

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /石墨複合電極對胺基酸進行電化學冷光偵測

計畫編號：NSC89-2113-M-041-008-

執行期間：89年8月1日至90年7月31

計畫主持人：唐自強 嘉南藥理科技大學 藥學系

一 中文摘要

本計劃目的在於研究將可產生電化學冷光 (electrochemiluminescence, ECL) 之分子固定在固態複合電極內，以製成可拋磨、可重複使用、無須在溶液中添加放光離子之電化學冷光偵測裝置。

在研究中發現使用 sol-gel 或者是環氧樹脂作為複合電極聚合材料，與石墨粉及可產生 ECL 之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 離子混合填充於塊狀 Teflon 之孔洞內，經固化後所製成之電化學冷光複合電極，於磷酸鹽緩衝溶液中以循環伏安法測定，於約 +1.5V (銀/氯化銀參考電極) 處產生氧化/還原波峰電流。將此電化學冷光複合電極裝置於流動注入分析系統中結合光電倍增管偵測裝置並以 TPA 或 oxalic acid 注入可觀測到電化學冷光之產生而電極經拋磨後仍具有電化學冷光放光活性

本實驗成功證明可拋磨式電化學冷光複合電極製作之可行性，可供其他學者作為電化學冷光測定研究之另一項選擇。

Abstract

Keywords: Electrochemiluminescence, Composite electrode, Amino acids

An electrochemiluminescent composite

electrode has been developed successfully in this work. While using sol-gel or epoxy resin as solidification material, graphite powder and $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ are immobilized in Teflon block and act as an ECL working electrode.

When connecting with flow injection analysis system, an ECL reaction is observed which +1.5V (vs. Ag/AgCl reference electrode) is applied to ECL working electrode and with solutions of TPA or oxalic acid injected into it.

This composite working electrode maintains its ECL activity after polishing, which indicates that a polishable, easy handled, solid-state ECL electrode can be obtained by this work.

二 計劃緣由與目的

電化學冷光

(electrochemiluminescence, ECL) 為利用施加氧化電位方式，使溶液中具有 luminophores 的物種在工作電極表面氧化而：1) 產生激發態氧化物，然後以放光方

式釋出能量而回到基態，如具相鄰醇基之化合物、luminol^(3,4,5)；或者：2) 其氧化物經由與其它還原劑作用而成為激發態還原物，然後以放光方式釋出能量而回到基態，如 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ^(6,7,8)。化學冷光法需要額外加入氧化(還原)劑與放光試劑反應，而電化學冷光法則直接以電位施加方式將放光試劑(分析物或其衍生物)氧化成激發態氧化物而放光，或者是直接以分析物作為還原劑將放光試劑還原而放光。在電化學冷光法中以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的應用及研究最為普遍⁽⁹⁻¹⁵⁾，當應用於 HPLC 或 CE 分離系統作為偵測器時，以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 試劑添加於動相中^(9-11,15)，或在分離管柱後端與流出物混合後，再作電化學冷光偵測^(12,13,14)為主要方法。因此比化學冷光法雖然少了氧化試劑的加入，然而仍遭遇到所添加 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 試劑對滯留時間及滯留次序^(9-11,15)，或者是偵測極限⁽¹²⁻¹⁴⁾的影響。

近年有學者⁽¹⁶⁾嘗試將 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 以化學衍生方式固定於聚合物(chitosan)上，然後塗覆於電極表面，在溶液中施加適當氧化電位將電極表面 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 氧化成 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，而當氧化電位較低之分析物(如 oxalic acid)加入溶液中時， $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 便被還原成激發態之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，經放光而回到基態，可作為靈敏的電化學冷光偵測裝置。以化學衍生方式固定於電極表面之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 進行電化學冷光偵測，可減少因流出物與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 試劑混合而產生之稀釋效應，以及放光試劑的消耗，並簡化藥品配製及溶液混合比例之控制。這種方法雖然具有良好的靈敏度及低偵測極限，但是聚合物之衍生步驟仍然繁瑣、費時。

Nieman⁽¹⁷⁾曾嘗試利用具有陰離

子官能基之 Nafion 薄膜，塗覆於工作電極上，待其乾燥後浸入 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液中做循環伏安掃描，以吸附 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 於 nafion 薄膜中，作為 FIA 之電化學冷光偵測器，偵測含胺基之物種。對於 oxalate、alkylamines 及 NADH 偵測，可得良好之結果(偵測極限分別為 1 μM ，10nM，1 μM)。

