

化学发光技术在活性氧检测中的研究进展

代鸿宇^{1†}, 孙红红^{1†}, 管伟江^{1*}, 吕超^{1,2*}

1. 北京化工大学化工资源有效利用全国重点实验室, 北京 100029

2. 郑州大学化学学院, 平原实验室, 郑州 450001

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: wjguan@mail.buct.edu.cn; luchao@mail.buct.edu.cn

2025-06-27收稿, 2025-09-25修回, 2025-09-29接受, 2025-09-30网络版发表

国家自然科学基金(22422401, 22534007, 22374007, U22A20397)和中央高校基本科研业务费专项资金(JD2507)资助

摘要 活性氧(reactive oxygen species, ROS)在多种生理病理过程中扮演重要角色, 其高效、特异性检测对疾病诊断、治疗监测及环境分析具有重要意义. 近年来, 化学发光(chemiluminescence, CL)、生物发光(bioluminescence, BL)和电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)技术因其高灵敏度、无需外部光源激发等优点, 在ROS检测中获得广泛应用. 本文系统梳理了2020~2025年间相关领域的代表性工作, 按照体系构建与功能提升两个主线展开评述. 首先, 液相CL体系持续拓展, 纳米材料和聚合物体系的引入使其在灵敏度、选择性和体内成像方面取得突破, 尤其近红外CL探针的开发大幅提升了组织穿透能力. BL体系则依托共振能量转移机制与开启型策略, 实现低背景、高选择性的ROS成像, 适用于深部组织与动态过程监测. ECL技术通过多种发光纳米材料及功能界面的构建, 提升了信号响应效率和生物适配性, 逐步向柔性化、生物集成方向演进. 尽管各类发光平台不断发展, 但在多种ROS的同步识别、生物稳定性与诊疗一体化等方面仍面临挑战. 未来研究有望依托智能响应、平台集成与人工智能辅助, 推动ROS检测向高通量、可视化与精准医疗方向迈进.

关键词 活性氧, 化学发光, 生物发光, 电化学发光, 探针

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一类化学性质活泼、具有强氧化能力的分子或自由基的统称,包括非自由基型如过氧化氢(H_2O_2)、单线态氧($^1\text{O}_2$)、次氯酸(HOCl)/次氯酸盐(ClO^-)和过氧亚硝酸盐(ONOO^-),以及自由基型如羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)等^[1,2]. ROS可通过内源性途径(如线粒体呼吸链、黄素单加氧酶等酶促反应)或外源性方式(如紫外线照射、污染物引发的光化学反应)生成. 在生物体内,ROS参与调节信号传导、细胞凋亡等生理过程,但当ROS水平显著升高并超过抗氧化系统的清除能力时,会导致氧化应激状态,是多种疾病发生与发展的重要因素之一^[3~6]. 在环境中,ROS对于大气污染物的氧化降解、有机材料的老化过程也起着关键作用^[7]. 因此,如何在复杂环境或生物体系中实现对短寿命、多态性ROS的实时、高灵敏和选择性检测,已成为分析化学、生物医学与环境科学领域的研究热点.

目前,已开发多种检测ROS的方法,包括电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)^[8,9]、荧光探针法^[10~12]、质谱分析^[13]、分光光度法^[14,15]、化学发光(chemiluminescence, CL)^[16]等. 这些分析方法在检测限、选择性及应用场景方面存在差异: ESR可直接检测ROS中自由基种类,具备较高选择性,适合机制研究,但灵敏度有限,常常需要高浓度样品,且设备昂贵、操作复杂;荧光探针法检测限低,响应速度快,适合活体细胞及组织内ROS的动态成像,但易受非特异性反应及背景干扰影响;质谱分析可对ROS衍生物进行高选择性定性与定量,但样品需预处理,检测过程较复杂;分光光度法操作简便、成本低,适用于较高浓度ROS的快速筛查,但检测限较高、特异性较差. CL是一类由化学反应直接产生发光的现象,通过底物之间的氧化还原反应产生高能中间体,激发电子跃迁至激发态,随后回到基态时释放光子. 由于无需外部激发光源,CL在检测ROS时灵敏度高、背景低,适用于环境样品和体内ROS的高灵敏检测^[17,18]. 在本综述中,CL作为总称,涵盖三类具有代表性的化学驱动发光机制: (1) 液相CL,通过分子探针与ROS反应生成激发态中间体,释放光子^[19,20]; (2) 生物发光(bioluminescence, BL),通过生物体内酶催化特定底物反应产生发光,具有良好的选择性与生物相容性^[21,22]; (3) 电化学发光(electrochemiluminescence, ECL),通过外加电位在电极界面触发电化学反应,生成激发态发光物种,能够对界面ROS进行动态监测与调控^[23~25]. 这三类体系本质上均依赖化学过程产生激发态,但在激发方式、反应环境和应用方面各具特色,为ROS检测与成像研究提供了重要手段(图1).

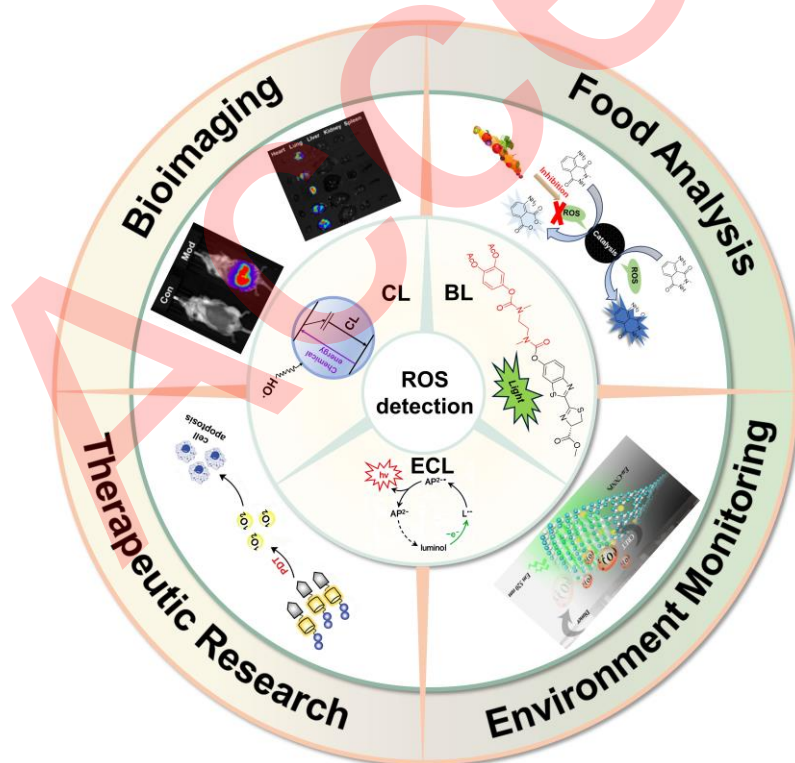


图1 (网络版彩色)液相CL、BL、ECL检测ROS的机理和应用

Figure 1 (Color online) Mechanism and applications of liquid-phase CL, BL, and ECL for detecting ROS

鉴于液相CL、BL与ECL在ROS检测中所展现出的互补优势与应用潜力, 本文将依次展开综述. 首先介绍液相CL体系, 包括经典CL体系、纳米材料增强CL体系、聚合物功能化CL体系及近红外CL探针开发方面的代表性进展; 其次, 详述BL技术在纳米材料介导的能量转移系统和开启型特异响应探针构建中的创新成果; 随后, 阐述ECL体系利用多类纳米发光材料及三维柔性界面等策略, 在ROS高灵敏检测与细胞微环境监测中的技术发展; 最后, 总结这三类方法在实际应用中面临的关键挑战, 并对其在ROS检测与成像领域的未来发展趋势与潜在突破方向进行展望.

