



doi: 10.19969/j.fxcsxb.21092201

空间分辨测量解析三(2, 2'-联吡啶)钌(II)电化学发光机理的研究进展

胡诗帆, 王亚锋, 苏彬*

(浙江大学 化学系 分析化学研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要: 电化学发光(ECL)是由电化学反应引发, 通过一系列化学反应产生激发态发光体进而辐射发光的过程, 其产生的方式主要有湮灭型电化学发光和共反应剂型电化学发光。ECL是一种表面限域的发光过程, 其发光层的厚度主要由反应中间体在电极表面的分布决定。空间分辨测量能够直接测得激发态发光体、共反应剂自由基等中间体在电极表面附近的分布, 进而解析ECL反应机理。该文首先简要介绍了ECL的研究进展和不同体系的反应机理, 在此基础上, 对空间分辨测量, 包括扫描电化学显微镜、电化学发光显微成像技术和电化学发光自干涉光谱在解析ECL机理中的应用进行了总结。最后, 对ECL机理解析中存在的问题及发展前景进行了展望。

关键词: 电化学发光(ECL); 反应机理; 空间分辨测量; 电化学发光显微成像

中图分类号: O657.3; O614.243 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2022)01-0001-10

Research Progress on Spatially Resolved Measurements for Decipherment of Ru(bpy)₃²⁺ Electrochemiluminescence Mechanisms

HU Shi-fan, WANG Ya-feng, SU Bin*

(Institute of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Electrochemiluminescence(ECL) refers to the luminescence process, in which excited luminophores are generated by electrochemical reactions and sequential chemical reactions. Generally, ECL can be generated through either the annihilation or the coreactant route, which is a surface-confined luminescence process. The thickness of ECL layer is controlled by the distribution of reaction intermediates near the electrode surface. Meanwhile, spatially resolved measurements are capable of directly measuring the distribution of excited luminophores or coreactant radicals in the vicinity of electrode surface, holding great promise for deciphering the ECL mechanisms. In this review, the research progress on ECL and the reaction mechanisms of different ECL systems are first briefly introduced. Then the applications of spatial resolution measurements, including scanning electrochemical microscopy, ECL microscopy and ECL self-interference spectroscopy in unraveling the mechanisms for ECL generation are summarized. Finally, perspectives and challenges in mechanistic studies of ECL generation are presented.

Key words: electrochemiluminescence(ECL); reaction mechanisms; spatially resolved measurements; ECL microscopy

1 电化学发光概述

电化学发光(ECL)是由电极表面的电子转移反应引发的暗场光辐射^[1], 可通过电化学反应进行调控, 且无需外加激发光, 具有时空可控性强、背景信号低和灵敏度高优点^[2-3]。ECL在生物传感、发光器件、核酸检测、免疫分析等研究领域有着广泛的应用^[4-5]。以三(2,2'-联吡啶)钌(II)(Ru(bpy)₃²⁺)为探

收稿日期: 2021-09-22; 修回日期: 2021-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(22074131, 21874117)

* 通讯作者: 苏彬, 博士, 教授, 研究方向: 电化学发光, E-mail: subin@zju.edu.cn

针的 ECL 是现行免疫分析中最先进的信号转导方法之一。Roche Diagnostics 和 Meso Scale Discovery 等公司开发的电化学发光免疫分析仪已被广泛应用于临床诊断中, 包括肿瘤标志物、传染性疾病、心血管疾病等多种疾病的早期诊断。

1.1 电化学发光的研究进展

1927 年, Dufford 等^[6]在无水乙醚中电解格氏试剂时发现了发光现象。1929 年, Harvey 等^[7]用多种不同的金属电极在电解碱性鲁米诺水溶液时, 观察到了阴极和阳极区的发光, 电化学发光研究的序幕从此拉开。然而, 受到仪器设备等限制, 电化学发光研究在最初的几十年进展缓慢。直到 20 世纪 60 年代, 光电倍增管(PMT)和电荷耦合器件(CCD)等高灵敏光电传感器的出现, 极大地促进了 ECL 的研究发展。60 年代中期, Kuwana 等^[8]用 PMT 研究了脉冲电压下鲁米诺电化学发光的动力学, 并提出了新的发光机理。Hercules 和 Bard 等^[9-10]报道了稠环芳烃类化合物在有机溶剂中的 ECL。这类有机化合物的电化学发光对溶剂的要求较高, 大多不能直接在水溶液中进行反应, 因此其应用受到很大的限制。无机金属配合物, 如 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 等, 是目前应用最广泛的 ECL 探针。1972 年, Bard 等^[11]首次报道了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在乙腈中的 ECL。随后, 他们以草酸盐和过硫酸盐作为共反应剂, 构建了水溶液中的 ECL 体系, 拓宽了 ECL 的应用范围^[12-14]。1987 年, Engstrom 等^[15-18]发展了电化学发光成像技术, 将电极表面的活性位点和电流密度的分布可视化, 研究了电极的边缘效应和电化学发光反应的动力学参数在空间上的变化, 为电化学发光反应机理的研究提供了全新的方法。1990 年, Powell 等^[19]首次将三正丙胺(TPrA)作为共反应剂用于 ECL 中, 当发光体和共反应剂均被氧化时, 可观察到较强的 ECL 信号。同时, 该工作还提出了氧化-还原路径, 为胺类共反应剂的开发和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ 体系在生物、医药、临床等领域的广泛应用奠定了基础。1995 年, Wightman 等^[20]采用快速电位脉冲法研究了超微电极表面单分子的电化学发光, 并确定了反应中的速控步骤。21 世纪以来, 纳米材料作为新型电化学发光体(如不同结构的量子点: 硒化镉、硫化镉、硒化镉/硫化镉/硫化锌^[21-22]等)引起了研究者的研究兴趣, 也极大地增大了发光分子的选择范围^[23]。此外, Xu 等^[24]将 2-(二丁氨基)乙醇(DBAE)这种毒性低、水溶性好的羟乙基胺类分子作为共反应剂, 发现以铂或者金电极作为工作电极时, ECL 的强度会显著提高。

1.2 电化学发光反应机理

电化学发光反应机理一般可以分为湮灭型机理和共反应剂型机理^[5]。

1.2.1 湮灭型电化学发光 湮灭型电化学发光主要发生在有机溶剂中, 并且需要在电极上施加正负双阶跃脉冲电位, 电极表面电化学还原和氧化反应产生的高能阴、阳离子自由基 $\text{A}^{\cdot-}$ 和 $\text{D}^{\cdot+}$ 之间发生电子转移反应(其中, A 和 D 可以是同种物质也可以是不同物质), 形成激发态分子, 激发态分子跃迁回基态产生光辐射(图 1)。

