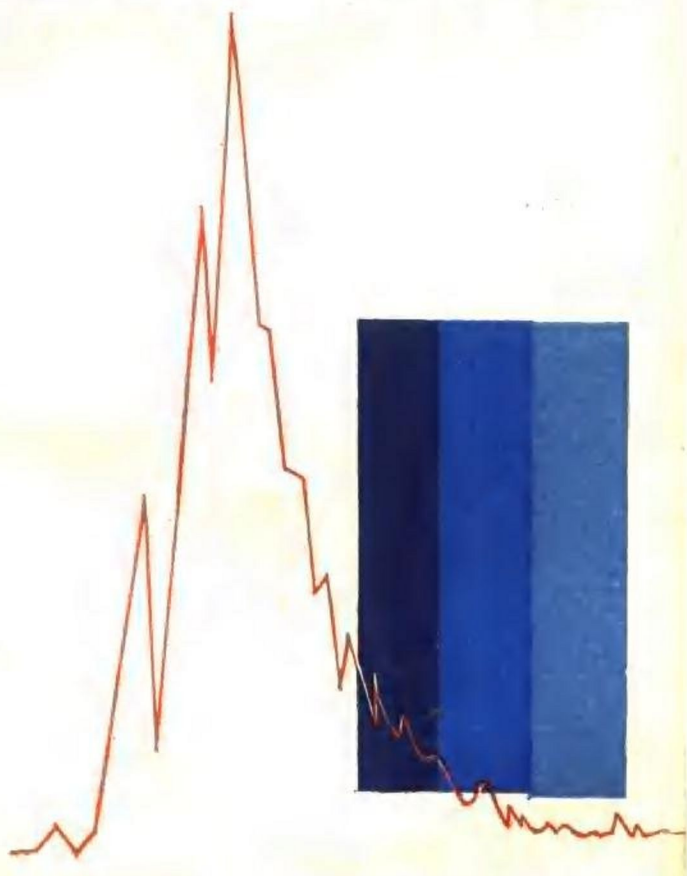


# 化学发光分析



511/204/11

# 化学发光分析

陆明刚 编译

化学发光分析

安徽科学技术出版社

责任编辑：舒 群  
封面设计：肖 萍

## 化 学 发 光 分 析

陆明刚 编译

安徽科学技术出版社出版

(合肥市跃进路1号)

安徽省新华书店发行 六安地区印刷厂印刷

开本：787×1092 1/32 印张：5 字数：105,000

1986年6月第1版 1986年6月第1次印刷

印数：00,001—54,000

统一书号：15200·59 定价：1.10元

# 序

在现代分子电子光谱学领域中，一项带有许多独特优点的、新颖的光谱分析技术正在迅速地发展，并且引起了人们的注意，这就是分子发射的化学发光分析法。

以化学反应激发分子为基础的化学发光分析技术具有灵敏度高、专一性强、线性响应的浓度范围宽以及仪器设备简单等优点，它代表了一种新的发展方向，是实现分析测定自动化、程序化、连续化而成为真正具有实时性测定的最好手段之一。

化学发光分析技术在环境科学研究和实践中，成功地用于空气污染物的研究、自动监测、水污染研究和成分分析；在现代医学和分子生物学中，用于研究酶反应和各种酶的测定；在临床上用于人体的各种甾质化合物的研究和免疫测定。近年来，氧酶反应的化学发光开始用于研究母体致癌物质及其代谢产物和多形核白细胞吞噬细菌时的现象，这对现代医学发展具有重要意义。

化学发光分析技术也是当代法医学研究、细菌浓度测定、水源中痕量金属离子选择性分析以及生物量测定的一种新兴手段。

对基础学科而言，化学发光不仅开创了一个新的分析领域，而且对于光化学、络合物化学、生物化学、微生物学以

及火焰中的气相化学反应、有机物氧化反应、催化反应、酶反应等理论研究也有重要作用。

为开发此项新技术，陆明刚同志广集国内外这方面的主要文献，结合自己点滴的研究工作经验撰写成册，以供读者参考和使用。本书内容丰富，实用性强，书中列举的专门文献达数百条，可以说是研究化学发光分析的一本“小手册”。本书对于化学发光的基本理论、实验技术以及发展动向等也都进行了较全面的论述。

