

化學冷光儀

Luminometer

王建華、莊琮凱

Jiann-Hua Wang, Tsung-Kai Chuang

冷光反應被用來偵測化學物質及生化樣品已有數十年的歷史，由於量測技術與儀器隨時間而進步，因此偵測極限愈趨靈敏，也能量測更多樣性的樣品。本文將介紹冷光反應的機制、量測設備的原理、市面上的冷光分析儀以及應用範圍，期使讀者對於冷光儀有所瞭解。

Luminescence has been used to probe chemicals or biological samples for several decades. Because of the development of instruments and measurement technology, luminometer is more sensitive and can measure various samples. This article would like to introduce the mechanism of luminescence, the principle of the instrument, commercial luminometers, and the applications. It can let readers to understand a luminometer more.

一、前言

一般光物理 (photophysical) 及光化學 (photochemical) 過程中，物質吸收光子而產生物理或化學反應或產生發光現象 (luminescence)，然而在化學發光或化學冷光 (chemiluminescence) 的現象中，則是由化學反應而釋出光子。其原理為將分子或原子經由化學反應形成激發態 (excited state)，而後於激發態回到基態 (ground state) 的過程中放出光子。此發光現象也包含了一般所謂的螢光 (fluorescence) 與磷光 (phosphorescence)，而螢光或磷光的反應機制可由圖 1 的 Jablonski 的能量圖來表示。

圖 1 中的螢光機制需從 S_1 的激發態回到 S_0 的基礎態，而磷光則從 T_1 的激發態回到 S_0 的基礎態。若無分子內的緩解過程 (internal conversion, IC)，則從 S_2 激發態到 S_1 激發態之間亦會發出光子產生

發光現象 (luminescence)，所以一般化學發光之光譜的譜寬非常寬，可達 200 nm 範圍，甚至更寬。

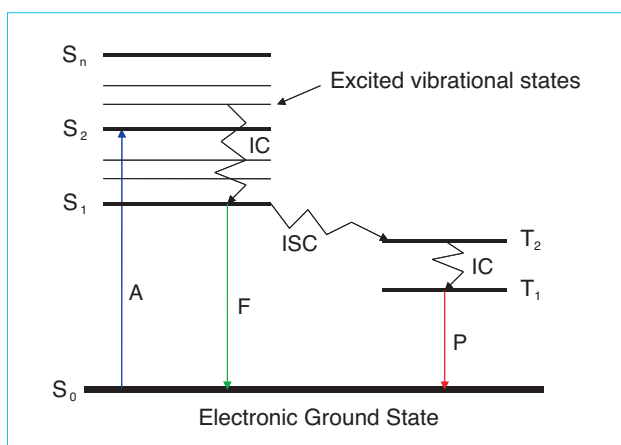
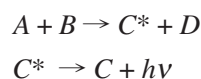


圖 1. Jablonski 的能階圖。A：吸收光子，F：螢光，P：磷光。

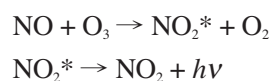
因化學發光的機制為伴隨著化學反應而產生處於激發態的產物或中間物質，而後以光的形式將能量釋出，過程中沒有熱能伴隨釋出，因此一般稱為化學冷光。在生物界中螢火蟲之發光機制亦為相似過程，但其反應分子為生化分子，其冷光反應亦可稱為生物冷光 (bio-luminescence)。不論是化學冷光或生物冷光，在許多文獻上已有探討⁽¹⁻⁴⁾，本文將著重於冷光儀的設計分析。而偵測冷光的儀器設計與偵測光物理或光化學過程所產生之螢光與磷光的儀器將有數點顯著不同的設計。第一為無激發光源，因其為化學或生化反應所產生。第二為只需一個偵測器如光電倍增管 (photomultiplier tube, PMT)，不需要利用單光儀 (monochromator) 進行分光的设计。第三在一般的冷光儀中不需要置入濾光片，因無背景激發光源。