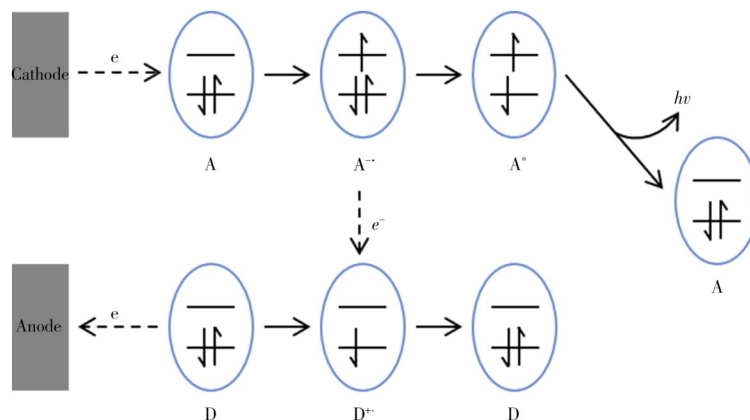


图 1 湮灭型电化学发光机理

Fig. 1 Reaction mechanisms of annihilation ECL

1.2.2 共反应剂型电化学发光 当水溶液中同时存在 ECL 发光体和共反应剂时, 施加单向的扫描电位就能产生光信号。与湮灭型电化学发光相比, 共反应剂型电化学发光中产生的活性中间体的稳定性更高并且能够产生更强的光辐射。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ 是目前最常见, 也是实际免疫分析中采用的共反应

剂型电化学发光体系^[25-26], 其可能的反应机理如图 2 所示^[27]。路径 1 中, 在电极表面施加适当的正电位, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在电极表面被氧化为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, 同时 TPrA 被氧化为 TPrA^+ , TPrA^+ 脱质子生成具有强还原性的 TPrA^\cdot , $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 被 TPrA^\cdot 还原生成激发态 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ 后, 以辐射复合的形式回到基态, 从而产生光辐射。路径 2 中, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 被 TPrA^\cdot 还原为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 之间通过湮灭反应生成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ 。路径 3 中, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+/\text{TPrA}$ 以催化路径进行反应, 只有 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 在电极表面发生氧化反应生成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 再将 TPrA 氧化为 TPrA^+ 。催化路径对 ECL 的贡献主要取决于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 的浓度, 当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 的浓度较低时, 催化路径的贡献几乎可以忽略不计; 而当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 的浓度大于 $500 \mu\text{mol/L}$ 时, ECL 反应主要由催化路径所主导^[28]。路径 4 由 Miao 等提出^[27], 即所谓的低氧化电位路径(LOPECL)。在这一路径中, 只有 TPrA 在电极表面被氧化为 TPrA^+ , 而 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 不发生电化学氧化, TPrA^+ 脱质子生成 TPrA^\cdot , $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 被 TPrA^\cdot 还原为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$, TPrA^\cdot 再将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 氧化为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$; 该路径也是磁微粒免疫分析中 ECL 信号的主要产生方式。

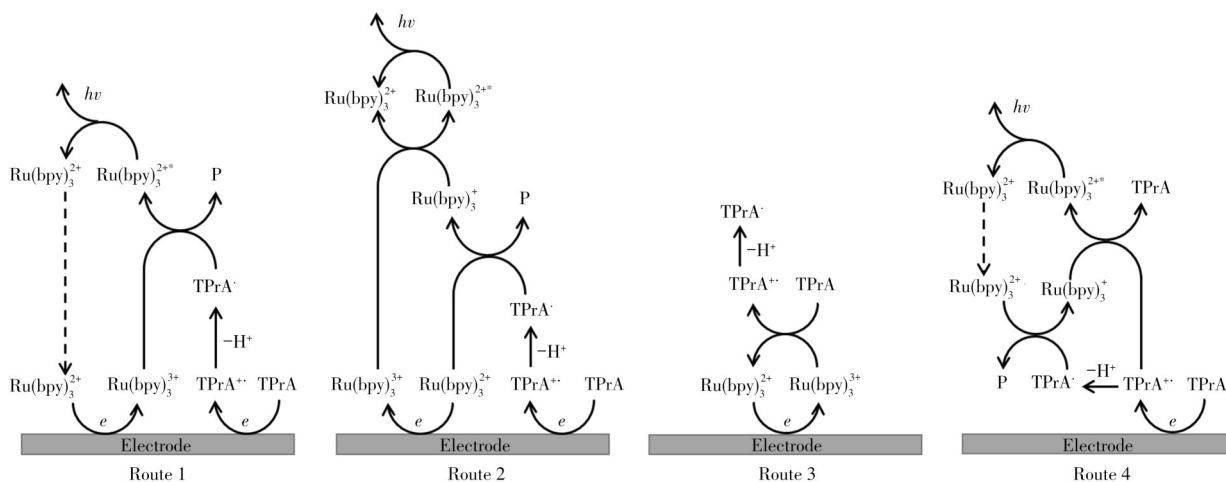


图 2 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ 共反应剂型电化学发光的反应机理

Fig. 2 Reaction mechanisms of coreactant ECL for $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ system

电化学发光反应的过程较为复杂, 涉及电极-溶液界面的电荷转移反应、活性中间体的生成与扩散、激发态的生成和辐射复合等, 目前对电化学发光反应机理的理解仍不十分清楚。解析电化学发光反应机理对设计新型电化学发光体系, 提高发光效率, 筛选发光分子和共反应剂, 调控发光区域和发展高效免疫分析体系等具有重要意义。

2 电化学发光机理解析

电化学发光是一种表面限域的分析方法, ECL 的发光层限域在电极表面附近, 发光层主要由 ECL 反应过程和反应中间体的寿命所决定^[29]。以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ 体系为例, 当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度较低时, 发光层的厚度由 TPrA^+ 的扩散决定, 由于 TPrA^+ 不稳定, 其扩散距离受限, 发光层局域在电极表面附近; 而当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度较高时, 电化学发光反应由催化路径主导, 发光层的厚度由 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 的扩散决定, 在一定时间尺度上电化学氧化产生的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 可在溶液中稳定存在, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 的扩散使发光层在空间上延展。因此, 改变发光分子或共反应剂的种类和浓度、施加的电位、电位的持续时间等可以改变各路径在 ECL 反应中的占比, 进而实现对发光层的空间调控。空间分辨测量是一种获得空间分辨信息的有效方法, 主要分为横向(平行于电极表面方向)空间分辨测量和纵向(垂直电极表面方向)空间分辨测量。其中, 纵向空间分辨测量可以直接对电极表面发光层的厚度等参数进行测量, 是研究发光机理最直接和有效的方法之一。目前, 扫描电化学显微镜(SECM)和电化学发光显微成像(ECLM)技术是实现电化学发光空间分辨测量的主要方法和工具。

