电化学发光分析研究进展

启黎明^{1,2}, 袁帆^{1,3}, 徐国宝^{1*}

1. 中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室, 吉林 130022

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 中国科学技术大学, 合肥 230026

*通讯作者, E-mail: guobaoxu@ciac.ac.cn

收稿日期: 2018-03-20; 接受日期: 2018-05-02; 网络版发表日期: 2018-07-09

国家重点研发计划(编号: 2016YFA0201300)和国家自然科学基金(编号: 21475123, 21675148)资助项目

摘要 电化学发光方法是一种重要的电化学分析方法, 具有灵敏度高、背景低、易控制和检测时间短等优点. 本综述着重介绍了中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室在新型电化学发光试剂、高效电化学发光共反应剂、新型电极、新型纳米催化剂、毛细管电泳/微流控芯片电化学发光和电化学发光装置及仪器等方面取得的主要研究成果.

关键词 电化学发光, 发光试剂, 共反应剂, 电化学发光增强, 电化学发光器件

1 引言

电化学发光(electrochemiluminescence, ECL), 又称电致化学发光, 是通过反应物在电极表面发生电子转移及伴随的化学反应导致的发光现象^[1-4]. 它兼备了电化学及化学发光方法的优点. 电化学发光无需引入外部光源, 相比于光致发光方法可有效地避免背景光源的干扰, 提高信噪比从而提高检测灵敏度. 相比于化学发光, 电化学发光只有在电化学激发下才可以产生发光, 因此具有很好的可控性.

该方法是一种重要的电化学及发光分析方法, 具有高灵敏度、低背景、快速简单等优点, 广泛应用于生物免疫分析、医疗诊断、食品和环境监测等方面, 已成为体外诊断的重要方法之一^[2,3]. 中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室在汪尔

康、董绍俊和杨秀荣院士的带领下, 在电化学发光新体系的建立、电化学发光增强方法的寻找及电化学发光与其他技术联用等方面进行了深入研究, 并获得了一系列重要的研究成果.

2 新型电化学发光体系的研究

电化学发光体系按照发光试剂的不同主要分为金属配合物电化学发光体系、有机分子电化学发光体系和纳米材料电化学发光体系. 传统的金属配合物电化学发光试剂主要包括钌、铱和锇的配合物; 有机分子电化学发光试剂主要包括鲁米诺、光泽精和过氧化草酸酯等; 随着纳米材料的不断发展, 科研人员发现纳米尺度的材料具有很好的光学性质, 因此近些年来也发展了很多纳米材料的电化学发光试剂, 如量子点、纳

引用格式: Qi L, Yuan F, Xu G. Advances in electrochemiluminescence analysis. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 914-925, doi: 10.1360/N032018-00053

米簇等^[2,3,5]. 以下主要介绍了我所电分析化学国家重点实验室在新型电化学发光体系建立方面的主要研究成果.

2.1 钌配合物电化学发光体系

金属钌配合物是一类重要的电化学发光试剂, 具有电化学发光稳定、灵敏、简单快速等优点. 近年来对钌类电化学发光体系的研究发展迅速.

三联吡啶钌($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)是一种经典的电化学发光试剂, 其发光稳定且在中性水溶液中具有很好的电化学发光特性, 因此常被用作电化学发光标记分析的标记物^[3]. 为了克服现有三联吡啶钌标记物制备困难及价格昂贵的问题, 一种新型的电化学发光分子二(2,2'-联吡啶)(5,6-环氧-5,6-二氢[1,10]菲咯啉)钌($\text{bis}(2,2'\text{-bipyridine})(5,6\text{-epoxy-}5,6\text{-dihydro-[1,10]phenanthroline})\text{ruthenium}$)被提出, 其结构如图1所示^[6]. 该配合物涉及的配体均可以用较低的价格购买到, 且其所含有的环氧基团易于连接到生物大分子上, 为钌配合物标记电化学发光方法的建立开辟了新的途径. 另外, 我们发现被广泛用作荧光开关的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 在DNA存在下电化学发光信号增强高达1000倍左右, 增强效果远优于其他的电化学发光开关(图2). 由于适配体在溶液中会形成独特的三维结构, 并以此来特异性识别其相应的目标分子, 在此过程中 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 也会嵌入其结构中, 因此目标分子与 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 对适配体有着竞争作用^[7]. 利用以上竞争机制建立了检测ATP的适配体电化学发光传感器.

在电化学发光标记方法中除了常用电化学发光分子作为标记物以外, 还可以用共反应剂进行标记, 从而实现目标物的分析检测. 4-(二甲基氨基)丁酸(4-(dimethylamino)butyric acid, DMBA)是一种叔胺类的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ECL共反应物, 且易于进行标记, 因此, DMBA被用作电化学发光标记物用于蛋白质的电化学发光传感^[8]. 一方面通过将DMBA与生物素标记于牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)上, 在金电极表面自组装一层疏基自组装薄膜, 再将亲和素修饰于薄膜上, 而后BSA通过亲和素-生物素间的作用连接到电极表面从而引起电化学发光信号变化, 进行电化学发光分析检测(图3(A)-a, (B)-a). 另一方面, 利用DMBA作为电化学发光标记物通过抗原抗体三明治夹心方法检测了免疫球蛋白G(IgG)(图3(A)-b, (B)-b). 在

图1 二(2,2'-联吡啶)(5,6-环氧-5,6-二氢[1,10]菲咯啉)钌的结构示意图^[6]

Figure 1 Structure of $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phen-epoxide})(\text{PF}_6)_2$ [6].