二、原理

冷光反應被發現已超過百年，在各類型的冷光反應中，最簡單的為下列方程式的形式：



A 及 B 代表反應物，C* 代表產物 C 之激發態，而發出之冷光為產物 C 的冷光光譜。若以實際反應為例，如下列氣體反應方程式所示：



所放出的波長範圍落在 600 nm 到 2400 nm 之間。此項反應一般用於模擬或實際測定大氣中氮氧化物 (NO_x) 的濃度。除此之外，多數的有機化合物利用環狀過氧化物 (peroxide) 的中的氧原子的鍵結 (O—O) 斷裂而產生冷光。一般而言，多數反應物所產生的冷光壽命甚短，從微秒到數十秒之間，此類反應一般稱之為快冷光反應，如圖 2 所示。因此在實際測量上的儀器設計便需有所謂流體系統的设计以量測壽命短的冷光，因為無法將反應物置於樣品槽

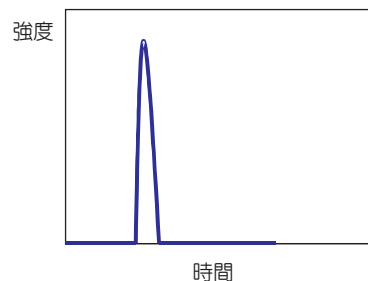
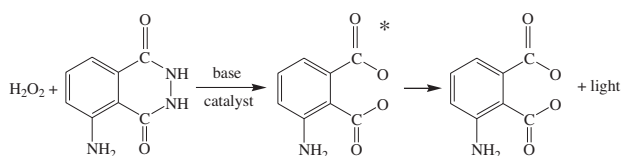


圖 2. 一般快冷光反應強度與時間的分布圖。

後再行量測，因其在尚未進行偵測前，反應物可能已反應完畢。

因此這類量測快冷光的設備較為複雜，便在實際應用上會加入特定受質，以延長冷光壽命，例如常見的反應物 luminol 與雙氧水作用可放出冷光，如下列反應式：



然而其壽命甚短，若加入 SA-HRP 酵素 (streptavidin-horseradish peroxidase)，則冷光壽命如圖 3 所示，冷光壽命可長達數十分鐘，一般稱之為慢冷光反應，因此在操作上便有許多時間的餘裕，而使得儀器的設計上也方便許多，並進而可降低製造成本以便普及。

除了冷光壽命會牽動儀器的設計之外，冷光強度因靈敏度之故亦影響偵測器的選擇，而冷光強度會受反應物的種類及溶劑的環境所影響，冷光發光的量子效率 (quantum yield) 如下列方程式：

$$\Phi = \frac{\text{發光分子總數}}{\text{反應激發分子總數}}$$

$$= \Phi_C \times \Phi_{\text{EX}} \times \Phi_F$$

由上式可知，若發光分子的總數愈多，則量子效率愈佳，可用愈少量的樣品達到偵測的目的，因此在臨床的生物醫學診斷上儘量尋找及使用高量子效率的反應分子，以減少檢體取樣的需求。而 Φ 代表進行化學冷光反應的分子比率，其值介於 0 到

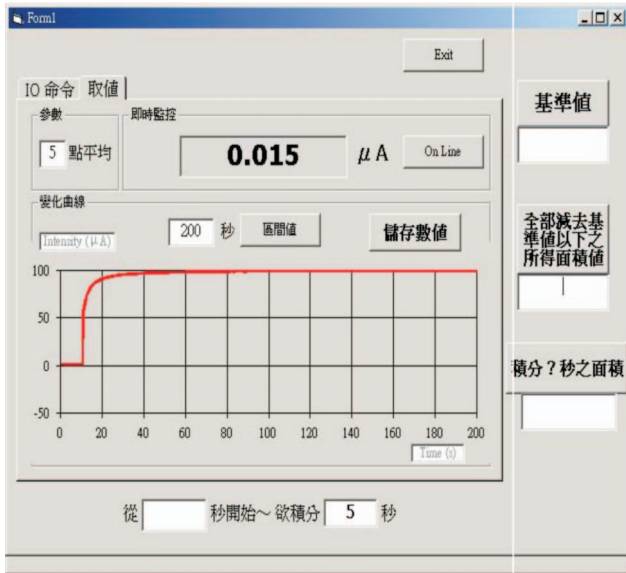


圖 3. SA-HRP 酵素與 luminal 以及雙氧水反應後的冷光壽命圖，使用開物科技的冷光儀所量測。

1 之間，若為 0 則代表無分子能進行化學冷光反應，亦即不發光，若為 1 則代表所有分子皆可進行冷光反應，常見的值為 10^{-3} 以上。 Φ_{EX} 代表激發態分子的比率，亦即經過化學冷光反應後處於激發態分子的比率。 Φ_{F} 則代表激發態的量子效率，亦即相較於其他能量緩解過程，激發態會放出光子的比率。一般而言，冷光發光的量子效率值約在 0.01 到 1 之間，依照反應物的種類與反應條件而不同。