中国科学技术大学教授 尹 方

# 目 录

<b>第一章 现代分子电子光谱学导论</b> .....	1
1.1 引言.....	1
1.2 分子对中的激子：二氧杂四元环酮的分解.....	2
1.3 发生在分子对中的同时跃迁：单线态分子氧.....	3
1.4 溶剂笼中的光谱：粘滞流动势垒.....	4
1.5 介电松弛溶剂笼效应.....	7
1.6 极化溶剂笼效应.....	8
1.7 无序和有序偶极子溶剂笼效应.....	10
<b>第二章 化学发光分析基础</b> .....	17
2.1 化学发光的基本理论.....	17
2.1.1 化学激发的能量和发光反应的类型.....	17
2.1.2 激发跃迁能级图.....	18
2.1.3 化学发光的物理基础.....	21
2.2 有机物化学发光的一般机理探讨.....	22
2.2.1 用热力学观点简论有机物的化学发光.....	23
2.2.2 电子转移型的化学发光.....	24
2.2.3 激发态氧生成型的化学发光.....	24
2.2.4 过氧化物分解型的化学发光.....	26
2.3 化学发光的效率.....	26
2.3.1 气相化学发光反应中的激发分子辐射寿命.....	26

2.3.2	气相化学发光反应中的激发分子碰撞寿命	27
2.3.3	化学发光反应的总效率	29
2.4	化学发光分析	29
2.4.1	化学发光分析的特点	29
2.4.2	化学发光分析基本原理	31
<b>第三章</b>	<b>液相化学发光和水分析</b>	<b>37</b>
3.1	ATP分析	37
3.1.1	ATP分析原理	37
3.1.2	ATP分析仪器	39
3.1.3	生物量测定	39
3.2	Fe(Ⅰ)分析	42
3.3	磷分析	46
3.4	化学发光分析的未来发展	50
3.4.1	液相化学发光	50
3.4.2	火焰化学发光	52
<b>第四章</b>	<b>气相化学发光分析</b>	<b>56</b>
4.1	引论	56
4.2	现行的化学发光监测器	59
4.2.1	化合物的专用检测器	59
4.2.2	元素专用检测器	62
4.3	以 $\text{NO} + \text{O}_3 \longrightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2 + h\nu$ 反应为基础 的化合物专用检测器	67
4.3.1	NO和 $\text{O}_3$	67
4.3.2	$\text{NO}_2$ , $\text{NO}_x$ ( $=\text{NO} + \text{NO}_2$ )	71
4.3.3	$\text{NH}_3$ 及胺类	74
4.3.4	多功能监测器及其校准	75

4.4	以其它反应为基础的O <sub>3</sub> 监测器	79
4.4.1	均相化学发光	79
4.4.2	异相化学发光	81
4.5	正在发展或研究中的化合物特效监测技术	82
4.5.1	O+NO <sub>2</sub> →NO <sub>2</sub> +hν反应的应用	82
4.5.2	借助于O <sub>3</sub> 化学发光的NO <sub>2</sub> 光致裂片技术	86
4.5.3	其它反应的利用	87
4.6	关于空气污染物监测技术的结论	92
<b>第五章</b>	<b>分子发射腔分析</b>	<b>101</b>
5.1	概述	101
5.2	进样装置及仪器组合	103
5.3	发射腔的性能	105
5.4	硫化合物的分子发射	107
5.5	火焰气体组成对S <sub>2</sub> 发射的影响	108
5.6	发射腔体在火焰中的位置	110
5.7	不同的硫化合物效应	112
5.7.1	无机含硫化合物	112
5.7.2	有机含硫化合物	114
5.8	溶剂对S <sub>2</sub> 分子发射的影响	117
5.9	S <sub>2</sub> 分子发射的测定步骤	118
5.10	分子发射腔其它形式的装置及非硫元素的测定	119
5.11	MECA结论	121
<b>第六章</b>	<b>化学发光在医学检验方面的应用示例</b>	<b>124</b>
6.1	以抗体增加强度的化学发光免疫法测定性腺甾类化合物	124



