

电致化学发光研究的新材料和新方法*

罗 峰¹ 林志杰² 陈 曦^{2**}

(1. 福建省计量科学研究院 福州 350003;

2. 厦门大学化学化工学院化学系 厦门 361005)

摘 要 由于方法的使用范围广、光学系统简单和操作容易,电致化学发光(ECL)得到人们的广泛重视。随着对 ECL 研究的深入,ECL 研究所涉及的领域和层面已有很大的扩展,特别是近十年来,ECL 研究发展更为迅猛。除 ECL 理论研究外,为了适应分析检测的应用的需求,ECL 在新材料、新实验技术和方法方面出现了许多的研究报道。本文综述最近几年来 ECL 研究在新材料应用和新实验技术的开发方面的一些进展,包括纳微米材料和量子点材料在 ECL 方面的研究,同时对固态 ECL 和基于三原色(RGB)机理的可视化 ECL 研究进展,进行了一些讨论。最后,综述展望纳米和量子点材料修饰电极 ECL 的研究和应用的前景。

关键词 电致化学发光 新材料 新方法

中图分类号: O667.39 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2011)12-2588-10

Novel Materials and Approaches for Electrochemiluminescence Studies

*Luo Feng¹ Lin Zhijie² Chen Xi^{2**}*

(1. Fujian Research Institute of Metric Science, Fuzhou 350003, China;

2. Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering,
Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Electrochemiluminescence (ECL) approaches have been received great attention due to their versatility, simplified optical setup, and good temporal and spatial control. With the extension of ECL study, ECL has been applied in a lot of fields, and got great development in recent ten years. Besides their theory studies, to meet the ECL analytical applications, there have been many reports on new materials and approaches for ECL study. In this review, we focus on the ECL applications of new materials and techniques and summary the recent development of ECL, including nano-micro and quantum dot materials for ECL studies. In addition, solid-state ECL and visible ECL approaches based on red-green-blue (RGB) tri-color system are also discussed. Finally, the prospect of ECL studies and applications using nano or quantum dot modified electrodes is presented.

Key words electrochemiluminescence; new materials; new approaches

Contents

1 Introduction

2 New ECL materials

2.1 Metal complexes

2.2 Nano-micro materials based on Ru complexes

2.3 Quantum dot materials for ECL

3 New development of ECL techniques

3.1 Solid-state ECL

3.2 New approaches of ECL for bio-analysis

3.3 Visible ECL technique

4 Conclusions and outlook

收稿: 2011 年 3 月,收修改稿: 2011 年 5 月

* 国家自然科学基金面上项目(No. 21175112)资助

** Corresponding author e-mail: xichen@xmu.edu.cn

1 引言

电致化学发光 (electrogenerated chemiluminescence, ECL) 是指发光物质在电极表面经由电化学和化学反应后, 形成高能的激发态, 再经弛豫而产生光的过程。ECL 由电化学反应激发产生, 无需外界激发光源, 因此该方法具有低信号背景和高灵敏度的特点。由于发光过程是由所施加的电压控制的, 该方法具有很强的可控性。另外, ECL 强度与共反应物浓度成正比, 因此 ECL 方法被广泛地应用于分析检测中, 并逐渐发展成为分析化学的一个重要的分支。近年来对其研究和应用也有一些综述报道^[1-3], 如 Xu 等对 ECL 的现象、发光机理和应用^[1], 特别是联吡啶钌配合物的 ECL 研究进行了比较全面的综述^[2]。ECL 的发光过程涉及到发光物质在电极表面的电化学反应以及中间产物的化学反应, 根据发光过程电位控制的方法以及参与发光反应的物质种类, 可以将 ECL 方法分成两类: 湮灭型 ECL (annihilation ECL) (图 1, 途径 a) 和共反应物参与型 ECL (coreactant ECL) (图 1, 途径 b)。对湮灭型 ECL, 方法是在电极表面施加一交变电压脉冲, 使在电极表面迅速形成发光物质的氧化态 (自由基) 和还原态 (自由基)。氧化态和还原态产物在发生湮灭反应后, 形成发光物质的激发态, 再经弛豫后发光。而对共反应物参与型 ECL 的电氧化过程中, ECL 试剂与共存物质同时氧化, 共存物迅速被氧化为高能自由基中间态, ECL 试剂与该高能自由基发生反应, 形成激发态, 经弛豫而发光。这种共反应物参与型的 ECL 过程为“氧化-还原”型。该种类型的共反应物最为典型的反应体系为三丙基胺 (tripropylamine, TPA)-联吡啶钌的反应体系^[3]。Xu 等还发现了具有很高检测灵敏度并对环境绿色友好的共反应物—二丁氨基醇^[4]。由于共反应物的存

在可以极大增强 ECL 的强度, 并且产生的光强与共反应物的浓度相关, 因而, 该类型的 ECL 被广泛地应用于分析检测中。

2 新型 ECL 材料

2.1 金属配合物

在所有 ECL 化合物中, 联吡啶钌是应用最为广泛的试剂之一。它能够溶解于水相和有机相中, 其 ECL 效率是钌配合物中最高的。由于联吡啶钌激发态寿命短, 其激发态在被氧猝灭之前, 就已经弛豫到基态, 发光基本不受氧浓度的影响, 在有氧存在的情况下, 联吡啶钌也具有很强的 ECL 信号。但联吡啶钌类配合物的发射波长在 600nm 左右的窄波段内, 在 ECL 的应用中, 检测通量较低, 很难实现多组分的同时检测, 这在很大程度上限制了 ECL 分析方法的应用。由于分析应用对 ECL 试剂发光波段的新需求, 人们在不断地合成新的 ECL 试剂。Mark M. Richter 在 Allen J. Bard 主编的 *Electrogenerated Chemiluminescence* 一书中^[5] 曾指出, 如果能够合成不同波段发光的 ECL 试剂, 就能够实现单一样品中多组分的同时检测, 这成为人们寻找不同金属配合物的主要原因。