三、儀器設計

雖然在眾多的分析儀器之中，化學冷光分析儀被認為是架構較單純的儀器，然而因冷光的應用歷史悠久，因此符合不同需求的冷光儀便被發展出來，而影響儀器的各樣因素如光電倍增管、流體系統等將會在後文逐一介紹。

1. 基本架構

冷光儀的基本組成包含樣品槽、偵測器、控制電路、流體系統 (此項依實際需求而定) 以及阻絕外界光干擾的箱蓋設計，如圖 4 所示。

在這些組件之中，樣品槽需選擇不吸收冷光且品管良好的製品，以免因管壁厚度或材質吸收冷光

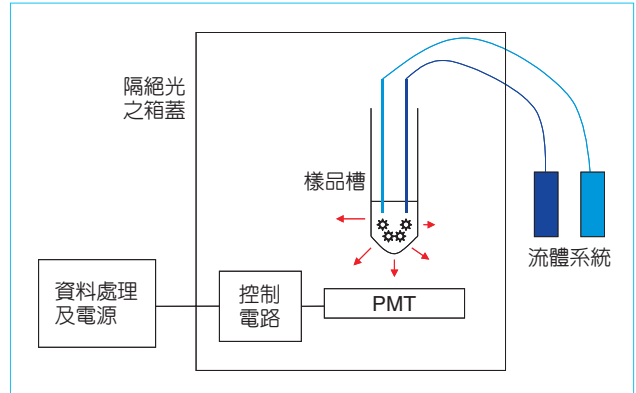


圖 4. 一般冷光儀的基本設計。

影響光電倍增管的讀值。流體系統通常因應冷光壽命短的樣品，若在樣品之冷光壽命夠長而無需使用流體系統的情形下，樣品槽通常會置於一滑軌上以便取放，此時每次滑軌移入後樣品槽相對於光電倍增管之位置需在同一位置，以免讀值偏差。而控制電路會影響偵測的靈敏度與動態範圍。所謂動態範圍之意義為讀取冷光強度值僅限於動態範圍內，如果動態範圍是 10^6 ，則表示冷光強度的讀取範圍為 1 – 1,000,000。假設樣品濃度 10^{-3} M 時的讀值為 1,000,000，則代表濃度高於 10^{-3} M 的樣品無法進行定量；若樣品濃度為 10^{-8} M 的讀值為 1，則濃度低於 10^{-8} M 時的樣品亦無法進行定量。而對於不同的樣品系統，其濃度相對於動態範圍區間的比例亦有所不同，因此除標準的試劑，可能已有不同廠商建立比較標準之外，各使用者應對自身所選擇的樣品建立對照標準。

2. 光電倍增管

在一般商業上的冷光儀中，最常使用的偵測器為光電倍增管，雖然光電二極體 (avalanche photo diode, APD) 與電荷耦合元件 (charge coupled device, CCD) 有逐漸被採用的趨勢，但在靈敏度的考量之下，仍以光電倍增管為主流。而光電倍增管為利用光電效應，亦即光子由發光體進入光電板後將其轉換成電能，由於光電板的材質使得對不同波長的光的轉換效率不同，同時也對不同波長的光靈敏度不同。例如圖 5 為製造商 Hamamatsu 的不同型號光電倍增管的光譜反應範圍⁽⁵⁾，在圖 5 中不同型號的