6·1·1	概论	124
6·1·2	基本原理	124
6·1·3	试验器材的准备	125
6·1·4	孕甾酮的分析步骤	126
6·1·5	雌三醇的化学发光免疫测定	128
6·1·6	化学发光免疫测定用于甾质及生物样品分析的准确性	129
6·1·7	结论	131
6·2	尿液中甾质的免疫测定	132
6·2·1	测定的基本原理	132
6·2·2	分析步骤	133
6·2·3	免疫测定法的验证	134
6·2·4	关于以抗体增加强度的化学发光免疫测定法的结论	136
6.3	血斑的化学发光检测	136
6.4	微生物的化学发光分析	138
附录		142
I	一些重要的气相化学发光反应的速率常数	142
I	可利用鲁米诺体系化学发光分析的痕量金属离子	143
II	可利用鲁米诺及其附加物的化学发光法来测定的氧化剂和抑制剂	145
IV	可用化学发光法测定的一些有机物质	146
V	用光泽精化学发光反应分析的痕量金属	147

# 第一章 现代分子电子光谱学导论

## 1.1 引言

现代分子电子光谱学的建立，经历了三个发展阶段。第一阶段的特征是：仅就孤立的单一分子来论述辐射分子的电子跃迁〔1〕，其中包括轨道特征〔2,3〕及其多重性〔4〕。这方面的内容以原子光谱学和分子光谱学为基础〔5〕，直到现在也仍然是光谱学的权威性部分〔6,7〕。

分子光谱学发展的第二阶段认识到〔1〕在多原子的分子中，由于无辐射电子跃迁的支控作用而导致多原子分子的激发与单原子和双原子分子的激发情况不太相同。分子的激发途径以及它们的相关性可由唯象学〔8〕来确定，然而，尽管在确定多原子分子〔10~13〕的无辐射跃迁过程的条件方面已取得一定成果，但其复杂过程的理论至今仍在不断发展〔9〕。

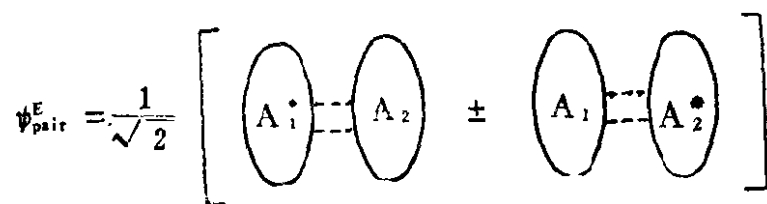
分子光谱学发展的第三阶段是在了解分子电子激发现象〔14〕的演变中，考虑到复合分子的多重激发作用，而不再局限于孤立的分子中电子构型的激发。此时，生物学家、化学家和物理学家经常论及的分子已经是指聚结体系中的分子了。于是人们不仅注意到分子间的制约作用（溶质与溶质以及溶质与溶剂间的作用），而且注意到多重光子的活动可能要进入图象，尤其是利用光子流进行的激光激发。可以归入这种

类型的一些现象有电荷转移激发、分子的激子效应、分子对中的同时跃迁、非线性双光子吸收、三重线态-三重线态的湮灭、超发光以及双质子的光致互变异构等。

## 1.2 分子对中的激子：二氧杂四元环酮的分解

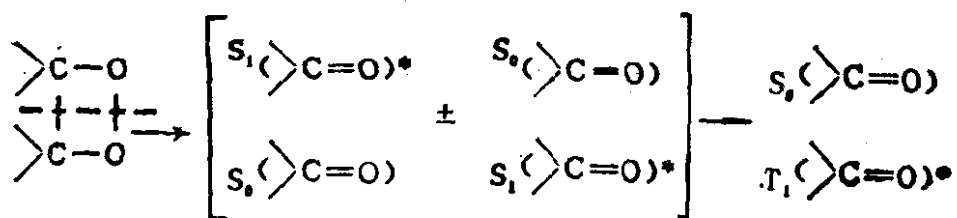
关于多聚分子的激发过程，最新的典型示例可借助于分子激发与分子对中的同时跃迁机理为比照来说明。