1 液相CL用于ROS检测

液相CL技术的基本原理是化学反应直接或间接生成激发态分子, 这些分子从激发态回到基态时释放光子, 从而形成CL信号^[26]. 鲁米诺体系是最经典的液相CL体系, 在碱性条件下可被多种ROS(如 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 等)氧化生成激发态3-氨基邻苯二甲酸并发射可见光^[27], 具有广谱ROS响应性和应用基础. 高锰酸钾($KMnO_4$)体系利用其强氧化性, 在酸性条件下与还原剂反应生成激发态 MnO_2 并发光, 适用于强氧化条件的ROS检测^[28]. 光泽精体系在碱性条件下与 $O_2^{\cdot-}$ 或 H_2O_2 反应, 经二氧环丁烷中间体裂解产生激发态N-甲基吡啶酮, 发射光子^[20]. 此外, 在过氧化物CL体系中, 四(2-氯苯基)草酸酯(TCPO)和双(2-氯苯基)草酸酯(CPPO)也常用于ROS相关研究^[26]. 它们通过与 H_2O_2 反应生成高能的1,2-二氧化环己二酮中间体, 该中间体将能量转移给荧光物质, 使其激发并在回到基态时发光. TCPO与CPPO体系的优势在于发光持续时间长、信号稳定, 尤其适合对 H_2O_2 等相对稳定的ROS进行高灵敏检测. 综合来看, 鲁米诺适合广谱ROS分析, 光泽精适于特异性检测 $O_2^{\cdot-}$, $KMnO_4$ 用于强氧化条件下测定ROS, 而TCPO/CPPO在检测 H_2O_2 时具有较高稳定性和信噪比.

1.1 经典液相CL体系

基于鲁米诺- H_2O_2 体系, Li等人^[29]开发了一种用于评估储存大米新鲜度的液相CL方法. 研究发现, 在大米储存过程中, 由于不饱和脂肪酸氧化, 常伴随ROS的持续生成. 基于此, 将大米样品引入鲁米诺- H_2O_2 反应体系, 结果发现CL信号较单独加入鲁米诺和 H_2O_2 时显著增强, 且发光峰形更窄. 该现象归因于大米中天然存在的过氧化氢酶对 H_2O_2 的催化作用, 促进了ROS的中间产物生成, 进而增强了CL反应效率. 进一步实验表明, CL信号强度随大米用量增加而增强, 而随着不饱和脂肪酸含量升高则逐渐下降, 反映了脂质氧化与ROS水平之间的内在联系. 因此, 该体系不仅可用于检测大米中新鲜度相关的ROS水平, 还可间接评估其氧化状态与品质变化.

在拓展鲁米诺体系灵敏度与功能化方面, Gao等人^[30]设计并合成了一种以铜离子为中心、鲁米诺为配体的ROS响应型配位聚合物探针——Cu-Lum@NPs(图2(a)). 该探针通过铜离子催化 H_2O_2 分解, 激发鲁米诺发生CL反应. 相较于鲁米诺体系, Cu-Lum@NPs的发光强度增强了约300倍, 且发光持续时间显著延长. 这一增强效应主要归因于配位结构对CL反应的催化与能量稳定作用. 在功能应用中, Cu-Lum@NPs实现了炎症组织和ROS相关氧化损伤的可视化, 显示出其在炎症成像和药物反应评估中的应用潜力. 特别是在活体小鼠实验中, 该探针展现了优异的成像清晰度与组织穿透深度, 为液相CL高灵敏活体成像提供了新思路.

1.2 纳米材料增强型CL体系

纳米材料因其独特的表面效应、量子尺寸效应及可调控的电子结构, 在CL体系中表现出良好的催化性能与能量调控能力^[31]. 通过引入不同类型的纳米材料, 可显著提高ROS的生成速率或促进CL反应过程中的电子转移, 从而有效放大CL信号, 提升检测灵敏度与选择性. 因此, 纳米材料被广泛用于构建功能化液相CL平台, 以实现特定ROS的高效分析.

碳基纳米材料, 如碳点(carbon dots, CDs), 因其易于表面改性、结构可调等优势, 被用于ROS高灵敏检测. Wang等人^[32]以邻苯二酚为前体, 采用溶剂热法合成原始碳点(o-CDs), 其具有致密的碳核结构, 外层包裹有惰性烷链, 对 $\cdot OH$ 基本不响应. 随后利用 H_2O_2 对o-CDs进行受控氧化, 制得的氧化碳点(ox-CDs)表面暴露出大量活性位点, 可与 $\cdot OH$ 发生高效反应, 释放化学能并产生强烈CL信号. 该探针对于0.01~150 $\mu mol/L$ 浓度范围的 $\cdot OH$ 响应线性良好, 检测限低至3 nmol/L. 该方法被成功应用于检测香烟和蚊香烟烟雾中产生的 $\cdot OH$, 展现出良好的实用性和环境样品适用性.

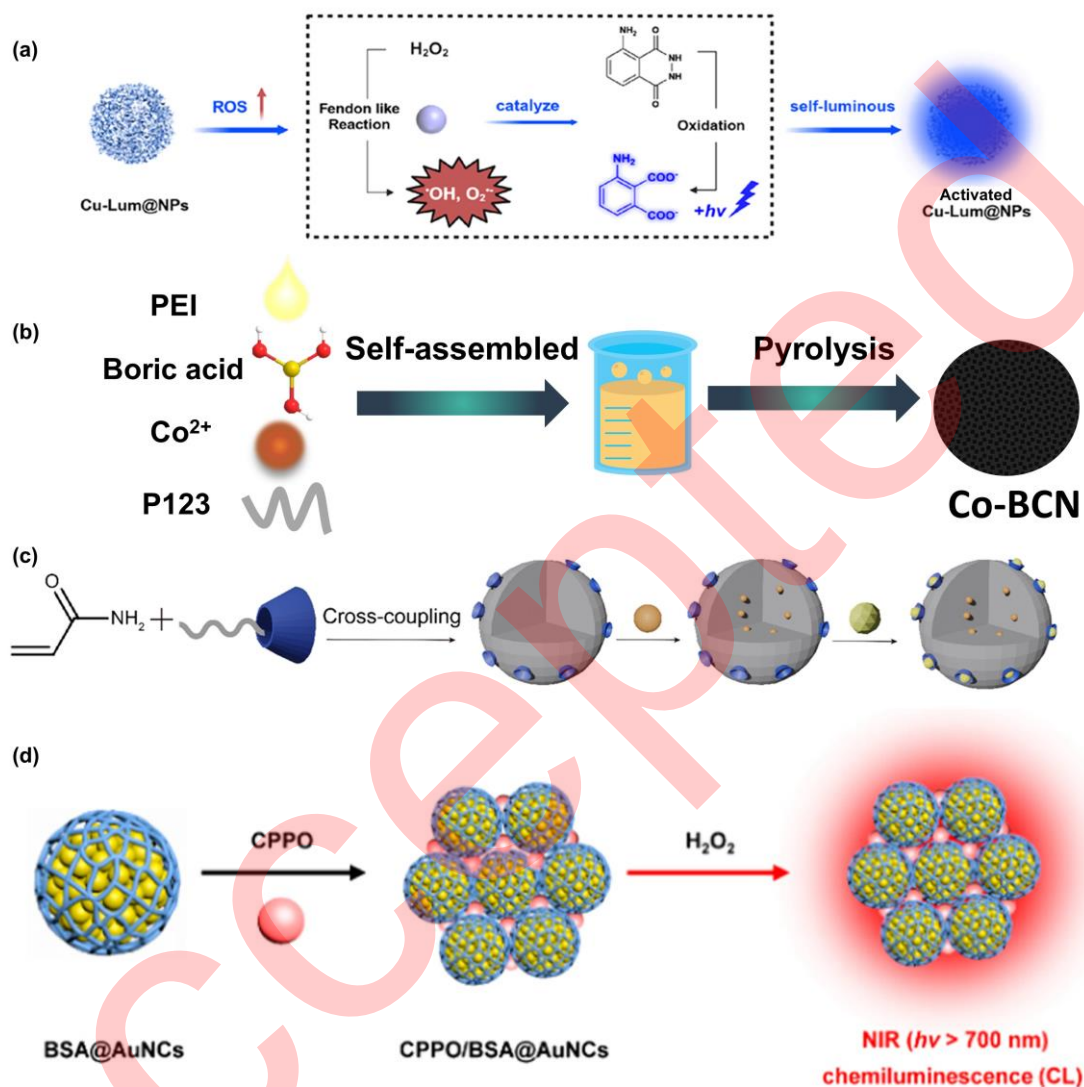


图2 (网络版彩色) (a) Cu-Lum@NPs的ROS传感发光^[30]. (b) Co-BCN合成流程图^[34]. (c) 长效CL纳米水凝胶(L-012/ Co^{2+} @NGs)的制备^[36]. (d) CPPO/BSA@AuNCs的制备示意图及CL的产生过程^[42]

