

Application Note AN-EC-039

两种发光体同步发射的光谱电化学发光研究

对鲁米诺与荧光素构成的共振能量转移(RET)体系的电化学发光(ECL)监测

电生成化学发光,简称电化学发光(ECL),是指由电极表面电子转移反应产生的激发态所引发的光发射现象。该技术具备诸多优势,例如通用性强、灵敏度优异、设备紧凑便携。此外,ECL 可对反应实现精准的时间与空间控制 [1,2]。

本应用报告阐述了溶液中存在一种以上发光体时的 ECL 响应特性。

仪器与软件

ECL 实验采用 SpectroECL 仪器进行,该仪器可配备微型光谱仪检测池(图 1)或光电二极管检测池(ECLPHOTODIODCELL)作为检测器。
本 ECL 实验采用碳丝网印刷电极(SPEs, 110)。
SpectroECL 由 DropView SPELEC 软件控制,该软件可同步采集电化学信号与发光信号。此外,软件还包含数据处理与分析工具。表 1 列出了本研究使用的全部硬件与软件。



图1. SpectroECL 仪器与微型光谱仪检测池

表 1 硬件与软件设备清单

设备	货号
仪器	SPECTROECL
检测池	ECLPHOTODIODCELL
金丝网印刷电极	110
丝网印刷电极连接线	CAST
软件	DropView SPELEC

鲁米诺发光体的电化学发光（ECL）

在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 8)中,于 0.05 mol/L 过氧化氢存在下,采用线性扫描伏安法对 0.002 mol/L 鲁米诺进行电化学激发,扫描电位范围为 0.00 V 至 + 1.00 V,扫描速率为 0.05 V/s。

集成于 ECL 光电二极管检测池中的光电二极管检测器可记录总 ECL 信号,但不具备波长分辨能力。
该检测器灵敏度极高,可实现对所研究发光体极低浓度的检测。

如图 2 所示,线性扫描伏安图(蓝线)在 0.30 V 处出现氧化峰,对应鲁米诺在过氧化氢存在下的电化学氧化过程。该过程同时产生 425 nm 波长的光发射,由光电二极管以总光发射形式记录(绿线)。ECL 峰与电化学峰在 0.30 V 处完全重合。

在过氧化氢存在下,鲁米诺的 ECL 信号呈现其特征行为:发射强度随鲁米诺的氧化过程而升高 [3,4]。

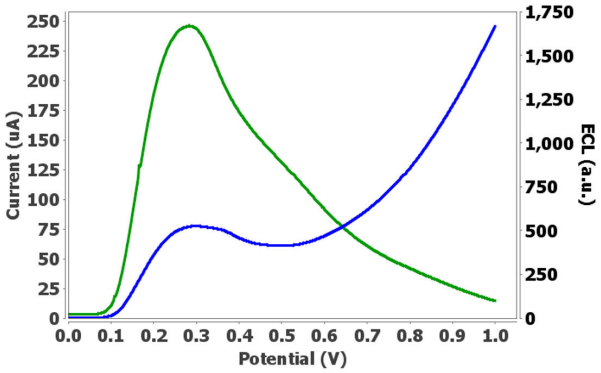


图2. 采用 ECLPHOTODIODCELL 检测池，在 PBS 溶液中 0.002 mol/L 鲁米诺与 0.05 mol/L 过氧化氢体系的线性伏安图（蓝线）与 ECL 信号（绿线）

改用微型光谱仪检测池重复实验时,电化学响应与图 2 中的结果一致(蓝线),但光学响应存在差异,这是因为微型光谱仪具备波长分辨能力。所记录的光谱显示在 425 nm 处存在单一发射带,如图 3a 所示。

