：<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书，如有缺损质量问题，本社销售中心负责调换。

定 价：36.00 元

版权所有 违者必究

前 言

从 20 世纪 70 年代开始，化学发光分析得到了相当大的发展，化学工作者们发现了一大批新的化学发光物质，并建立了比较完善统一的化学发光理论。随着对化学发光分析方法的不断深入研究，化学发光分析仪器也得到了长足的发展，由最初的照相法发展为光电法、电荷偶合法检测，检测样式由便携式单管发展为 48、96、384 孔微孔板，动态范围从 10^2 到 10^5 ，操作方式从手动发展为自动、原位及在线检测。因此化学发光分析法是近 40 年来发展起来的一种高灵敏的微量及痕量分析法，具有仪器设备简单、操作方便、灵敏度高、线性响应范围宽和易于实现自动化等显著优点，在药品食品分析中的应用日益广泛。从目前的发展来看，针对高效分离与高灵敏检测连续操作等问题，化学发光仪器将向集成化、智能化、自动化等方面发展，电子、光学、计算机等相关技术的发展必将带动化学发光仪器产生质的飞跃。

本书除了介绍化学发光的基本原理及实验技术外，还针对其选择性差的缺点，将现代的样品前处理技术运用到化学发光的样品前处理中，如将固相萃取、分子印迹、膜分离、微波消解等样品前处理技术引入化学发光分析中；同时将化学计量学中“数学分离”的概念引入到复杂样品的多组分同时测定，针对复杂组分体系的定量问题，通过对测定数据进行数学处理，可以不经分离，同时得出所有共存组分的含量。本书收集了比较重要的又较为常用的多元校正方法，内容涉及多元线性回归、主成分回归、偏最小二乘、人工神经网络及卡尔曼滤波等，从一定程度上扩大了化学发光的应用范围，为化学发光研究开拓了一个新的方向。本书用较多的篇幅介绍了化学发光分析方法在药品食品分析中的应用，这些内容大多来自于编者近年来在化学发光的研究成果，是科研工作的总结与积累。

本书根据化学发光分析技术的发展，同时又结合编者的实际科研工作成果进行选材编写而成。基本内容与主要编写人员为：第1章化学发光分析技术概述（屈凌波、吴拥军）；第2章化学发光分析基础理论（曾华金）；第3章化学发光分析仪器（王华栋）；第4章化学发光的样品前处理技术（杨冉）；第5章化学发光信号处理技术（王华栋）；第6章化学发光常用的数学处理方法（吴拥军、屈凌波）；第7章流动注射化学发光在药物分析中的应用（曾华金）；第8章静态注射化学发光法在药物分析中的应用（于斐）；第9章毛细管电泳-联吡啶钌电致化学发光联用技术在药物分析中的应用（杨冉）；第10章化学发光免疫分析法在药物分析中的应用（玉崧成）；第11章化学发光分析法在食品分析中的应用（于斐）；第12章化学发光体系查询数据库的建立（刘向辉）；第13章化学发光分析技术专利概述（玉崧成）。在编写过程中一些研究生也参与了修改工作，最后全书由屈凌波、吴拥军统稿定稿。在本书出版之际，真诚感谢所有给予帮助的老师和同学们。

由于编者水平有限，书中难免存在疏漏之处，有待于我们以后改进、充实和完善，恳请同行专家、学者以及广大读者批评指正。

屈凌波 吴拥军

2011年10月

目 录

第一部分 化学发光分析理论基础 / 001

第 1 章 化学发光分析技术概述	003
1.1 化学发光分析技术的发展	003
1.2 化学发光分析仪器的发展	004
1.3 化学发光分析技术的特点	004
1.4 化学发光分析技术的展望	005
参考文献	008
第 2 章 化学发光分析基础理论	010
2.1 化学发光基本概念	010
2.2 化学发光反应的基本原理	010
2.3 化学发光分析法	012
2.4 化学发光免疫分析的基本原理	013
2.5 毛细管电泳电致化学发光分析的基本原理	017
2.6 常见的化学发光反应体系	018
参考文献	027
第 3 章 化学发光分析仪器	030
3.1 化学发光仪发展现状	030
3.2 单管式静态注射化学发光仪	031
3.3 流动注射化学发光仪	035
3.4 便携式化学发光仪器	037
3.5 微孔板化学发光仪器	037
3.6 毛细管电泳化学发光仪	040
3.7 专用化学发光检测仪器(氮氧化物气体分析仪)	044
3.8 色谱仪器化学发光检测器	046
3.9 全自动化学发光免疫分析仪	048
3.10 化学发光成像分析仪	049