图2 基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 和DNA的电化学发光开关示意图^[7]

Figure 2 Scheme of ECL switch, based on $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ and DNA [7].

此基础上, 为了增强其电化学发光信号, 在金电极表面修饰上金纳米粒子, 以金纳米粒子作为基质进行了生物传感平台建设(图3(C)). 金属纳米粒子的加入增加了对蛋白质的吸附容量从而提高了该方法的检测灵敏度. 该研究工作为叔胺标记电化学发光方法的发展奠定了基础.

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 常用共反应物三丙胺具有毒性大、易挥发、电化学反应速度慢等缺点. 因此发展新型环境友好的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 共反应剂很有必要. 经系统研究, 一种环境友好且高效的共反应剂——二丁基乙醇胺被发现^[9]. 它相比于三丙胺具有很大的优势: (1) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /二丁基乙醇胺体系的动力学范围比 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /三丙胺宽4个数量级, 且灵敏度高; (2) 二丁基乙醇胺更加环境友好、毒性小、不易挥发、水溶性好; (3) 在金电极上, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /二丁基乙醇胺体系的发光是 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /三丙胺体系的10倍左右, 在铂电极上, 则是100倍左右(图4).

电化学发光猝灭是实现电化学发光分析的另一种

图3 在金电极表面修饰检测BSA (a)和IgG (b)的流程图(A)和示意图(B); 以金纳米粒子修饰的金电极检测BSA (a)和IgG (b)的示意图(C)^[8]

Figure 3 Flowcharts (A) and schematic diagrams (B) of the processes for the electrode pretreatment of immobilization of BSA (a) and IgG (b) via avidin-biotin reaction on the gold electrode; Schematic diagrams (C) of immobilization of BSA (a) and IgG (b) on the gold electrode with gold nanoparticle amplification [8].

图4 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /二丁基乙醇胺(DBAE)体系和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /三丙胺(TPA)体系在金电极(a)和铂电极(b)上的电化学发光对比示意图^[9] (网络版彩图)

Figure 4 Comparison of ECL curves of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /DBAE and $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /TPA at Au electrode (a) and Pt electrode (b) [9] (color online).

重要途径. 一般在钌配合物/共反应剂/猝灭剂体系中猝灭剂浓度高于共反应物或发光试剂浓度时, 才能完全猝灭体系电化学发光, 因此很大程度上限制了检测方

法的灵敏度. 最近一种高猝灭效率的 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ /乙二醇/臭氧体系被发现, 并用于臭氧的检测. 我们用不到共反应物(乙二醇)浓度的千分之五的臭氧就实现了对乙二醇/ $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 体系的电化学发光的完全猝灭(图5)^[10]. 而低浓度的臭氧对三丙胺/ $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 和草酸/ $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 的电化学发光几乎没有影响. 同时我们还观察到臭氧对甲醛、丙酮醛和乙醛酸等另外几种醛的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 电化学发光也存在非常高效的猝灭效应^[11]. 该体系的猝灭效率远远优于文献报道的其他体系, 因而为其他高效猝灭电化学发光方法的建立提供了新思路与基础. 基于这种高效猝灭效应, 我们还发展了一种高选择性、高灵敏检测臭氧的新方法.

2.2 纳米电化学发光体系

随着纳米科学与技术的不断发展, 科研人员们不断发展出尺寸不同、形貌各异的纳米材料. 大的比表面积、丰富的活性位点和特殊的光学性质给予了纳米材料的电化学发光研究以新的机遇与挑战.

由于尺寸效应及形貌的影响半导体量子点具有独特的光学与电学性质. Bard等^[12]发现量子点可在有机相中产生电化学发光, 但在有机相中发光电位很高, 且有机溶剂具有一定的毒性, 因此CdTe量子点在水溶液中的电化学发光被研究(图6)^[13]. 通过考察不同胺类物质对其电化学发光的影响, 发现二丁基乙醇胺对CdTe量子点的电化学发光具有很好的增强作用, 该研究为量子点电化学发光在水溶液中的应用与研究奠定了基础. 由于 Cu^{2+} 会与巯基琥珀酸保护的CdTe量子点

图5 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ (黑)在乙二醇(红)、乙二醇/臭氧(蓝)、臭氧(绿)体系电位-电化学发光强度图^[10] (网络版彩图)

Figure 5 ECL intensity-potential profiles of $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ (black curve) at the glassy carbon electrode in the presence of ozone (green curve), glyoxal (GL, red curve), glyoxal and ozone (blue curve) [10] (color online).

图 6 CdTe量子点在有二丁基乙醇胺(b)和无二丁基乙醇胺(a)时的电化学发光^[13]

Figure 6 ECL of CdTe quantum dots with (b) and without (a) DBAE as coreactent. [13].