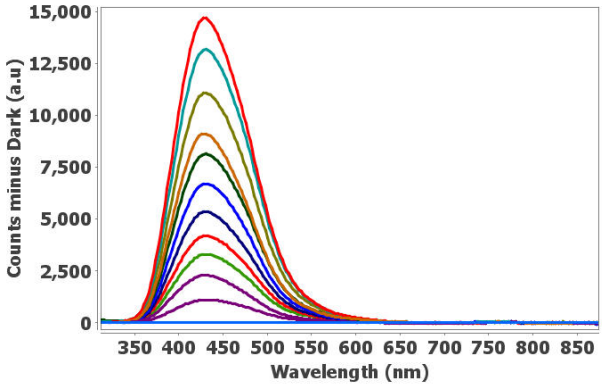


图 3a. 采用微型光谱仪检测池，在 PBS 溶液中 0.002 mol/L 鲁米诺与 0.05 mol/L 过氧化氢体系的 ECL 信号

利用 DropView SPELEC 软件中的「Spectra vs EC」工具,可获取 425 nm 处发射强度随电位的变化规律。如图 3b 所示,ECL 行为与光电二极管检测器测得的 ECL 响应(图 2 绿线)完全一致。当鲁米诺在 0.30 V 处的氧化峰被电化学观测到时,ECL 发射达到最大值。

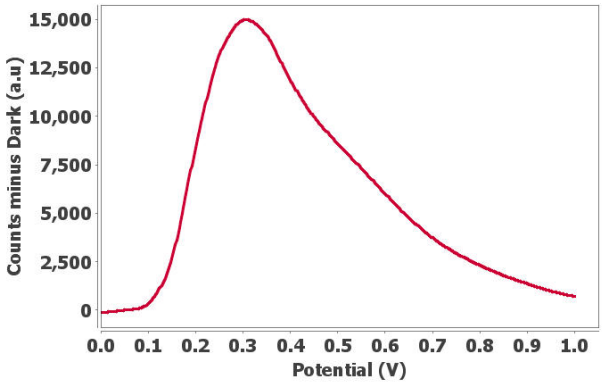


图 3b. 鲁米诺在 425 nm 处的发射强度随电位的变化曲线

鲁米诺与荧光素发光体的电化学发光（ECL）

本研究针对由发光体鲁米诺(供体)与荧光素(受体)构成的共振能量转移(RET)体系展开研究 [5]。根据 RET 作用机制,鲁米诺在过氧化氢存在下发生电化学氧化时会产生发光现象。该发射光的一部分可作为荧光素的激发光源,使荧光素在不同波长下重新发射光。

采用 ECLPHOTODIODCELL 检测池对该体系进行分析,得到如图 4 所示的电化学响应(蓝线)与 ECL 响应(绿线)。由于仅鲁米诺发生电化学氧化,伏安图与不含荧光素时的结果(图 2)完全一致。光电二极管检测器记录到,鲁米诺在 0.30 V 氧化过程中总 ECL 强度升高。然而,由于光电二极管无法记录发射光谱,因此无法区分鲁米诺与荧光素各自的贡献。

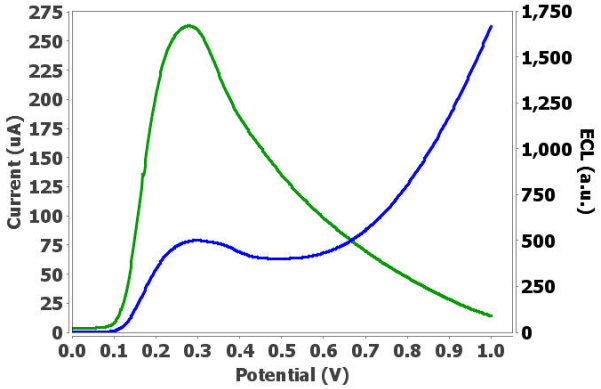


图4. 采用 ECLPHOTODIODCELL 检测池，在 PBS 溶液中 0.002 mol/L 鲁米诺、0.0001 mol/L 荧光素与 0.05 mol/L 过氧化氢体系的线性伏安图（蓝线）与 ECL 信号（绿线）

改用微型光谱仪检测池重复实验时,电化学行为与图 4 中的结果一致(蓝线),但 ECL 信号呈现两个发射带。图 5a 为线性扫描伏安法过程中记录的光谱:425 nm 处的发射带对应鲁米诺的发光,而 530 nm 处的发射带则与荧光素的发光相关。这一结果证实了鲁米诺向荧光素的 RET 过程,并证明了微型光谱仪可区分不同发光体的发射信号。