参考文献	050
------------	-----

第二部分 化学发光分析实验技术 / 051

第 4 章 化学发光的样品前处理技术	053
4.1 液-液萃取	054
4.2 沉淀	055
4.3 固相萃取	056
4.4 分子印迹	058
4.5 其他方法	060
参考文献	060
第 5 章 化学发光信号处理技术	064
5.1 化学发光信号采集原理	064
5.2 化学发光信号的信号处理	071
参考文献	076
第 6 章 化学发光常用的数学处理方法	077
6.1 概述	077
6.2 几种常见的多元校正方法及其应用	078
6.3 发展前景	094
参考文献	094

第三部分 化学发光分析在药品、食品分析中的应用 / 097

第 7 章 流动注射化学发光法在药物分析中的应用	099
7.1 概述	099
7.2 流动注射化学发光在药物分析中的应用	100
7.3 流动注射化学发光法在药物分析中的应用实例	105
参考文献	113
第 8 章 静态注射化学发光法在药物分析中的应用	118
8.1 概述	118
8.2 药物分析中常用的静态注射化学发光体系	119
8.3 静态注射发光法在药物分析中的应用实例	120
8.4 静态注射化学发光法在药物分析中的应用展望	128
参考文献	128
第 9 章 毛细管电泳-联吡啶钌电致化学发光联用技术在药物分析中的应用	130

9.1	毛细管电泳-电致化学发光技术在药物制剂分析中的应用	130
9.2	毛细管电泳-电致化学发光技术在生物分析技术中的应用	132
9.3	毛细管电泳-电致化学发光技术在天然药物分离分析中的应用	135
9.4	毛细管电泳-电致化学发光技术在药物小分子与蛋白相互作用研究中的应用	136
9.5	毛细管电泳-电致化学发光技术的应用展望	138
参考文献	140
第 10 章	化学发光免疫分析法在药物分析中的应用	144
10.1	概述	144
10.2	化学发光免疫分析的主要类型	145
10.3	化学发光免疫分析的一般应用步骤	145
10.4	化学发光免疫分析法在药物分析中的研究进展	146
10.5	化学发光免疫分析法在药物分析中的应用实例	146
10.6	化学发光免疫分析的现状及其发展趋势	153
参考文献	154
第 11 章	化学发光分析法在食品分析中的应用	157
11.1	概述	157
11.2	食品中营养物质的分析测定	158
11.3	食品中添加剂的测定	160
11.4	食品中药物残留测定	161
11.5	食品中的致病微生物及毒素测定	163
11.6	食品中的元素测定	164
11.7	食源性物质的抗氧活性测定	165
11.8	化学发光法在食品检测中的应用实例	166
11.9	展望	171
参考文献	171
第 12 章	化学发光体系查询数据库的建立	177
12.1	概述	177
12.2	开发工具简介	177
12.3	开发思路	178
12.4	开发过程及系统功能	179
12.5	数据库主要特点	186
12.6	小结	186
参考文献	186
第 13 章	化学发光分析技术专利概述	187
13.1	总述	187

13.2 化学发光仪器	188
13.3 化学发光反应体系	189
13.4 化学发光复合物	191
13.5 化学发光增强方法	191
13.6 化学发光具体应用	193
13.7 化学发光试剂容器设计	201
13.8 展望	202
参考文献	202

第一部分

化学发光分析 理论基础

第1章 化学发光分析技术概述 / 003

第2章 化学发光分析基础理论 / 010

第3章 化学发光分析仪器 / 030

第1章

化学发光分析技术概述

1.1 化学发光分析技术的发展

化学发光是指某些化学反应中发生可见光的现象。最早发现的化学发光现象发生在生物体内，如萤火虫和一些海洋生物，但是当时不知道为什么有的生物能发光而有的生物却不能发光。直到 1885 年，法国生理学家 Dubois 才首次解释了发光的化学机制，把这种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）。