在分子激子<sup>[15]</sup>态的激发作用中，对一已形成的分子对（由氢键或范德华氏力形成的二聚体）是进行单元上的激发：

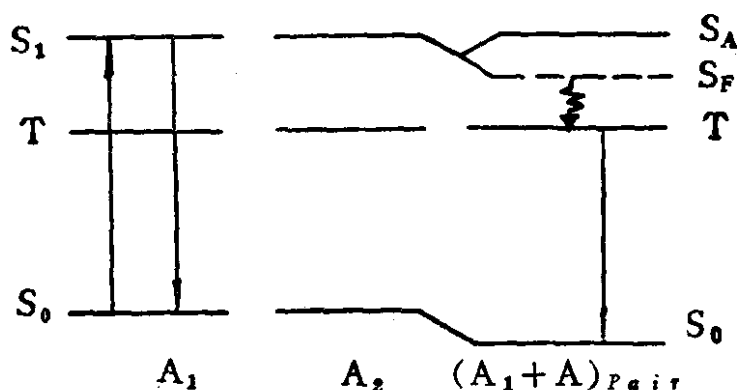


这时，就可能发生分子对单元间的共振相互作用或激子传递，因此，二聚体中的单元分子A的激发态就会受到分子激子的共振相互作用而分裂。分裂的程度如用波数来表示可大到 $500 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 范围，此能量可供强烈的电子跃迁。由激子共振作用所引起分裂的结果取决于分子对的几何构型，一般是大大地改变了激发机理，例如有效地加强了三重线态的激发作用<sup>[16]</sup>。

上述机理的一个示例是二氧杂四元环酮(Di-oxetane)形成受激的丙酮，从而出现了显著的重线态。其过程如下式所示：



这一机理的能级图解如下：

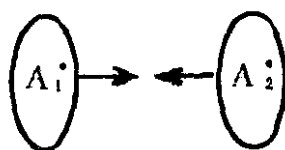


其中单一丙酮分子A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>有显著的荧光发射。由二氧杂四元环酮形成的丙酮分子对应该有激子态的分裂，伴随有量子力学许可的(S<sub>A</sub>)和禁戒的(S<sub>F</sub>)单线态组分，产生了占优势的三重线态激发。这一机理较通常所说的二氧杂四元环酮分解作用中双重的或两步阶的电子转移机理更为简明。

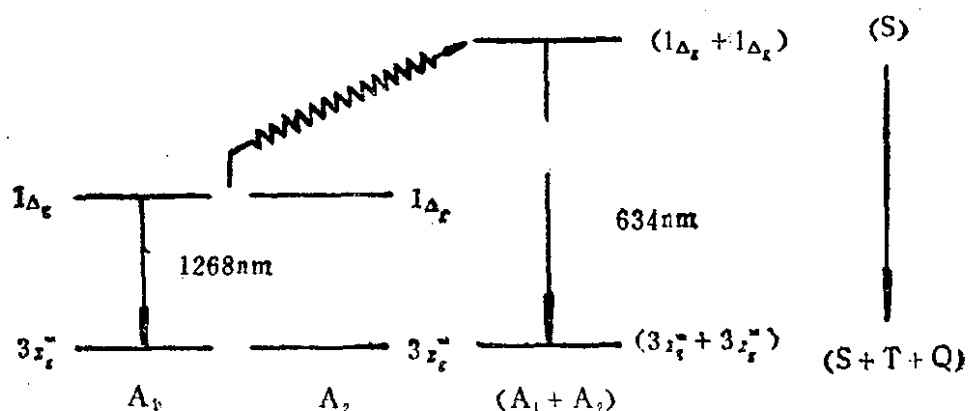
### 1.3 发生在分子对中的同时跃迁：单线态分子氧

在氧分子对〔17,18〕中发生的同时跃迁，是一对碰撞着的分子同时受到激发：

$$\begin{aligned}
 \psi_E &= (\Lambda_1^{\uparrow})(\Lambda_2^{\uparrow}) \\
 \psi_G &= (\Lambda_1^{\downarrow})(\Lambda_2^{\downarrow})
 \end{aligned}$$



在这种情况下，不存在激发共振的可能性，而是产生了激发叠加。换句话说，即是当两个受激单线态分子氧相互碰撞时，发生了光子倍加：



因而，单分子1268nm的近红外跃迁就表现为634nm单光子（红-橙）的双分子发射。

同时跃迁使得分子氧的化学发光变得显著<sup>[17]</sup>，并且敏化了存在于化学体系中的受体分子的化学发光<sup>[18]</sup>而产生了单线态分子氧。直接检验单线态分子氧很重要，Khan和Kasha<sup>[19]</sup>俩人最近论述了紫外敏化的近红外光谱仪，此种光谱仪能直接监测波长为1268nm的单线态的 $\Delta$ -氧发射。由于这种设备十分灵敏，故可作为生物学上的化学发光探针。

