



Application Note AN-EC-039

## 【技術資料】 分光電気化学発光による2種ルミノフォアの同時発光解析

ECL monitoring of the resonance energy transfer (RET) system formed by luminol and fluorescein

電解化学発光、略して電気化学発光(ECL)は、電極表面での電子移動反応によって生成された励起状態から生じる発光現象です。

この技術には、高い汎用性、優れた感度、小型でポータブルな装置といった利点があります。さらに、

ECLでは反応を時間的・空間的に精密に制御できます[1,2]。

このアプリケーションノートでは、溶液中に複数のルミノフォアが存在する場合のECL応答について説明します。

## 装置とソフトウェア

ECL実験は、検出器としてマイクロ分光器セル(図1)またはフォトダイオードセル(ECLPHOTODIODECELL)のいずれかを搭載したSpectroECL装置を使用して行います。

ECL実験には、カーボンスクリーン印刷電極(SPE、110)を使用します。

SpectroECLはDropView SPELECソフトウェアで制御され、電気化学信号と発光信号を同時に取得できます。さらに、このソフトウェアにはデータ処理および解析のためのツールが含まれています。表1に、本検討で使用したすべてのハードウェアとソフトウェアを示します。



図1. SpectroECL装置とマイクロ分光器セル。

表1. ハードウェアおよびソフトウェア機器の概要。

| 機器         | 品番                |
|------------|-------------------|
| 装置         | SPECTROECL        |
| セル         | ECLPHOTODIODECELL |
| 金SPE       | 110               |
| SPE用接続ケーブル | CAST              |
| ソフトウェア     | DropView SPELEC   |

## ルミノールルミノフォアのエCL

0.1 mol/LのPBS緩衝液(pH 8)中、0.05 mol/Lの過酸化水素の存在下で、0.002 mol/Lのルミノールを電気化学的に励起します。励起は、リニアスweepポルタンメトリーにより、0.00 Vから+1.00 Vまで0.05 V/sで掃引して行います。

ECLPHOTODIODECELLに内蔵されたフォトダイオード検出器は、ECL信号の総量を記録しますが、波長分解能は得られません。

この検出器は感度が高く、検討対象のルミノフォアを非常に低い濃度で検出できます。

図2に示すように、リニアスイープボルタモグラム(青線)では、0.30 Vに酸化ピークが見られ、これは過酸化水素の存在下でのルミノールの電気化学的酸化に対応します。この酸化により、425 nmの発光も生じ、これはフォトダイオードによって総発光量として記録されます(緑線)。ECLピークと電気化学ピークは、0.30 Vで完全に一致します。過酸化水素の存在下でのルミノールのECL信号は、ルミノールの酸化の間に発光強度が増加するという特徴的な挙動を示します[3,4]。

検出器としてマイクロ分光器を使用して実験を繰り返すと、同じ電気化学応答が得られます(図2の青線)が、マイクロ分光器は波長を識別するため、光学応答は異なります。記録されたスペクトルには、図3aに示すように、425 nmに単一の発光バンドが見られます。

425 nmにおける発光の電位に対する変化は、DropView SPELECの「Spectra vs EC」ツールを使用して取得できます。図3bに示すように、このECL挙動は、フォトダイオード検出器で得られたECL応答(図2の緑線)と完全に一致します。ECL発光は、0.30 Vでのルミノールの酸化ピークが電気化学的に観測されるときに最大に達します。

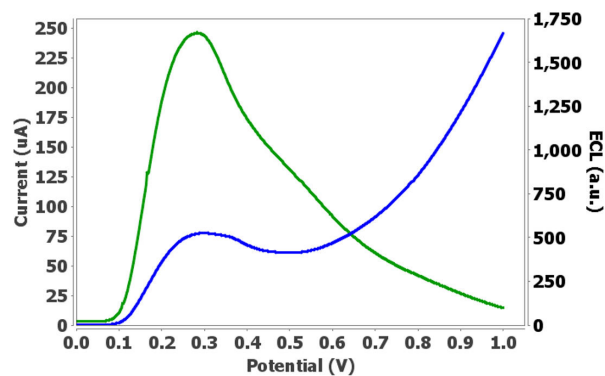


図 2. リニアボルタモグラム(青線)およびECL信号(緑線)。ECLPHOTODIODECELLを使用し、PBS溶液中の0.002 mol/Lルミノールと0.05 mol/L過酸化水素を測定しています。

