

Application Note AN-EC-039

Estudio espectroelectroquimioluminiscente de la emisión simultánea de dos luminóforos.

Monitorización mediante ECL del sistema de transferencia de energía por resonancia (RET) formado por luminol y fluoresceína.

La quimioluminiscencia electrogenerada, o electroquimioluminiscencia (ECL), es la emisión de luz que surge de estados excitados generados por reacciones de transferencia de electrones en la superficie del electrodo.

Esta técnica ofrece ventajas como una gran versatilidad, una excelente sensibilidad y un dispositivo compacto y portátil. Además, la ECL permite un control temporal y espacial preciso de la reacción [1,2].

Esta nota de aplicación describe la respuesta de la electroquimioluminiscencia (ECL) cuando hay más de un luminóforo presente en una solución.

INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Los experimentos de ECL se realizan utilizando el instrumento SpectroECL equipado con una celda de microespectrómetro (Figura 1) o con una célula fotodiodo (ECLPHOTODIODCELL) como detector.

Para realizar los experimentos de electroquimioluminiscencia (ECL) se utilizan electrodos serigrafiados de carbono (SPE, 110).

El SpectroECL se controla mediante el software DropView SPELEC, que permite la adquisición simultánea de la senal electroquímica y la senal de luz emitida. Además, el software incluye herramientas para el tratamiento y análisis de datos. Tabla 1 Aquí se enumeran todos los componentes de hardware y software utilizados en este estudio.



Figure 1. El instrumento SpectroECL y la celda del microespectrómetro.

Tabla 1. Descripción general del hardware y el software.

Equipo	Número de artículo
Instrumento	ESPECTROECL
Celúla	Célula fotodiodo ECL
Oro SPE	110
Cable de conexión para SPEs	ELENCO
Software	DropView SPELEC

LUMINÓFORO ECL DE LUMINOL

La excitación electroquímica de luminol 0,002 mol/L en presencia de peróxido de hidrógeno 0,05 mol/L en tampón PBS 0,1 mol/L (pH 8) se lleva a cabo mediante voltametría de barrido lineal, escaneando desde 0,00 V a +1,00 V a 0,05 V/s.

El detector de fotodiodo integrado en la ECLPHOTODIODCELL registra la senal ECL total, pero no proporciona resolución de longitud de onda.

Este detector es altamente sensible, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del lumíforo en estudio.

Como se puede observar en Figura 2, el voltamograma de barrido lineal (línea azul) muestra un pico de oxidación en 0,30 V, correspondiente a la oxidación electroquímica del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. También genera la emisión de luz a 425 nm, que el fotodiodo registra como emisión total de luz (línea verde). Los picos de ECL y electroquímicos coinciden exactamente a 0,30 V.
La senal ECL del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno muestra su comportamiento característico con el aumento de la intensidad de emisión durante la oxidación del luminol [3,4].

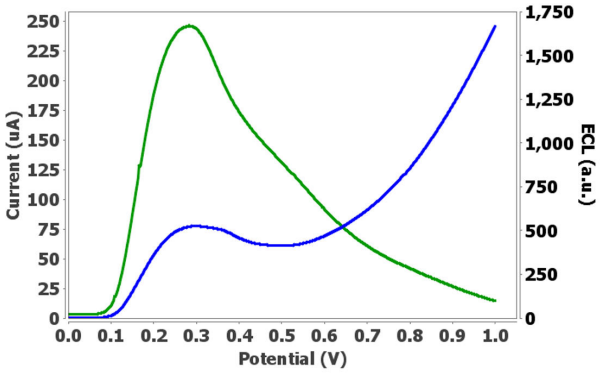


Figure 2. Voltamograma lineal (línea azul) y señal ECL (línea verde) para luminol 0,002 mol/L y peróxido de hidrógeno 0,05 mol/L en solución de PBS utilizando la celda de fotodiodos ECL.

Al repetir el experimento con el microespectrómetro como detector, se observa la misma respuesta electroquímica (línea azul). Figura 2), pero la respuesta óptica es diferente ya que el microespectrómetro diferencia entre longitudes de onda. El espectro registrado muestra una única banda de emisión a 425 nm, como se observa en Figura 3a.

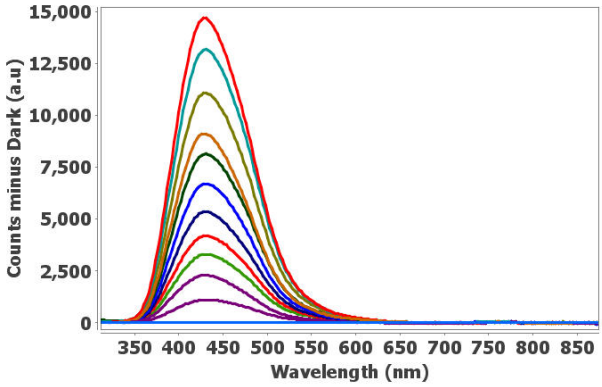


Figure 3a. Señal de electroquimioluminiscencia (ECL) para luminol 0,002 mol/L y peróxido de hidrógeno 0,05 mol/L en solución de PBS utilizando la celda del microespectrómetro.

