



Application Note AN-EC-039

Studio spettro-elettrochemiluminescente dell'emissione simultanea da due luminofori

Monitoraggio ECL del sistema di trasferimento di energia per risonanza (RET) formato da luminolo e fluoresceina

La chemiluminescenza elettrogenerata, o elettrochemiluminescenza (ECL), è l'emissione di luce derivante da stati eccitati generati da reazioni di trasferimento di elettroni sulla superficie dell'elettrodo.

Questa tecnica offre vantaggi quali elevata versatilità,

eccellente sensibilità e un dispositivo compatto e portatile. Inoltre, l'ECL consente un controllo temporale e spaziale preciso della reazione [1,2].

Questa Application Note descrive la risposta ECL quando in una soluzione è presente più di un luminoforo.

STRUMENTAZIONE E SOFTWARE

Gli esperimenti ECL vengono eseguiti utilizzando lo strumento SpectroECL dotato di una cella microspectrometrica (**Figura 1**) o di una cella a fotodiiodo (ECLPHOTODIODECELL) come rivelatore.

Per eseguire gli esperimenti ECL vengono utilizzati elettrodi serigrafati al carbonio (SPE, 110).

Lo spettrofotometro SpectroECL è controllato dal software DropView SPELEC, che consente la raccolta simultanea del segnale elettrochimico e del segnale luminoso emesso. Inoltre, il software include strumenti per l'elaborazione e l'analisi dei dati. La **Tabella 1** elenca tutto l'hardware e il software utilizzati per questo studio.



Figure 1. Lo strumento SpectroECL e la cella del microspectrometro.

Tabella 1. Panoramica delle apparecchiature hardware e software.

Strumenti	Codice articolo
Instrument	SPECTROECL
Cell	ECLPHOTODIODECELL
Gold SPE	110
Connection cable for SPEs	CAST
Software	DropView SPELEC

ECL DEL LUMINOFORO LUMINOLO

L'eccitazione elettrochimica di luminolo 0,002 mol/L in presenza di perossido di idrogeno 0,05 mol/L in tampone PBS 0,1 mol/L (pH 8) viene effettuata utilizzando la voltammetria a scansione lineare, con scansione da 0,00 V a +1,00 V a 0,05 V/s.

Il fotorivelatore integrato nell'ECLPHOTODIODECELL

registra il segnale ECL totale, ma non fornisce risoluzione in lunghezza d'onda.

Questo rivelatore è estremamente sensibile e permette di individuare concentrazioni molto basse della sostanza luminescente in esame.

Come si può osservare nella **Figura 2**, il voltammogramma a scansione lineare (linea blu) mostra un picco di ossidazione a 0,30 V, corrispondente all'ossidazione elettrochimica del luminolo in presenza di perossido di idrogeno. Genera inoltre un'emissione di luce a 425 nm, che viene registrata dal fotodiode come emissione luminosa totale (linea verde). I picchi ECL ed elettrochimici coincidono esattamente a 0,30 V.

Il segnale ECL del luminolo in presenza di perossido di idrogeno mostra il suo comportamento caratteristico con l'intensità di emissione che aumenta durante l'ossidazione del luminolo [3,4].

Ripetendo l'esperimento con il microspectrometro come rivelatore si osserva la stessa risposta elettrochimica (linea blu, **Figura 2**), ma la risposta ottica è diversa poiché il microspectrometro distingue tra le lunghezze d'onda. Lo spettro registrato mostra un'unica banda di emissione a 425 nm, come si può vedere nella **Figura 3a**.

L'evoluzione dell'emissione a 425 nm in funzione del potenziale può essere ottenuta utilizzando lo strumento «Spectra vs EC» in DropView SPELEC. Come si può osservare nella **Figura 3b**, il comportamento ECL corrisponde esattamente alla risposta ECL ottenuta dal rivelatore a fotodiode (linea verde **Figura 2**). L'emissione ECL raggiunge un massimo quando si osserva elettrochimicamente il picco di ossidazione del luminolo a 0,30 V.

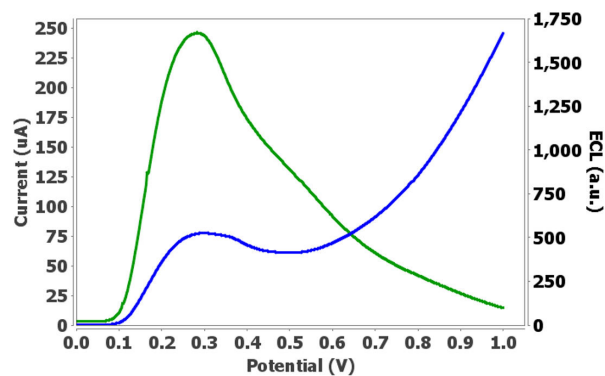


Figure 2. Voltammetria lineare (linea blu) e segnale ECL (linea verde) per luminolo 0,002 mol/L e perossido di idrogeno 0,05 mol/L in soluzione PBS utilizzando ECLPHOTODIODE CELL.