2.1 扫描电化学显微镜(SECM)技术

SECM 是基于电化学反应的微区测量技术^[30-31], 以超微电极(UME)为工作电极和扫描探针(Tip)^[32], 具有较高的灵敏度和空间分辨率。Fan 等^[33]使用 SECM 和超微金属电极研究了电极尖端产生的 ECL,

得出 ECL 强度与电极 - 基底之间距离的定量关系。同时, 实现了对基底表面的成像, 空间分辨率达到 $1\ \mu\text{m}$ 。如图 3 所示, Miao 等^[27]将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 修饰到氧化铟锡 (ITO) 基底电极表面, 以直径为 $1.5\ \text{mm}$ 的半球形金电极作为 Tip, 研究了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ 的 ECL 并提出了低氧化电位反应路径。在实验过程中, ITO 电极处于开路状态, 发光分子不会在电极表面直接被氧化。在 Tip 上施加 $+0.85\ \text{V}$ (vs. Ag/AgCl) 的氧化电位, 溶液中的 TPrA 在 Tip 表面被氧化为 $\text{TPrA}^{\bullet+}$ 。Tip 沿垂直于基底电极的方向向基底渐近, 当 Tip 距离基底表面 $5\sim 6\ \mu\text{m}$ 时, PMT 开始检测到 ECL 信号, 并且随着距离的进一步减小, ECL 强度呈指数型增强。实验结果表明, $\text{TPrA}^{\bullet+}$ 在水溶液中的最远扩散距离约为 $6\ \mu\text{m}$, 进一步结合扩散系数计算出 $\text{TPrA}^{\bullet+}$ 的半衰期约为 $0.2\ \text{ms}$ 。

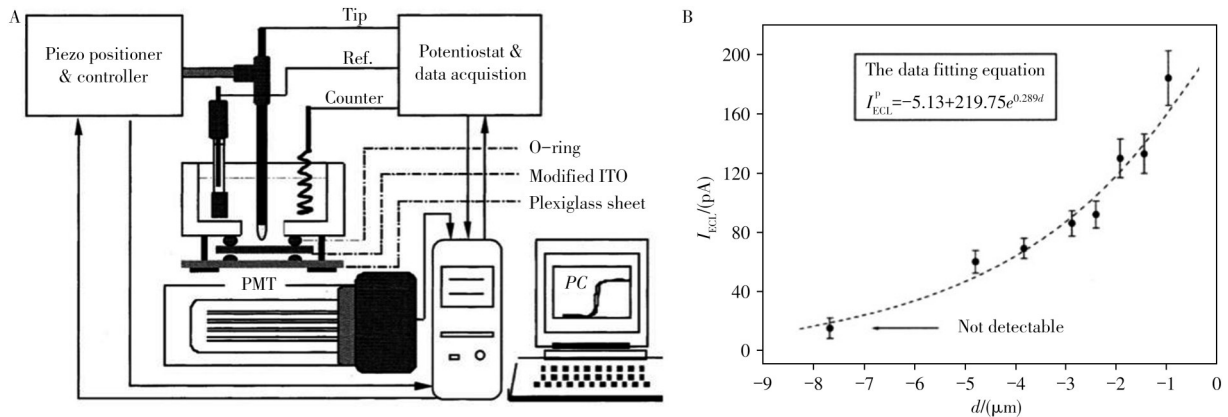


图 3 SECM 与 ECL 联用示意图 (A), ECL 强度随 Tip - 基底之间距离的变化曲线 (B)^[27]

Fig. 3 Experimental setup for studying ECL by SECM (A), dependence of ECL intensity on the distance between Tip and substrate (B)^[27]

Bard 课题组^[34]还运用 SECM 研究了湮灭型电化学发光的反应机理, 其原理如图 4 所示。在 SECM 探针与基底之间的微小间隙中, 电极表面产生的自由基之间发生湮灭反应生成激发态, ECL 的强度与距离相关。以红荧烯和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 作为发光分子, 改变探针与基底之间的距离得到一系列 ECL 强度 - 距离曲线, 并由这些发光曲线计算出稳态条件下湮灭型电化学发光反应的动力学参数, 计算结果与有限元多物理场模拟结果相吻合。

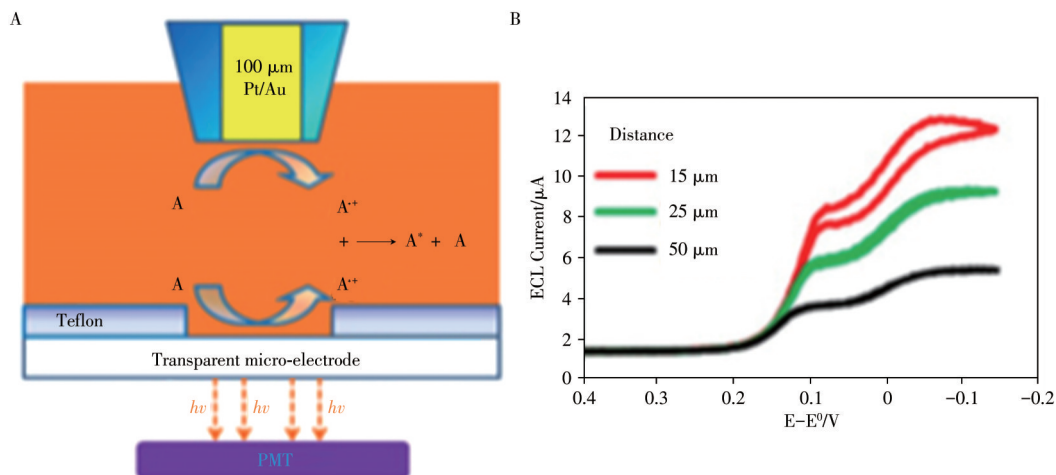


图 4 SECM 用于研究湮灭型电化学发光机理的示意图 (A), 及 ECL 强度 - 电位曲线随 Tip 与基底之间距离的变化 (B)^[34]