Figure 2 (Color online) (a) ROS-sensitive luminescence of Cu-Lum@NPs^[30]. (b) Diagram of the synthesis process of Co-BCN^[34]. (c) Preparation of the long-lasting CL nanohydrogel (L-012/ Co^{2+} @NGs)^[36]. (d) Schematic illustration of the preparation of CPPO/BSA@AuNCs and the generation of CL^[42]

氮化碳($g-C_3N_4$)材料由于其丰富的氮位点和良好的光/电性能,在ROS探针构建中展现出独特优势. Zhou等人^[33]通过掺杂铕离子(Eu^{3+})构建了基于 $g-C_3N_4$ 的纳米探针Eu-CNNPs,实现了 1O_2 的高选择性CL检测. 铕离子易与 $g-C_3N_4$ 中的氮位点配位,从而调控其表面能级结构,提升电子转移效率. 丰富的氮缺陷位点可加速ROS生成,尤其是促进 1O_2 的形成. 该材料对其他ROS几乎无响应,但在 1O_2 作用下产生显著的CL发射,具有高度选择性. Eu-CNNPs已被成功用于检测 $PM_{2.5}$ 样品及光敏剂(如Rose Bengal和Riboflavin)产生的 1O_2 ,线性范围为 $0.167\sim 16.7\text{ }\mu\text{mol/L}$,检测限为 $0.136\text{ }\mu\text{mol/L}$,验证了其在复杂样品分析中的应用潜力.

金属/非金属协同掺杂,可以构建多功能活性位点,从而显著放大ROS触发的CL信号. Qian等人^[34]通过高温热解法合成了钴改性硼掺杂的金属-氮-碳纳米颗粒(Co-BCN),兼具大比表面积与氧化酶类催化活性,可催

化溶解氧生成ROS,从而放大鲁米诺体系的CL信号(图2(b)).在鲁米诺-H₂O₂体系中加入Co-BCN后,CL强度显著提升.典型抗氧化剂(抗坏血酸、谷胱甘肽和半胱氨酸)的存在对该体系的CL信号具有抑制作用,且抑制程度与抗氧化剂浓度线性相关,检出限分别为0.026、0.21和1.0 μmol/L.该策略被成功应用于8种市售果汁和饮品中总抗氧化能力的评估,检测结果与经典铜离子还原抗氧化能力(CUPRAC)方法高度一致,验证了其在食品质量控制和抗氧化活性研究中的应用价值.

1.3 聚合物材料增强型CL体系

聚合物材料在CL检测体系中表现出多重优势,尤其在提升探针稳定性、延长信号持续时间和增强生物相容性方面发挥了关键作用^[35].通过对聚合物结构的合理设计,可有效控制反应物的扩散行为、调节发光反应的动力学过程,并提供优异的功能化平台,从而在复杂环境(如体内)中实现ROS的高灵敏、动态、可视化检测与成像.

水凝胶作为一种兼具结构可调与控释能力的功能材料,在CL信号的持续输出与生物体系动态监测中展现出独特优势.Zhang等人^[36]设计了一种功能化纳米水凝胶CL平台(L-012/Co²⁺@NGs),用于在肿瘤化疗过程中实时监测ROS变化(图2(c)).该平台采用乙烯基衍生的β-环糊精单体交联形成三维多孔结构,负载鲁米诺类似物L-012和Co²⁺催化剂.水凝胶的多孔网络显著延缓了H₂O₂的扩散,Co²⁺与Tris缓冲体系的协同催化进一步增强了ROS的生成与CL反应.该体系在体外对H₂O₂、·OH等ROS均表现出高选择性和灵敏度,CL信号持续时间长达4小时,信号强度提升722倍,检测限低至8.9 nmol/L.更重要的是,该平台被成功用于小鼠模型中ROS的体内追踪,在长胡椒碱干预后,CL信号在15分钟达到峰值,持续可监测至150分钟.这一研究首次实现了肿瘤微环境中ROS时空动态变化的CL监测,为成像引导下的精准治疗提供了新工具.

聚合物基探针具有良好的成像稳定性和可设计性,适合构建高选择性ROS成像平台.Guo等人^[37]构建了基于茚二酰亚胺(PDI)的聚合物探针SH-PDI,用于选择性检测O₂^{·-}.在二甲基亚砷溶液中,O₂^{·-}可诱导该聚合物分子中的硫醇基团(S-H)和二硫键(S-S)被氧化为亚砷结构,释放强烈的CL信号.为了进一步提高水溶性与成像性能,将SH-PDI与两亲性稳定剂共沉淀,形成水溶性纳米颗粒SPPS NPs.相比SH-PDI,SPPS NPs对O₂^{·-}具有更高的选择性和增强的CL响应,线性检测范围为0.25~60 μmol/L,检测限达8.2 × 10⁻⁸ mol/L.此外,SPPS NPs的最大发光波长为580和710 nm,位于生物成像窗口,具备良好的组织穿透力.在小鼠模型中,利用该探针成功实现了对脂多糖诱导急性炎症产生的内源性O₂^{·-}的体内成像,展现出优异的生物适用性和CL成像能力,为炎症过程可视化监测提供了有力手段.

1.4 近红外CL探针

尽管传统CL技术在ROS检测中展现出较高的灵敏度和特异性,但其发光波长多位于可见光范围,受限于生物组织的散射与吸收,穿透深度有限,难以满足对深部组织ROS的实时监测和精准成像需求.近红外CL(NIR-CL)探针通过将发光波长调控至700~900 nm甚至更远的第二窗口(NIR-II, > 1000 nm),在降低背景噪声、提高成像对比度及组织穿透能力方面展现出显著优势,已成为ROS成像研究的热点方向^[38~40].

针对生物成像中面临的信噪比低和细胞穿透性差等问题,Zhao等人^[41]开发了一种近红外CL探针DCM-Cy,用于在光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)过程中实时追踪¹O₂的生成动态.该探针通过移除烯醚结构中的甲氧基,显著抑制了其自发光氧化反应,从而降低背景信号.同时,将原有刚性金刚烷结构替换为紧凑的环丁烷,提升了细胞膜渗透性约6倍.DCM-Cy发光峰位于近红外区,可有效避免可见光的散射与吸收,其对¹O₂具有高选择性和nmol/L级灵敏度,在¹O₂存在下,DCM-Cy发生氧化,形成不稳定的应变苯酚-二氧杂环中间体,迅速自发分解成激发的羰基化合物,其衰变至基态并伴随着近红外CL.在体外实验中,该探针被成功用于追踪HeLa细胞及金黄色葡萄球菌在PDT处理下的ROS释放行为;在体内肿瘤模型中,DCM-Cy实现了高信噪比(达95倍)的实时成像,远优于传统荧光探针(信噪比仅4.4倍).同时,该探针表现出优良的生物相容性(细胞存活率 > 81%),为PDT治疗过程中的ROS成像提供了低背景、高分辨率的检测工具.

在提升组织穿透深度和降低激发依赖性方面,Wang等人^[42]通过将CPPO封装于具有近红外聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)特性的牛血清白蛋白包覆金纳米簇(gold nanoclusters, AuNCs)中,设计了一种无需外部光源激发的NIR-CL纳米探针CPPO/BSA@AuNCs,实现了对深部肿瘤中ROS的高效成像(图2(d)).该探针利用CPPO与H₂O₂反应生成高能中间体1,2-二氧杂环丁烷二酮,通过化学发光共振能量转移(chemiluminescence resonance energy transfer, CRET)产生近红外发光信号,对H₂O₂的检测限为0.286 μmol/L.由于该体系无需激光激发,成功克服了传统荧光成像在穿透深度方面的物理局限,组织穿透能力超过27 mm.