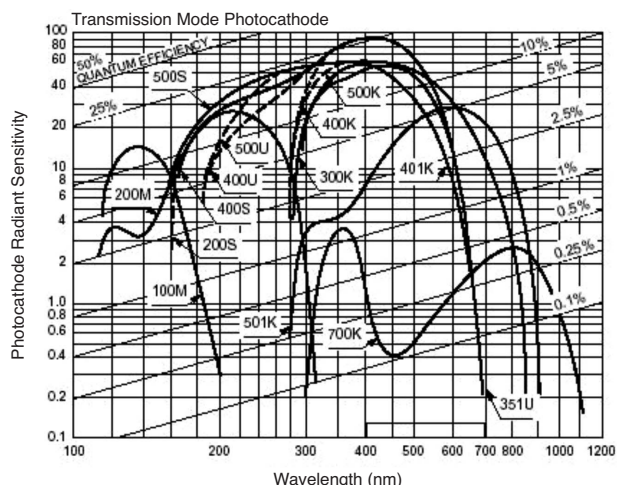


圖 5. Hamamatsu 的光電倍增管之光譜反應範圍⁽⁵⁾。

光電倍增管，對由紫外光區到紅外光區不同光波長的靈敏度明顯不同，因此在購買或設計冷光儀時需注意反應物之冷光波長。如表 1 所示係不同的冷光反應分子，包含氣體分子與蛋白質的冷光發光之中心波長。除此之外，由於許多的檢體量極為稀少，縱使有高的發光效率，而其發出的光仍非常微弱，因此常需要在光電倍增管訊號輸出端加入放大訊號及濾除雜訊的電路設計，此項設計的優劣將直接影響最終的靈敏度。

3. 流體系統

正如之前所敘述，當需要量測快冷光樣品時，即需要流體系統。除此之外，若需研究樣品之反應動力學，亦需使用含有流體系統的冷光儀進行測試。然而使用流體系統時，需注意若更換樣品時所產生的污染問題，由於冷光儀非常靈敏，即使殘留的樣品濃度很低，亦有可能影響偵測結果，因此在每次進行實驗前需徹底清潔系統。

4. 中性密度濾光片

當樣品濃度太高而使讀值超出動態範圍取值的情形，若無法調低光電倍增管的增益值 (gain) 時，有些冷光儀會設計在光電倍增管前可置入一片中性密度濾光片 (neutral density filter)，其作用為降低光的強度以能達到量測的效果，一般可降低強度為原先的十分之一到千分之一。

表 1. 不同冷光反應分子發光之中心最大波長。

冷光反應分子	中心最大波長
Oxidation of lumino in aqueous alkali	425 nm
Oxidation of lumino in dimethyl sulphoxide	500 nm
N-methylacridone (from lucigene) in various condition	420–500 nm
Oxyluciferin (from luciferin)	562 nm
Ru(bpy) ₃	600 nm
Aequoin	469 nm
CN	383–388 nm
HCF	475–750 nm
HCHO	350–500 nm
HF	670–700 nm
HSO	360–380 nm
IF	450–800 nm
NO ₂	1200 nm
OH	306 nm
S ₂	275–425 nm
SF ₂	550–875 nm
SO ₂	260–480 nm

四、商業產品

目前世界上生產冷光儀的廠商非常多，冷光儀的形式也非常多樣化。圖 4 的架構已描述大多數的單試管冷光儀的系統，但由於單試管系統每次只能量測一種樣品，因此便發展出盤式的冷光儀。圖 6 為美商 Turner Biosystems 的盤式冷光儀結構圖⁽⁶⁾，包含一個 96 孔的樣品盤，所以可置入複數樣品後進行偵測，亦可無需流體系統，端視使用者的需求而定。

除了只量測冷光的機種之外，廠商亦開發出量測螢光與冷光的機種，以及量測生物冷光共振能量傳遞 (bioluminescence resonance energy transfer, BRET) 的設備，此種技術來自螢光共振能量傳遞 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的原理，而可用蟲螢光酵素 (luciferase) 取代原先在螢光共振能量傳遞中提供能量的螢光分子的角色，此項技術用來偵測蛋白質之間的作用情形，因此發展至此，冷光技術不僅可量測樣品之濃度及反應動力學，並可提供生物物理化學的訊息。