La evolución de la emisión a 425 nm en función del potencial se puede obtener utilizando la herramienta «Espectros vs EC» en DropView SPELEC. Como se puede ver en Figura 3bEl comportamiento de la ECL coincide exactamente con la respuesta de la ECL obtenida por el detector de fotodiodo (línea verde). Figura 2). La emisión de ECL alcanza un máximo cuando se observa electroquímicamente el pico de oxidación del luminol a 0,30 V.

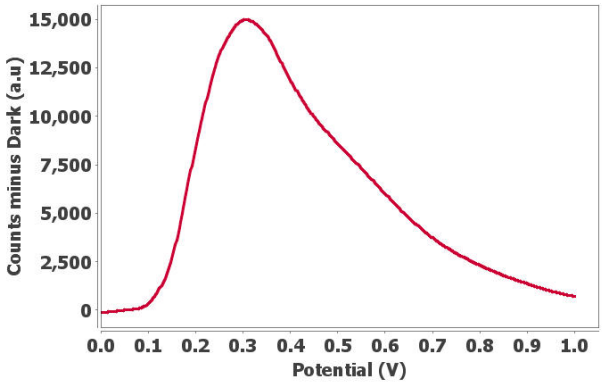


Figure 3b. Evolución de la emisión de luminol a 425 nm en función del potencial.

ECL DE LUMINÓFOROS DE LUMINOL Y FLUORESCEÍNA

El sistema de transferencia de energía por resonancia (RET) formado por los luminóforos luminol (donador) y fluoresceína (aceptor) [5] se estudia. Según el mecanismo RET, el luminol genera luminiscencia tras su oxidación electroquímica en presencia de peróxido de hidrógeno. Parte de esta luz emitida actúa como fuente de excitación para la fluoresceína, que reemite luz a una longitud de onda diferente.

El análisis de este sistema utilizando la ECLPHOTODIODCELL proporciona las respuestas electroquímicas (línea azul) y ECL (línea verde) que se muestran en Figura 4Como solo el luminol sufre oxidación electroquímica, el voltamograma es idéntico al que no contiene fluoresceína (Figura 2). El detector de fotodiodos registra un aumento en la intensidad total de la electroquimioluminiscencia durante la oxidación del luminol a 0,30 V. Sin embargo, dado que el fotodiodo no registra los espectros de emisión, no puede distinguir las contribuciones del luminol y la fluoresceína.

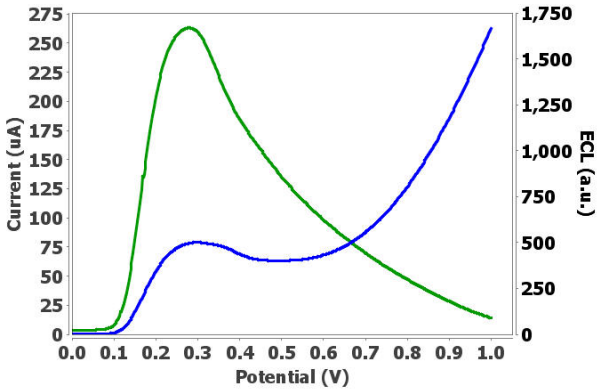


Figure 4. Voltamograma lineal (línea azul) y señal ECL (línea verde) para luminol 0,002 mol/L, fluoresceína 0,0001 mol/L y peróxido de hidrógeno 0,05 mol/L en solución de PBS utilizando la celda fotodiométrica ECL.

Cuando se repite el experimento utilizando la celda del microespectrómetro, el comportamiento electroquímico permanece igual (línea azul). Figura 4), pero el ECL muestra dos bandas de emisión. Figura 5a Muestra los espectros registrados durante la voltametría de barrido lineal. La banda a 425 nm corresponde a la emisión de luminol, mientras que la banda a 530 nm está asociada con la emisión de fluoresceína. Esto confirma la transferencia de energía por resonancia (RET) del luminol a la fluoresceína y demuestra la capacidad del microespectrómetro para diferenciar entre las emisiones de diferentes luminóforos.

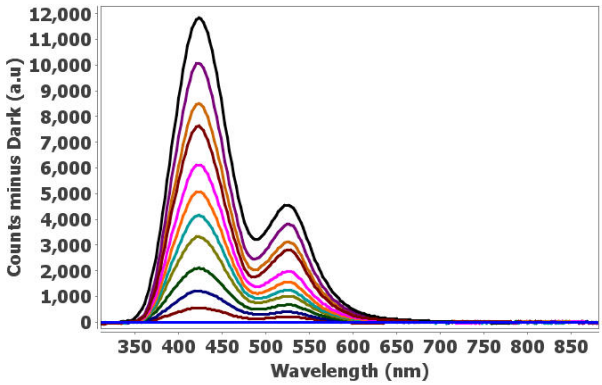


Figure 5a. Señal de electroquimioluminiscencia (ECL) para luminol 0,002 mol/L, fluoresceína 0,0001 mol/L y peróxido de hidrógeno 0,05 mol/L en solución de PBS utilizando la celda del microespectrómetro.