该探针可靶向识别4T1小鼠乳腺肿瘤模型的原发病灶，AIE特性和催化活性协同增强了信号强度，显著提升了成像对比度和诊断精度，展示出在深部肿瘤术前诊断和成像引导手术中的应用潜力。

2 BL用于ROS检测

BL是由生物体内的荧光素在荧光素酶的催化下，经化学反应产生激发态产物并释放光子的过程，其不依赖外部光源，背景噪声低，适用于高灵敏成像^[43,44]。该过程的核心原理是：荧光素在三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)或O₂等辅助因子的参与下被氧化生成高能中间体，中间体分解形成激发态分子，激发态分子回到基态时释放特定波长的光。

现有经典体系主要包括：(1) 萤火虫荧光素体系，荧光素先与ATP作用活化羧基，形成腺苷荧光素酰基中间体，随后在O₂参与下氧化生成二氧杂环丁酮结构，该中间体分解产生激发态氧化荧光素，弛豫至基态时发出黄绿色光；(2) 海洋腔肠素体系，腔肠素在O₂存在下被腔肠素酶氧化生成1,2-二氧四环酮中间体，分解后形成激发态产物并发出蓝光；(3) 细菌荧光素体系，荧光素在长链醛和还原型黄素单核苷酸的参与下被荧光素酶氧化，生成激发态中间体，返回基态时释放蓝绿色光。这些体系在发光波长、底物稳定性和检测环境适应性上存在差异，例如萤火虫体系发光效率高且易于基因工程改造，腔肠素体系适合海水和中性条件，细菌体系可实现自发光无需外加底物。

2.1 纳米材料增强型BL体系

传统BL体系通常存在发光效率有限、信号稳定性差等问题，难以满足对高灵敏度和长时间成像的需求。为克服这些限制，近年来研究者将纳米材料引入传统BL体系，结合生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)机制，显著提升了探针的发光效率与稳定性，扩展了其在ROS检测中的应用场景。BRET是一种基于共振能量转移的无辐射过程，BL供体(如荧光素酶-底物复合物)在发光反应产生的激发态能量可转移至邻近的荧光受体，引发受体荧光发射，而非依赖外部光源激发，因此有效避免了背景自发荧光的干扰。在构建BRET探针时，通常需满足两个条件：供体与受体之间需具备良好的光谱重叠，以及两者空间距离足够接近(< 10 nm)以实现高效能量转移。

为了提升BL体系在生物成像中的信号稳定性与可操作性，Liao等人^[45]开发了一种基于重组水母发光蛋白(aequorin)与CdTe/CdSe量子点(quantum dots, QDs)偶联构建的BRET探针Aeq-QD。该系统能量转移效率高达35.6%，且在室温下可稳定保存超过15天，表现出优异的稳定性和重现性。在功能验证中，研究者通过刺激不同类型的细胞(包括小鼠巨噬细胞、海马神经元、乳腺癌细胞和黑色素瘤细胞)产生O₂^{•-}，Aeq-QD探针均可实现有效检测，检测限为4 μmol/L。此外，该探针还成功应用于小鼠肿瘤模型中肿瘤内ROS水平的活体成像，验证了其在评估氧化应激和肿瘤微环境氧化状态中的应用潜力。

在此基础上，Yuan等人^[46]开发了一种基于BRET机制的多功能NIR-II自发光小分子平台—CLPD(图3(a))。该分子体系由四个功能模块构成：鲁米诺为BRET供体，在氧化条件下产生约450 nm的蓝光信号；Chlorin e6 (Ce6)为能量受体，接收能量后产生¹O₂；通过¹O₂氧化结构中的噻吩单元，从而激活NIR-II区发光。体内外实验结果显示，CLPD在过氧化酶与ROS丰富的肿瘤与炎症环境中能快速响应，产生强烈的NIR-II信号，用于高信噪比的深层组织成像。相较传统可见光发光探针，CLPD的NIR-II发光显著提高了成像穿透力和解析度，为复杂病理环境中的非侵入式ROS成像提供了有力工具。

2.2 开启型BL体系

在复杂的生理微环境中，传统持续发光型探针易受到非特异性背景干扰，尤其是在低丰度ROS信号监测或深层组织成像中，难以获得高信噪比和特异响应。为此，研究者提出“开启型BL探针”的概念^[47~49]，即通过合理设计，使发光反应只能在特定ROS条件下激活，从源头上抑制背景噪声，增强响应选择性与成像对比度。这类探针通常依赖于ROS敏感基团对底物的“笼罩保护”策略^[50]，通过ROS介导的化学反应释放发光前体，从而实现空间与时间上的“发光锁控”。

通过构建ROS特异性化学保护基团，可以实现发光底物的按需释放。O'Sullivan等人^[51]将对H₂O₂有响应的芳基硼酸酯基团引入发光底物中，开发了一种不依赖ATP的BL探针。以二苯基特拉克(DTZ)为核心，将芳基硼酸酯基团引入后成功合成产物bor-DTZ。在H₂O₂作用下，bor-DTZ氧化水解释放出DTZ，DTZ可与纳米荧光素酶反应，产生可检测的BL信号。实验表明，bor-DTZ对H₂O₂具有高选择性和高灵敏度，线性范围为0.05~0.25

mmol/L, 检测限为0.01 mmol/L. 在乳腺癌细胞中, 该探针成功监测了顺铂治疗时细胞内外的 H_2O_2 水平变化. 相较于传统依赖ATP的荧光素酶系统, bor-DTZ在不依赖细胞能量状态的前提下完成发光反应, 更适用于能量代谢紊乱等病理状态下的ROS成像.

通过多种结构可调、响应灵敏的开启型发光探针联用, 可以满足ROS动态变化的监测需求. Li等人^[52]开发了三种开启型BL探针F Probe、N Probe和P Probe, 用于实时监测顺铂化疗过程中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的实时变化. D-荧光素作为BL的发光底物, 三氟甲磺酸、对硝基苯磺酰基和二苯基膦基团分别为三种探针的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 响应基团. $\text{O}_2^{\cdot-}$ 触发亲核取代反应, 释放D-荧光素, D-荧光素在萤火虫荧光素酶和ATP的作用下, 产生BL信号. 其中, P Probe在体外表现出对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的高灵敏度, 检测限为5.84 $\mu\text{mol/L}$. 在体内实验中, P Probe被成功用于监测顺铂诱导的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 水平升高, 并实现活细胞及荷瘤小鼠成像(图3(b)). 此外, 该探针有望通过替换识别基团扩展至其他ROS检测.

通过开发结构定向响应型探针, 可以实现精准识别与区分成像. Larsen等人^[53]利用超氧化物(superoxide, SO)和一氧化氮(nitric oxide, NO)对生物系统的关键作用, 开发了两种BL探针分别检测 SO 和 NO . 为了靶向 SO , 选择富电子的邻苯二酚作为反应基团, 通过乙烯二胺连接到荧光素的氨基甲酸酯上, 获得探针1. 在 SO 作用下, 探针1中的邻苯二酚被氧化成半醌, 进一步被氧化生成缺电子的邻醌, 随后自发水解使连接体析出, 从而释放荧光素的甲酯. 通过加入酯酶, 将甲酯转化为游离荧光素, 所检测到的荧光素含量与 SO 浓度成正比. 为了检测 NO , 选择氨基硫脲基为反应基团, 将其与氨基荧光素通过脲键相连得到探针2. 该探针与 NO 反应会转化为相应的噁二唑, 随后自发水解释放出氨基荧光素的甲酯. 通过加入酯酶和荧光素酶, 可以对 NO 进行定量分析.

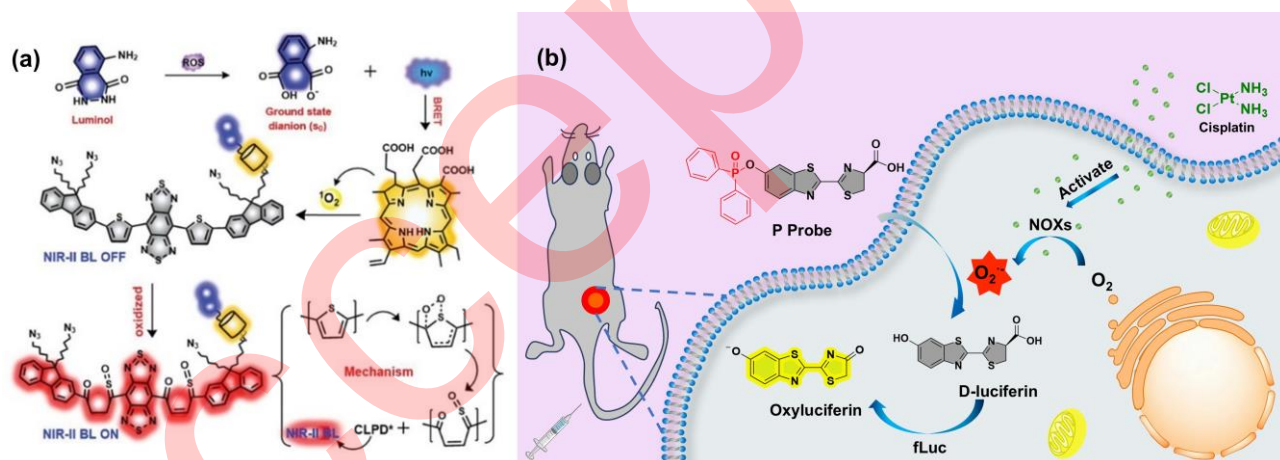


图3 (网络版彩色) (a) NIR-II自发光分子探针CLPD的示意图^[46]. (b) P Probe在顺铂化疗过程中对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的成像示意图^[52]

