

化学发光分析中10种重要 发光剂及其应用

呼世斌 冯贵颖 管 棣¹⁾ 李先文²⁾ 高向阳³⁾

(基础课部)

摘 要 本文重点介绍了鲁米诺、光泽精、洛粉碱、硅氧烯和双(2, 4, 6-三氯苯基)过氧草酰的结构、发光性质及其应用, 叙述了没食子酸、罗丹明B、连苯三酚、苏木色精、对-氯苯甲酸-5-溴水杨叉酰肼在分析化学中的应用, 并对化学发光分析的发展前景作了简要评价。参考文献50篇。

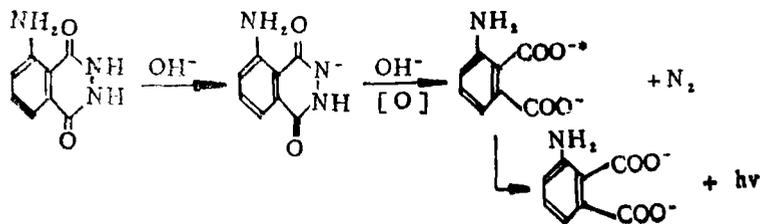
主题词 化学发光分析, 发光分析, 应用, 综述/发光剂

化学发光分析具有灵敏度高, 应用面广, 线性范围宽, 仪器简单、便宜等特点, 近年来在国内外发展很快。目前, 利用各种化学发光体系可测定的物质种类很多, 但归纳起来, 最常用的化学发光试剂主要有鲁米诺、光泽精、洛粉碱、硅氧烯和双(2, 4, 6-三氯苯基)过氧草酰、没食子酸、罗丹明B、连苯三酚、苏木色精、对氯苯甲酸-5-溴水杨叉酰肼等几种。下面分别予以介绍。

1 鲁米诺 (Luminol)

鲁米诺的化学名称为3-氨基苯二甲酰环肼, 它在碱性溶液中的氧化是最常见的化学发光反应之一, 发生化学发光反应时的量子产率介于0.01~0.05之间。

鲁米诺在碱性水溶液中, 或者在二甲基亚甲砷, 二甲基甲酰胺等极性溶剂中离解为一价阴离子, 该阴离子在适当体系中能被某些氧化剂氧化生成氨基邻苯二甲酸根离子。氧化过程中产生的化学能被氨基邻苯二甲酸根离子吸收, 使其处于激发状态, 其价电子从单线第一电子激发态的最低振动能级跃迁到基态各个不同振动能级时, 便产生最大辐射波长为425 nm (水溶液) 或485 nm (二甲基亚砷溶液) 的光, 这一反应可表示为:



文稿收到日期: 1989-04-08

1) 西南交大; 2) 渭南师专; 3) 河南农业大学。

将这一反应的化学发光光谱与氨基邻苯二甲酸根离子的荧光光谱比较,证明了这一反应历程^[1]。对上述反应具有氧化、催化或阻化作用的物质(含无机物和有机物)都可以此反应为基础进行测定。章竹君教授曾就无机分析方面的应用作过专门评述^[2]。下面就鲁米诺(包括异鲁米诺及鲁米诺的一系列衍生物)在免疫测定和有机物的化学发光分析中的应用列于表1、表2。

Лонамаренко и др 指出,某些含

表1 鲁米诺化学发光免疫测定

测定物	标记物	测定物	标记物
人IgG ^[3]	鲁米诺	兔IgG ^[7]	异鲁米诺
睾丸激素 ^[4]	鲁米诺衍生物	皮质醇 ^[8]	异鲁米诺
甲状腺素 ^[5]	鲁米诺衍生物	人血清白蛋白 ^[9]	过氧化物酶
生物素 ^[6]	异鲁米诺	地高辛 ^[10]	鲁米诺