表面巯基琥珀酸结合,使巯基琥珀酸剥离量子点表面,引起电化学发光猝灭,因此巯基琥珀酸保护的CdTe量子点被用于建立一个简单检测铜离子的量子点电化学发光传感器^[14]。而CdTe量子点和聚二烯丙基二甲基氯化铵(polydiallyldimethylammonium chloride, PDPA)层层组装到玻碳电极表面,以二丁基乙醇胺作为共反应剂,加入 Ag^+ 后其电化学发光得到了增强,该体系被用于 Ag^+ 的定量检测^[15]。

除了半导体纳米粒子外,金属纳米簇和碳材料也是一种具有潜在意义的电化学发光试剂^[16]。Wang等^[17]通过多相配体交换刻蚀金纳米粒子的方法合成了 Au_8 纳米簇,并对有机相中 Au_8 纳米簇的电化学发光和 Au_8 纳米簇薄膜在水溶液中的共反应剂的电化学发光进行了研究。该研究为纳米簇的电化学发光研究奠定了基础。Yang等^[18]报道了一种高效、快速、环保的微波热解法合成碳纳米粒子,该方法克服了以往合成方法上的缺点,如操作复杂、前驱体昂贵、合成条件苛刻等。同时,该方法合成的碳纳米粒子表面丰富的缺陷和功能基团使其具备了水溶性好、发光稳定等优点。他们还研究了碳纳米粒子的电化学发光过程(图7),发现其机理与量子点和纳米簇类似属于湮灭电化学发光过程,该工作推动了碳纳米材料电化学发光的发展。

3 新型电极

采用新型电极可以改变电化学发光物质在电极表

图 7 碳纳米粒子在ITO电极表面的电化学发光(b)和空白ITO电极的电化学发光(a) (插图为连续电位扫描下的阳极电化学发光^[18] (网络版彩图))

Figure 7 Representative ECL response of CNPs at an ITO electrode (b) and the ECL of bare ITO electrode (a). Insert: anodic ECL response during a continuous potential scan [18] (color online).

面的反应状态、浓度、扩散方式等,增强电化学发光强度可以提高体系的灵敏度。

我们采用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 修饰陶瓷电极进行二氧丙嗪电化学发光检测^[19]。此电极具有以下优点: (1) 陶瓷材料具有多孔结构,可对待分析物进行固相萃取,与其他无孔结构电极相比,单位面积的待分析物浓度有所增加,电化学发光信号增强,从而提高了微量检测的灵敏度,与其他固相联吡啶修饰材料相比,灵敏度提高了3个数量级; (2) 电极表面可通过打磨的方式更新,操作更加简单; (3) 由于二氧丙嗪发光效率高且其在陶瓷电极表面吸附强,而尿样中常见的物质发光效率低且在陶瓷电极表面吸附弱,这种基于固相萃取的电化学发光方法检测二氧丙嗪具有很好的选择性。

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 等阴极电化学发光体系需要施加较负电位才能产生电化学发光,然而负电位的析氢反应会造成发光信号的不稳定。我们将铈电极用于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 体系(图8),此电极上高的析氢过电势有效地避免了氢气对电化学发光信号的干扰,为阴极电化学发光的研究提供了新的途径^[20]。

除此之外,我们将不锈钢作为电极应用于luminol/ H_2O_2 体系(图9)。不锈钢电极表面的氧化铬钝化层可以减小背景信号、增加灵敏度。将此电极检测过氧化氢的检测限低至 $0.076 \mu\text{M}$,明显优于常见的其他电极^[21]。此外,不锈钢材料便宜易得,在生物分析与可穿戴传感器设计方面具有良好的应用前景。

图 8 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 体系在铂电极上的电化学发光示意图^[20]

Figure 8 ECL intensity-potential curves of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ system [20].

图 9 空白(a)和luminol在有 H_2O_2 (c)和无 H_2O_2 (b)时在不锈钢电极上的电化学发光示意图^[21] (网络版彩图)

Figure 9 ECL intensity curves of (a) blank and luminol (c) with and (b) without H_2O_2 measured at stainless steel electrode [21] (color online).

4 电化学发光信号分子固定化方法

将电化学发光试剂固定在电极表面可以节约试剂、简化实验装置和操作、改善分析性能等。为此, 我所发展了一系列新的固定化方法以及固定化材料, 构建了稳定性高、灵敏性好可再生的固相电化学发光传感器。

4.1 阳离子交换聚合物

Nafion是一种全氟磺酸型聚合物溶液, 易成膜, 最早被用于固定 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 分子构建固相电化学发光传感器。尽管 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 易与Nafion结合, 合成的材料仍面临着稳定性低、电子转移速率慢等问题。为了解决这

些问题, Dong等^[22]合成了碳纳米管(CNT)与Nafion的复合膜并将其用于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的固定。一方面, CNT的比表面积大, 可吸附更多 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 从而增加电化学发光信号强度; 另一方面, 带负电的CNT与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的静电作用增强了材料的稳定性。同时CNT优异的导电性弥补了Nafion电子转移速率低的问题。用CNT/Nafion修饰电极构建的电化学发光传感器稳定性好、灵敏度高, 比纯Nafion修饰电极的灵敏度高3个数量级。