Figure 3 (Color online) (a) Schematic of NIR-II self-luminescence molecular probe CLPD^[46]. (b) Schematic illustration of P Probe to image $\text{O}_2^{\cdot-}$ during the progression of cisplatin chemotherapy^[52]

3 ECL用于ROS检测

ECL是指在电极施加电位条件下, 于电极/扩散层附近通过电化学过程生成激发态发光物种, 当其回到基态时发射光子的一种发光方式. ECL兼具CL的高灵敏度与电化学的可控性, 已广泛应用于分析化学和生物检测. 其基本原理为: 发光底物及/或共反应物在电极上发生氧化还原, 生成自由基或过氧化中间体, 进一步反应形成激发态产物并发光. ROS在ECL体系中常作为关键反应中间体, 可提升发光效率并影响主导反应路径. 以鲁米诺体系为例^[54], 在阳极ECL模式下, 鲁米诺被电化学氧化为自由基/二氮杂醌中间体, 随后与 O_2 或 H_2O_2 衍生的过氧化物反应生成激发态3-氨基邻苯二甲酸, 发射约425 nm的蓝光; 在阴极ECL模式下, 溶解氧被还原为ROS, 并与鲁米诺中间体耦合生成激发态3-氨基邻苯二甲酸, 产生ECL信号. 近年来, 具有可调发射波长和优异光稳定性的纳米发光材料也逐渐被用于构建多信号、可调谐的ECL体系.

3.1 纳米材料增强型ECL体系

QDs是一类具有量子限域效应的纳米材料,其发射波长可通过尺寸精准调控,且具有优异的光稳定性,近年来已经发展成为ECL发光体的理想材料,通过调节QDs的尺寸、配体和掺杂等可以优化其ECL特性. Li等人^[55]鉴于单信号ECL传感器容易受到外部环境的干扰,开发了一个鲁米诺-QDs集成的双信号ECL平台(图4(a)),其中鲁米诺作为由 $O_2^{\cdot -}$ 驱动的阳极发光团, CdSe QDs作为 $\cdot OH$ 驱动的阴极发光团,以 Co_3O_4/Ti_3C_2 为电催化剂,充当共反应促进剂用于产生 $O_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot OH$. 将CdSe QDs通过静电作用吸附在 Co_3O_4/Ti_3C_2 纳米片上,增强了稳定性和ECL强度. 该内源性ROS驱动的双信号ECL可用于药物群勃龙的定量检测,检测限和定量限分别为3.6 mg/mL和11.7 fg/mL.

CDs作为一种新型ECL发光团,具有良好的成像与传感潜力. Yang等人^[56]开发了一种基于硼氮掺杂碳点(BN-CDs)的阴极ECL平台,用于检测海水中的溶解氧. BN-CDs在溶解氧存在下产生负电位的阴极ECL信号,且ECL强度与溶解氧浓度呈正相关,对溶解氧的线性响应范围为0.5~19.8 mg/L,检测限为0.12 mg/L. 该平台成功应用于自来水、湖水及海水等实际样品中的溶解氧检测,为海洋环境监测提供了新的工具.

AuNCs因其独特的量子尺寸效应、良好的表面修饰能力和催化活性,成为更高性能ECL发光体的热门材料. Cheng等人^[57]开发了一种基于AuNCs价态调控的ECL生物传感器,用于精浆中ROS的高灵敏快速检测. 通过电还原法获得零价态AuNCs (ER-AuNCs),其ECL信号强度较初始AuNCs提高6.3倍. ROS可通过氧化作用改变AuNCs的价态,从而快速猝灭ECL信号. 该传感器无需额外试剂,通过一步电压施加就能实现ROS的即时检测,检测限低至 0.75×10^{-10} mol/L,且对精浆中常见的共存物表现出优异的抗干扰性. 在临床应用中,传感器成功检测到弱精症组精浆ROS的浓度显著高于正常组,与商用检测剂结果一致. 该ECL平台通过直接调控AuNCs价态实现信号响应,避免了传统间接检测的复杂性,为男性不育诊断提供了快速的方法.

复合纳米结构通过协同调控电化学性能与生物界面功能,在实现细胞水平的高灵敏ROS检测方面展现出较大潜力. Du等人^[58]开发了两种用于监测脂多糖刺激的小鼠腹膜巨噬细胞(Ana-1细胞)分泌的ROS传感器,传感器1使用3-氨基丙基三甲氧基硅烷(3-aminopropyltrimethoxysilane, APTMS)的水解聚合物与AuNPs形成Au-N键将掺锡氧化铟(indium tin oxide, ITO)功能化,并利用多聚赖氨酸固定细胞. 为了充分利用金纳米颗粒/二氧化钛纳米管(Au nanoparticles/ TiO_2 nanotubes, AuNPs/ TiO_2 NTs)的协同作用,将其烧结至ITO表面后,成功构建传感器2. 两种基于AuNPs和AuNPs/ TiO_2 NT的传感器被成功用于监测Ana-1细胞分泌的ROS,检测限分别为8.9 nmol/L和2 nmol/L,为定制ECL细胞传感器提供了一种便捷的方式. Shen等人^[59]通过还原 α -酮戊二酸成功将AuNPs原位沉积在 Fe_3O_4 NPs上,通过与电活性蛋白血红蛋白(haemoglobin, Hb)或细胞色素C (cytochrome C, Cyt C)共价结合,开发了一种ECL超灵敏传感平台. Au@ Fe_3O_4 NPs能够有效增强鲁米诺ECL信号,降低了ROS检测限. 与Hb结合时检测限为7.69 nmol/L,线性范围为7~300 μ mol/L;与Cyt C结合时检测限为1.97 nmol/L,线性范围为3~30 μ mol/L. 该平台在小鼠心肌组织ROS检测中表现出优异性能,成功监测了异丙肾上腺素刺激下的ROS释放过程.