La evolución de las emisiones en función del potencial se analiza utilizando la herramienta «Spectra vs EC» en DropView SPELEC. Como se puede observar en Figura 5bLas emisiones tanto de luminol como de fluoresceína aumentan durante la oxidación del luminol y alcanzan sus valores máximos a 0,30 V. La respuesta espectroelectroquimioluminiscente también permite evaluar la contribución de cada luminóforo, demostrando que la emisión de luminol es mayor que la senal de fluoresceína.

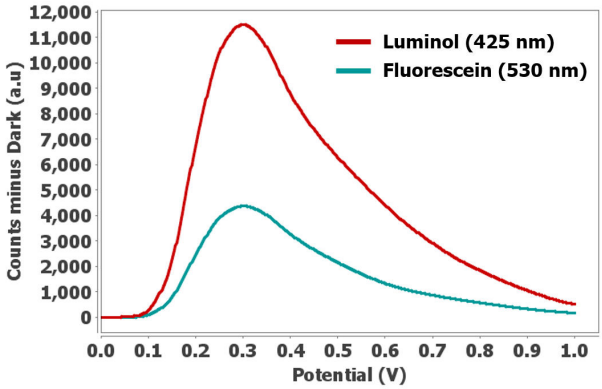


Figure 5b. Evolución de la emisión de luminol a 425 nm en función del potencial.

CONCLUSIÓN

Se ha estudiado el sistema ECL formado por luminol como luminóforo y peróxido de hidrógeno como correactivo, así como el sistema RET ECL basado en dos luminóforos, luminol y fluoresceína, y peróxido de hidrógeno como correactivo, utilizando el espectrómetro ECL con dos detectores diferentes.

El detector de fotodiodo no discrimina entre longitudes de onda y registra la intensidad de luminiscencia total para cada punto electroquímico. La célula fotodioda resulta muy útil para la detección de concentraciones muy bajas del lumíforo en estudio y para la investigación con una sola especie marcadora.

Por otro lado, el detector microespectrómetro proporciona resolución de longitud de onda y permite la realización de experimentos de espectro-electroquimioluminiscencia, ya que los espectros visibles se obtienen simultáneamente. registrada a la senal electroquímica. Esta celda resulta útil para sistemas multianalito, el desarrollo de nuevos luminóforos y la caracterización de las propiedades de los materiales.

REFERENCIAS

1. Richter, M. METRO. Electroquimioluminiscencia (ECL). *Química. Rdo.* 2004, *104*, 3003–3036. https://doi.org/10.1021/cr020373d.
2. Hu, L.; Xu, G. Aplicaciones y tendencias en electroquimioluminiscencia. *Química. Revista de la Sociedad* 2010, *39*, 3275–3304. https://doi.org/10.1039/b923679c.
3. Ballesta-Claver, J.; Valencia-Mirón, M. C.; Capitán-Vallvey, L. F. Biosensor electroquimioluminiscente desechable para la determinación de lactato en saliva. *Analista* 2009, *134*, 1423–1432. https://doi.org/10.1039/b821922b.
4. Yildiz, G.; Tasdoven, U.; Menek, N. Caracterización electroquímica del luminol y su determinación en muestras reales. *Métodos analíticos* 2014, *6*, 7809–7813. https://doi.org/10.1039/C4AY01281J.
5. Neves, M. METRO. PAG. S.; Bobes-Limenes, P.; Pérez-Junquera, A. et al. Instrumentación analítica miniaturizada para ensayos de electroquimioluminiscencia: un espectrómetro y un dispositivo basado en fotodiodos. *Química analítica y bioanalítica* 2016, *408*, 7121–7127. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9669-7.

CONTACT

Metrohm Hispania
Calle Aguacate 15
28044 Madrid
mh@metrohm.es



Aparato de espectroelectroquimioluminiscencia para electrodos serigrafiados

SpectroECL combina en un solo equipo un bipotenciostato/galvanostato y un microespectrómetro integrado en una innovadora celda para electrodos serigrafiados. Esta alternativa miniaturizada y portátil es perfecta para realizar mediciones de quimioluminiscencia electrogenerada (ECL)



Celda de fotodiodo para medidas de electroquimioluminiscencia

Celda para electrodos serigrafiados para efectuar medidas de electroquimioluminiscencia. Esta celda de ABS incluye un fotodiodo de silicio con preamplificador y un rango de respuesta espectral de 340–1100 nm y longitud de onda de sensibilidad pico de 960 nm.

Esta celda debería usarse junto con aparatos de electroquimioluminiscencia µStat ECL o µStat SpectroECL.



Conector de cable i-µStat para electrodos serigrafiados

Se trata de un conector que funciona como una interfaz entre nuestros electrodos serigrafiados y los potenciostatos de Metrohm DropSens.