由于有机发光二极管材料 (organic light-emitting diodes, OLEDs) 可在电激发下发光, 因此人们在研究过程中, 选用了很多不同金属离子作为中心离子的发光材料进行 ECL 研究。如 Al、Cr、Cu、Eu、Ir、Mo、Os、Pd、Pt、Re 和 Ru 等^[6]。但是, 在这些金属配合物中, 大多数的 ECL 都处于红光波段, 仅有少数在绿光范围, 如铝配合物^[7,8]、铈配合物^[9,10]。2000 年, Gross 等选用了三-(8-羟基喹啉) 合铝作为 ECL 的研究对象^[7]。他们发现, 在乙腈/水 (50/50, v/v) 体系中, 该试剂在 510nm 左右发光。但是与联吡啶钌相比其发光效率很低, 仅为联吡啶钌的发光效率的万分之九。另外由于三-(8-羟基喹啉) 合铝在水中不能溶解, 因而其应用价值很低。但是三-(8-羟基喹啉) 合铝在 ECL 中的研究, 为其在 OLEDs 的应用提供了理论基础。2003 年, Muegge 等^[8] 在此基础上进行了一些改进。为了提高铝配合物试剂在水溶液中的溶解性, 他们将配体羟基喹啉磺酸化, 得到可溶于水的三-(8-羟基喹啉-5-磺酸) 合铝盐, 其 ECL 波长为 499nm, 与其荧光发射波长相似。虽然获得了水溶性的 ECL 试剂, 但是在相同条件下, 该试剂在水溶液中的发光效率只有联吡啶钌的千分之二。

同样作为一个在 OLEDs 中有较多应用的发光

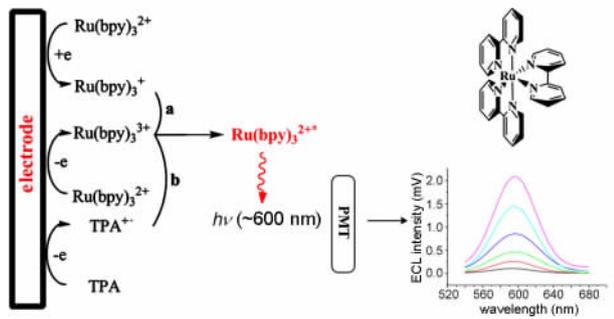


图 1 电致化学发光原理示意图

Fig. 1 Diagram of the ECL reaction mechanism

试剂, 铱配合物最大的特点就是能够通过调节配体组分或者改变配体, 使化合物的发光范围从蓝色到红色波段^[11-14]。这个特点引起了人们研究铱配合物 ECL 性能的兴趣。Bruce 等^[9]着重研究了 $\text{Ir}(\text{ppy})_3^{3+}$ (图 2a)。研究表明, 该染料的 ECL 最大发光波长为 517nm, 与其荧光发射波长相近。以 TPA 为共反应物, 在乙腈溶液中, 可以获得较高的发光效率, 达到联吡啶铱的发光效率的三分之一, 并且其氧化电位小于 1.0V, 远远小于联吡啶铱。但是 $\text{Ir}(\text{ppy})_3^{3+}$ 在水溶液中发光效率很低, 不及联吡啶铱的千分之一。为了进一步了解铱配合物的 ECL 性能, Muegge 等^[8]通过改变铱的配体, 比较详细地研究了两种铱配合物的发光情况。研究表明, $\text{F}(\text{Ir})\text{pic}$ (图 2b) 的发光波长为 470nm, 水相中的发光效率为联吡啶铱的千分之五; $(\text{btp})_2\text{Ir}(\text{acac})$ (图 2c) 发光波长为 600nm, 水相中的发光效率约为联吡啶铱的千分之二。结合之前研究的 $\text{Ir}(\text{ppy})_3^{3+}$, 铱配合物覆盖从蓝光到红光的波段, 这为实现同一样品不同组分的同时分析检测提供了一定的基础, 同时由于铱配合物的发光电压较低, 使其在生化检测应用中优于联吡啶铱, 但铱配合物在水相中的溶解度和发光效率都较低, 影响其检测灵敏度, 并限制了其应用。

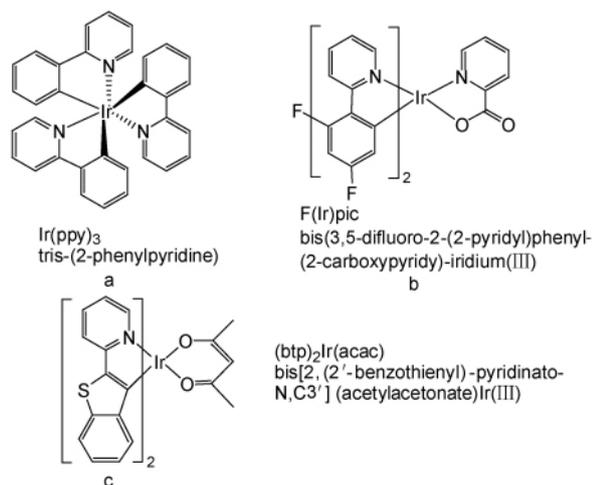


图 2 铱配合物结构

Fig. 2 Molecular structures of Ir complexes

最近 Zanarini 等^[15]将铱配合物包埋在 PEG-硅球中, 从而避免了氧对该类化合物高效的猝灭, 并且解决了其在水相中的溶解度问题, 获得了比较好的发光效果。这些改进为联吡啶铱类化合物以外金属配合物的应用提供了一些可能。

联吡啶铱类化合物具有很高的 ECL 发光量子

产率, 人们为克服其发光无选择性的缺点, 也尝试着在其配体上进行一些改进, 以提高选择性。其中最为典型的例子就是在配体上增加一个冠醚基团^[12-14]。该方法使联吡啶铱类化合物的 ECL 具有一定的选择性, 并使该化合物能够检测非共反应物类型的金属离子, 为 ECL 的应用拓宽了空间。

最早将冠醚基团引入联吡啶铱配体的是 Muegge 等^[16]及 Lai 等^[17]。他们发现在联吡啶铱的配体中引入冠醚基团后, 联吡啶铱的 ECL 会受到一些金属离子的影响, 如 Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ 。当上述离子加入到稳定的 ECL 体系中时, 会使联吡啶铱的发光增强, 并且增强程度与其浓度相关^[18]。目前, 金属离子增强冠醚型铱配合物发光的机理还不是非常清楚, 但是冠醚型铱配合物对金属离子选择性的响应以及其发光变化与金属离子浓度相关的特点, 使其在分析化学中具有较大的应用价值, 特别对金属离子 Na^+ 、 K^+ 等的检测具有十分重大的意义。

2.2 基于铱配合物的新型微纳米材料

联吡啶铱类化合物的发光效率、溶解性及其可循环利用的特点使联吡啶铱类化合物在 ECL 研究及应用中受到极大的关注。但随 ECL 分析技术的发展和推广以及纳米科学的发展, 溶液相中联吡啶铱的应用已经不能满足人们的需求。为了获得发光更强更为灵敏的材料, 合成基于联吡啶铱类化合物的纳米材料成为了近十年研究的一个热点。