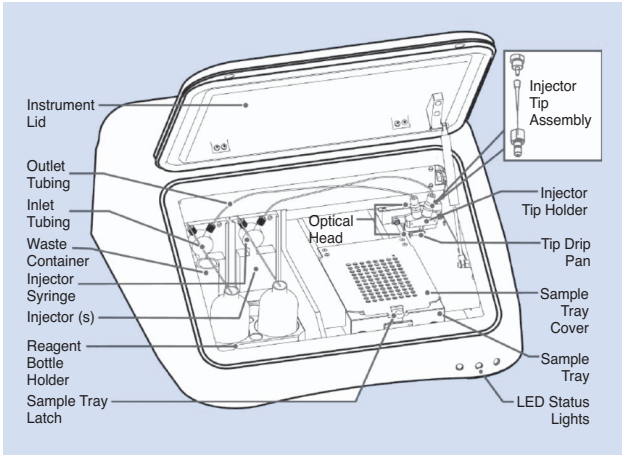


圖 6. Turner Biosystems 的盤式冷光儀結構圖⁽⁶⁾。

而在選擇冷光儀時會比較不同廠商的規格，表 2 列出一般冷光儀的基本規格⁽⁶⁻⁸⁾。在偵測器方面，目前仍以光電倍增管為主。由於多數在生物實驗上的冷光波長位於可見光區，多數在 400–600 nm 之間，因此多數偵測器的波長範圍在 300–600 nm 之間。舉例而言，對於 SA-HRP 酵素與 luminol 以及雙氧水反應後的冷光中心波長在 420 nm，而在 420 nm 的光波長時，光電倍增管的靈敏度可達 90%，已達最大效率之範圍，此時最為靈敏。關於靈敏度則依各家機型不同而有所差異，一般冷光儀的最低靈敏度為 10^{-12} M (1 pM) ATP、 10^{-15} M (1 fM) ATP、 10^{-17} M (10 attoM) ATP 不等，或是 1000 個蟲螢光劑分子 (luciferin)。對使用者而言，自然是越靈敏越好，但要顧慮到價格因素，以及本身是否需要極靈敏之系統。動態範圍目前多數為 10^6 ，此項值越大越好。精確度的標準差亦因機型而有差異，在 $\pm 3\%$ 之內已為穩定良好之機型。樣品形式為管式或盤式居多。而資料輸出目前多已 RS-232 介面為主，未來應可期待使用 USB 介面機型出現。

五、應用

由於冷光反應有多項優點，所以應用非常廣泛，不論是氣相、液相或是固相，皆發展出不同的儀器設備加以應用，所以在此對於實際應用的範例加以介紹，以瞭解冷光反應的用途。

表 2. 一般冷光儀的基本規格⁽⁶⁻⁸⁾。

偵測器	光電倍增管，波長範圍 300–600 nm
靈敏度	可低至 10^{-17} M ATP 或 1000 個 luciferin 分子
動態範圍	10^6
精確度	標準差 $< \pm 3\%$
樣品形式	12 mm 樣品管，96 或 384 孔的樣品盤
資料輸出	RS-232 介面

1. 氣相

如同在原理部分所敘述，可利用臭氧 (O_3) 與氮氧化物 (NO_x) 的冷光反應來檢定空氣中氮氧化物的濃度。大氣中的氮氧化物多半來自汽車、摩托車、飛機以及各式工廠，由於氮氧化物可破壞大氣中的臭氧層，因此定期監控氮氧化物的濃度便為必要之務。一般量測氣相冷光反應的設備皆須有氣體流量控制設備，而偵測器通常仍為光電倍增管，直接偵測反應槽所發出之冷光，較特殊的是需要有真空幫浦系統將反應氣體定量抽出。圖 7 為 ECO Physics 公司的冷光反應分析儀的流體系統簡圖，偵測器未在圖上顯示，但通常位於氣體反應槽壁隔一玻璃直接偵測。除量測氮氧化物之外，亦可量測甲基硫化物 ($(CH_3)_2S$)、異戊間二烯 (isoprene) 等會影響空氣中臭氧、一氧化碳、過氧化物濃度的有機反應物之濃度，以監測空氣的品質。