除此之外, 我们还使用石墨烯/Nafion固定 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 来构建电化学发光传感器。带负电的石墨烯既增加了材料的电子转移速率, 其与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的结合又可以抑制 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 向Nafion的非电活性疏水区迁移, 进一步提高了传感器的稳定性与灵敏度。用于检测尿样中的草酸, 检测限可达800 nM^[23]。

聚磺酸酯阳离子交换物Eastman-AQ55D是一种比Nafion亲水性更好、价格更低廉的阳离子交换材料。由于其更为优异的离子选择能力以及信号响应速度, 在传感器的构建方面应用十分广泛。采用Eastman-AQ55D- SiO_2 复合薄膜将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 固定于玻碳电极表面构建检测三丙胺、草酸和氯丙嗪的电化学发光传感器, 此传感器在干燥储存2个月后, 信号强度无明显降低, 展现出极高的稳定性^[24]。

4.2 二氧化硅固定化材料

二氧化硅凝胶与二氧化硅纳米粒子由于其良好的生物相容性、易于修饰和极高的热稳定性等优点被广泛用于生物传感器的构建。Wang等^[25]通过酸催化水解的方法将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 掺杂的二氧化硅转化为凝胶, 并将其旋涂到ITO电极上, 该电极电化学发光效率高。我所还采用气相表面溶胶-凝胶沉积法合成了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 掺杂的二氧化硅溶胶-凝胶, 并将其修饰电极用于检测三丙胺, 线性范围可达4个数量级, 检测限低至5 nM。

然而, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 由二氧化硅材料向溶液中的扩散损失降低了检测的稳定性。Dong等^[26]发展了一种油包水微乳液法合成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 掺杂的二氧化硅纳米颗粒, 将其壳聚糖的复合膜修饰到电极上构建传感器。壳聚糖易于成膜, 可有效防止 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的泄漏。该传感器用于检测三丙胺, 检测限低至2.8 nM, 与基于Nafion的电化学传感器相比低了3个数量级。另外, 在 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 掺杂 SiO_2 纳米粒子的表面修饰上金胶体得到凝胶, 通过Au-S将其固定在巯基修饰的ITO上构建传感器。金

胶体可防止 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 泄漏的同时对于电化学发光有一定催化作用, 将其用于三丙胺的检测, 线性范围达到4个数量级^[27].

4.3 贵金属纳米粒子

贵金属纳米粒子具有良好的催化电化学发光的作用^[28-30], Dong等^[31]合成了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 与金纳米粒子的聚集体, 并将乙醇脱氢酶修饰到该材料中, 通过 Au-S 键将其固定在巯基修饰的ITO上构建传感器. 带负电的金纳米粒子与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的静电吸引作用使 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 稳定地固定在电极表面, 增加了传感器的稳定性. 用于检测乙醇线性范围可达3个数量级, 检测限低至3.33 M. 该研究组还利用水热法合成Pt纳米粒子, 通过 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 对Pt纳米粒子的作用使其在电极表面成膜, 得到了电化学发光行为良好的传感器^[32].

4.4 磁性纳米粒子

磁性纳米粒子在磁性吸附、载体、修饰、固定和分离等方面被广泛关注. Wang等^[33]在磁性 Fe_3O_4 纳米晶簇外面包裹丙烯酸修饰的石墨烯纳米层, 将其与Nafion结合成膜修饰到电极表面, 并将其用于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的固定. 由于石墨烯具有多孔性且带负电, 可以有效地固定发光分子, 具有长期的稳定性. 在永久性磁铁的作用下, 用于固定 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的磁性粒子可稳定地存在于Nafion膜内, 提高了电化学发光的稳定性. 同时, 该磁性材料易于在外加磁场的作用下修饰到纸基芯片上, 这是首次将磁性纳米粒子固定电化学发光分子与纸基芯片结合构建固相电化学发光传感器. 将其用于检测三丙胺的检测限低至5 nM, 且可以检测到0.5 nM单链核苷酸的错配, 是一种简便的传感器.

5 毛细管电泳/微流控芯片电化学发光技术

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是一种有效的分离方式, 具有高效、快速、低成本、需要样品量少等特点, 因此被认为是可替代高效液相色谱的有效方法. 然而它的检测器很受限制, 常见的紫外可见吸收检测器灵敏度低、激光诱导荧光检测和质谱技术可以满足高的灵敏度, 但其仪器体积较大且成本很高, 因此发展新的信号输出方式很重要.