在诸多的纳米材料中, 张丽华等合成的掺杂联吡啶铱的纳米硅球 (RuDS)^[19] 最具代表性。他们利用反相胶束法 (reverse micelle) 一锅法合成 RuDS, 方法简单方便, 24h 的反应就可以合成 40nm 左右的 RuDS 固体。由于联吡啶铱离子带正电荷而纳米硅球网格带负电荷, 联吡啶铱很难从 RuDS 中泄漏, 从而保证 RuDS 修饰的电极具有很好的稳定性。由于单个 RuDS 可以固定很多联吡啶铱分子, 在纳米材料中富集了高浓度的联吡啶铱, 因此 RuDS 修饰的电极具有很低的 ECL 检测限, 对三丙基胺 (TPA) 其检测限达 2.8nM。众所周知, 二氧化硅是一种生物相容性很好的材料, 并且二氧化硅材料表面有着丰富的含氧基团, 因而可以很容易在二氧化硅表面修饰所需基团, 进行进一步的应用。Chen 等^[20]在合成 RuDS 的基础上, 在 RuDS 表面氨基化后连接酒精脱氢酶, 实现了对酒精的高灵敏度测定。张丽华在之前的工作基础上, 进一步合成了具有磁性核的 RuDS, 这使得 RuDS 的固定或者收集更为便捷, 为 RuDS 的应用拓宽了道路 (图 3)^[21]。

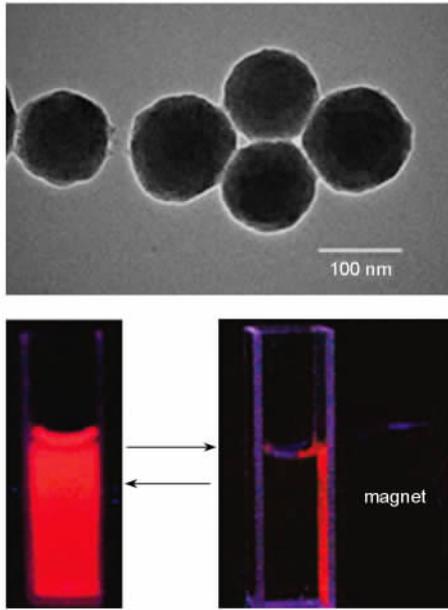
图 3 磁性 RuDS 透射电镜图以及 ECL 图^[21]

Fig. 3 TEM image of magnetic RuDS and corresponding ECL image^[21]

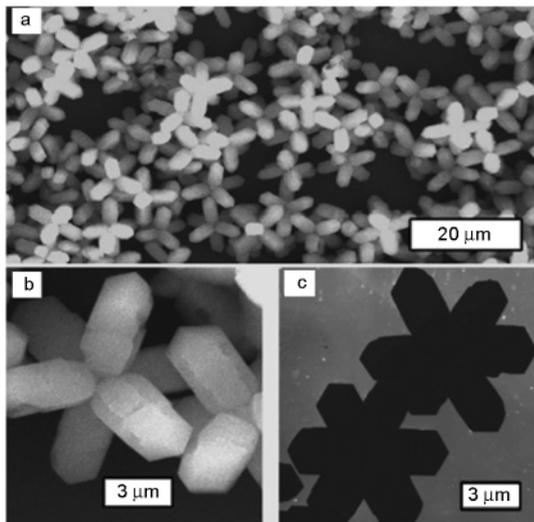
图 4 联吡啶钌亚铂酸盐超分子扫描电镜图^[22]

Fig. 4 TEM images of the super molecular structure of Ru complex^[22]

近几年,人们也合成了一些联吡啶钌类配合物的超分子结构化合物,如董绍俊等^[22]简单地将 H_2PtCl_6 溶液与联吡啶钌的水溶液混合,并控制两者比例,获得了不同形状的联吡啶钌亚铂酸盐的超分子结构(图 4)。该产物具有很好的 ECL 性能。Yu 等^[23]则是将非水溶性的 Ru-LC(图 5a)分散在乙腈中,再迅速注射到水中,沉降过夜后得到 Ru-LC 非水溶性的亚纳米带(图 5b)。该结构具有很强的 ECL 性能,肉眼可感知其发光(图 5c)。

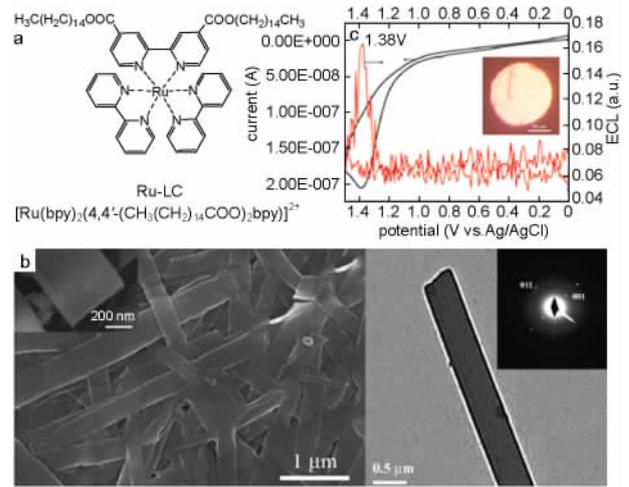
图 5 Ru-LC 化学结构和形貌图^[23]。(a) 化学结构图;(b) 纳米带扫描电镜图;(c) ECL 图谱

Fig. 5 Images related to Ru-LC^[23]: (a) molecular structure; (b) TEM images of nanobelts; (c) ECL images

2.3 量子点 ECL 材料

如果说寻找以及合成新的金属配合物,仅仅是在传统的 ECL 领域里寻找所需要的或更好的发光试剂,那么 Bard 等在 2002 年 *Science* 上发表的“Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence from Silicon Nanocrystal Quantum Dots”则开辟了一个 ECL 材料的全新领域,让人们耳目一新,迅速引起了广泛的关注^[24]。

在量子点应用于 ECL 之前,量子点已因具有发光效率高、激发谱带宽、发射谱带窄、发光波长随尺寸可调等突出的特点,而被广泛应用于荧光分析中。对于体相半导体材料,其电子能带是由存在能级差的价带和导带组成,而价带和导带是准连续能级,所以无法以光的形式辐射能量。但是当半导体材料的尺寸接近其玻尔半径时,由于量子限域效应,连续能带变成具有分子特性的分立能级结构。因此光学行为与某些有机分子很相似,从而可以发射荧光。