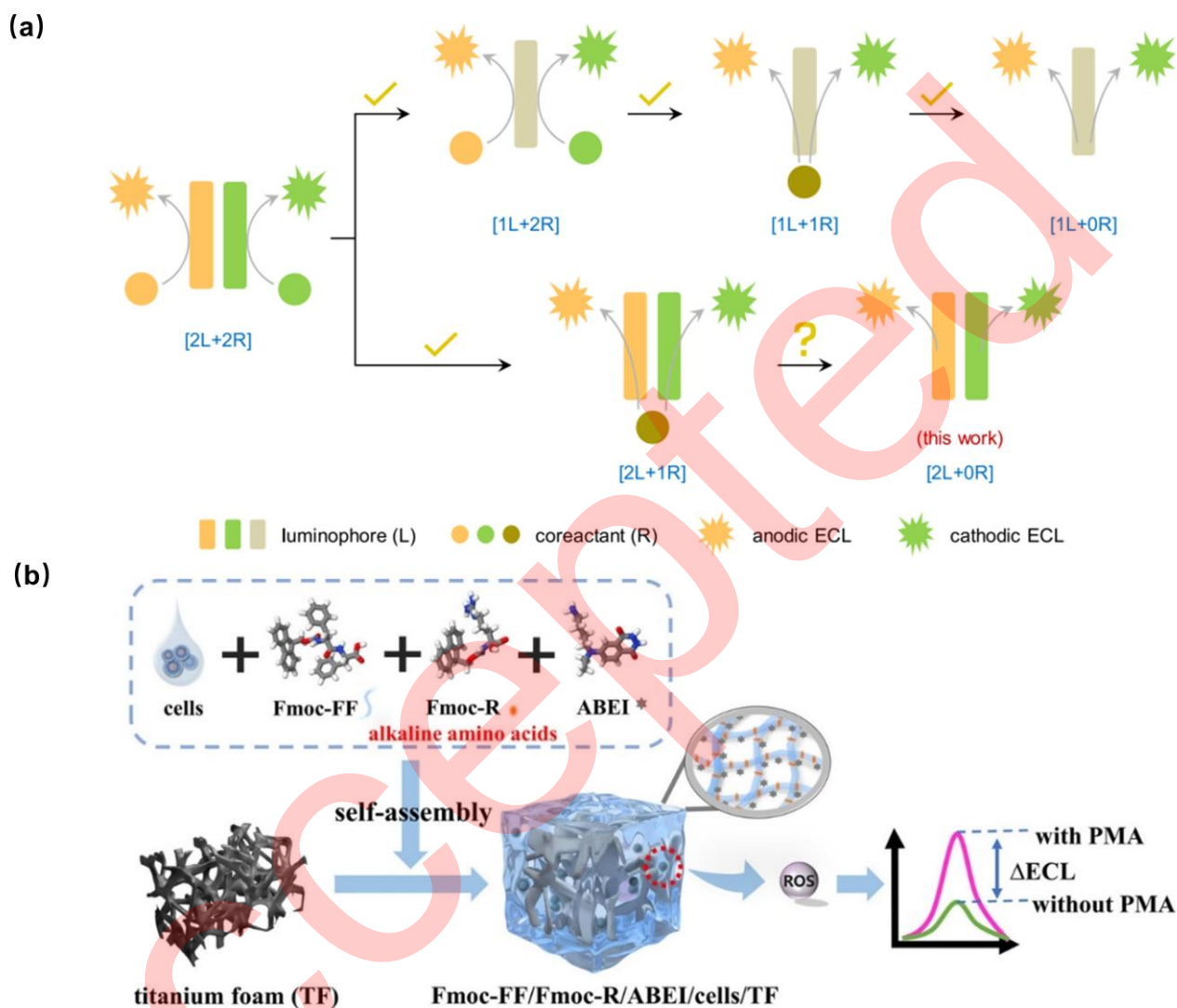


图4 (网络版彩色) (a) 典型的双信号ECL传感器配置分区的示意图^[55]. (b) 3D ECL传感平台FRAC-Hydrogel/TF的构筑过程及工作原理示意图^[65]

Figure 4 (Color online) (a) Schematic illustration of the configuration divisions of representative dual-signal ECL sensors^[55]. (b) Schematic illustration of the fabrication process and working principle of the 3D ECL sensing platform FRAC-hydrogel/TF^[65]

3.2 基于激发态调控与界面构筑的功能材料

在ECL响应机制不断拓展的背景下^[60~63], AIE策略的引入为激发态能量调控提供了新路径. Gao等人^[64]通过 Zn^{2+} 介导的AIE型AuNCs组装(Zn^{2+} -AIE-AuNCs), 实现了聚集诱导型ECL, 并对 1O_2 具有选择性响应. 在碳酸盐缓冲溶液中, Zn^{2+} -AIE-AuNCs与三乙胺共存的电化学氧化作用会促进 Zn^{2+} -AIE-AuNCs的氧空位形成, 有效地将激发单线态 Zn^{2+} -AIE-AuNCs的能量转移给 3O_2 , 生成激发态的 1O_2 . 该策略不仅为 1O_2 的检测提供了新方法, 还阐明了AIE发光在ECL中的应用潜力, 为ROS的检测提供了新的工具.

相较于分子结构调控的策略, 三维功能材料的引入则在提升ECL系统的柔性化与生物界面兼容性方面展现出重要优势, 在柔性传感和生物医学监测领域具有重要意义. 其中水凝胶的高孔隙率为ECL发光底物提供了理想的固化平台, 提升了ECL的稳定性, 同时为ECL柔性传感器的设计提供了可能. Zhou等人^[65]开发了一种三维ECL传感平台, 结合肽水凝胶与钛泡沫电极, 用于检测乳腺癌亚型细胞释放的 H_2O_2 (图4(b)). 通过自组装策略, 将N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI)与碱性氨基酸Fmoc-精氨酸(Fmoc-R)共同嵌入Fmoc-二苯丙氨酸(Fmoc-FF)肽水凝胶中, 构建均匀稳定的三维传感界面, Fmoc-R的引入能够有效提高ECL量子产率. 同

时, 钛泡沫的三维多孔结构不仅有好的生物相容性和导电性, 还可以用作三维衬底电极和三维细胞培养基质匹配, 以缩短电子转移路径. 该传感器在无需额外共反应物的条件下, 可检测细胞释放的痕量 H_2O_2 , 在pH 7.4时检测限为0.023 nmol/L. 细胞实验表明, 未受刺激的转移性乳腺癌细胞释放的 H_2O_2 浓度显著低于非转移性乳腺癌细胞和正常乳腺癌细胞. 该三维ECL生物传感平台通过对癌细胞的实时监测, 为乳腺癌亚型的生理机制研究提供了新工具.

4 结论与展望

综上所述, 液相CL、BL与ECL三类发光机制在ROS检测中展现出独特优势和良好互补性. 随着功能纳米材料、光/电调控机制及生物相容性结构的不断引入, 三类发光技术在反应灵敏度、信号放大能力、选择性识别与组织穿透深度等方面取得显著进展, 逐步拓展至活体动态成像、肿瘤微环境监测、药物反应评估及复杂样品分析等多种应用场景(表1).

表1 不同发光技术在活性氧检测中的对比

Table 1 Comparison of chemiluminescence techniques for reactive oxygen species detection

检测物	发光底物	发光技术	检测限(mol/L)	线性范围 (mol/L)	文献
H_2O_2	鲁米诺	CL	/	/	[29]
	CPPO/BSA@AuNCs	CL	2.86×10^{-7}	/	[42]
	bor-DTZ	BL	1×10^{-5}	$5 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-4}$	[51]
	鲁米诺	ECL	1.97×10^{-9}	$5 \times 10^{-9} \sim 3 \times 10^{-7}$	[57]
	/	ECL	0.75×10^{-10}	$1 \times 10^{-8} \sim 0.1$	[58]
	异鲁米诺	ECL	2.3×10^{-11}	$5 \times 10^{-11} \sim 5 \times 10^{-9}$ $5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$	[65]
$^1\text{O}_2$	DCM-Cy	CL	/	/	[41]
	Eu-CNNPs	CL	1.36×10^{-7}	$1.67 \times 10^{-7} \sim 1.67 \times 10^{-5}$	[33]
	SH-PDI聚合物	CL	8.2×10^{-8}	$2.5 \times 10^{-7} \sim 6 \times 10^{-5}$	[37]
$\text{O}_2^{\cdot -}$	Aeq-QD	BL	4×10^{-6}	/	[45]
	P Probe	BL	5.84×10^{-6}	/	[52]
$\cdot\text{OH}$	O-CDs	CL	3×10^{-9}	$1 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-4}$	[32]
	L-012	CL	8.9×10^{-9}	/	[36]
总ROS	AuNPs-鲁米诺	ECL	8.9×10^{-9}	$1 \times 10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	[59]
	AuNPs/TiO ₂ NTs-鲁米诺	ECL	2×10^{-9}	$5 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$	[59]

尽管目前各类体系在ROS检测方面已经取得很大进展, 但每种方法仍具有部分缺点. 对于液相CL, 反应易受环境如温度和pH的影响, 限制了其在生物中的应用. 未来研究应聚焦于智能响应探针设计、CL诊疗一体化平台构建及与微流控、可穿戴技术的集成, 推动CL技术向高通量、可持续监测和精准医疗方向演进. 随着材料科学、生物医学和数据分析等多学科的交叉融合, 液相CL体系有望在疾病早筛、疗效评估和环境毒性监控等领域发挥更重要的作用. 对于BL, 底物稳定性和组织穿透能力差, 部分探针可能干扰细胞正常代谢. 未来研究可从以下几个方面深入推进: 引入智能响应模块与靶向递送系统, 提升ROS探针的特异性和应用稳定性; 结合人工智能与动态建模技术, 实现ROS的定量追踪与可视化; 进一步拓展探针的治疗功能, 实现成像与治疗一体化发展. 可以预见, 随着多学科交叉融合的加速, 基于BL的ROS检测平台将在基础研究与临床应用持续发挥重要作用. 对于ECL, 某些ECL体系在高电压或非生理条件下才活跃, 不适合体内应用, 同时ROS种类识别选择性有限, 易受多种氧化还原物干扰. 展望未来, ECL体系在ROS检测中的进一步突破有赖于多学科交叉协同. 一方面, 需加强对ECL发光机制的基础研究, 探索更多可调控激发态与界面电子行为的功能材料; 另一方面, 集成微纳器件、单细胞平台和体内传感技术, 将有助于实现对ROS时空分布的实时动态监测. 结合智能算法与数据驱动分析, ECL体系有望由单纯的检测手段拓展至集诊断和调控于一体的新阶段.