电化学发光是一种背景信号低、灵敏度高的信号输出方式, 因此Wang等^[34]将毛细管电泳分离方法与电化学发光技术相结合, 进行了一系列研究. 在研究初期自主搭建了一套毛细管电泳电化学发光平台(图10), 利用该平台研究了毛细管电泳的高压电流对电化学发光检测体系电化学行为的影响, 并研究了毛细管与电极间距离对检测的影响以及毛细管内径对体系的影响, 并对该条件进行了优化. 为了简化装置, 他们巧妙地对接出口处的毛细管进行部分刻蚀, 有效地消除了毛细管电泳高压场对电化学发光的影响, 如图11所示^[35]. 与此同时, 为了提高毛细管电泳-电化学发光的信号输出强度与稳定性, 建立了固态电化学发光与毛细管电泳结合的分离检测平台, 将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 固定在聚对苯乙烯磺酸-二氧化硅-聚乙烯醇嫁接4-乙烯基吡啶共聚物薄膜中修饰于电极表面实现了三丙胺和脯氨酸的毛细管电泳-电化学发光检测^[36].

为了优化毛细管电泳-电化学发光方法, 离散小波变换法(discrete wavelets transform, DWT)被用于对毛细管电泳-电化学发光方法进行去噪, 利用重建信号峰值与纯信号峰值的比值来评估去噪的影响, 并优化了去噪的最优条件. 通过该方法提高了检测方法的重现性, 并降低了检测限^[37].

他们还将毛细管电泳-电化学发光技术与微芯片

图10 毛细管电泳-电化学发光技术反应池的示意图. 1. 不锈钢螺丝钉; 2. PVC毛细管支架; 3. 不锈钢管; 4. 毛细管; 5. 参比电极; 6. 对电极; 7. 校准阀; 8. 工作电机槽; 9. PVC电极支架; 10. 工作电极; 11. 光学监测窗口; 12. PMT^[34]

Figure 10 Schematic diagram of the ECL cell coupled with separation capillary by end-column mode. 1. Stainless steel holding screw; 2. PVC capillary holder; 3. stainless steel tube; 4. separation capillary; 5. reference electrode; 6. counter electrode; 7. nylon screws for alignment; 8. working electrode cable; 9. PVC electrode holder; 10. working electrode; 11. optic glass window; 12. PMT^[34].

图 11 毛细管电泳-电化学发光反应池示意图: (a) 发光池正面图, (b) 溶液储存池侧面图。 (1) 工作电极; (2) 光电倍增管; (3) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液储存池; (4) 接地对电极; (5) 多孔部分的毛细管; (6) 分离毛细管; (7) 参比电极口; (8) 对电极口; (9) 工作电极校准阀; (10) sealon膜^[35]

Figure 11 The schematic diagram of the ECL detection cell: (a) front view and (b) side view from $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ solution reservoir. (1) Working electrode; (2) PMT; (3) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ solution reservoir; (4) CE ground electrode; (5) porous section of capillary; (6) separation capillary; (7) for reference electrode; (8) for counter electrode; (9) working electrode alignment screws; (10) sealon film^[35].

结合, 设计了一款微型化芯片式结构的电化学发光池, 可与毛细管电泳和流动注射(flow injection, FI)结合用于检测. 发光池结构如图12所示, 由两片玻璃片组合、铂盘电极为工作电极、不锈钢导管作为对电极、银丝作为准参比电极. 他们用脯氨酸、三丙胺、草酸对该器件与毛细管电泳和流动注射与电化学发光联合应用进行了可行性分析, 得到了很好的结果^[38]. 另外, 还设

计了一款毛细管电泳-电化学发光微芯片, 芯片如图13所示. 通过光刻方法在ITO表面进行刻蚀得到毛细管电泳通道, 再将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 固定在Eastman AQ55D-二氧化硅-碳纳米管复合物薄膜中修饰于ITO电极表面, 而后再由相同纹路的聚二甲基硅氧烷膜密封电极, 得到芯片, 用该芯片对脯氨酸进行了检测, 得到了较好的结果^[39].

6 双极电极电化学发光技术

双极电极(bipolar electrode, BPE)是指置于电解质溶液中的电子导体(或半导体), 在其两端通过驱动电极以非直接欧姆接触的方式施加电压形成电场, 引起电子导体内部电子的重排形成电势差, 当驱动电极两端施加的电压足够大, 电子导体两极就能够发生氧化还原反应. 双极电极具有无线连接的特质和易于集成化制备和控制的特点. 因此, 在很多领域具有很好的应用潜力, 如不对称修饰和合成、目标物的富集与分离、化学和生物传感以及微型化芯片制作等. 双极电极分为开放式^[40]、半开放半封闭式^[41]、封闭式^[42]双极电极^[43].

电化学发光分析方法作为一种高效的分析方法已被广泛应用于双极电极体系. 虽然双极电极与电化学发光的结合在以往的工作中得到了很好的结果, 但仍存在着局限与挑战: (1) 电流效率 η_c ($\eta_c = i_{\text{BPE}}/i_{\text{DE}}$, 其中 i_{BPE} 为流过BPE的电流, i_{DE} 为流过驱动电极的电流)低; (2) 以往报道多为单通道, 将驱动电极阳极(阴极)与

图 12 芯片式结构的电化学发光池设计图和与毛细管电泳, 流动注射联合模式示意图. (a) 流动管道和凹槽设计, (b) 刻蚀玻璃板, (c) 管道和移液枪头组装, (d) 毛细管电泳模式, (e) 流动注射模式^[38]

Figure 12 Constructing process of the chip-type ECL flow cell and schematic view of CE and FI measurement modes. Design pattern of (a) flow channel and accommodating grooves, (b) etched glass plates, (c) accommodating pipet tips and guides, (d) CE, and (e) FI measurement modes^[38].