ECL 研究中使用的染料都是荧光分子,并且在 ECL 过程中产生的染料激发态与该染料因光照产生的激发态是一致的。可能是由于这样的联系,使 Bard 小组的 Ding 等在考察所合成的硅量子点晶体性能时,也测试了其 ECL 性能^[24]。在研究中,Ding 等发现了硅量子点得到一个电子与失去一个电子的能差随着量子点尺寸的减小而增大。而在施加交变电压的过程中,得电子而带负电荷的硅量子点与失电子而带正电荷的硅量子点间的电子转移(或者说电子和空穴的湮灭反应)产生了 640nm 左右的可见

光类似于湮灭型 ECL。同样,硅量子点也能够产生类似于共反应物参与型的 ECL。实验中,Ding 等还发现硅量子点的 ECL 波长(640nm) 相对其荧光发射波长(420nm) 发生了较大的红移。他们认为硅量子点的荧光是硅核的荧光,而硅量子点的 ECL 则是受激量子点经弛豫后产生的表面态发光(图 6)。这个发现在 Myung^[25] 以及 Bae 等^[26] 的后续工作中得到进一步的证实。他们对比了具有核壳结构的 CdSe/ZnSe 和无核壳结构的 CdTe 的 ECL 行为,发现具有核壳结构的量子点其 ECL 波长相对荧光波长有非常明显的红移,而无核壳结构的量子点则相对较小。这个现象说明了表面势阱大的结构,ECL 波长红移大,反之,红移则小。从而证明了量子点的 ECL 是表面态发光。这些重要发现说明,并非只有传统的染料才能够产生 ECL,同时,量子点的 ECL 可能存在与传统的染料不一致之处。

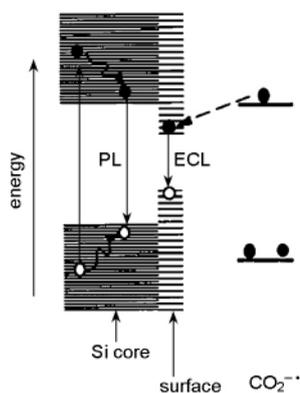


图 6 硅量子点的 ECL 原理示意图^[24]

Fig. 6 Principle of the silicon nanoparticle ECL^[24]

在 Bard 小组研究的启发下,人们展开了对不同量子点 ECL 性能及其应用的研究。鞠焯先小组仔细研究了 CdSe/双氧水水溶液体系^[27-28] 以及 CdTe/邻苯二酚衍生物水溶液体系的 ECL 原理^[29] 及其简易的电化学合成方法^[30],并分别将两个体系应用于氧化酶的底物检测^[28] 以及多巴胺和肾上腺素的检测^[31]。朱俊杰等将 CdS 量子点应用于高灵敏度地检测低密度脂蛋白,其检测限为 0.006ng/ml^[32],并合成了 CdS 量子点修饰的碳纳米管,将其应用于检测胆碱和乙酰胆碱,其检测限为 0.8 和 1.7 μM^[33]。

除了常规的量子点 ECL 研究,不同构型的纳米半导体的 ECL 性能也引起了人们的关注。朱俊杰等应用牺牲模板法合成了 CdS 纳米管,具有很强的 ECL 性能^[34],还建立了树枝状的 CdO 纳米晶体的合成方法,并发现不同形状的 CdO 纳米晶体具有不

同的 ECL 性能^[35]。Guo 等合成了 CdSe 的纤维状纳米晶体,但其 ECL 性能一般^[36]。

虽然半导体量子点具有很好的 ECL 性能,但其毒性不可忽视,要将其直接应用于活体检测有很大的困难,因而找出一种具有 ECL 能力并且毒性小的替代物有着重大的意义。2009 年,池毓务等^[37] 及 Zhu 等^[38] 分别报道了应用电化学法和微波法制备了水溶性碳量子点晶体,并发现了碳量子点晶体的 ECL 性能。由于碳量子点具有很好的水溶性和生物兼容性以及较低的制备成本,因此碳量子点有可能在 ECL 的研究应用中得到进一步的发展。

3 ECL 分析技术的新发展

近 30 年来,由于 ECL 技术的发展,该方法在分析精度、灵敏度以及实用性上都得到很大的提高。其中对 ECL 方法影响最为深远的就是固相 ECL (solid-state electrochemiluminescence) 技术的提出和发展,近年的 ECL 研究很多都集中于固相 ECL 技术,并开始出现可视化检测的研究报道。此外,ECL 与高效液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE) 联用技术的发展以及在生物分析技术等方面的发展,也为 ECL 的应用拓宽了道路。

3.1 固相 ECL 技术

传统的 ECL 分析方法是流动注射分析法。该方法将 ECL 试剂与目标分析物同时溶解于水溶液中,再由流动系统输送到电极表面进行分析,因此所使用的发光试剂无法回收,这对一些可循环利用的 ECL 试剂是很大的浪费,也提高了分析成本。针对这个问题,人们提出将 ECL 染料固定在电极表面的想法。目前,文献报道的方法主要有 Langmuir-Blodgett(LB) 技术、自组装膜技术、离子交换聚合物膜技术及溶胶-凝胶技术。

Bard 等最早报道了利用 LB 技术将发光试剂固定在电极表面的 ECL 研究^[39]。他们利用具有表面活性剂性质的联吡啶钌衍生物在电极表面制备了有序单分子层,并实现了其 ECL 的性能。该方法虽然实现了联吡啶钌的固定,但是由于修饰层仅靠物理吸附,很容易被溶剂破坏,特别是被有机溶剂破坏,稳定性不高,从而限制了其应用。此后,该课题组^[40] 同样利用联吡啶钌巯基化的衍生物,使用自组装技术将其固定在金电极表面,并获得了 CCD 可捕获的 ECL 信号。但是,由于巯基的存在,该修饰层很容易在电氧化过程中被破坏,导致电极不稳定,因此其应用也受到一定的限制。虽然还有其他的自组