注: 右上角 [] 内为参考文献号。

表2 鲁米诺化学发光分析测定的有机物及灵敏度

μg/mL

有机物	灵敏度	有机物	灵敏度
甘氨酸 ^[11]	150	萘酚类 ^[18] (1-亚硝基-2-萘酚)	20
氨基酸 ^[12]	—	维生素 B ₁₂ ^[19]	—
半光氨酸 ^[13]	0.01	多元胺(或羟醛基) ^[20]	—
铁蛋白 ^[14]	2	抗坏血酸 ^[20]	—
细胞色素C ^[14]	0.025	VB ₆ ^[20]	—
肌红蛋白 ^[14]	0.0001	甘油醇 ^[20]	—
血红蛋白 ^[14]	0.0001	L-组氨酸 ^[21]	2.5~20
羟高铁血红素 ^[14]	0.00006	马拉松 ^[22]	—
过氧化物酶 ^[14]	0.0001	甲拌磷 ^[22]	—
神经错乱毒气 ^[15]	0.5	保棉丰 ^[22]	—
杀虫剂(Isopestox) ^[16]	200	敌敌畏 ^[23]	0.02
酚 ^[17]	400		

注: 右上角 [] 内为参考文献号。

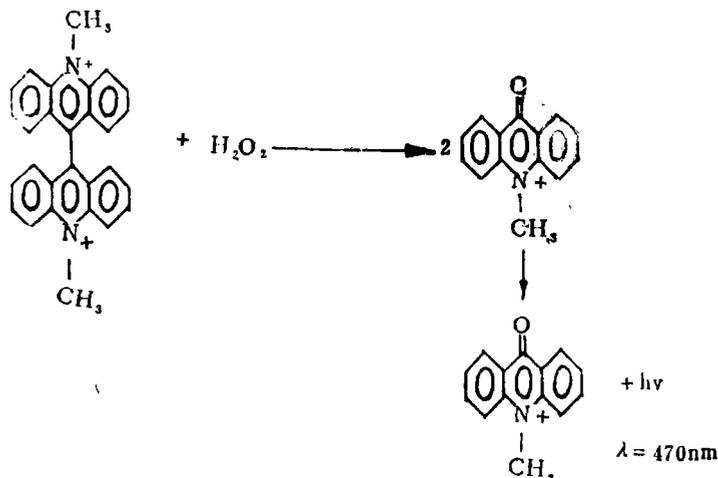
NO₂, NH₂, OH基团的苯的衍生物如硝基酚、氨基酚、苯三酚、二硝基酚、硝基苯胺、苯二胺等都能抑制鲁米诺-铜氨液-过氧化氢的化学发光。异构体对体系的发光强度有不同影响,苯的二取代物异构体的抑制次序为:邻位>对位>间位。利用这些差异可分析二元络合物,尤其是用于某些芳香族化合物反应中异构体百分产率的测定。苯的三元取代物的异构体对鲁米诺化学发光反应的淬灭作用,同样可以加以区别。

在水生生物研究中,酚的化学发光测定已用于研究微生物藻类在各个生长阶段分泌物中酚的含量。

葡萄糖在特定的酶催化下,可生成H₂O₂,然后与鲁米诺等发光物质反应,可间接测定葡萄糖含量。该方法将酶的特效性与化学发光的灵敏性结合起来,能达到相当高的选择性和灵敏度,为临床上迅速测定生物组织中微量葡萄糖含量,提供了一种新的手段。

2 光泽精 (Lucigenin)

光泽精 (N, N-二甲基吡啶硝酸盐), 在碱性溶液中与过氧化氢反应可生成电子激发态的N-甲基吡啶酮产生蓝绿色的化学发光, 最大发光波长为470 nm, 这一反应可受多种离子的催化或抑制, 借此可测定这些离子。其化学反应可表示为:

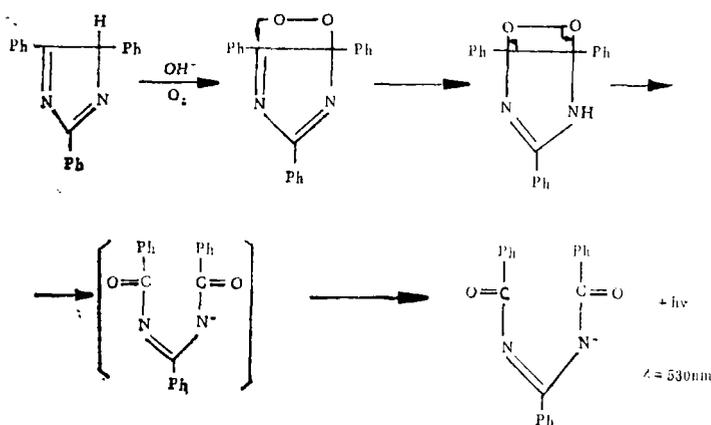


它的量子产率介于0.01~0.02之间。某些物质如丙酮、甘油、尿素、抗坏血酸等的存在会使光泽精的化学发光增强, 这可能是由于溶剂化作用或氢键的生成引起的。利用上述反应可测定金属离子^[2, 24]。已经证明许多吡啶盐在碱性溶液中被氧化时也有类似行为, 这类化合物都是非水溶性的, 但如果在乙腈等能与水混溶的溶剂存在下, 可将其制成水溶液, 有利于进行化学发光分析。