图 13 固定 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的ITO电极的照片(a)和SEM图(b)^[39] (网络版彩图)

Figure 13 Photograph of TBR-modified ITO electrode by digital camera (a) and SEM (b) [39] (color online).

双极电极阳极(阴极)置于同一通道中, 反应会优先在驱动电极上进行反应, 从而驱动电极的背景信号很高; (3) 为了降低驱动电极的背景信号, 研究人员常引入高阻值的驱动电极, 该方法对双极电极设备的微型化造成了很大的阻碍; (4) 以往报道中, 电化学发光探针与被分析物质总被放入同一溶液中, 会产生相互影响. 为了改进双极电极电化学发光体系的缺陷, 一种双通道封闭式双极电极的电化学发光微流控传感平台被提出^[44]. 在该设计中(图14), 驱动电极的阳极与双极电极的阳极被置于两个通道, 且电化学发光试剂溶液通入双极电极阳极端输出通道. 该双通道设计不仅可有效地避免驱动电极的背景信号, 还可以避免待测物与发光试剂间的直接接触带来的影响. 在该封闭式设计中电流仅流过双极电极形成回路, 因此理论上的电流效率可达100%. 与此同时, 该设计中驱动电压采用双向电位施加模式, 为高通量分析提供了前提.

单通道与双通道双极电极电化学发光传感平台在设计上只能用来检测氧化物或者还原物, 并不能进行氧化物与还原物的同时检测. 因此, Wang等^[45]又进一步设计了一种多通道封闭式双极电极传感系统(图15).

图 14 双通道封闭式双极电极系统的基本原理^[44] (网络版彩图)

Figure 14 Fundamental principle of the dual-channel bipolar ECL sensor [44] (color online).

图 15 三通道封闭式双极电极体系的结构及操作原理^[45] (网络版彩图)

Figure 15 Structure and operation mechanism of the full-featured ECL sensing platform [45] (color online).

利用这个设计, 所有的氧化剂、还原剂或电化学发光共反应剂和猝灭剂都能被检测.

不仅如此, Wang等^[46]还构建了一种纳米级多通道封闭式双极电极电化学发光传感平台(图16). 利用聚对苯二甲酸乙二醇酯(poly(ethylene terephthalate), PET)为基底, 以NaOH对其进行刻蚀, 再用Au纳米纤维进行填充得到纳米级的双极电极阵列. 利用纳米级多通道封闭式双极电极电化学发光传感平台实现了一系列目标物包括三丙胺、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 、多巴胺、 H_2O_2 、 α -胎甲球蛋白、癌胚抗原的检测. 该平台的设计及PET的刻蚀技术可实现多种尺寸及密度的纳米级双极电极的制作, 为今后双极电极阵列芯片的制作提供了新的手段与思路.

图 16 纳米级多通道封闭式双极电极系统的基本原理^[46] (网络版彩图)

Figure 16 Fundamental principle of the multichannel closed bipolar electrode ECL sensor for analyte detection ^[46] (color online).

7 无线输电电化学发光技术

无线输电是指不通过电缆等导线的连接将电能从发电装置传送到接收端的技术, 是一种在无法使用导线或需简化线路时可利用的有效方法。因此, 无线输电技术近些年来受到了极大的关注, 并将其应用于多种产品, 如无线充电手机、无线充电汽车、嵌入式医疗设备、无线充电台灯、电动牙刷及其他无线充电设备。由于近年来现场即时检测、快速诊断的需求越来越大, 分析设备的微型化、便携化已经成为了一种趋势。然而, 现有的经典电化学发光仪器体积庞大且均需导线将电极连接于电化学仪器上, 不便携带。为解决该问题, 我们将无线输电技术与电化学发光分析方法相结合设计了一款无线输电电化学微型器件, 该器件的理论基础主要是电磁感应技术。如图17所示, 该器件由发射装置——无线充电牙刷底座或连有无线输电模块的线圈, 接收端——金属线圈、反应池等组成; 利用经典的鲁米诺/过氧化氢电化学发光体系对该新型装置的可行性进行了验证。该技术有效地避免了导线与电极直接相连的输电方式^[47]。由于无线传输利用的是振荡的交流电, 接收端的交流电会使器件阴极阳极随着时间交替变换, 导致电化学反应发光中间体的损失, 从而降低发光效率。为了解决该问题, 我们又设计了一款新型无线输电电化学发光芯片, 并在该芯片电路中引入了二极管对设备电流进行整流。芯片结构如图18(a, b)所示, 包括8个金盘电极作为工作电极, 8个金环电极作为对电极, 芯片中心上下分别有一个线圈作为无线接收端, 两个线圈之间接入高频二极管,

图 17 (a) 无线输电电化学发光体系示意图。无线输电电化学发光体系照片(b)和电化学发光照片(c)^[47] (网络版彩图)

Figure 17 (a) Schematic representation of the wireless ECL system. (b) The photo and (c) ECL image of the wireless ECL minidevice ^[47] (color online).