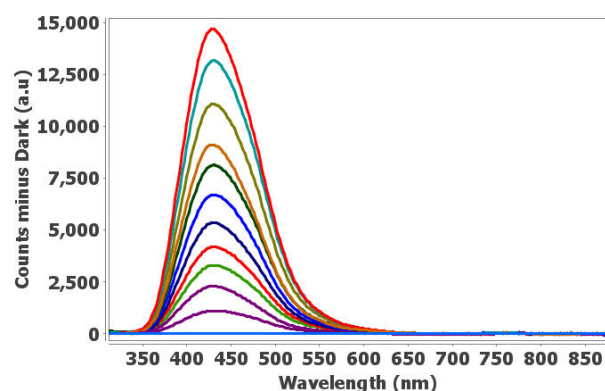


Figure 3a. Segnale ECL per luminolo 0,002 mol/L e perossido di idrogeno 0,05 mol/L in soluzione PBS utilizzando la cella del microspectrometro.

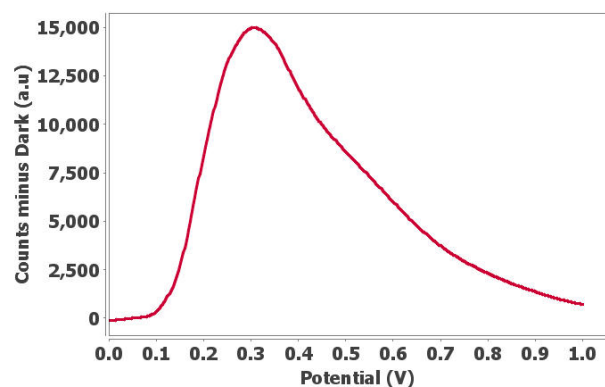


Figure 3b. Evoluzione dell'emissione del luminolo a 425 nm in funzione del potenziale.

ECL DEI LUMINOFORI DI LUMINOLO E FLUORESCINA

Viene studiato il sistema di trasferimento di energia per risonanza (RET) formato dai luminofori luminolo (donatore) e fluoresceina (accettore) [5]. Secondo il meccanismo RET, il luminolo genera luminescenza in seguito alla sua ossidazione elettrochimica in

L'analisi di questo sistema mediante la cella fotoelettrochimica a diodo (ECLPHOTODIODECELL) fornisce le risposte elettrochimiche (linea blu) ed elettroluminescenti (ECL) (linea verde) mostrate in **Figura 4**. Poiché solo il luminolo subisce ossidazione elettrochimica, il voltammogramma è identico a quello senza fluoresceina (**Figura 2**). Il rivelatore a fotodiodo registra un aumento dell'intensità ECL totale durante l'ossidazione del luminolo a 0,30 V. Tuttavia, poiché il fotodiodo non registra gli spettri di emissione, non può distinguere i contributi del luminolo e della fluoresceina.

Quando l'esperimento viene ripetuto utilizzando la cella del microspectrometro, il comportamento elettrochimico rimane lo stesso (linea blu **Figura 4**), ma l'ECL mostra due bande di emissione. La **Figura 5a** mostra gli spettri registrati durante la voltammetria a scansione lineare. La banda a 425 nm corrisponde all'emissione del luminolo, mentre la banda a 530 nm è associata all'emissione della fluoresceina. Ciò conferma il trasferimento di energia per risonanza (RET) dal luminolo alla fluoresceina e dimostra la capacità del microspectrometro di differenziare le emissioni provenienti da diversi luminofori.

presenza di perossido di idrogeno. Parte di questa luce emessa funge da sorgente di eccitazione per la fluoresceina, che riemette luce a una diversa lunghezza d'onda.

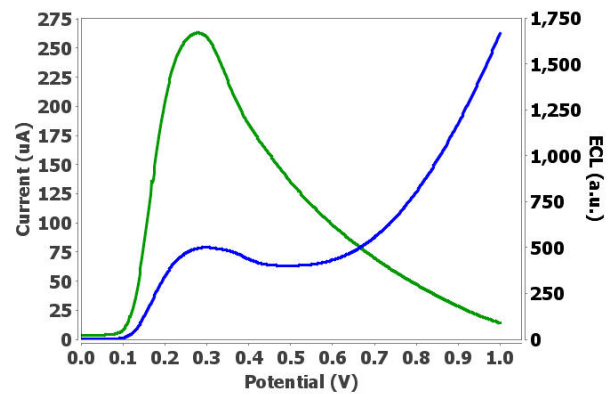


Figure 4. Voltammetria lineare (linea blu) e segnale ECL (linea verde) per luminolo 0,002 mol/L, fluoresceina 0,0001 mol/L e perossido di idrogeno 0,05 mol/L in soluzione PBS utilizzando ECLPHOTODIODECELL.