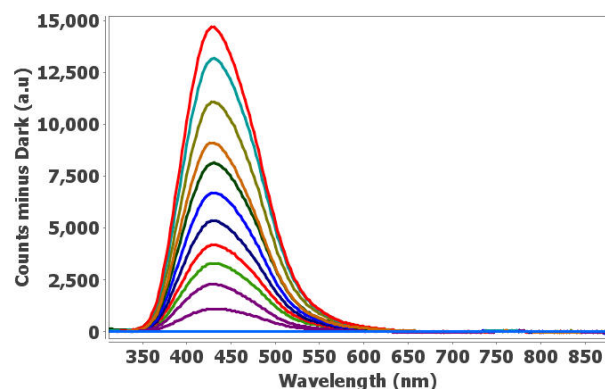


図 3a. マイクロ分光器セルを使用した、PBS溶液中の0.002 mol/Lルミノールと0.05 mol/L過酸化水素のECL信号。

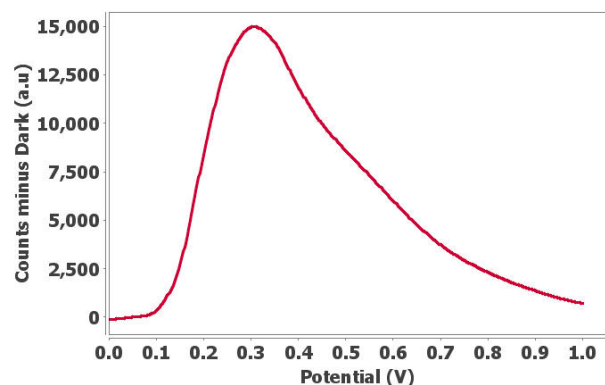


図 3b. ルミノールの425 nmにおける発光の電位に対する変化。

## ルミノールとフルオレセインのルミノフォアのECL

ルミノフォアであるルミノール(ドナー)とフルオレセイン(アクセプター)から成る共鳴エネルギー移動(RET)系[5]を検討します。RETの機構によれば、ルミノールは過酸化水素の存在下での電気化学的酸化

により発光します。この発光の一部がフルオレセインの励起源として作用し、フルオレセインは異なる波長で光を再放出します。

ECLPHOTODIODECELLを使用してこの系を分析すると、図4に示す電気化学応答(青線)とECL応答(緑線)が得られます。電気化学的に酸化されるのはルミノールのみであるため、ボルタモグラムはフルオレセインを含まない場合(図2)と同一です。フォトダイオード検出器は、0.30 Vでのルミノールの酸化中に、ECL総強度の増加を記録します。ただし、フォトダイオードは発光スペクトルを記録しないため、ルミノールとフルオレセインそれぞれの寄与を区別することはできません。

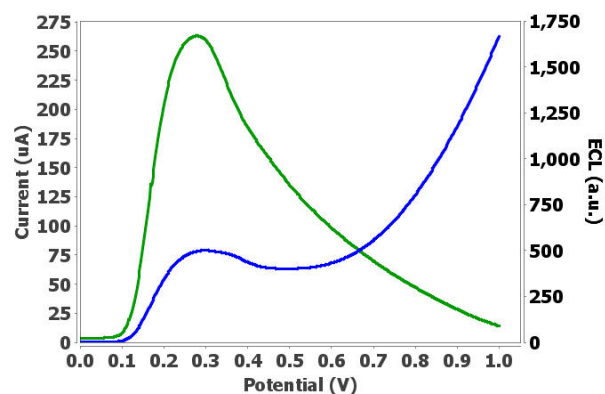


図 4. リニアボルタモグラム(青線)およびECL信号(緑線)。ECLPHOTODIODECELLを使用し、PBS溶液中の0.002 mol/Lルミノール、0.0001 mol/Lフルオレセイン、および0.05 mol/L過酸化水素を測定しています。

マイクロ分光器セルを使用して実験を繰り返すと、電気化学挙動は同じままです(図4の青線)が、ECLには2つの発光バンドが現れます。図5aは、リニアスweepボルタンメトリー中に記録されたスペクトルを示しています。425 nmのバンドはルミノールの発光に対応し、530 nmのバンドはフルオレセインの発光に関連しています。これは、ルミノールからフルオレセインへのRETを裏付けるとともに、マイクロ分光器が異なるルミノフォアからの発光を識別できることを示しています。

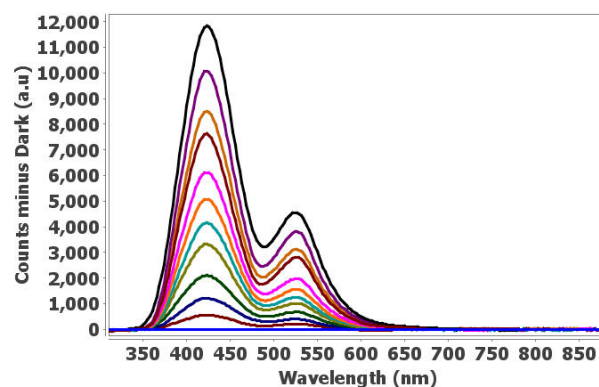


図 5a. マイクロ分光器セルを使用した、PBS溶液中の0.002 mol/Lルミノール、0.0001 mol/Lフルオレセイン、および0.05 mol/L過酸化水素のECL信号。