装方法实现固相 ECL^[41, 42], 但是同样由于在正电压扫描过程中, 电极修饰层不稳定, 从而限制了这类传感器在 ECL 分析中的应用。

在固相 ECL 技术中, 具有一定实用价值的是离子交换聚合物膜技术以及溶胶-凝胶技术。这两类技术都是用很稳定的聚合物膜将发光试剂固定在电极表面。由于能够固定大量的发光试剂, 所制备的修饰电极通常具有较高的灵敏度和较低的检测限。Bard 小组的 Rubinstein 最早将离子交换聚合物膜——Nafion 应用于固相 ECL 的研究^[43]。他们将 Nafion 滴加在电极表面成膜后, 将电极浸泡在联吡啶钌溶液中进行离子交换吸附, 获得了具有较好 ECL 性能的修饰电极。Nafion 具有化学稳定性高、耐热性好、不溶于水、导电性好等特点, 并对大型阳离子有很强的吸附作用, 因此 Nafion 非常适用于固定联吡啶钌, 并应用于水溶液体系检测。在 Rubinstein 的工作基础上, Downey 等^[44]将该修饰电极应用于草酸、烷基胺以及 NADH 等物质的检测中, 其检测限分别可达到 $1\mu\text{M}$ 、 10nM 和 $1\mu\text{M}$, 线性范围为 4 个数量级, 并进行了葡萄糖传感器的构建, 对葡萄糖的检测限达 $10\mu\text{M}$ ^[45]。虽然 Nafion 可以很好地固定联吡啶钌, 但是固定在 Nafion 中的联吡啶钌比较容易进入 Nafion 中非电活性的憎水区域, 从而失去其 ECL 的性能, 因而该方法中使用的修饰电极的稳定性和使用寿命尚需进一步提高。

溶胶-凝胶是一种光透性和生物相容性很好并且十分稳定的聚合物膜材料, 但是其导电性很差, 因此在固相 ECL 研究中溶胶-凝胶作为一种固定材料很少单独使用。在研究中, 人们经常将溶胶-凝胶作为一种辅助材料用于联吡啶钌的固定, 如二氧化硅溶胶-凝胶-Nafion 混合膜^[46]、二氧化钛溶胶-凝胶-Nafion 混合膜^[47]。用复合膜制备的联吡啶钌修饰电极与单独的 Nafion 膜相比, 其使用寿命有很大的提高。针对溶胶-凝胶导电性差的缺点, 在单独使用溶胶-凝胶作为固定材料时, 人们也尝试用其他的导电材料进行改进, 如使用 PSS^[48]、PSS/碳纳米管^[49]等, 也同样获得了比较好的效果。除使用溶胶-凝胶作为辅助材料外, 人们还使用碳纳米管^[50]、铂纳米颗粒^[51]来增强 Nafion 和 Eastman AQ55D 这些高聚物膜的稳定性和导电性, 并获得了很好的效果。Yang 等^[51]报道的方法甚至可以检测到 10^{-15}M 的三丙基胺。

除使用常规的膜技术之外, Lee 等^[52]及 Greenway 等^[53]报道了直接在联吡啶钌上衍生硅烷

基团, 从而在水解过程中直接将联吡啶钌衍生物固定在电极表面。该方法虽然可以获得稳定性比较好的修饰电极, 但是成本太高。董绍俊等则利用阳离子与阴离子稳定的纳米颗粒间会产生共沉降的特点, 将联吡啶钌与金纳米^[54]或铂纳米颗粒^[55]共沉降于电极表面形成较为稳定的修饰电极, 但由于金和铂在电化学过程中很容易被氧化, 使用寿命受到限制。

与传统的流动注射法相比, 固相 ECL 在很大程度上节约了试剂, 提高了实验效率和实验的灵敏度, 降低了检测限, 使 ECL 方法器件化的可能性大大提高。在固相 ECL 的众多研究方法中, 使用高聚物膜固定发光试剂的方法最具有使用价值。因为膜固定法具有较高的稳定性、较长的使用寿命、简单而易于制备的特点, 并且成本较低。

3.2 ECL 技术在生物分析中的应用

由于具有低背景、高灵敏度的特点, ECL 分析方法已被应用于生化分析中。但是大部分的生物分子都不具有“共反应物”性能的官能团, ECL 在生化分析方面需要解决这一关键问题。

Miao 于 2008 年在 *Chemical Reviews* 上^[56]比较全面地总结了 ECL 在生化检测中的原理和应用。如图 7 所示^[56], 图中 (a)、(b)、(c) 是 DNA 检测, 图 (d)、(e)、(f) 是免疫检测方法, (g)、(h) 是酶活性的检测。DNA 的检测主要利用单链及其互补链的识别原理, 用发光试剂对作为信号报告部分的单链 DNA 进行标记, 在完成互补链识别后, 进行 ECL 检

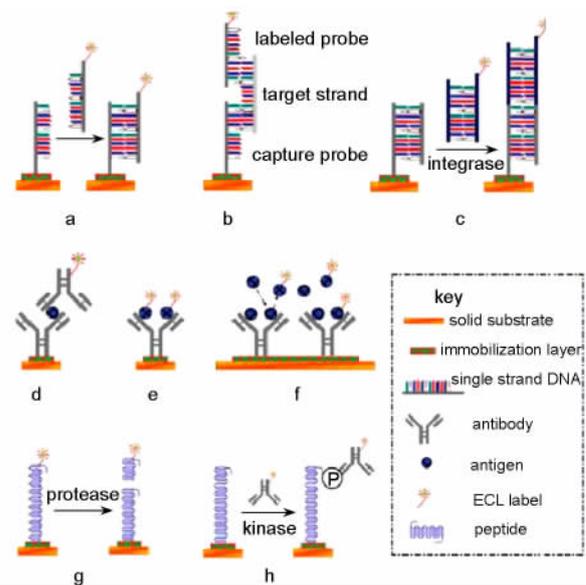


图 7 基于 ECL 的生化检测原理示意图^[56]

Fig. 7 Principle of ECL bioassays^[56]

测(途径 a、b)^[57-60]。也可以通过 DNA 整合酶,将信号报告部分的 DNA 双链与其相对的 DNA 双链整合在一起后,进行检测,从而判定目标分子是否存在并测定其含量(途径 c)。在免疫检测中,最为常见的就是三明治结构的测定原理(途径 d)。首先利用固定在电极表面的抗原(或抗体)捕捉待测的抗体(或抗原),然后,再与标记了发光试剂的抗原(或抗体)进行免疫反应,最后进行 ECL 检测,测定其含量^[58,61]。直接检测模式(途径 e)以及竞争检测模式(途径 f)都未能达到三明治模式的检测效果。在酶活性检测中,主要有两种模式:使用蛋白酶切割后 ECL 标记部分减少的猝灭模式(途径 g)和使用亲和酶反应后 ECL 标记部分增多的增强模式(途径 h)。两种方式都可以较好地表征酶的活性。

在生化分析中,提高方法的灵敏度、降低检测限十分重要。为了提高 ECL 在生化分析中的检测灵敏度,人们曾经尝试在同一个生物分子上通过多点标记方法,标记多个联吡啶钌分子。但是高标记量会造成生物分子的失活,甚至可能导致生物分子沉降。因此,如何在进行单点标记保持生物分子活性的同时,提高标记量是一个重要的课题。