Fig. 4 Schematic illustration of SECM used in annihilation ECL (A), dependence of ECL intensity - potential curve on the distance between Tip and substrate (B)^[34]

SECM 在电化学发光反应动力学和机理研究中有着重要的应用, 但其空间分辨率很大程度上受到探针尺寸的限制, 且超微电极可能会对研究体系有一定的影响。因此, 目前电化学发光空间分辨测量主要基于电化学发光成像。

2.2 电化学发光显微成像(ECLM)技术

近年来,随着光学成像仪器灵敏度的逐渐提高,ECL成像分析发展迅速。ECL成像需要结合电荷耦合器件或电子倍增电荷耦合器件(EMCCD)实现。CCD可以将光学信号转换为电流信号,并能将电流信号进行放大和转换,以图像的形式输出,具有响应速度快、分析通量高、成像视野宽的优势^[35]。与CCD相比,EMCCD增加了电子寄存器,其检测灵敏度可达到单光子水平,能够显著地提高ECL成像的灵敏度和信噪比。为了提高空间分辨率,ECL成像通常需要结合显微镜使用,即ECLM^[36]。目前,ECLM技术主要应用于免疫分析^[37]、酶生物传感^[38]、细胞成像^[39-40]、核酸分析及指纹成像^[41-44]。

Sojic 课题组^[45]在亚微米尺寸的光纤阵列表面溅射ITO层,并在ITO表面涂覆绝缘材料,仅使锥形尖端暴露。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 与TPrA在尖端产生的ECL可以通过光纤传输,并使用CCD相机对ECL过程进行成像。阵列电极锥形尖端的直径约为 $0.6\ \mu\text{m}$,间距约为 $4\ \mu\text{m}$ 。电极之间的ECL图像不重叠,尺寸约为 $1\sim 1.5\ \mu\text{m}$ 。计算可得,ECL发光区域被限制在电极表面约 $400\ \text{nm}$ 的范围内,此即为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在电极表面的分布范围。

近年来,ECLM也被用于研究微球体系的电化学发光机理。Sojic 课题组^[46]利用夹心免疫反应将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 固定在直径为 $12\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球表面,通过俯视和侧视显微成像,研究了微球表面ECL的空间分布。如图5所示,荧光图像表明 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 均匀分布于微球表面。因为电子隧穿的距离仅为 $1\sim 2\ \text{nm}$,所以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 分子在电极表面的直接氧化可以忽略不计。以TPrA作为共反应剂时,施加 $+1.1\ \text{V}$ 的氧化电位,TPrA在电极表面被氧化为 TPrA^+ ,但由于 TPrA^+ 的扩散距离有限,只在距离电极表面 $3\sim 4\ \mu\text{m}$ 的范围内观察到明显的ECL信号。微球顶部的发光信号则来源于微球对底部ECL信号的物理汇聚,并非源于微球顶部的ECL。以DBAE作为共反应剂时,在微球表面未检出ECL信号。这是由于微球体系的ECL由共反应剂自由基的扩散和分布决定,而 DBAE^+ 的寿命远小于 TPrA^+ (约为 TPrA^+ 的十分之一),能扩散的距离非常有限,故产生的发光信号无法被检出。因此,虽然 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{DBAE}$ 溶液相体系的发光更强且发光效率更高^[23],但并不适用于微球免疫分析。该课题组还对 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 修饰的微球的不同区域(电极表面附近和远离电极表面的位置)进行成像,证明了共反应剂的氧化是微球体系ECL的关键步骤^[47]。除共反应剂外,缓冲溶液也会对微球表面的ECL产生较大的影响。Fiorani等^[48]报道了一种通过改变缓冲溶液的浓度调控微球表面发光层厚度的方法。当磷酸缓冲溶液的浓度增大时,缓冲能力增强,起缓冲作用的离子与质子结合的速率增加,使 TPrA^+ 脱质子的速率加快, TPrA^+ 的最大扩散距离减小,微球表面发光层的厚度减小,发光强度降低。

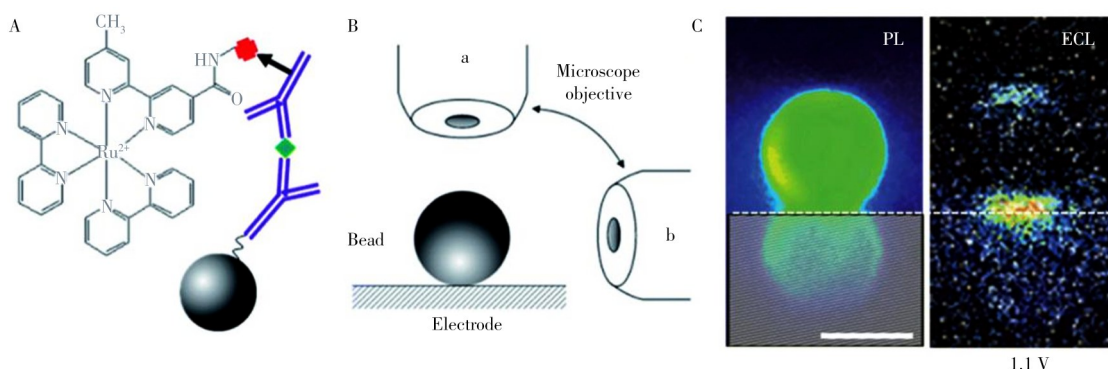


图5 在直径为 $12\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球表面修饰 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的示意图(A), 俯视(a)和侧视(b)显微成像示意图(B), 以及单个聚苯乙烯微球的荧光和ECL图像(C)^[46]

Fig. 5 Schematic illustration of immobilizing $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ on the surface of polystyrene (PS) bead with a diameter of $12\ \mu\text{m}$ (A), the optical configurations used for imaging the functionalized bead: top-view (a) and side-view (b) (B), and side-view PL and ECL images of single PS bead (C)^[46]

Paolucci 课题组^[49]结合ECLM、SECM和质谱等技术,发现了一种能增强ECL强度的共反应剂中间体。将发光分子在单位时间释放的光子数定义为转化频率(TOF),根据ECL图像计算不同直径微球的TOF,发现TOF随微球直径减小而明显增大。此外,将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 修饰在基底上,以TPrA作为共反应