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 发现了在碱性介质中洛粉碱（lophine, 2,4,5-triphenyl imidazole）被过氧化氢氧化时会发出绿色光。但由于化学发光反应的复杂性，在此后的 50 年间，此方面的研究工作没有太大的进展。直到 1928 年，Albrecht 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，对化学发光发展成为一种分析方法起到了重要的作用，成为有机化合物发光研究史上的一个里程碑。1935 年同样具有发光现象与较高的发光效率的另一有机化合物——光泽精（lucigenin）也被发现。但是，由于大多数化学发光非常微弱，且发光时间较短，因此早期的化学发光研究进展一直缓慢，几乎没有实质性的进展。直到 20 世纪 60 年代以后，现代电子技术和高灵敏度的光电传感器的发展，提供了许多研究和测量化学发光的新手段；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，发光反应用于分析化学才有较广泛的研究。从 20 世纪 70 年代开始，化学发光分析的应用得到相当大的发展，发现了一大批新的化学发光化合物，并建立了比较完善统一的化学发光理论^[1-2]。根据化学发光反应在某一时刻的发光强度或反应发光总量来确定反应中相应组分含量的分析方法，称为化学发光分析（chemiluminescence analysis），这种分析方法灵敏度高、仪器设备简单、造价低廉、操作简便、分析快速，同时又易于实现自动化，而且可与其他分析方法联合使用作为其他分析技术的检测器。尤其是灵敏度这一优势是其他学分析方法和简单的仪器分析方法所无法比拟的。

1.2 化学发光分析仪器的发展

随着对化学发光分析方法的不断深入研究，化学发光分析仪器也得到了长足的发展。20 世纪 60~70 年代国外化学发光分析仪器已有了迅速的发展^[3]。国内化学发光分析方面的研究起步于 20 世纪 80 年代初，30 年来，国内化学发光分析的研究取得了很多的进展，各种商品化的化学发光分析仪已相继研制出来^[4-6]。有关化学发光仪器的综述文献已有报道^[7]。用于化学发光分析的手段由最初的照相法发展为光电法（photomultiplier tube, PMT）、电荷耦合法（charge-coupled device, CCD）检测，检测样式由便携式单管发展为 24 孔、48 孔、96 孔、384 孔微孔板，动态范围从 10^2 到 10^5 ，操作方式从手动发展为自动、原位及在线检测。从目前的发展来看，针对高效分离与高灵敏检测连续操作等问题，化学发光仪器将向集成化、智能化、自动化等方面发展，电子、光学、计算机等相关技术的发展必将带动化学发光仪器产生质的飞跃。

1.3 化学发光分析技术的特点

① 灵敏度很高。例如利用鲁米诺化学发光体系测定 Co^{2+} 的检出限可达 10^{-13} mol/L ^[8]；用荧光素酶和三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）的化学发光反应，理论上灵敏度可达 10^{-18} mol/L ATP，比普通方法高 7~8 个数量级^[9]；检出限甚至还可以达到单个分子^[10]。

② 测定的线性范围宽。一般有 5~6 个数量级。

③ 仪器设备简单，操作方便。化学发光分析仪没有激发光源，不存在杂散光和散射光等引起的背景干扰，并且检测的是整个光谱范围内的发光总量，因而也不需要单色器。

④ 分析速度快，易实现自动化。流动注射化学发光分析每小时可测定 100 个以上的试样。

1.4 化学发光分析技术的展望

化学发光分析法是近 30 年来迅速发展起来的一种高灵敏的微量及痕量分析法，具有上述较多优点，因此化学发光分析作为一种分析测试手段有着广泛的应用前景。

但是化学发光分析法也具有一些固有的缺点，如易受干扰，选择性欠佳；作为一种新的分析方法，如何使高效分离与高灵敏检测连续操作，实现在线分析，还需做很多研究工作；再者，在应用过程中，如实际样品的背景复杂，待测物含量低，如何实现待测样品的分离富集等众多方面尚需要进一步的完善和深入探讨。

尽管化学发光分析法存在一些不足，但随着相关学科及现代技术的发展，化学发光分析法的发展逐步呈现了新化学发光体系、新催化剂的研究活跃，化学发光与其他技术、方法联用多样化，新领域中化学发光方法应用频繁等特点^[11]。

1.4.1 完善现有的化学发光体系及建立新的化学发光体系

目前主要使用的化学发光反应体系有：

① 鲁米诺 (luminol, 3-氨基苯二甲酰肼) + 强氧化剂 (如过氧化氢、铁氰化钾、高碘酸钾等) 体系。由于鲁米诺氧化反应的发光效率较低、反应速率较慢，人们常向体系中加入某些酶类 (如辣根过氧化物酶、过氧化氢酶等)、金属蛋白质类 (如血红蛋白) 以及金属离子催化剂 (如 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+}) 等，这些物质可增强鲁米诺的化学发光反应。此外可通过鲁米诺类衍生物的氨基进行烷基化，增强鲁米诺及其衍生物的发光效率^[12]。