2. 固相

冷光反應多半應用於氣相或液相反應，而固相則多為分子在固體表面進行反應後能以固相方式存在，例如在傳統的酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 中可以用化學冷光反應物進行反應而後量測，如圖 8 所示⁽¹⁰⁾，先在所選擇的抗體上加入特定的抗原，再加上鹼磷酸脂酶 (alkaline phosphatase) 以為標記，之後再加入化學冷光受質及增強劑 (enhancer)，冷光強弱的比例與抗原的濃度成正比，不同的化學受質可依不同的抗原而被選擇。除了應用於酵素免疫分析法之外，在電化學冷光免疫分析法 (electrochemilumescence immunoassay) 反應中，可用電極將化學冷光分子激發以進行反應。

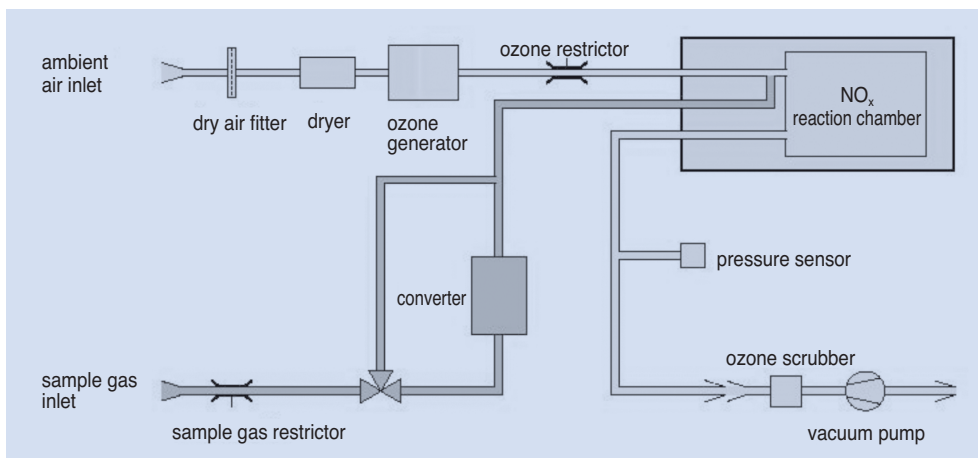
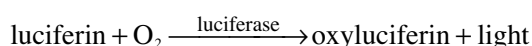


圖 7. ECO Physics 的 CLD 70S 氣相冷光分析儀流體系統簡圖⁽⁹⁾。

3. 液相

液相所進行之化學冷光反應可配合液相色層分析法 (liquid chromatography) 以同時分離偵測分子，而目前大部分的液相冷光反應多用於分析生化系統，正如同之前所述為生物冷光 (bioluminescence) 反應，而一般自然界生物冷光反應中的冷光機制來源如下：



其中 luciferin 為螢光劑，而 luciferase 為酵素觸媒。在自然界數以百種的動物或昆蟲會發光，但其反應機制來自數種的螢光劑，而已知的五種以 luciferase 為觸媒的反應螢光劑，其名稱及結構式如表 3 所示，其中 firefly luciferin 為螢火蟲之螢光劑，其餘的螢光劑存於魚類、蝦類等生物體中。除此之外，另有不同的螢光觸媒如 aequorin、polynoidin 等存於生物體中。

而生物冷光反應除自然界生物體外，亦可應用於基因分析，如應用 luciferase、 β -galactosidase、 β -glucuronidase、鹼磷酸脂酶 (alkaline phosphatase)、人類成長荷爾蒙 (human growth hormone, HGH) 等作為報導基因 (reporter gene) 以插入分子，利用其冷光之性質可標定特定之 DNA 或特定之基因，達到分析之效果。而螢火蟲螢光劑亦常用來與細胞內的 ATP 反應發出冷光，藉由冷光強度便可判定細胞內 ATP 的多寡。此項反應廣泛的應用於偵測水

中、食物或藥物中微生物的含量，以確定安全性，同時亦可運用於臨床醫學上，偵測在藥物的影響之下微生物中抗體成長的情況。

六、結語

本文在開始介紹冷光發光的基本原理後，以較長篇幅敘述冷光儀的架構與組成，因為一般的論文多著墨於應用冷光技術分析物質，而較少分析冷光儀中各項器件之組成及如何選擇合適的冷光量測系統。目前市面上所有商業型的冷光分析儀皆為國外