剂, SECM的探针渐近基底的过程中, 同样观察到当探针距离基底表面小于 $1 \mu\text{m}$ 时, ECL强度随距离的进一步减小呈指数型增强, 表明电极表面附近存在一种活性更高、不同于 TPrA^+ 的共反应剂中间体。同时, 根据 ECL 强度与距离的关系曲线计算出电极表面附近和距离电极表面较远处共反应剂中间体的寿命分别为 $5 \mu\text{s}$ 和 $700 \mu\text{s}$ 。在 ECL 过程中, 质谱同时检出 TPrA^+ 和二丙胺阳离子自由基 ($\text{DPrA}^{\cdot+}$), 表明后者是提高电极表面附近 ECL 强度的关键。进一步在体系中加入 N-二丙基异丁胺 (DPIBA), 电极表面附近的 ECL 强度显著增强。这是因为 DPIBA 是一种含有支链的胺类共反应剂, 其 C—N 键断裂时生成的碳正离子比 TPrA 的 C—N 键断裂时生成的碳正离子更稳定, 所以 DPIBA 的 C—N 键更容易断裂生成 $\text{DPrA}^{\cdot+}$ 。该工作优化了微球尺寸并在反应体系中加入 DPIBA, 其 ECL 强度提高了 128%。

Sojic 课题组^[50-51]采用 ECLM 技术研究了纳米通道内的 ECL, 并比较了薄层电化学池中共反应剂型和湮灭型电化学发光的特点。纳米通道被固定在 SiN 壳层中的两个 Pt 电极之间, 长度约为 $20 \mu\text{m}$, 高度约为 100 nm , 其俯视图和截面示意图如图 6A、B 所示。将反应体积限制在飞升级, 活性中间体在微小体积内的扩散距离很短, 能显著增强 ECL 的强度。当纳米通道内同时存在 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和 TPrA 时, 分别在微电极上施加氧化电位和还原电位, TPrA 立即被消耗, 纳米通道中产生极弱的 ECL (图 6C); 在微电极上只施加氧化电位, 无法产生 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$, 仅在纳米通道的两端产生发光 (图 6D)。而当纳米通道中只有 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 时, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 可以在电极之间高效循环, 产生均匀的发光 (图 6E)。作者用电化学发光成像比较了多种反应路径共存时, 纳米通道内共反应剂型电化学发光和湮灭型电化学发光的贡献, 证明了显微成像技术是解析电化学发光反应机理的重要方法。

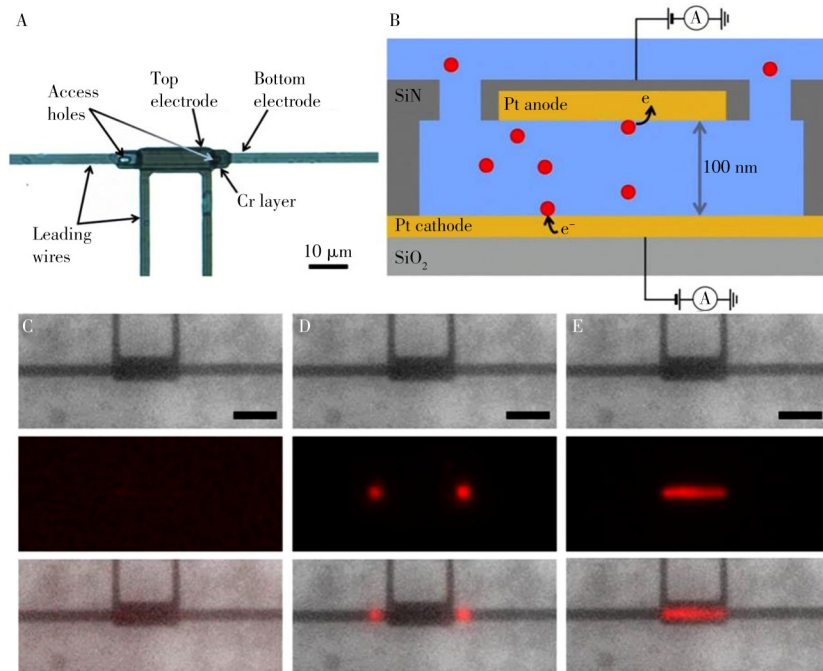


图 6 纳米流体装置的俯视图(A)和截面示意图(B); 纳米通道内湮灭型和共反应剂型电化学发光同时存在(C), 纳米通道内只有共反应剂型电化学发光(D), 纳米通道内只有湮灭型电化学发光(E)^[51]

Fig. 6 Top-view(A) and schematic cross-sectional(B) images of a nanofluidic device, mixed annihilation and coreactant modes in presence of TPrA (C), coreactant mode(D) and annihilation mode(E)^[51]

Guo 等^[52]采用无电镀金的方法制备了金微米管电极, 并通过显微成像技术, 研究了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度以及共反应剂种类对发光层厚度的影响。如图 7 所示, 以 TPrA 作为共反应剂, 当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度由 $10 \mu\text{mol/L}$ 增至 $500 \mu\text{mol/L}$ 时, ECL 的图像由圆环变为圆斑, 对应发光层的厚度由 $3.1 \mu\text{m}$ 增至超过 $4.5 \mu\text{m}$ 。当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度较高时, 催化路径起主导作用, 电极表面产生的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ 的扩散使发光层在空间延展。而以相同浓度的 DBAE 作为共反应剂时, ECL 图像的形状不随 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度的变化而变化, 始终为表面限域的圆环, 表明 DBAE 自由基不稳定, 扩散距离较短。该工作证明了可以通过改变发光分子的浓度或改变共反应剂的种类对电化学发光的空间分布进行调控。Ding 等^[53]采用化学沉积

法制备了类似的超高密度微孔电极阵列,研究了Ru(bpy)₃²⁺/TPrA体系在微孔内的ECL行为。TPrA自由基在微孔内部径向和轴向扩散的叠加使管壁内侧的ECL强度最强。当Ru(bpy)₃²⁺浓度较低时,单个微孔中ECL的图像为环形,且形状不随曝光时间的延长而改变。