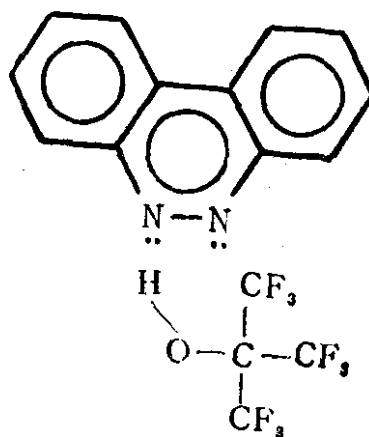
#### 1.4 溶剂笼中的光谱：粘滞流动势垒

分子在凝聚的介质中总是被溶剂笼子所包围，这种笼子可能是下列物质之一：

(1)液态溶剂；(2)大分子包壳（酶场所）；(3)脂质薄膜；(4)多层次体系；(5)由晶体或表面吸附作用形成的壳层。

在光化学以及其它动力学的研究上虽早已注意到溶剂笼对再组合反应速率方面产生的影响，但忽略了用对照法对溶剂笼作用机理的光谱学研究。

Dellinger和Kasha<sup>[20,21]</sup>俩人曾以量子力学为基础，分析了溶剂笼子的力学粘滞流动势垒，他们研究出来的基本模型如图1-1所示。倘若某分子在激励状态中对于平衡松弛作用存在有很大的畸变运动，则包围溶质的溶剂笼必然有大部分被溶质的分子所取代。例如反-二苯代乙烯在扭力松弛作用中，其双键苯基约需扫开大部分溶剂以形成平衡激发态的构型<sup>[21]</sup>（参看图1-1a）。另一方面，以氢键结合的分子对邻-偶氮菲（9, 10-diazaphenanthrene）和3-过氟丁醇（t-perfluorobutyl alcohol）形成的络合物为例：



在分子络合物<sup>[21]</sup>的光致解离激-需作发用中，要取代大部分溶剂分子。

根据Dellinger和Kasha俩人拟定的模型，溶剂笼应具有一定的势垒可迫使分子运动，这种势垒表现为高斯流动势垒以增加势能功效，而导致分子拉成水平，亦即在离解情况中常使分子达到离解的极限。此类流动势垒唯象的真实性曾用低温光谱学的方法研究和检验过。例如发光现象曾揭示出这样的事实：在刚体玻璃溶剂中，分子就陷入到基态构型。