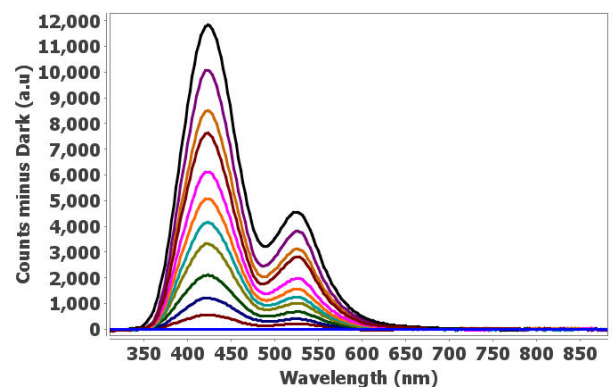


Figure 5a. Segnale ECL per luminolo 0,002 mol/L, fluoresceina 0,0001 mol/L e perossido di idrogeno 0,05 mol/L in soluzione PBS utilizzando la cella del microspectrometro.

L'evoluzione delle emissioni in funzione del potenziale viene analizzata utilizzando lo strumento «Spectra vs EC» di DropView SPELEC. Come si può osservare nella **Figura 5b**, le emissioni sia del luminolo che della fluoresceina aumentano durante l'ossidazione del luminolo e raggiungono il loro massimo a 0,30 V. La risposta spettro-elettrochemiluminescente consente inoltre di valutare il contributo di ciascun luminoforo, mostrando che l'emissione del luminolo è superiore al segnale della fluoresceina.

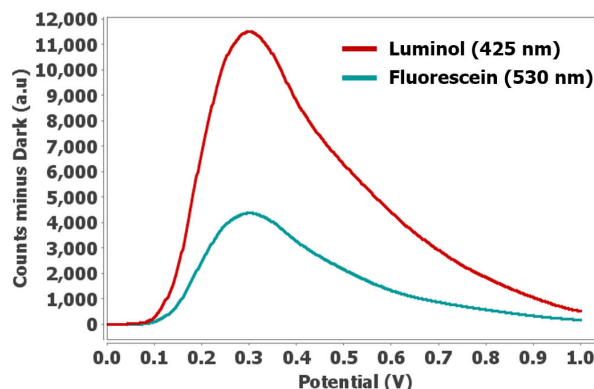


Figure 5b. Evoluzione dell'emissione del luminolo a 425 nm in funzione del potenziale.

CONCLUSIONE

Il sistema ECL formato da luminolo come luminoforo e perossido di idrogeno come co-reagente, così come il sistema RET ECL basato su due luminofori, luminolo e fluoresceina, e perossido di idrogeno come co-reagente, sono stati studiati utilizzando lo SpectroECL con due diversi rivelatori.

Il rivelatore a fotodiodo non discrimina tra le lunghezze d'onda e registra l'intensità totale della luminescenza per ogni punto elettrochimico. La cella a fotodiodo è molto utile per rilevare concentrazioni

molto basse del luminoforo in esame e per la ricerca con una sola specie marcatrice.

D'altro canto, il rivelatore del microspettrometro offre una risoluzione in lunghezza d'onda e consente l'esecuzione di esperimenti di spettro-elettrochemiluminescenza, poiché gli spettri visibili vengono registrati simultaneamente al segnale elettrochimico. Questa cella è utile per sistemi multi-analita, lo sviluppo di nuovi luminofori e la caratterizzazione delle proprietà dei materiali.

RIFERIMENTI

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 Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it



Strumento per elettroluminescenza per gli elettrodi stampati

SpectroECL combina in una sola attrezzatura un bipotenziostrato/galvanostato e un microspettrometro integrati in una cella innovativa per elettrodi stampati. Quest'alternativa portatile e in miniatura è perfetta per effettuare misure mediante chemiluminescenza elettrogenata (ECL)



Cella con fotodiodo per misure dell'elettrochemiluminescenza

Cella per elettrodi a membrana per eseguire misure dell'elettrochemiluminescenza. Questa cella ABS include un fotodiodo al silicio con preamplificatore con un intervallo di risposta spettrale compreso tra 340 e 1100 nm e una lunghezza d'onda di sensibilità di picco di 960nm.

Questa cella dovrebbe essere usata in combinazione con strumenti di elettrochemiluminescenza μ Stat ECL o μ Stat SpectroECL.



Connettore per cavi i- μ Stat per elettrodi a membrana

Connettore che funge da interfaccia tra i nostri elettrodi a membrana e i potenziostati DropSens Metrohm.



Software DropView SPELEC

DropView SPELEC è un software spettroelettrochimico che controlla strumenti SPELEC, offrendo una perfetta sincronizzazione delle misure ottiche ed elettrochimiche, nonché strumenti avanzati per il trattamento dei dati.