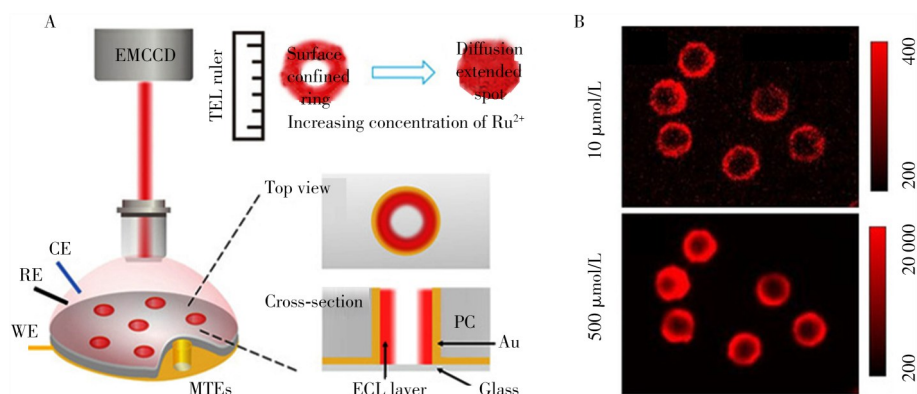


图7 通过微米管电极测量发光层厚度的原理示意图(A)及不同Ru(bpy)₃²⁺浓度下的ECL图像(B)^[52]

Fig. 7 Illustration of measuring the thickness of ECL layer through microtube electrodes (A), and ECL images recorded in 0.01 mol/L phosphate buffer (pH 7.4) containing 25 mmol/L TPrA and 10 μmol/L / 500 μmol/L Ru(bpy)₃²⁺ (B)^[52]

改变共反应剂的浓度,同样可以实现对发光层厚度的调控。Ding等^[54]在ITO电极表面制备了惰性半球形光胶点阵列,其直径约为20 μm,高度约为5.1 μm。当在电极上施加适当的氧化电位时,未被光胶点覆盖的电极表面将产生ECL信号,而光胶点覆盖的位置则不发生ECL反应,对应于ECL图像中的黑色圆形(图8A)。如图8B-E所示,Ru(bpy)₃²⁺的浓度为500 μmol/L,当TPrA的浓度由20 mmol/L减小到2.5 mmol/L时,黑色圆形的面积明显变小,同时圆心的ECL强度增强,表明随着TPrA浓度的降低,发光层从电极表面限域扩展至远离电极表面处(几微米)。当Ru(bpy)₃²⁺的浓度较高且TPrA的浓度较低时,电极表面氧化产生的Ru(bpy)₃³⁺能够向本体溶液中扩散较远的距离,并通过催化路径发光,此时发光层厚度较大;而当提高TPrA的浓度时,Ru(bpy)₃³⁺与TPrA的反应速率增加,Ru(bpy)₃³⁺在扩散过程中被大量消耗,其扩散距离变短,相应的发光层厚度也变小(图8F)。

电化学发光成像可以将激发态分子的分布可视化,在电化学发光机理研究中有着重要的应用。但受到光学衍射极限(~200 nm)的限制,成像的空间分辨率仍为亚微米级,在测量发光层厚度时还存在一定的局限性。

2.3 电化学发光自干涉光谱(ECLIS)

薄膜光学干涉指的是从薄膜的不同界面处反射的两束或多束相干光发生叠加的现象,是一种非侵入式、无需标记、超灵敏的测量方法。薄膜的折射率或厚度的微小变化均会引起干涉光谱形

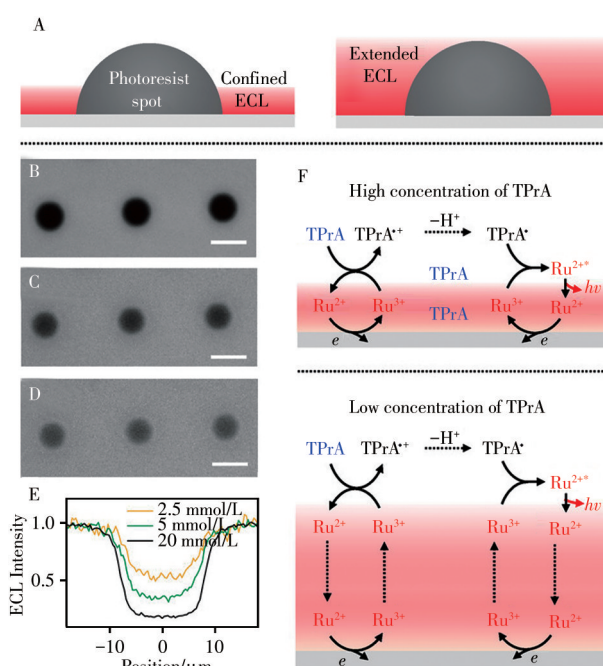


图8 发光层厚度变化对ECL图像中光胶点阵列面积的影响示意图(A);在500 μmol/L Ru(bpy)₃²⁺和20 mmol/L(B)、5 mmol/L(C)、2.5 mmol/L(D) TPrA中,光胶点阵列的ECL图像(比例尺为20 μm);在不同TPrA浓度下单个光胶点的归一化ECL强度曲线(E);以及在高、低TPrA浓度下发光层的分布示意图(F)^[54]

Fig. 8 Schematic illustration of modulating the thickness of ECL layer to image an inert photoresist spot (A), ECL images of photoresist spots in phosphate buffer saline containing 500 μmol/L Ru(bpy)₃²⁺ and different concentrations of TPrA (B: 20 mmol/L; C: 5 mmol/L; D: 2.5 mmol/L, the scale bars are 20 μm), normalized ECL intensity profiles along a single photoresist spot at different concentrations of TPrA (E), and illustration of the thickness of ECL layer at a high and low concentration of TPrA (F)^[54]

状的变化和光谱峰位置的移动。因此,薄膜光学干涉在痕量检测、分子识别和免疫分析等领域有重要应用^[55]。Wang等^[56]将电化学发光和薄膜光学干涉相结合,发展了电化学发光自干涉光谱(ECLIS),将电化学发光空间分辨测量的纵向空间分辨率提高至纳米水平。如图9A所示,以二氧化硅/硅片作为基底,溅射厚度约为4 nm的钛黏附层和10 nm的超薄金层,以此作为工作电极。在ECL过程中,电极表面附近的发光分子直接发射的光和从电极界面反射的光之间发生干涉,得到含一系列有序排列的干涉峰的干涉光谱。结合双光束干涉模型和传输矩阵模型,对光谱进行模拟解析,即可计算得到发光分子与电极表面的距离或发光层的厚度。将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 分别用3-巯基丙酸或含50个碱基对的双链DNA分子固定在电极表面,测得 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 与电极表面的垂直距离分别为1.5 nm和8.7 nm,证明了电化学发光自干涉光谱具有纳米水平的纵向空间分辨率。对于溶液相的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ 体系,当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度由 $1 \mu\text{mol/L}$ 增至 1mmol/L 时,干涉峰发生明显的红移和展宽,测得发光层厚度由350 nm增加至950 nm(图9B)。ECLIS具有较高的纵向空间分辨率,为电化学发光机理的研究提供了新思路。