参考文献

- 1 Kwon N, Kim D, Swamy K M K, et al. Metal-coordinated fluorescent and luminescent probes for reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Coord Chem Rev*, 2021, 427: 213581
- 2 Huang C, Zhou W, Wu R, et al. Recent advances in nanomaterial-based chemiluminescence probes for biosensing and imaging of reactive oxygen species. *Nanomaterials*, 2023, 13: 1726-1749
- 3 Madamanchi N R, Vendrov A, Runge M S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 29-38
- 4 Valko M, Rhodes C J, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006, 160: 1-40
- 5 Sameenoi Y, Koehler K, Shapiro J, et al. Microfluidic electrochemical sensor for on-line monitoring of aerosol oxidative activity. *J Am Chem Soc* 2012, 134: 10562-10568
- 6 Su Y, Song H, Lv Y. Recent advances in chemiluminescence for reactive oxygen species sensing and imaging analysis. *Microchemical Journal*, 2019, 146: 83-97
- 7 Takhar V, Singh S. Nanomaterials ROS: a comprehensive review for environmental applications. *Environ Sci Nano*, 2025, 12: 2516-2550
- 8 Nosaka Y, Takahashi S, Mitani Y, et al. Reaction mechanism of visible-light responsive Cu(II)-grafted Mo-doped SrTiO₃ photocatalyst studied by means of ESR spectroscopy and chemiluminescence photometry. *Appl Catal B Environ Energy*, 2012, 111-112: 636-640
- 9 Wang Z, Ma W, Chen C, et al. Probing paramagnetic species in titania-based heterogeneous photocatalysis by electron spin resonance (ESR) spectroscopy—A mini review. *Chem Eng J*, 2011, 170: 353-362
- 10 Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Bio Med*, 2007, 43: 995-1022
- 11 Nagarajan S, Skillen N C, Fina F, et al. Comparative assessment of visible light and UV active photocatalysts by hydroxyl radical quantification. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2017, 334: 13-19
- 12 Chen T, Hu Y, Cen Y, et al. A dual-emission fluorescent nanocomplex of gold-cluster-decorated silica particles for live cell imaging of highly reactive oxygen species. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 11595-11602
- 13 Kshnendu M R, Singh S. Reactive oxygen species: Advanced detection methods and coordination with nanozymes. *Chem Eng J*, 2025, 511: 161296
- 14 Li Y, Zhang W, Niu J, et al. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. *ACS Nano*, 2012, 6: 5164-5173
- 15 Zhang Y, Dai M, Yuan Z. Methods for the detection of reactive oxygen species. *Anal Methods*, 2018, 10: 4625-4638
- 16 Yu W, Zhao L. Chemiluminescence detection of reactive oxygen species generation and potential environmental applications. *Trends Anal Chem*, 2021, 136: 116197-116212
- 17 Nosaka Y, Nosaka A Y. Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis. *Chem Rev*, 2017, 117: 11302-11336
- 18 Zhou W, Cao Y, Sui D, et al. Radical pair-driven luminescence of quantum dots for specific detection of peroxynitrite in living cells. *Anal Chem*, 2016, 88: 2659-2665
- 19 Han S, Liu B, Fan Z, et al. Chemiluminescence detection of trace iodide with flow injection analysis of KMnO₄ - carbon dots system. *Luminescence*, 2017, 32: 1192-1196
- 20 Wu D, Wang Y, Qi W, et al. Long-lasting chemiluminescence of lucigenin/p-aminophenol system for detection of p-aminophenol in environmental water. *Dyes Pigments*, 2024, 223: 111959
- 21 Syed A J, Anderson J C. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem Soc Rev*, 2021, 50: 5668-5705
- 22 Tung J K, Berglund K, Gutekunst C-A, et al. Bioluminescence imaging in live cells and animals. *Neurophotonics*, 2016, 3: 025001
- 23 Kirschbaum-Harriman S, Mayer M, Duerkop A, et al. Signal enhancement and low oxidation potentials for miniaturized ECL biosensors via N-butyl-diethanolamine. *Analyst*, 2017, 142: 2469-2474
- 24 Lang G, Zhao K, He Y, et al. Carbon dots and gold nanoparticles doped metal-organic frameworks as high-efficiency ECL emitters for monitoring of cell apoptosis. *Microchem J*, 2021, 171: 106787
- 25 Zhu H, Zhou J, Ma C, et al. Self-enhanced electrochemiluminescence imaging system based on the accelerated generation of ROS under ultrasound. *Anal Chem*, 2023, 95: 11526-11534
- 26 Al Mughairy B, Al-Lawati H A J. Recent analytical advancements in microfluidics using chemiluminescence detection systems for food analysis. *Trends Anal Chem*, 2020, 124: 115802

- 27 Deepa S, Venkatesan R, Jayalakshmi S, et al. Recent advances in catalyst-enhanced luminol chemiluminescence system and its environmental and chemical applications. *J Environ Chem Eng*, 2023, 11: 109853
- 28 Xue H, Zheng H, Xiang J, et al. Chemiluminescence of Cl-NCDs and KMnO₄ systems based on waste pomelo peel for erythromycin detection. *Dyes Pigments*, 2025, 239: 112734
- 29 Li L, Zhang Y, Gu Y, et al. Detection of the freshness of rice by chemiluminescence. *Luminescence*, 2023, 38: 109-115
- 30 Gao H, Sun T, Wang W, et al. Self-Illuminating copper-luminol coordination polymers for bioluminescence imaging of oxidative damage. *Anal Chem*, 2024, 96: 16434-16442
- 31 Zhu H, Huang X, Deng Y, et al. Applications of nanomaterial-based chemiluminescence sensors in environmental analysis. *Trends Anal Chem*, 2023, 158: 116879
- 32 Wang C, Fang Y, Zhou D, et al. Surface oxidation of carbon dots enables highly selective and sensitive chemiluminescence detection of hydroxyl radical. *Nano Res*, 2024, 17: 9275-9283
- 33 Zhou Y, Zhou Y, Gou J, et al. Europium-functionalized graphitic carbon nitride for efficient chemiluminescence detection of singlet oxygen. *ACS Sens*, 2023, 8: 3349-3359
- 34 Qian F, Zhang D, Huang Y, et al. Development of the cobalt-modified boron-doped metal–nitrogen–carbon nanoparticles (co-BCN) for the chemiluminescent determination of the total antioxidant capacity of beverages and fruits. *Food Chem*, 2025, 485: 144517-144526
- 35 Wu X, Deng Y, Xu Y, et al. Activatable fluorescence and bio/chemiluminescence probes for aminopeptidases: From design to biomedical applications. *Adv Mater*, 2024, 36: 2409893-2409930
- 36 Zhang M, Wang K, Li M, et al. Highly efficient and long-lasting chemiluminescence-functionalized nanohydrogel for imaging-guided precise piperlongumine chemotherapy. *Anal Chem*, 2024, 96: 19833-19839
- 37 Guo Q, Feng Y, Song H, et al. New perylene-based chemiluminescent polymer nanoparticles for highly selective detection of the superoxide anion in vivo. *Anal Chem*, 2023, 95: 15102-15109
- 38 Feng Y, Yang X, Rao Q, et al. Persistent Luminescence Lifetime-Based Near-Infrared Nanoplatfrom via Deep Learning for High-Fidelity Biosensing of Hypochlorite. *Anal Chem*, 2024, 96: 7240-7247
- 39 Dai Y, Zhang K, Yuan X, et al. Novel Near-Infrared Iridium(III) Complex for Chemiluminescence Imaging of Hypochlorous Acid. *Anal Chem*, 2023, 95: 8310-8317
- 40 Rao Q, Zhou J, Su Y, et al. Near-Infrared Catalytic Chemiluminescence System based on Zinc Gallate Nanoprobe for Hydrazine Sensing. *Anal Chem*, 2024, 96: 6373-6380
- 41 Zhao M, Lu Y, Zhang Y, et al. Ultra-high signal-to-noise ratio near-infrared chemiluminescent probe for in vivo sensing singlet oxygen. *Chin Chem Lett*, 2025, 36: 110105
- 42 Wang M, Liu R, Li J, et al. Self-Illuminating near-infrared chemiluminescence nanosensors for tumor imaging. *ACS Appl Nano Mater* 2024, 7: 13809-13819
- 43 Xie J, Leng Y, Cui X, et al. Theoretical study on the formation and decomposition mechanisms of coelenterazine dioxetanone. *J Phys Chem A*, 2023, 127: 3804-3813
- 44 Lee J, Müller F, Visser A J W G. The sensitized bioluminescence mechanism of bacterial luciferase. *Photochem Photobiol*, 2019, 95: 679-704
- 45 Liao W, Pan Y, Fu J, et al. Bioluminescence resonance energy transfer sensor with tunable conjugation efficiency for highly sensitive detection of superoxide anion in tumors. *ACS Appl Bio Mater*, 2024, 7: 8709-8717
- 46 Yuan M, Fang X, Liu J, et al. NIR-II self-luminous molecular probe for in vivo inflammation tracking and cancer PDT effect self-evaluating. *Small*, 2023, 19: 2206666
- 47 Wu W, Li J, Chen L, et al. Bioluminescent probe for hydrogen peroxide imaging in vitro and in vivo. *Anal Chem*, 2014, 86: 9800-9806
- 48 Liu X, Tian X, Xu X, et al. Design of a phosphinate - based bioluminescent probe for superoxide radical anion imaging in living cells. *Luminescence*, 2018, 33: 1101-1106
- 49 Tang C, Gao Y, Liu T, et al. Bioluminescent probe for detecting endogenous hypochlorite in living mice. *Org Biomol Chem*, 2018, 16: 645-651
- 50 Ma Q, Shao H, Feng Y, et al. A new bioluminescent imaging technology for studying oxidative stress in the testis and its impacts on fertility. *Free Radical Bio Med*, 2018, 124: 51-60
- 51 O'Sullivan J J, Heffern M C. Development of an ATP-independent bioluminescent probe for detection of extracellular hydrogen peroxide. *Org Biomol Chem*, 2022, 20: 6231-6238
- 52 Li Q, Chen Z, Su L, et al. Constructing turn-on bioluminescent probes for real-time imaging of reactive oxygen species during cisplatin chemotherapy. *Biosens Bioelectron*, 2022, 216: 114632
- 53 Larsen M A, Valley M, Karassina N, et al. Bioluminescent probes for the detection of superoxide and nitric oxide. *ACS Chem Biol*, 2025, 20: 56-61
- 54 Chen R, Wang X, Wu K, et al. Voltammetric Study and Modeling of the Electrochemical Oxidation Process and the Adsorption Effects of Luminol