Zhou 等^[62]首先提出使用含三个联吡啶钌基团的发光试剂进行标记的方法,实现了在传统方法条件下,提高发光试剂的标记量并保持生物分子活性。该方法虽然解决了上述问题,但其灵敏度提高有限,并且合成相应的联吡啶钌衍生物十分困难和复杂。在 Zhou 等的研究基础上, Miao 等提出将大量发光试剂联吡啶钌固定在聚苯乙烯球中,并在聚苯乙烯球上修饰相应的单链 DNA^[57]或者抗原(抗体)^[61],用于标记并测定相应的互补链 DNA 或者目标蛋白质。该方法大大提高了分析的检测限,最低可测得 1 fM 单链 DNA、10 ng/ml C-反应蛋白。但是该方法在检测时,需要使用有机溶剂将联吡啶钌释放出来,不适用于现有的 ECL 商业仪器。Zhan 等提出使用脂质体富集联吡啶钌,并在脂质体上进行修饰得到可用于识别并检测含量的脂质体。通过在检测过程中破坏脂质体释放联吡啶钌,可测得 100 ng/ml C-反应蛋白^[63]。该方法不需要使用有机溶剂,因此其适用面更广。Egashira 等应用该方法实现了在 50 L 样品中对 10^{-19} mol 的红细胞凝聚素含量的测定^[64],进一步说明了该方法的优越性。

除了提高单点标记的标记量,人们也尝试将联吡啶钌的共反应物——4-(dimethylamino) butyric acid (DMBA) 标记在生物分子上的方法。由于

DMBA 与生物分子有很好的生物兼容性,因此多点标记并不影响其活性。Yin 等将 DMBA 标记于牛血清白蛋白以及免疫球蛋白上,并通过金纳米颗粒提高电极表面对上述蛋白的负载能力,放大了反应,提高了检测限,获得较好的检测效果^[65]。

除了上述比较经典的检测方法之外,近年来,文献还报道了其他一些检测 DNA 的新方法。传统认为 DNA 的稳定结构是很难作为共反应物促进联吡啶钌的发光,但是 Rusling 小组^[66,67]发现 DNA 中的鸟嘌呤氧化后可形成自由基结构,并促进一些试剂的发光,实现了对 DNA 的简单测定以及 DNA 破坏程度的测定。Hu 等^[68]发现原本在水溶液中不能产生 ECL 的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$,在加入 DNA 后,由于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 进入到 DNA 二级结构中,避免了吩嗪基团受溶剂(即水)的影响,从而在水溶液中产生了很强的 ECL。他们将 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 与 ATP 适配子结合,用于检测 ATP 含量,获得了较好的效果。

3.3 ECL 可视化检测

在英语中有一句谚语“Seeing is believing”。意思是看到了真实的东西才能够相信。随着 ECL 分析技术应用的日益广泛,人们逐渐产生了对 ECL 可视化检测的需求。David 小组的 Szunerits 等首先使用了刻蚀的光纤构建了 ECL 微阵列,并实现了对小区间产生的 ECL 进行区分(图 8)^[69],但是当微阵列中所有的电极都产生 ECL 时,则很难进行区分。Arnaud 等进一步优化了 ECL 微阵列,实现了亚微米级的微小区域的 ECL 区分,并且避免了 David 等实验中的问题^[70]。

虽然这两个实验实现了可视化的 ECL 微阵列的构建,但是都只是理论层面的研究,尚未进行实际的应用。Rusling 小组的研究人员^[71,72]则第一次将可视化的 ECL 阵列应用于实际研究中。他们将不同的细胞色素 C P450 酶及相同的 DNA 固定在电极表面不同的位置,利用电荷耦合器件(CCD)检测器,在 ECL 分析中引入维度因子,从而提高检测通量。在分析中,他们实现了同时检测不同细胞色素 C P450 酶在代谢过程中对相同 DNA 的氧化破坏作用,获得了很好的效果。但是由于电极表面发光不均匀,他们利用 CCD 检测器所拍摄的 ECL 光斑亮度不均一,很难直接从图上读取所需信息,一般需要额外的数据处理。因此该方法还有进一步提高的空间。

除了常规的可视化检测,ECL 还被应用于扫描

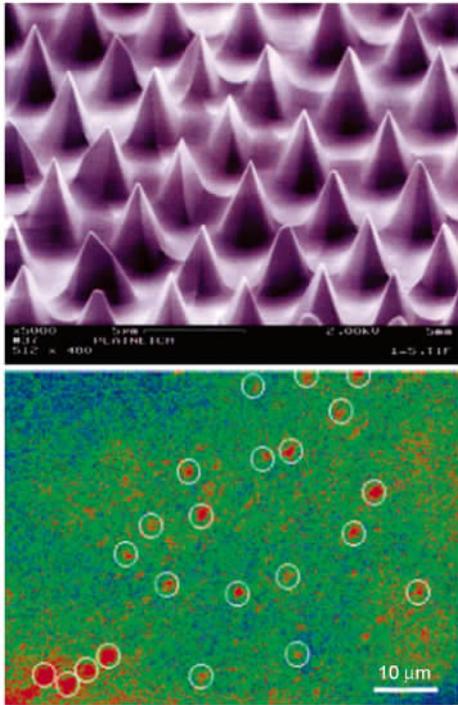


图 8 ECL 阵列及其实验效果图^[69]

Fig. 8 ECL arrays and corresponding image^[69]

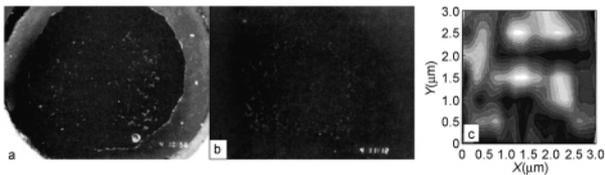


图 9 (a) 碳糊电极在光照下的荧光成像图^[73]; (b) 碳糊电极 ECL 成像图; (c) 基于 ECL 的扫描显微镜图^[77,78]

Fig. 9 (a) Fluorescence image^[73], (b) ECL image of carbon paste electrode and (c) Surface image obtained by ECL scanning microscopy^[77,78]

显微镜中,用于固体表面成像。自从 Engstrom 等^[73]在 1987 年第一次发现 ECL 方法能够比较准确地将电极表面状态成像后(图 9),ECL 被应用于扫描显微镜的研究,并发现 ECL 强度与电极和测试表面的距离成反比^[74],在高频交变电压下,ECL 现象主要集中在电极锐利的边缘^[75,76]。因此,在此基础上,人们设计并搭建了基于 ECL 的扫描显微镜,并成功地将其应用于复杂表面的成像(图 9c)^[77,78]。