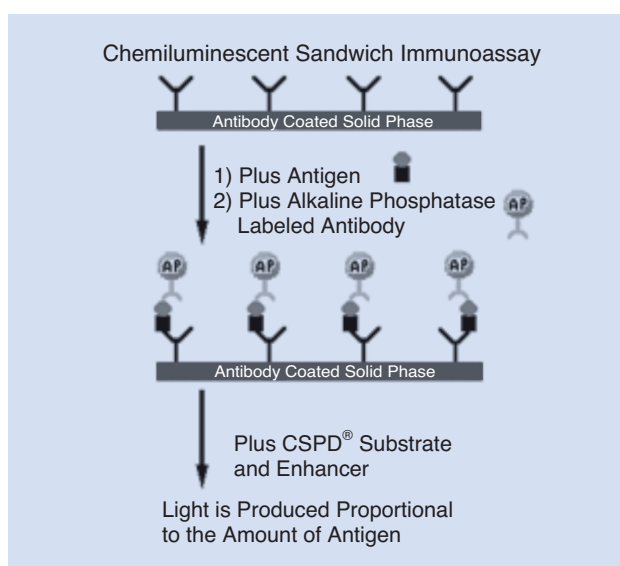


圖 8. 在固相基質上進行化學冷光免疫反應的機制⁽¹⁰⁾。

表 3.
已知的五種反應螢光劑的名稱
及結構式。

名稱	結構式
Bacterial Luciferin	
Dinoflagellate Luciferin	
Vargulin	
Coelenterazine	
Firefly Luciferin	

之產品，國內已有廠商開始開發冷光儀以因應市場需求。冷光量測技術的發展隨著時間而能偵測出更低濃度的樣品，應用於環境污染偵測、基因與藥物分析，以及使用生物冷光共振能量傳遞的技術偵測蛋白質間的作用，因此未來的發展方向，除將傳統

冷光儀的架構因零組件性能的增進而增加靈敏度等功能外，也將整合其他偵測方式，如螢光分析等，成為一套可提供完整光譜分析的設備。若再加上微機電或微流體晶片技術，或許未來在極小化的設備上只需極少的檢體即可完成偵測。

參考文獻

1. A. K. Campbell, *Chemiluminescence Principles and Applications in Biology and Medicine*, Chichester (England): Ellis Horwood (1988).
 2. P. Suppan, *Chemistry and Light*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry (1994).
 3. F. Berthold, *Luminescence Immunoassay and Molecular Applications*, Boca Raton, CRC Press (1990).
 4. 柯淑惠, 張煥宗, 儀器總覽 4—化學分析儀器 (1993).
 5. *PMT Handbook*, Hamamatsu Corporation, Hamamatsu City, Japan, http://sales.hamamatsu.com/assets/applications/ETD/pmt_handbook/pmt_handbook_complete.pdf
 6. *The Veritas Microplate Luminometer Operating Manual*, Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA (2004), http://www.luminometer.com/doc/manuals/veritas_manual.pdf
 7. *Smart Line Tube Luminometer User's Manual*, Berthold Detection Systems GmbH, Phorzheim, Germany (2003).
 8. *TR717TM Microplate Luminometer Instruction*, Applied Biosystems, Bedford, MA, USA (2000).
 9. *CLD 70S Chemiluminescence Analyzer*, Eco Physics AG, Duernten, Switerland, http://www.ecophysics-us.com/pdf/source_emissions/cld_70_s.pdf
 10. *Catalog of ELISA-Light Immunoassay System*, Applied Biosystems, CA, USA, <http://www.appliedbiosystems.com/catalog/myab/StoreCatalog/products/CategoryDetails.jsp?hierarchyID=101&category1st=19159&category2nd=19164&category3rd=111837>
-

- 王建華先生為英國劍橋大學化學博士，現任開物科技股份有限公司生醫光電課課長。
- 莊琮凱先生為美國德州農工大學化工博士，現任台南女子技術學院助理教授。
- Jiann-Hua Wang received his Ph.D. in Chemistry from the University of Cambridge, UK. He is currently the manager of Biophotonics Department of Kaiwood Technology.
- Tsung-Kai Chuang received his Ph.D. in chemical engineering from the Texas A&M University, USA. He is currently a assistant professor of Tainan Woman's College of Arts and Technology.