- and Luminol Derivatives on Glassy Carbon Electrodes. *Anal Chem*, 2022, 94: 17625-17633
- 55 Li Y, Kuang K, Chen Y, et al. Exogenous coreactant-free electrocatalytic reactive oxygen species-driven dual-signal molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor for the detection of trenbolone. *Anal Chem*, 2025, 97: 3198-3206
- 56 Yang H, Zhang Y, Gao W, et al. Cathodic electrochemiluminescence of boron and nitrogen-codoped carbon dots for the detection of dissolved oxygen in seawater. *Talanta*, 2024, 279: 126529
- 57 Cheng L, Yang Y, Lin S, et al. Sensitive and quick electrochemiluminescence biosensor for the detection of reactive oxygen species in seminal plasma based on the valence regulation of gold nanoclusters. *Anal Chim Acta*, 2024, 1330: 343284
- 58 Du D, Wei X, Huang J, et al. Real-time monitoring of ROS secreted by Ana-1 mouse macrophages by nanomaterial sensitized electrochemiluminescence. *J Electroanal Chem*, 2021, 889: 115230
- 59 Shen Y, Qian X, Mi X, et al. An ultrasensitive electrochemiluminescent sensing platform for oxygen metabolism based on bioactive magnetic beads. *Bioelectrochemistry*, 2022, 145: 108086
- 60 Gu W, Wang H, Jiao L, et al. Single-atom iron boosts electrochemiluminescence. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 3534-3538
- 61 Tang Y, Liu Y, Xia Y, et al. Simultaneous detection of ovarian cancer-concerned HE4 and CA125 markers based on Cu single-atom-triggered CdS QDs and Eu MOF@Isoluminol ECL. *Anal Chem*, 2023, 95: 4795-4802
- 62 Zong L, Ruan L, Li J, et al. Fe-MOGs-based enzyme mimetic and its mediated electrochemiluminescence for in situ detection of H₂O₂ released from Hela cells. *Biosens Bioelectron*, 2021, 184: 113216
- 63 Li X, Du X. Surface enhanced electrochemiluminescence of the Ru(bpy)₃²⁺/tripropylamine system by Au@SiO₂ nanoparticles for highly sensitive and selective detection of dopamine. *Microchem J*, 2022, 176: 107224
- 64 Gao X, Zhao H, Wang D, et al. Selectively lighting up singlet oxygen via aggregation-induced electrochemiluminescence energy transfer. *Anal Chem*, 2022, 94: 3718-3726
- 65 Zhou Y, Wei X, Chen J, et al. A three-dimensional electrochemiluminescence sensor integrated with peptide hydrogel for detection of H₂O₂ released from different subtypes of breast cancer cells. *Anal Chem*, 2024, 96: 13464-13472

Recent Progress in Chemiluminescence Techniques for Reactive Oxygen Species Detection

Hongyu Dai¹, Honghong Sun¹, Weijiang Guan^{1*} & Chao Lu^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

² Pingyuan Laboratory, College of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

* Corresponding authors, E-mail: wjguan@mail.buct.edu.cn; luchao@mail.buct.edu.cn

Reactive oxygen species (ROS) play crucial roles in a wide range of physiological and pathological processes. Consequently, their efficient and selective detection is of significant importance for disease diagnosis, therapeutic monitoring, and environmental analysis. Chemical reaction-driven luminescence techniques, including chemiluminescence (CL), bioluminescence (BL), and electrochemiluminescence (ECL), have emerged as powerful detection modalities, offering high sensitivity, intrinsic background suppression, and operation without external light excitation, thus minimizing photodamage and autofluorescence. Over the past five years, these platforms have undergone rapid innovation in molecular design, materials integration, and system engineering, dramatically expanding their capabilities for ROS sensing in complex biological environments. In CL systems, advanced architectures incorporating nanomaterials, polymeric matrices, and hybrid composites have yielded substantial gains in analytical performance. These enhancements have increased photon yield, extended operational stability, and enabled multifunctional sensing-imaging platforms. The development of near-infrared (NIR) CL probes has been particularly transformative, affording deeper tissue penetration and improved *in vivo* imaging resolution. BL approaches have capitalized on resonance energy transfer cascades and activatable probe chemistries to achieve highly selective, low-background imaging of specific ROS species, facilitating longitudinal monitoring of oxidative events in living systems. ECL strategies have progressed through the synthesis of novel luminophore-doped nanostructures and the engineering of functionalized electrode interfaces, enhancing signal responsiveness, operational stability, and biocompatibility. Notably, flexible and bio-integrated ECL devices are emerging, enabling conformal interfacing with biological tissues for localized ROS sensing. Despite these advances, fundamental challenges persist. CL detection remains vulnerable to environmental fluctuations in pH and temperature, constraining stability *in vivo*. BL probes often suffer from poor substrate stability, limited penetration depth, and the risk of perturbing normal cellular metabolism. ECL typically requires high voltages or non-physiological electrolytes, which limit direct *in vivo* applications; additionally, its selectivity for distinct ROS species is often insufficient, with signals susceptible to interference from a wide range of redox-active biomolecules. Overcoming these limitations demands innovation in molecular probe chemistry, adaptive materials, and system-level integration to enable simultaneous multi-ROS detection, robust biological stability, and theranostic functionality. Looking ahead, the convergence of chemical luminescence technologies with cutting-edge innovations is poised to redefine ROS sensing. Future research is expected to focus on smart-responsive mechanisms capable of adapting to fluctuating biological microenvironments, seamless integration of multi-modal detection platforms, and AI-assisted data analysis to enhance signal interpretation and predictive modeling. These advances aim to propel ROS detection toward high-throughput screening, real-time visualization of redox dynamics, and precision medicine applications. The design of next-generation luminescent substrates with superior photophysical stability, optimized quantum yield, and tunable emission wavelengths, combined with synergistic integration with complementary imaging or biosensing modalities, will further elevate spatial res-

olution, molecular specificity, and background discrimination. Such progress will not only deepen mechanistic understanding of ROS-mediated signaling and pathology but also accelerate translation into clinically actionable diagnostics and targeted interventions.

reactive oxygen species, chemiluminescence, bioluminescence, electrochemiluminescence, probe

Accepted