② 光泽精 (lucigenin, N,N -二甲基吖啶硝酸盐) + 过氧化氢体系。该体系发光效率较高，只是氧化产物 N -甲基吖啶酮难溶于水，常沉积在反应器壁上，为此，常加入表面活性剂 (如 CTAB) 使之增活。由于光泽精的分子结构由两部分组成，即吖啶环发光基团和离去基团 (苯氨基和磺酰氨基等)，因此为了提高量子产率，其结构修饰工作主要集中在离去基团、吖啶环侧链上和 10 位 N 原子上取代基的修饰^[13]。

③ 过氧草酸盐 (酯) 类 + 荧光物质 + 过氧化氢体系。该体系反应速率快，量子产率高，灵敏度高，但易受体系中溶剂和试剂纯度、溶剂组成和极性等因素的影响^[14]。

④ 强氧化性物质，如四价铈、高锰酸钾、过氧化氢、高碘酸钠等作氧化剂的化学发光体系^[15]。

⑤ 钝联吡啶电致化学发光体系。是在化学发光基础上发展起来的一种新的分析方法^[16]。

化学发光试剂及其发光体系是化学发光技术应用的前提和基础。近年来，随着对化学发光反应机理以及对化学发光试剂性能影响因素认识的深入，合成新的高效能的发光试剂、开发新的发光体系，仍将是化学发光今后发展的趋势。

1.4.2 化学发光与其他技术的联用

1.4.2.1 化学发光与免疫技术的联用

化学发光灵敏度很高，但选择性欠佳。1977年 Halmann 根据放射性免疫分析的原理，将高灵敏度的化学发光技术与高特异性的免疫反应结合起来建立了一项技术——化学发光免疫分析（chemiluminescence immunoassay, CLIA），是化学发光试剂直接标记抗体或抗原的一类免疫测定方法，具有灵敏度高、特异性强、无辐射、标记物有效期长并可实现全自动化等优点^[17]。鲁米诺及其衍生物、吖啶酯衍生物、辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶是目前化学发光免疫分析中使用最多的标记物。随着增强剂、标记物、标记技术、新型固相载体的应用以及联用技术的不断发展，化学发光免疫技术已被广泛用于临床药物分析、食品检测及环境分析等领域。

1.4.2.2 化学发光与毛细管电泳技术的联用

毛细管电泳（capillary electrophoresis, CE）与化学发光的联用（CE-CL），兼备了毛细管电泳分离效率高和化学发光灵敏度高的优点，直接用于复杂样品中微量组分的分离与测定，可同时解决选择性差和灵敏度低的问题，给化学发光研究和毛细管电泳技术提供了发展机会^[18]。经过近30年的发展，CE-CL不断突破联用接口技术难关，技术优势不断发展。目前国内外已经研制出商品化的毛细管电泳化学发光检测仪，实现了在线分离、实时检测。今后CE-CL将在微型化、集成化和自动化方面进一步发展。

1.4.2.3 化学发光与高效液相色谱技术的联用

化学发光与分离技术的联用可用于复杂体系中组分的分离和低组分含量的分析，目前已有多 种化学发光体系与液相色谱成功联用。但是目前仍有一些关键因素制约着其进一步发展，其中液相色谱流动相与化学发光体

系不兼容是化学发光与液相色谱联用中存在的最大问题；再者测定的物质种类仍十分有限，难以解决实时在线检测。解决这些问题仍将是以后化学发光与色谱联用技术研究的重点之一^[19]。

1.4.2.4 化学发光与分子印迹技术的联用

分子印迹技术（molecular imprinted technique, MIT）是近年来发展的高效分离技术，它模拟了生物学上抗原抗体的特异选择性。若将分子印迹技术应用到化学发光分析中，利用分子印迹聚合物对目标分子的选择性识别能力和捕获能力，使目标分子与样品中的共存物质分离并在分子印迹聚合物上吸附，然后进行化学发光检测，这样共存物质的干扰就会被消除，提高了被测组分的选择性^[20]。故分子印迹-化学发光分析集成了分子印迹技术的高选择性和化学发光分析高灵敏度的优势。