图 18 无线电化学发光芯片的正反面照片(a), 发射端: 铜线圈与无线输电模块(b)及其电路图(c): DC为直流电源, module为无线输电模块, L_1 为发射端线圈, L_2 、 L_3 为芯片上的接收线圈, D为芯片上的高频二极管, $C_1 \sim C_8$ 为芯片上的金电极对^[48] (网络版彩图)

Figure 18 Schematic representation of the wireless mini-device and its working circuit. (a) Front and back view of the wireless electrode array chip. (b) Transmitter: copper coil with wireless module; (c) Working circuit of the device: DC is the direct-current power supply, module is the wireless module, L_1 is the copper coils of the transmitter, L_2 and L_3 are coils on the chip, D is the diode, and C_1 to C_8 are the electrode pairs on the chip ^[48] (color online).

器件电路如图18(c)所示。二极管的加入, 减轻了对电生的中间体的消耗, 显著提高了电化学发光效率, 实现了利用智能手机对过氧化氢的可视化检测^[48]。该研究工作进一步证明了无线输电技术在电化学发光分析领域的潜力。

8 毛细管电泳电化学发光仪

毛细管电泳是一种高效的分离技术, 且电化学发

光法是一种灵敏的、广谱的检测方法. 这两种技术的联用可以实现众多物质的分离检测, 在药物分析、环境监测等领域具有广阔的应用前景. 鉴于国际上缺乏毛细管电泳电化学发光仪, Wang等^[49]与西安瑞迈电子有限责任公司合作, 率先研发了多款毛细管电泳电化学发光仪, 如MPI-A型毛细管电泳电化学发光仪(图19). 这些毛细管电泳电化学发光仪是将毛细管电泳的分离技术与电化学发光的检测方法相结合的多测试界面、多分析参数、多控制部件系统集成仪器. 它可同时实现待测样品毛细管电泳在线分离、电化学发光实

图 19 MPI-A型毛细管电泳电化学发光分析仪^[49] (网络版彩图)

Figure 19 A commercial MPI-A type CE-ECL system fabricated by our laboratory ^[49] (color online).

时检测, 并同步显示化学发光信号、电化学电位扫描信号、电化学电极电流信号及毛细管电泳电流信号, 并可对其进行详细分析. 该仪器解决了传统电化学发光仪器的电化学扫描与电化学发光检测的不同步性等诸多问题, 且简化了操作, 提高了分析结果的准确性^[1]. 目前已被众多科研院校广泛使用, 极大地推动了电化学发光的研究.

9 结论与展望

近些年, 越来越多的科研人员涌入了电化学发光领域, 与之相关的文献报道也越来越多. 电化学发光作为高灵敏的分析检测方法, 已被广泛应用于食品、药物、环境监测、生物、化学传感、疾病诊断等领域. 由于其广泛的应用前景, 电化学发光免疫分析、核酸分析和适配体传感器及新体系的建立将持续被广泛研究. 随着近些年来多种技术的交叉与便携式设备的兴起, 在未来的很长一段时间里, 电化学发光联合检测方法、双极电极电化学发光传感平台的搭建、无线输电电化学发光将会继续得到大力发展, 电化学发光微型化便携式的分析检测设备将成为一个发展焦点. 此外, 电化学发光成像分析包括电化学发光高通量分析的研究将日益兴盛.

参考文献

- 1 Miao W. *Chem Rev*, 2008, 108: 2506–2553
- 2 Hu L, Xu G. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 3275–3304
- 3 Liu Z, Qi W, Xu G. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 3117–3142
- 4 Gao W, Saqib M, Qi L, Zhang W, Xu G. *Curr Opin Electrochem*, 2017, 3: 4–10
- 5 Li J, Guo S, Wang E. *RSC Adv*, 2012, 2: 3579–3586
- 6 Wei H, Yin J, Wang E. *Anal Chem*, 2008, 80: 5635–5639
- 7 Hu L, Bian Z, Li H, Han S, Yuan Y, Gao L, Xu G. *Anal Chem*, 2009, 81: 9807–9811
- 8 Yin XB, Qi B, Sun X, Yang X, Wang E. *Anal Chem*, 2005, 77: 3525–3530
- 9 Liu X, Shi L, Niu W, Li H, Xu G. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 421–424
- 10 Qi W, Liu Z, Lai J, Gao W, Liu X, Xu M, Xu G. *Chem Commun*, 2014, 50: 8164–8166
- 11 Gao Y, Liu X, Qi W, Gao W, Li Y, Xu G. *Analyst*, 2015, 140: 3996–4000
- 12 Bae Y, Myung N, Bard AJ. *Nano Lett*, 2004, 4: 1153–1161
- 13 Zhang L, Zou X, Ying E, Dong S. *J Phys Chem C*, 2008, 112: 4451–4454
- 14 Zhang L, Shang L, Dong S. *Electrochem Commun*, 2008, 10: 1452–1454
- 15 Li Y, Sun M, Yang F, Yang X. *Anal Lett*, 2010, 43: 2837–2847
- 16 Xu Y, Liu J, Gao C, Wang E. *Electrochem Commun*, 2014, 48: 151–154
- 17 Guo W, Yuan J, Wang E. *Chem Commun*, 2012, 48: 3076–3078