最近,Chen 等^[79]利用三原色原理以及固相 ECL 方法,建立了一套比色 ECL 检测平台,首次将比色概念引入到 ECL 检测中。并利用该平台实现对 TPA 和赖氨酸(ECL 增强体系)以及多巴胺(ECL

猝灭体系)的比色检测(图 10)。由于构建的平台具有很强的 ECL 性能,检测基本可以用商品化的 CCD 实现,甚至肉眼可见,大大简化了传统的检测设备。

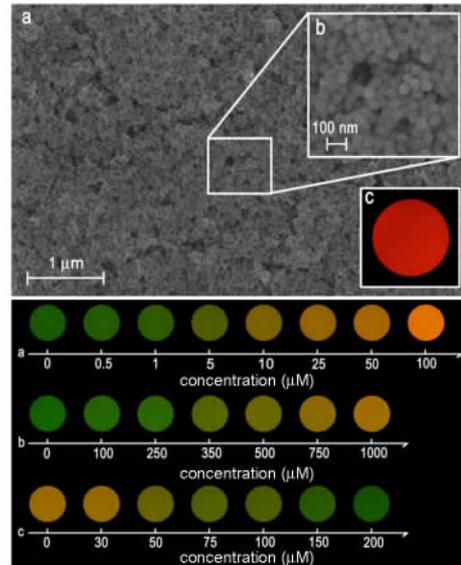


图 10 比色 ECL 的应用^[79]。上:(a),(b) RuSiNPs 修饰 ITO 玻片的 SEM 形貌,(c) CCD 相机获得的 ECL 信号;下:不同浓度下三丙基胺(TPA)(a)、脯氨酸(b)和多巴胺(c)

Fig. 10 Colorimetric ECL applications^[79]. top: (a), (b) SEM images of RuSiNPs modified ITO glass, (c) correspondent ECL image taken by a CCD camera; bottom: Color variation under different concentration of (a) TPA, (b) proline, (c) dopamine

4 展望

纳米和量子点材料修饰电极 ECL 的研究,将会大大拓宽 ECL 分析的应用范围。通过选择和合成具有一定分子识别能力的发光试剂,对提高 ECL 的选择性将发挥重要的作用。ECL 的可视化研究,将会大大推进 ECL 的成像技术的成熟,在多组分和高通量组分检测应用中也会担当重要的角色。和荧光方法相比,虽然 ECL 的成熟度和应用范围还有所欠缺,但其便捷的电化学控制和各种修饰电极的特点已经开始显现,相信新材料的研究和新方法的提出,将会进一步加速 ECL 的发展。

参考文献

- [1] Hu L Z, Xu G B. Chem. Soc. Rev., 2010, 39: 3275—3304
- [2] Li H J, Han S, Hu L Z, Xu G B. Chin. J. Anal. Chem., 2009, 37: 1557—1565
- [3] Chen X M, Su B Y, Song X H, Chen Q A, Chen X, Wang X R. TRAC-Trend Anal. Chem., 2011, 30: 665—676

- [4] Liu X Q, Shi L H, Niu W X, Li H J, Xu G B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46: 421—424
- [5] Bard A J. *Electrogenerated Chemiluminescence*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004
- [6] Ritcher M M. *Chem. Rev.*, 2004, 104: 3003—3036
- [7] Gross E M, Anderson J D, Slaterbeck A F, Thayumanavan S, Barlow S, Zhang Y, Marder S R, Hall H K, Flore N M, Wang J F, Mash E A, Armstrong N R, Wightman R M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 4972—4979
- [8] Muegge B, Richter M. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 1102—1105
- [9] Bruce D, Richter M G. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 1340—1342
- [10] Muegge B D, Richter M M. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 73—77
- [11] Grushin V V, Herron N, LeCloux D D, Marshall W J, Petrov V A, Wang Y. *Chem. Commun.*, 2001, 1494—1495
- [12] Baldo M A, Lamansky S, Burrows P E, Thompson M E, Forrest S R. *Appl. Phys. Lett.*, 1999, 75: 4—6
- [13] Adachi C, Baldo M A, Forrest S R, Lamansky S, Thompson M E, Kwong R. *Appl. Phys. Lett.*, 2001, 78: 1622—1624
- [14] Chen X, Liao J, Liang Y, Ahmed M O, Tseng H, Chen S. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 636—637
- [15] Zanarini S, Rampazzo E, Bonacchi S, Juris R, Marcaccio M, Montalti M, Paolucci F, Prodi L. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131: 14208—14209
- [16] Muegge B D, Richter M M. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 547—550
- [17] Lai R Y, Chiba M, Kitamura N, Bard A J. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 551—553
- [18] Li M, Chen Z, Zhu N, Yam V W, Zu Y. *Inorg. Chem.*, 2008, 47: 1218—1223
- [19] Zhang L, Dong S. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 5119—5123
- [20] Jia T T, Cai Z M, Chen X M, Lin Z, Huang X, Chen X, Chen G. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 25: 263—267
- [21] Zhang L, Liu B, Dong S. *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111: 10448—10452
- [22] Sun X, Du Y, Zhang L, Dong S, Wang E. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 2588—2592
- [23] Yu J, Fan F F, Pan S, Lynch V M, Omer K M, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 7196—7197
- [24] Ding Z, Quinn B M, Haram S K, Pell L E, Korgel B A, Bard A J. *Science*, 2002, 296: 1293—1297
- [25] Myung N, Bae Y, Bard A J. *Nano Lett.*, 2003, 3: 1053—1055
- [26] Bae Y, Myung N, Bard A J. *Nano Lett.*, 2004, 4: 1153—1161
- [27] Zou G, Ju H. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 6871—6876
- [28] Jiang H, Ju H. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 6690—6696
- [29] Liu X, Jiang H, Lei J, Ju H. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 8055—8060
- [30] Ge C, Xu M, Liu J, Lei J, Ju H. *Chem. Commun.*, 2008, 450—452
- [31] Jiang H, Ju H. *Chem. Commun.*, 2007, 404—406
- [32] Jie G, Liu B, Pan H, Zhu J, Chen H. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 5574—5581
- [33] Wang X, Zhou Y, Xu J, Chen H. *Adv. Funct. Mater.*, 2009, 19: 1444—1450
- [34] Miao J, Ren T, Dong L, Zhu J, Chen H. *Small*, 2005, 1: 802—805
- [35] Wang X, Xu J, Chen H. *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112: 7151—7157
- [36] Guo X, Zhang S, Jiang B, Jin B, Tian Y. *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112: 17899—17905
- [37] Zheng L, Chi Y, Dong Y, Lin J, Wang B. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131: 4564—4565
- [38] Zhu H, Wang X, Li Y, Wang Z, Yang F. *Chem. Commun.*, 2009, 5118—5120
- [39] Miller C J, McCord P, Bard A J. *Langmuir*, 1991, 7: 2781—2787
- [40] Obeng Y S, Bard A J. *Langmuir*, 1991, 7: 195—201
- [41] Wang H, Xu G, Dong S. *Talanta*, 2001, 55: 61—67
- [42] Bi L, Wang H, Shen Y, Wang E, Wang E, Dong S. *Electrochem. Commun.*, 2003, 5: 913—918
- [43] Rubinstein I, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102: 6641—6642
- [44] Downey T, Nieman T A. *Anal. Chem.*, 1992, 64: 261—268
- [45] Martin A F, Nieman T A. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 281: 475—480
- [46] Khramov A N, Collinson M M. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 2943—2948
- [47] Choi H N, Cho S, Lee W. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 4250—4256
- [48] Wang H, Xu G, Dong S. *Analyst*, 2001, 126: 1095—1099
- [49] Tao Y, Lin Z J, Chen X M, Chen X, Wang X R. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 594: 169—174
- [50] Guo Z, Dong S. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 2683—2688
- [51] Du Y, Qi B, Yang X, Wang E. *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110: 21662—21666
- [52] Lee J, Lee S, Kim M, Kim H, Kim D, Lee W. *Chem. Commun.*, 2003, 1602—1603
- [53] Greenway G M, Greenwood A, Watts P, Wiles C. *Chem. Commun.*, 2006, 85—87
- [54] Sun X, Du Y, Dong S, Wang E. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 8166—8169
- [55] Sun X, Du Y, Zhang L, Dong S, Wang E. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 6674—6677
- [56] Miao W. *Chem. Rev.*, 2008, 108: 2506—2553
- [57] Miao W, Bard A J. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 5379—5386
- [58] Miao W, Bard A J. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 5825—5834
- [59] Lo W, Baeumner A J. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 1386—1392
- [60] Lo W, Baeumner A J. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 1548—1554
- [61] Miao W, Bard A J. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 7109—7113
- [62] Zhou M, Roovers J, Robertson G P, Grover C P. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 6708—6717
- [63] Zhan W, Bard A J. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 459—463
- [64] Egashira N, Morita S, Hifumi E, Mitoma Y, Uda T. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 4020—4025
- [65] Yin X, Qi B, Sun X, Yang X, Wang E. *Anal. Chem.*, 2005,