発光の電位依存的な変化は、DropView SPELECの「Spectra vs EC」ツールを使用して解析します。図5bに示すように、ルミノールとフルオレセインの両方の発光は、ルミノールの酸化中に増加し、0.30 Vで最大に達します。分光電気化学発光の応答により、各ルミノフォアの寄与を評価することもでき、ルミノールの発光がフルオレセインの信号よりも高いことが分かります。

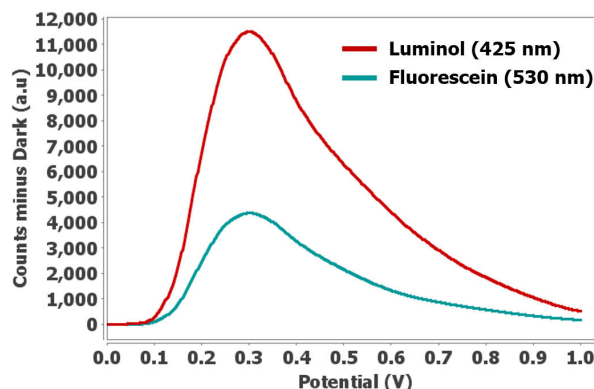


図 5b. ルミノールの425 nmにおける発光の電位に対する変化。

## まとめ

ルミノフォアとしてルミノール、共反応物として過酸化水素から成るECL系、ならびに、2種類のルミノフォアであるルミノールとフルオレセイン、および共反応物として過酸化水素に基づくRET ECL系について、2種類の異なる検出器を備えたSpectroECLを使用して検討しました。

フォトダイオード検出器は波長を識別せず、各電気化学的測定点における発光の総強度を記録します。フォトダイオードセルは、検討対象のルミノフォア

を非常に低い濃度で検出する場合や、標識種が1種類のみの研究に非常に有用です。

一方、マイクロ分光器検出器は波長分解能を備えており、電気化学信号と同時に可視スペクトルが記録されるため、分光電気化学発光実験を行うことができます。このセルは、複数の分析対象を含む系、新しいルミノフォアの開発、および材料特性の評価に有用です。

## 参考資料

1. Richter, M. M. 電気化学発光(ECL)。 *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3003–3036.  
<https://doi.org/10.1021/cr020373d>.
2. Hu, L.; Xu, G. 電気化学発光の応用と動向。 *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3275–3304.  
<https://doi.org/10.1039/b923679c>.
3. Ballesta-Claver, J.; Valencia-Mirón, M. C.; Capitán-Vallvey, L. F. 唾液中の乳酸定量のための使い捨て型電気化学発光バイオセンサー。 *Analyst* **2009**, *134*, 1423–1432.  
<https://doi.org/10.1039/b821922b>.
4. Yildiz, G.; Tasdoven, U.; Menek, N. ルミノールの電気化学的特性評価と実試料中での定量。 *Analytical Methods* **2014**, *6*, 7809–7813.  
<https://doi.org/10.1039/C4AY01281J>.
5. Neves, M. M. P. S.; Bobes-Limenes, P.; Pérez-Junquera, A. 他。電気化学発光アッセイ用の小型分析機器:分光器およびフォトダイオードベースの装置。 *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408*, 7121–7127.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-016-9669-7>.

## CONTACT

メトロームジャパン株式会  
社  
143-0006 東京都大田区平  
和島6-1-1  
null 東京流通センター アネ  
ックス9階

metrohm.jp@metrohm.jp



### SpectroElectrochemiluminescence instrument for Screen-Printed Electrodes

SpectroECL combines in one equipment a biopotentiostat/galvanostat and a microspectrometer integrated in an innovative cell for Screen-Printed Electrodes. This miniaturized and portable alternative is perfect for performing Electrogenenerated ChemiLuminescence (ECL) measurements



電気化学発光測定を行うためのスクリーンプリント電極用セル。この ABS セルには、スペクトル応答範囲 340 ~ 1100 nm、ピーク感度波長 960 nm のプリアンプ付きシリコンフォトダイオードが含まれています。

このセルは、 $\mu$ Stat ECL または  $\mu$ Stat SpectroECL 電気化学発光装置と組み合わせて使用する必要があります。



### i- $\mu$ Stat Cable Connector for Screen-Printed Electrodes

Connector that act as an interface between our Screen-Printed Electrodes and Metrohm DropSens potentiostats.