- 18 Zhu H, Wang X, Li Y, Wang Z, Yang F, Yang X. *Chem Commun*, 2009, 7: 5118–5120
- 19 Shi L, Liu X, Li H, Xu G. *Anal Chem*, 2006, 78: 7330–7334
- 20 Hu L, Li H, Zhu S, Fan L, Shi L, Liu X, Xu G. *Chem Commun*, 2007, 72: 4146
- 21 Kitte SA, Gao W, Zholudov YT, Qi L, Nsabimana A, Liu Z, Xu G. *Anal Chem*, 2017, 89: 9864–9869
- 22 Guo Z, Dong S. *Anal Chem*, 2004, 76: 2683–2688
- 23 Li H, Chen J, Han S, Niu W, Liu X, Xu G. *Talanta*, 2009, 79: 165–170
- 24 Wang H, Xu G, Dong S. *Anal Chim Acta*, 2003, 480: 285–290
- 25 Wei H, Du Y, Kang JZ, Xu GB, Wang EK. *Chin J Chem*, 2007, 25: 159–163
- 26 Zhang L, Dong S. *Anal Chem*, 2006, 78: 5119–5123
- 27 Qian L, Yang XR. *Adv Funct Mater*, 2007, 17: 1353–1358
- 28 Zhang L, Niu W, Gao W, Qi L, Lai J, Zhao J, Xu G. *ACS Nano*, 2014, 8: 5953–5958
- 29 Cui H, Xu Y, Zhang ZF. *Anal Chem*, 2004, 76: 4002–4010
- 30 Jie G, Liu B, Pan H, Zhu JJ, Chen HY. *Anal Chem*, 2007, 79: 5574–5581
- 31 Zhang L, Xu Z, Sun X, Dong S. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 1097–1100
- 32 Sun X, Du Y, Zhang L, Dong S, Wang E. *Anal Chem*, 2006, 78: 6674–6677
- 33 Xu Y, Lv Z, Xia Y, Han Y, Lou B, Wang E. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 3549–3558
- 34 Cao W, Liu J, Yang X, Wang E. *Electrophoresis*, 2002, 23: 3683–3691
- 35 Yin XB, Qiu H, Sun X, Yan J, Liu J, Wang E. *Anal Chem*, 2004, 76: 3846–3850
- 36 Cao W, Jia J, Yang X, Dong S, Wang E. *Electrophoresis*, 2002, 23: 3692–3698
- 37 Cao W, Chen X, Yang X, Wang E. *Electrophoresis*, 2003, 24: 3124–3130
- 38 Liu J, Yan J, Yang X, Wang E. *Anal Chem*, 2003, 75: 3637–3642
- 39 Du Y, Wei H, Kang J, Yan J, Yin X, Yang X, Wang E. *Anal Chem*, 2005, 77: 7993–7997
- 40 Arora A, Eijkel JCT, Morf WE, Manz A. *Anal Chem*, 2001, 73: 3282–3288
- 41 Sheridan E, Knust KN, Crooks RM. *Analyst*, 2011, 136: 4134–4137
- 42 Guerrette JP, Oja SM, Zhang B. *Anal Chem*, 2012, 84: 1609–1616
- 43 Zhang X, Zhai Q, Xing H, Li J, Wang E. *ACS Sens*, 2017, 2: 320–326
- 44 Zhang X, Chen C, Li J, Zhang L, Wang E. *Anal Chem*, 2013, 85: 5335–5339
- 45 Zhang X, Li J, Jia X, Li D, Wang E. *Anal Chem*, 2014, 86: 5595–5599
- 46 Zhai Q, Zhang X, Han Y, Zhai J, Li J, Wang E. *Anal Chem*, 2016, 88: 945–951
- 47 Qi W, Lai J, Gao W, Li S, Hanif S, Xu G. *Anal Chem*, 2014, 86: 8927–8931
- 48 Qi L, Xia Y, Qi W, Gao W, Wu F, Xu G. *Anal Chem*, 2016, 88: 1123–1127
- 49 Yin XB, Dong S, Wang E. *TrAC Trends Anal Chem*, 2004, 23: 432–441

Advances in electrochemiluminescence analysis

Liming Qi^{1,2}, Fan Yuan^{1,3}, Guobao Xu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

² University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

*Corresponding author (email: guobaoyu@ciac.ac.cn)

Abstract: Electrochemiluminescence (ECL) is an important electrochemistry analytical method with high sensitivity, low backgrounds, excellent controllability and rapid determination. The State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry has been working on ECL for more than two decades. We introduce the main research results of our institute in the field of novel ECL reagent, highly efficient coreactant, new kinds of electrodes, nanoparticle catalyst, capillary electrophoresis/microfluidic chip on ECL analysis and ECL device.

Keywords: electrochemiluminescence, luminophor, coreactant, electrochemiluminescence enhancement, electrochemiluminescent device

doi: [10.1360/N032018-00053](https://doi.org/10.1360/N032018-00053)