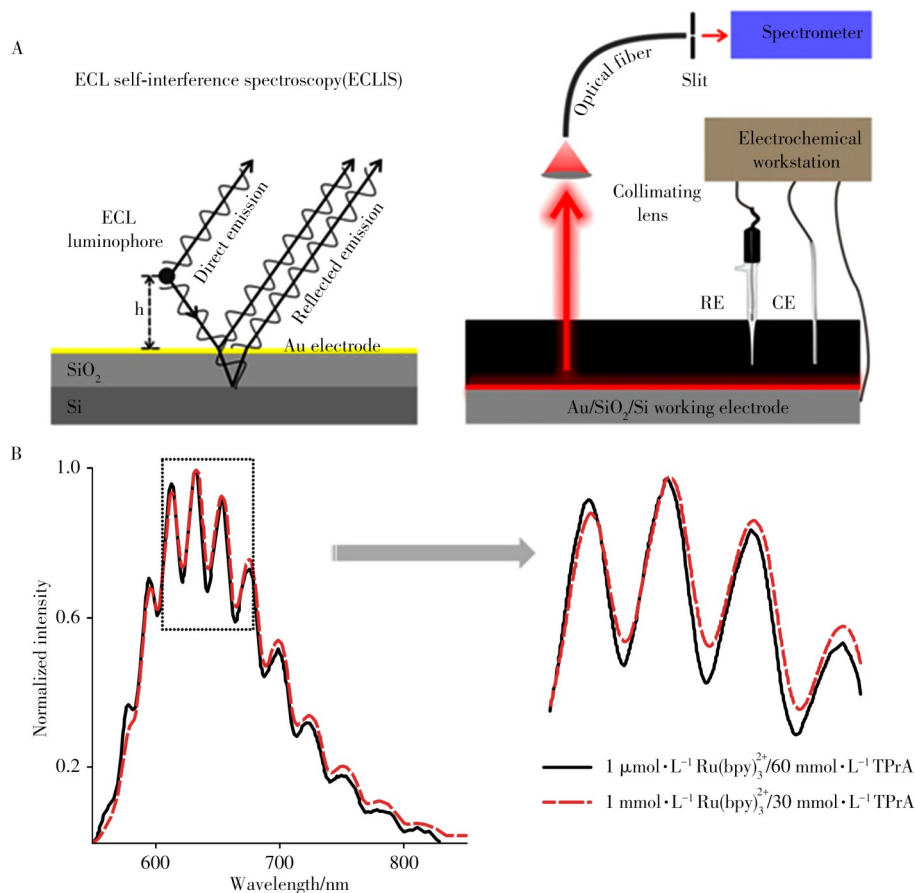


图9 电化学发光自干涉光谱的原理(左)及实验装置(右)示意图(A),以 $\text{Au}/\text{SiO}_2/\text{Si}$ 电极作为工作电极,施加电位为 1.2V ,在 $1 \mu\text{mol/L} \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/60 \text{mmol/L TPrA}$ (黑线)和 $1 \text{mmol/L} \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/30 \text{mmol/L TPrA}$ (红线)

(0.2mol/L 磷酸盐缓冲液, $\text{pH} 7.4$)中测得的归一化ECL自干涉光谱(B)^[56]

Fig. 9 Schematic illustration of principle (left) and experimental setup (right) for ECL self-interference spectroscopy (A), normalized ECL self-interference spectra obtained using a $\text{Au}/\text{SiO}_2/\text{Si}$ electrode in phosphate buffer (0.2mol/L , $\text{pH} 7.4$) containing $1 \mu\text{mol/L} \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/60 \text{mmol/L TPrA}$ (black curve) and $1 \text{mmol/L} \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/30 \text{mmol/L TPrA}$ (red curve) at applied potential of 1.2V (B)^[56]

3 总结与展望

ECL具有背景信号低、时空可控性强和灵敏度高的优势。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 作为最经典的ECL发光体,基于其的ECL体系已在生化分析、生物成像、临床诊断等领域得到广泛应用。虽然对 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 体系发光机理的研究已持续了很多年,湮灭型ECL和共反应剂型ECL路径也已提出很多年,但目前仍未在实验上得到直接证明,对 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 体系发光机理的理解仍不十分清楚,尤其是共反应剂型ECL,涉及的

反应过程较为复杂,反应中间体的寿命较短,对不同条件下的反应机理尚无明确定论。目前常用的电化学发光分析方法测量的大多为电极表面的整体平均信息(如发光强度),缺少空间分辨信息,无法准确揭示反应机理。而空间分辨测量能够直接得到电极表面附近 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 或者共反应剂自由基的分布,是最简单、高效的解析发光机理的方法之一。目前,而空间分辨测量主要基于SECM和ECLM,但SECM使用的探针可能会干扰初始的ECL体系,使测量的结果偏离真实值;而ECLM则受限光学衍射极限,分辨率仍停留在亚微米水平。ECLIS是一种灵敏度更高的分析方法,具有纳米级的纵向空间分辨率,有望实现发光层厚度的准确测量,进而解析发光机理。此外,将ECL与质谱、电子自旋共振技术结合,有望实现对反应中间体的直接测量,进而解析发光机理。

ECL是目前生化分析中最先进的检测技术之一,而对 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPrA}$ 这一经典体系机理的解析也是目前最为重要的研究方向之一。阐明ECL的机理,除了可提高其分析检测性能外,对设计高效的发光分子、筛选合适的共反应剂、调控发光层厚度和设计新型电化学发光传感器也具有指导性意义,亦有助于拓宽其在生物传感、发光器件、核酸检测、免疫分析、环境监测等研究领域的应用范围。

参考文献:

- [1] Miao W J. *Chem. Rev.*, **2008**, 108(7): 2506–2553.
- [2] Hu L Y, Wu Y, Xu M, Gu W L, Zhu C Z. *Chem. Commun.*, **2020**, 56(75): 10989–10999.
- [3] Xu J J, Huang P Y, Qin Y, Jiang D C, Chen H Y. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(9): 4609–4612.
- [4] Sun Y Y, Wu X H. *J. Instrum. Anal.* (孙莹莹, 吴晓惠. 分析测试学报), **2021**, 40(3): 363–369.
- [5] Liu Z Y, Qi W J, Xu G B. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44(10): 3117–3142.
- [6] Dufford R T, Nightingale D, Gaddum L W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1927**, 49(8): 1858–1864.
- [7] Harvey N. *J. Phys. Chem.*, **1929**, 33: 1456–1459.
- [8] Kuwana T, Seo E T, Epstein B. *J. Phys. Chem.*, **1963**, 67(10): 2243–2244.
- [9] Hercules D M. *Science*, **1964**, 145(363): 808–809.
- [10] Santhanam K S V, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87(1): 139–140.
- [11] Tokel N E, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94(8): 2862–2863.
- [12] Rubinstein I, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103(3): 512–516.
- [13] White H S, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104(25): 6891–6895.
- [14] Chang M M, Saji T, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99(16): 5399–5403.
- [15] Engstrom R C, Johnson K W, DesJarlais S. *Anal. Chem.*, **1987**, 59(4): 670–673.
- [16] Engstrom R C, Pharr C M, Koppang M D. *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, 221(1/2): 251–255.
- [17] Pharr C M, Engstrom R C, Klancke J, Unzelman P L. *Electroanalysis*, **1990**, 2(3): 217–21.
- [18] Pharr C M, Engstrom R C, Tople R A, Bee T K, Unzelman P L. *J. Electroanal. Chem.*, **1990**, 278(1/2): 119–128.
- [19] Leland J K, Powell M J. *J. Electrochem. Soc.*, **1990**, 137(10): 3127–3131.
- [20] Collinson M M, Wightman R M. *Science*, **1995**, 268(5219): 1883–1885.
- [21] Wang Q, Li C, Zhang Z X. *J. Instrum. Anal.* (王琪, 李超, 张召香. 分析测试学报), **2021**, 40(8): 1197–1202.
- [22] Cao Z Y, Shu Y F, Qin H Y, Su B, Peng X G. *ACS Cent. Sci.*, **2020**, 6(7): 1129–1137.
- [23] Cao Z Y, Sun H, Su B. *Chem. J. Chin. Univ.* (曹芷源, 孙慧, 苏彬. 高等学校化学学报), **2020**, 41(9): 1945–1955.
- [24] Liu X Q, Shi L H, Niu W X, Li H J, Xu G B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46(3): 421–424.
- [25] Deaver D R. *Nature*, **1995**, 377(6551): 758–760.
- [26] Hu L Z, Xu G B. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(8): 3275–3304.
- [27] Miao W J, Choi J P, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124(48): 14478–14485.
- [28] Zu Y B, Bard A J. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(14): 3223–3232.
- [29] Voci S, Goudeau B, Valenti G, Lesch A, Jović M, Rapino S, Paolucci F, Arbault S, Sojic N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140(44): 14753–14760.
- [30] Bard A J, Fan F R F, Kwak J, Lev O. *Anal. Chem.*, **1989**, 61(2): 132–138.
- [31] Amemiya S, Bard A J, Fan F F, Mirkin M V, Unwin P R. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2008**, 1: 95–131.
- [32] Penner R M, Heben M J, Longin T L, Lewis N S. *Science*, **1990**, 250(4984): 1118–1121.

- [33] Fan F R F, Cliffel D, Bard A J. *Anal. Chem.*, **1998**, 70(14): 2941 – 2948.
- [34] Rodríguez – López J, Shen M, Nepomnyashchii A B, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(22): 9240 – 9250.
- [35] Liu Y H, Guo W L, Su B. *Chin. Chem. Lett.*, **2019**, 30(9): 1593 – 1599.
- [36] Zanut A, Fiorani A, Rebecani S, Kesarkar S, Valenti G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2019**, 411(19): 4375 – 4382.
- [37] Deiss F, LaFratta C N, Symer M, Blicharz T M, Sojic N, Walt D R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(17): 6088 – 6089.
- [38] Marquette C A, Degiuli A, Blum L J. *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 19(5): 433 – 439.
- [39] Ding H, Guo W L, Su B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(1): 449 – 456.
- [40] Ding L R, Fu W X, Ding H, Zhou P, Guo W L, Su B. *Chin. J. Anal. Chem.* (丁鹭榕, 傅文轩, 丁昊, 周萍, 郭维亮, 苏彬. 分析化学), **2021**, 49(7): 1188 – 1197.
- [41] Xu L R, Li Y, Wu S Z, Liu X H, Su B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51(32): 8068 – 8072.
- [42] Xu L R, Zhou Z Y, Zhang C Z, He Y Y, Su B. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(65): 9097 – 9100.
- [43] Su B. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, 408(11): 2781 – 2791.
- [44] Xu L R, Zhang C Z, He Y Y, Su B. *Sci. China Chem.*, **2015**, 58(7): 1090 – 1096.
- [45] Chovin A, Garrigue P, Vinatier P, Sojic N. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(2): 357 – 364.
- [46] Sentic M, Milutinovic M, Kanoufi F, Manojlovic D, Arbault S, Sojic N. *Chem. Sci.*, **2014**, 5(6): 2568 – 2572.
- [47] Dutta P, Han D, Goudeau B, Jiang D, Fang D, Sojic N. *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 165: 112372.
- [48] Fiorani A, Han D, Jiang D, Fang D, Paolucci F, Sojic N, Valenti G. *Chem. Sci.*, **2020**, 11(38): 10496 – 10500.
- [49] Zanut A, Fiorani A, Canola S, Saito T, Ziebart N, Rapino S, Rebecani S, Barbon A, Irie T, Josel H P, Negri F, Marcaccio M, Windfuhr M, Imai K, Valenti G, Paolucci F. *Nat. Commun.*, **2020**, 11(1): 2668
- [50] Al – Kutubi H, Voci S, Rassaei L, Sojic N, Mathwig K. *Chem. Sci.*, **2018**, 9(48): 8946 – 8950.
- [51] Voci S, Al – Kutubi H, Rassaei L, Mathwig K, Sojic N. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2020**, 412(17): 4067 – 4075.
- [52] Guo W L, Zhou P, Sun L, Ding H, Su B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(4): 2089 – 2093.
- [53] Ding J L, Zhou P, Guo W L, Su B. *Front. Chem.*, **2020**, 8: 630246
- [54] Ding H, Zhou P, Fu W X, Ding L R, Guo W L, Su B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(21): 11769 – 11773.
- [55] Jane A, Dronov R, Hodges A, Voelcker N H. *Trends Biotechnol.*, **2009**, 27(4): 230 – 239.
- [56] Wang Y F, Guo W L, Yang Q, Su B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142(3): 1222 – 1226.

(责任编辑: 龙秀芬)