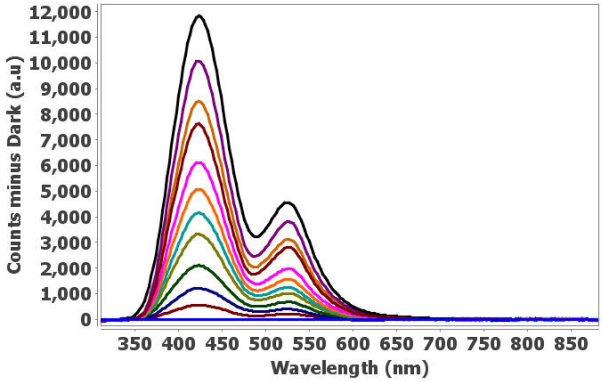


图 5a. 采用微型光谱仪检测池，在 PBS 溶液中 0.002 mol/L 鲁米诺、0.0001 mol/L 荧光素与 0.05 mol/L 过氧化氢体系的 ECL 信号

利用 DropView SPELEC 软件中的「Spectra vs EC」工具,对发射强度随电位的变化规律进行分析。如图 5b 所示,鲁米诺与荧光素的发射强度均在鲁米诺氧化过程中升高,并于 0.30 V 处达到最大值。光谱电化学发光响应还可用于评估各发光体的贡献,结果显示鲁米诺的发射强度高于荧光素信号。

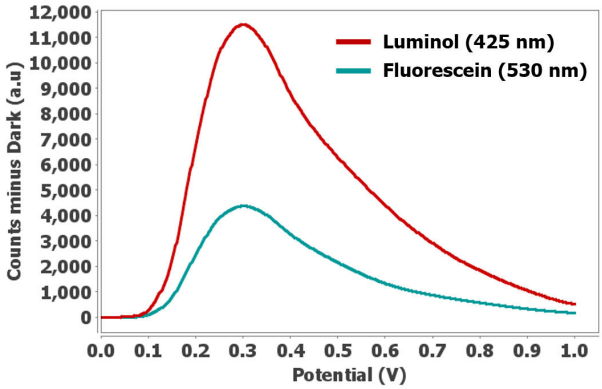


图 5b. 鲁米诺在 425 nm 处的发射强度随电位的变化曲线（含荧光素 530 nm 发射对比）

结论

本研究采用 SpectroECL 仪器搭配两种不同检测器,分别对以鲁米诺为发光体、过氧化氢为共反应剂的 ECL 体系,以及基于鲁米诺、荧光素两种发光体、过氧化氢为共反应剂的 RET ECL 体系进行了研究。

光电二极管检测器不具备波长分辨能力,仅记录每个电化学节点的总发光强度。光电二极管检测池适用于极低浓度发光体的检测,以及仅含单一标记物的研究场景。

相比之下,微型光谱仪检测器可提供波长分辨能力,支持光谱电化学发光实验,能够在采集电化学信号的同时同步记录可见光谱。该检测池适用于多分析物体系、新型发光体开发以及材料性能表征。

参考资料

1. Richter, M. M. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3003–3036. https://doi.org/10.1021/cr020373d.
2. Hu, L.; Xu, G. Applications and Trends in Electrochemiluminescence. *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. Disposable Electrochemiluminescent Biosensor for Lactate Determination in Saliva. *Analyst* **2009**, *134*, 1423–1432. https://doi.org/10.1039/b821922b.
4. Yildiz, G.; Tasdoven, U.; Menek, N. Electrochemical Characterization of Luminol and Its Determination in Real Samples. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 7809–7813. https://doi.org/10.1039/C4AY01281J.
5. Neves, M. M. P. S.; Bobes-Limenes, P.; Pérez-Junquera, A. et al. Miniaturized Analytical Instrumentation for Electrochemiluminescence Assays: A Spectrometer and a Photodiode-Based Device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408*, 7121–7127. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9669-7.

CONTACT

Metrohm Taiwan Ltd.
開封街二段 46 號 5 樓
108 台北市
info@metrohm.com.tw



SpectroECL 将一个双恒电位仪/恒电流仪和一个微型光谱仪集成在一个用于丝网印刷电极的创新电池中。这种小型化的便携式仪器非常适合进行电致化学发光(ECL)测量。



用于丝网印刷电极的检测池,可执行电化学发光测量。该 ABS 检测池包含一个带前置放大器的硅光电二极管,其光谱响应范围为 340 - 1100 nm,峰值灵敏度波长为 960 nm。
该检测池应与 µStat ECL 或 µStat SpectroECL 电化学发光仪器配合使用。



i-µStat
连接器将作为我们丝网印刷电极和瑞士万通 DropSens 恒电位仪间的接口。