- 77: 3525—3530
- [66] Denny L, Forster R J, Rusling J F. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 5213—5218
- [67] Denny L, Forster R J, White B. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 8835—8841
- [68] Hu L, Bian Z, Li H, Han S, Yuan Y, Gao L, Xu G. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 9807—9811
- [69] Szunerits S, Tam J M, Thouin L, Amatore C, Walt D R. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 4382—4388
- [70] Arnaud C, Partick G, Philippe V, Neso S J, Vinatier P, Sojic N. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 357—364
- [71] Hvastkovs E G, So M, Krishnan S, Bajrami B, Tarun M, Jansson I, Schenkman J B, Rusling J F. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 1897—1906
- [72] Krishnan S, Hvastkovs E G, Bajrami B, Choudhary D, Schenkman J B, Rusling J F. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 5279—5285
- [73] Engstrom R C, Johnson K W, DesJarlais S. *Anal. Chem.*, 1987, 59: 670—673
- [74] Fan F F, Cliffel D, Bard A J. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 2941—2948
- [75] Wightman R M, Curtis C L, Flowers P A, Maus R G, McDonald E M. *J. Phys. Chem. B*, 1998, 102: 9991—9996
- [76] Maus R G, McDonald E M, Wightman R M. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 4944—4950
- [77] Zu B, Ding Z, Zhou J, Lee Y, Bard A J. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 3993—3998
- [78] Maus R G, Wightman R M. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 2153—2156
- [79] Lin Z J, Chen X M, Jia T T, Wang X D, Xie Z X, Oyama M, Chen X. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 830—833

《化学进展》近期目次预告

- 界面超分子化学与响应性功能表面(万鹏博 Hill Eric H. 张希)
- 宽光谱太阳能电池(李承辉 王锴 郑玮 王致祥 刘建 游效曾)
- 巴豆醛气相选择性加氢催化剂(陈萍 谢冠群 罗孟飞)
- SiO₂/聚合物核壳型杂化粒子及其空心结构的制备进展(黄平 柴仕淦 袁建军 路国红 杨婷婷 程时远)
- 低温催化法制备石墨化碳空心球(靳权 刘应亮 武拥建 谢春林 肖勇)
- 动力锂离子电池正极材料磷酸钒锂制备方法(李月姣 洪亮 吴锋)
- 有机-无机杂化骨修复材料(范群英 詹红兵)
- 具有生理活性甾体酰胺类化合物(黄燕敏 崔建国 甘春芳 姚秋翠 贾琳怡)
- 基于环糊精和偶氮化合物的光控可逆超分子体系(孙涛 李月明 辛飞飞 李尚洋 侯月会 郝爱友)
- 有机共轭分子自组装方法(宋世松 戴郁菁 范曲立 黄维)
- 蛋白质与高分子的自组装(何乃普 王荣民)
- 实时直接分析质谱的原理及应用(张佳玲 霍飞凤 周志贵 白玉 刘虎威)
- 纳米材料修饰电极在重金属离子检测中的应用(尉艳 高超 杨苒 王伦 刘锦淮 黄行九)
- 硅胶基质高效液相色谱填料(赵贝贝 张艳 唐涛 王风云 张维冰 李彤)
- 电化学酶传感器在环境污染监测中的应用(刘佳 殷立峰 代云容 江帆 牛军峰)
- 钴催化过一硫酸氢盐降解水中有机污染物:机理及应用研究(韩强 杨世迎 杨鑫 邵雪停 牛瑞王雷雷)
- 微生物燃料电池生物阴极研究进展(陈立香 肖勇 赵峰)
- 双相致密透氧膜(陈婷 赵海雷 谢志翔 徐景璨 徐南生 李福燊)
- 间充质干细胞扩增载体材料(赵爽 赵燕燕 孟恒星 李茜 尹玉姬)
- 宽温域蓝相液晶材料的研究进展及应用展望(何万里 王玲 王乐 崔晓鹏 谢谟文 杨槐)