利用光泽精-过硼酸钠化学发光体系还可测定神经性毒气磷酸乙脂, 其灵敏度为 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[25]。

3 洛粉碱 (Lophine)

洛粉碱 (2, 4, 5-三苯基咪唑), 是属芳基咪唑类化合物, 是最常用的化学发光试剂之一。在碱性介质和氧化剂存在下, 它的发光机理可能是经氧化后先生成过氧化物, 然后重排生成一种双氧基化合物, 最后分解发光。反应历程为:



该反应的 λ_{max} 取决于所使用的荧光剂性质。荧光剂的作用可能是对中间体能量释放起催化作用, 而使荧光剂本身被激发。这样, 利用 TCPO 可直接测定 H_2O_2 和反应中能定量产生 H_2O_2 的许多物质。

过氧草酰发光体系用于无机离子和有机化合物的分析均属刚刚起步。由于荧光剂的种类很多, 不同荧光基团具有不同的发光光谱, 同时, 金属离子对不同基团具有不同的作用, 这两种优势结合, 可大大提高反应的选择性。另外, 这类反应的量子效率很高, 灵敏性必然很高, 如果能克服该类化合物的制备、稳定以及所用发光反应中荧光剂的溶解问题, 那么, 该体系在化学发光分析中的应用必将取得很大发展。

6 其它发光剂

除上述5种发光剂外, 还有没食子酸(Ga)、罗丹明B(RDB)、连苯三酚(Pg)、对-氯苯甲酸-5-溴水杨叉酰肼(BSHCBA)、苏木色精(hematoxylin)5种发光剂。利用它们可测定的金属离子有: $Co(II)^{[43]}$, $Mn(II)$, $Cd(II)$, $Pb(II)^{[44]}$, $Ag(I)^{[45]}$, $Cr(VI)^{[46]}$, $Ir(IV)$ 、 $Os(VIII)$ 、 $Ru(IV)^{[47]}$ 等。非金属有: $S^{2-}[48]$ 、 $O_3^{[49]}$ 、甲醛^[50]等。测定的灵敏度分别为: 0.5, 400, 800 ppb; 1 ppm; $3 \times 10^{-6} mol/L$; 28, 0.2, 5, 10ppb; 500ppt; 1, 1 ppb。

上述10种发光剂在目前分析化学中应用较多, 不太常用的还有许多。如黄素单核苷酸(FMN)、硫酸双胍酰肼(DHOZ)、叠氮化合物等。由于它们在化学发光反应机理上的差异, 因而在特定的反应条件下能各显优势、互有长短。严格讲, 很难说谁更重要。在具体分析中, 可根据情况选择使用。

表4 TCPO化学发光反应测定的物质

无机物	检测限 (mol/L)	有机物
H_2O_2 [36]	2×10^{-7}	多环芳胺类 [39]
Mo (VI) [37]	1×10^{-4}	葡萄糖 [40]
V (V) [37]	1×10^{-4}	甲醛 [41]
Cr (VI) [37]		甲酸 [41]
Zn (II) [38]	8pg	丹磺酰类 [42]

参 考 文 献

- White E H, Bursey M M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86: 941
- 章竹君. 冶金分析, 1983, 3 (4): 49
- Ibid. *Meth. Enzymol.*, 1981, 73: 608
- Pratt J J et al. *J. Immunol. Methods*, 1978, 21: 179
- Schoeder H R et al. *Clin.*, 1979, 23: 1132
- Ibid. *Anal. Chem.*, 1976, 48: 1933
- Patel A et al. *Anal. Biochem.*, 1983, 129: 162
- Kohen F, Pazzagli M, Kim J B et al. *Storoids.*, 1980; 36: 421
- Olsson T G et al. *J. Immunol. Meth.*, 1979, 25: 127
- Deluca N et al. *Trends. Anal. Chem.*, 1982, 1: 225
- Ponomarenko A A et al. *J. Gen. Chem.*, USSR, 1965, 35: 750
- Ibid. *Idem.*, 1965, 35: 2252