1.4.2.5 化学发光与成像技术的联用

化学发光免疫成像分析法是将化学发光免疫分析与成像技术联用而发展起来的一种新方法。成像技术是将某些特殊反应所产生的化学发光信号通过超灵敏的电荷耦合装置（CCD），用高分辨率的相机以积分的形式拍摄下来，可以提供直观图像和光学图像的动态信息。化学发光免疫成像分析法既具备了化学发光免疫分析的高灵敏度，又具备了成像技术的高通量及多个样品同时检测等优点^[21]。近年来的研究表明，利用化学发光成像技术替代放射成像技术，不仅发挥了化学发光检测高灵敏度的特点，也可以避免放射性污染及由此而带来的一系列问题，是一种很有前途的研究方向。

1.4.2.6 化学发光与其他方法技术联用

最近有人尝试将化学发光分析法与光激发法^[22]、纳米标记法^[23]、声场诱导法^[24]、微全分析系统^[25]、传感器技术^[26]等联用，也取得了一定的进展。

1.4.3 其他相关研究工作

① 深入研究化学反应机理，借助荧光光谱、紫外吸收光谱、发光动力学曲线、波长扫描曲线、质谱及核磁共振谱等相关手段证实其合理性和科学性；在此基础上利用分子轨道理论、热力学原理解释机理，为建立和完善化学发光反应提供理论支持。

② 进一步提高化学发光方法的稳定性。化学发光法尽管灵敏度很高，但稳定性较差，关键在于检测器，再者体系条件的影响也较大。如何克服这些问题，研究开发出超灵敏而又稳定的检测器及仪器也是目前亟待解决

的难题。

③逐步完善各种化学发光体系，建立相应的标准化方法，扩大其应用范围，逐步推广到药物分析、临床检验、食品检验、环境监测等各个领域。

化学发光分析技术作为一种分析测试手段有着广泛的应用前景，今后将在合成新的化学发光试剂、寻找新的化学光体系方面以及与新方法、新技术等的联用方面加大研究，以达到对分析物进行灵敏准确的分析测定。其次将会加大对化学发光体系的发光机理探讨，寻求从化学本质上揭示其发光规律，为化学发光新试剂的合成及化学发光新体系的发现等方面提供理论指导。再者化学发光仪器的研制也正向集成化、智能化和自动化发展，实现实时原位在线检测。

参 考 文 献

- [1] 陈国南, 张帆著. 化学发光与生物发光—理论与应用 [M]. 福建: 福建科学技术出版社, 1998.
- [2] 林金明. 化学发光基础理论与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [3] Camp-ns-FalcoP, Tortajad-GenA, Bosc Reig F. A new flow cell design for chemiluminescence analysis [J]. Talanta, 2001, 55 (2): 403-413.
- [4] 李先洁, 于振安. 流动注射化学发光联用技术及其应用 [J]. 化学通报, 1992, (4): 42-46.
- [5] 林金明, 张帆. 高灵敏度化学发光仪的研制 [J]. 分析仪器, 1992, (1): 26-28.
- [6] 章竹君. 化学发光分析 [M]. 西安: 陕西师范大学出版社, 1986.
- [7] 金雪玲, 陈怀成, 混旭. 化学发光分析仪器的研究进展 [J]. 延安大学学报: 自然科学版, 2009, 28 (3): 76-80.
- [8] Huang Bo, Li Jianjun, cheng Jieke. On-line chemiluminescence detection for capillary ion analysis [J]. Anal Chem, 1996, 68 (14): 2366-2369.
- [9] 郝巧玲, 吕斌, 周宜开, 等. 生物发光法快速检测细胞内三磷酸腺苷 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2005, 34 (1): 61-64.
- [10] 刘彦明, 刘二保, 程介克. 检测溶液中单分子 [J]. 分析化学, 2002, 30 (8): 1000-1004.
- [11] 李晓丹. 化学发光体系的研究与应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [12] 林旭聪, 郭良治, 谢增鸿. 化学发光试剂研究新进展 [J]. 世界科技研究与发展, 2004, 26 (4): 136-143.
- [13] 穆小静, 夏之宁. 化学发光试剂的结构修饰及化学发光性能研究进展 [J]. 化学通报, 2009, 3: 195-201.
- [14] 范春雷, 温珍昌. 药物分析中常用的化学发光试剂及其应用进展 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2006, 24 (1): 66-73.
- [15] 孙秀新, 同国婷, 杨宇龙. 化学发光新体系在药物分析中的应用研究进展 [J]. 河北工业科技, 2008, 25 (4): 255-258.
- [16] 丁收年, 徐静娟, 陈洪渊. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电致化学发光技术的若干进展 [J]. 中国科技论文在线, 2007, 2 (8): 595-606.