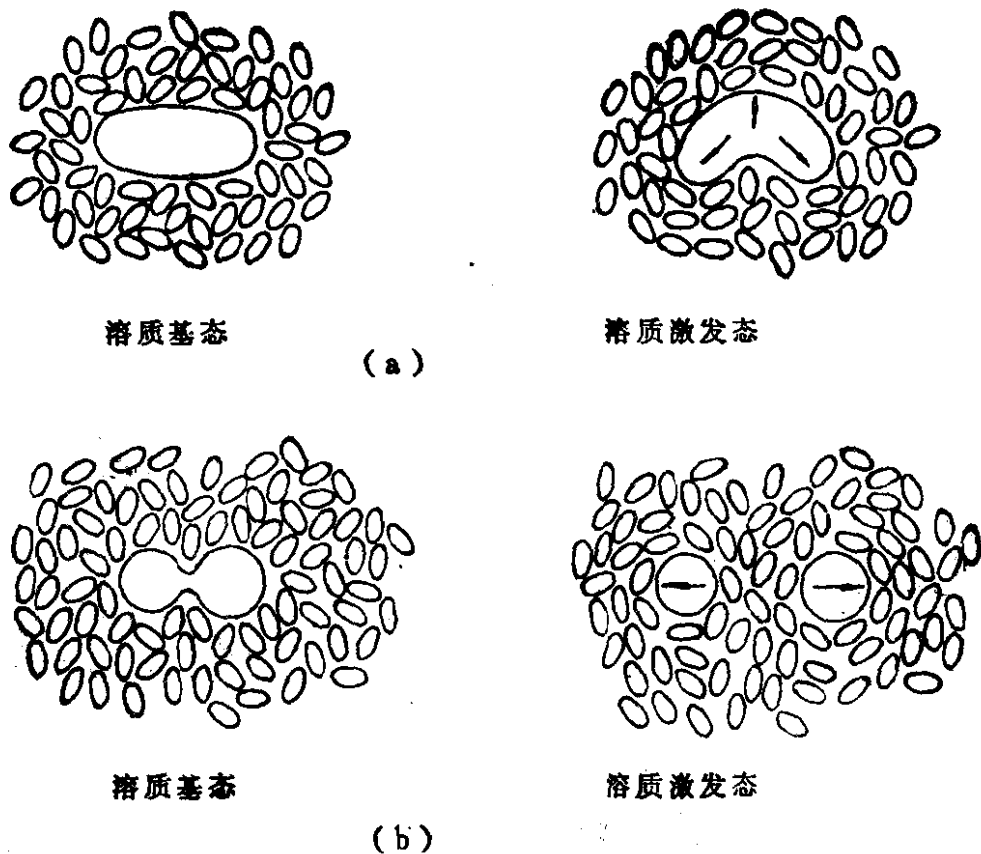


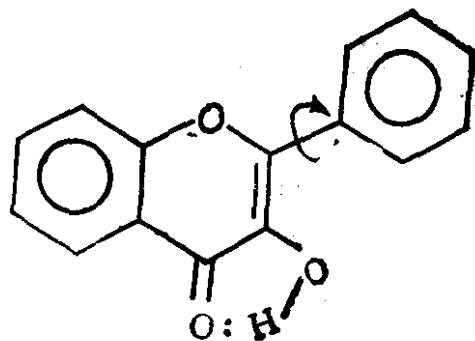
图1-1 力学粘滞流动势垒笼

(a) —— 异构化作用时的激励; (b) —— 解离作用时的激励

近来, Mohammadi和Henry<sup>[22]</sup>俩人采用截然不同的于已往的途径来验证粘滞流动势垒迫使分子运动。他们研究了甲基丁烷的C—H振动红外谐波的非谐性,表明这种非谐性的降低可由Dellinger和Kasha的模型预示,并可用实验来验证,而且还能够用Lennard-Jones位能作为Morse位能<sup>[22]</sup>的定量扰动量来进行计算。

最近, Sengupta和Kasha<sup>[23]</sup>俩人发现在黄酮分子中有激发态的质子转移光谱,此乃一种有趣的实例。如发现3-羟基-黄酮在碳氢化合物的溶剂中于室温下可观察到绿色

的荧光,并且与分子的紫外吸收无关,于是可以推论在分子内部氢键与羰基间发生了分子内质子转移,借此可以推想类似的吡啶(pyrilium)激发态互变异构体产生了绿色荧光。当将此分子冷冻到刚体玻璃溶剂中时,则可观察到正常的紫色的紫外激发荧光。在此情况下,苯基的扭力受到溶剂笼的抑制,所以粘滞流动势垒防止了互变异构作用。



栝精( $C_{15}H_{10}O_7$ )是一种天然的黄酮,它在薄层色谱片上可显示出类似于上面所说的绿色荧光。更为有趣的是:5-羟基黄酮显示出消耗性的无辐射质子转移;而7-羟基黄酮则显示出消散性的分子之间的质子转移。

### 1.5 介电松弛溶剂笼效应

为适应力学粘滞流动势垒溶剂笼模式的要求,迫使大量的分子变形并发生分子中的电子激发,但这种情况并不常见。实际上,仅是许多荧光染料,尤其是作为免疫学和细胞学探针用的一类染料却表现出对粘滞度依赖性很大的荧光产额,而且分子变形可能吻合于粘滞流动势垒模式,因为这些分子内部的扭力势能可以与此相适应。对大多数分子而言,当其电子受激时只显示很小的轮廓性的松弛而没有巨大的分子构型上的变化以取代溶剂笼分子,这种类型的分子可以免除力学流动势垒的影响。



从另一方面来说，对激发研究很有意义的许多分子当其处于基态时具有中等的或更大的偶极矩；而当其处于激发态时就可能有较大的偶极矩转向。例如，氮杂茛和7-偶氮杂茛：



可以预料，此分子在溶剂笼中具有灵敏的介电松弛作用，但并不表现任何较大的力学粘滞流动势垒效应。

### 1.6 极化溶剂笼效应

图1-2(a)粗略地表示了具有持久偶极矩的溶质分子处于基态时，被非极性分子的溶剂笼所包围的情况。此处表明在溶剂分子中存在着诱导生成的偶极矩，可以预料这种诱导作用至少会在周围第一层笼的分子中或更远一些地方发生。当激发时，如果溶质偶极矩方向强烈地逆转，可以推断诱导偶极