- 13 Lukovskaya N M et al. *J. Anal. Chem.*, USSR, 1969, 24 : 1512
- 14 Neafeld H A et al. *Anal. Biochem.*, 1965, 12 : 303
- 15 Goldenson J. *Anal. Chem.*, 1957, 26 : 877
- 16 Weber K et al. *Arch. Hig. Reda.*, 1958, 9 : 325
- 17 Ponomarenko A A et al. *J. Anal. Chem.*, USSR, 1964, 19 : 1300
- 18 Lukovskaya N M et al. *Ibid.*, 1971, 26 : 1642
- 19 贾生华, 章竹君. 化学世界, 1983, 24 (7) : 204
- 20 Лемровская Н А И ДР. *ЖАХ*, 1982, 37 (10) : 1785
- 21 Pantel S et al. *Anal. Chim. Acta.*, 1975, 74 : 275
- 22 袁进华, 曹金鸿. 分析化学, 1985, 13 (10) : 764
- 23 袁进华, 曹金鸿. 分析化学, 1985, 13 (8) : 640
- 24 张帆, 陈玉龙. 分析试验室, 1987, 6 (4) : 44~54
- 25 Weber K et al. *Arch. Toxicol.*, 1965, 21 : 38
- 26 Zhuravleva Q S et al. *Izv. Akad. Nauk.*, USSR, 1978, 8 : 1755
- 27 C A. 1983, 98 : 190911
- 28 Kenny F Kurtz R B. *Anal. Chem.*, 1950, 22 : 693
- 29 Kenny F, Kurtz R B. *Anal. Chem.*, 1953, 25 : 1550
- 30 Kenny F, Kurtz R B. *Anal. Chem.*, 1956, 28 : 1206
- 31 Buzas I, Erdey L. *Talanta.*, 1963, 10 : 467
- 32 Kenny F, Kurtz R C, Vandenoever A C et al. *Anal. Chem.*, 1964, 36 : 529
- 33 张帆, 陈国南. 分析化学, 1985, 13 (10) : 790
- 34 C A. 1983, 99 : 186598
- 35 Candross E A. *Tetrahedron, Lett.*, 1963 : 761
- 36 Williams D C et al. *Anal. Chem.*, 1976, 48 : 1478
- 37 Holzbecher Z et al. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1982, 47 : 1606
- 38 Ригин В И. *ЖАХ*, 1979, 34 : 680
- 39 Sigvardson K W. *Anal. Chem.*, 1984, 58 : 1096
- 40 Williams D C et al. *Anal. Chem.*, 1976, 48 : 1003
- 41 Ригин В И. *ЖАХ*, 1981; 36 (8) : 1582
- 42 Curtis T G et al. *J. Chromatogr.*, 1977, 134 : 343
- 43 Miller R J et al. *Talanta.*, 1982, 29 : 303
- 44 Stieg S et al. *Anal. Chem.*, 1977, 49 : 1322
- 45 Stieg S et al. *Anal. Chem.*, 1980, 52 : 800
- 46 张帆, 陈玉龙. 分析试验室, 1986, 5 (6) : 1
- 47 Golovina A P et al. *Struct. Bonding.*, 1981, 47 : 94
- 48 Burgura J L et al. *Talanta.*, 1980, 27 : 309
- 49 Van Dijk J F M et al. *Environ. Pollut. Manage.*, 1978, 9 : 42
- 50 Paul D B. *Talanta.*, 1978, 25 : 377

Ten Important Luminescence Reagents of Chemiluminescence Analysis and Their Application

Hu Shibin Feng Guiying

(*Department of Basic Course*)

Guan Di Li Xianwen Gao Xiangyang

Abstract In this paper, the structures, luminescence properties and applications of luminol, lucigenin, lophine, siloxene and TCPO were introduced. The applications in analytical chemistry of Ga, RDB, Pg, Hcm and BSHCBA were also described. In addition, the paper gave a brief review on the future development of chemiluminescence analysis.

Subject words chemiluminescence analysis, luminescence analysis, application, survey / luminescence reagent