然而 Nieman 之偵測器穩定性不理想，須於每次使用前重新製作以得最佳靈敏度；且當去除施加電位超過 1 天時，則因 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 由 Nafion 薄膜內移出，使得偵測器靈敏度嚴重下降。

三 結果與討論

本計劃目標為製作固態可拋磨之電化學冷光發光電極，因此嘗試使用兩種聚合材料(Epoxy、sol-gel)作為固化劑，將可導電之石墨粉及可產生電化學冷光之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 錯合物，填充固定於 Teflon 塊狀之凹洞中，製成流動式 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /石墨工作電極電解槽(flow cell)，並以銅導線連接定電位儀(Potentiostat)，而以石英片作為放光之窗口。參考電極(Reference Electrode)與輔助電極(Counter Electrode)則接於工作電極溶液出口處。

首先將此 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /石墨電極在燒杯中進行循環伏安法測試，以驗證 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /石墨電極之導電性，以及電極內 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 離子在此石墨/聚合材料複合體內是否仍可藉由石墨粉傳遞電子，以進行氧化還原反應，並進而與溶液中之物種(如 TPA)進行電子交換而產生電化學冷光。

經比較加入/未加入 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 離子複合電極之循環伏安圖得知：二者在約1.5伏特附近(參考電極為銀/氯化銀電極)有差異，而所加入之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 離子數量越多則差異越加明顯；然而所加入之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 離子數量過多，則將導致固化劑無法完全固結(sol-gel)或產生 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶解、洩漏現象(Epoxy)。

當測試溶液中加入TPA等可與 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 進行電化學冷光反應之試劑時，循環伏安圖中之氧化電流值產生增加現象，由此推論溶液中之TPA確實可以與複合電極中之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 離子進行電子傳遞。

因此，將上述之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /石墨電極安裝於流動注入分析系統中，並將此系統裝置於有光電倍增管之暗箱中，進行電化學冷光測定，並以TPA注入測定，發現此複合電極分析系統確實可產生電化學冷光，且隨TPA濃度升高而發光強度增強。由定電位儀之電流值增加現象也可觀測驗證。

將此複合電極拆解、拋磨後，再將其重新安裝測試，仍可偵測到電化學冷光之發生，證明本構想：製作可拋磨式電化學冷光電極之可行性。

然而本系統中所使用之石墨粉，因在複合電極表面易被分析物(TPA)之氧化產物吸附，阻礙電化學冷光反應進行，導致電化學放光效率逐漸下降。此外與文獻⁽¹⁷⁾記載，將 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 離子與固定於白金電極上之Nafion結合，在批次溶液(batch type solution)中，進行電化學冷光測定相比較，則本複合電極放光效率偏低，導致偵測極限值高於前述文獻所記載方法之

值。

根據有關工作電極表面處理法之文獻記載，工作電極表面吸附問題，可藉由電極活化(activation)法或者加入適當介面活性劑、調整溶液之極性等，以減少吸附效應，延長複合電極連續使用時間。

而放光效率偏低則與複合電極所能加入之 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 離子量受限外，與使用之石墨粉也有關係。因為石墨為黑色，易吸收部分電化學冷光反應所放出之光，而使用白金電極作為 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /sol-gel塗覆表面時，則具有反射作用，可使產生之電化學冷光聚集，進而增加光電倍增管所測得之光強度。因此，若能以惰性金屬粉末(如金、白金等)取代石墨粉作為導電性材料，應可使本複合電化學冷光電極所放之冷光更加集中，提高光電倍增管偵測到之光強度，進而降低偵測極限。

四 計劃成果自評

本研究計劃證明製作可拋磨式電化學冷光偵測電極之可行性，可避免因溶液中需添加放光離子($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)所導致試劑之大量消耗、溶液添加放光試劑導致組成變化等因素，若能再對電極表面吸附，以及放光效率、冷光聚集等問題作進一步探討及改進，必能更加充分發揮此電化學冷光複合電極之特性。

五 參考文獻

1. Bobbitt, D.R.; Jackson, W.A.; Hendrickson, H. P. *Talanta*, 1998, ??,??;
2. Forbes, G. A.; Nieman, T. A.; Sweedler, J.

- V. *Anal. Chim. Acta*, 1997, 347, 289.
3. Karatani, H. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 1994, 79, 71.
 4. Kremeskotter, J.; Wilson, R.; Schiffrin, D. J.; Luff, B. J.; Wilkinson, J. S. *Meas. Sci. Technol.* 1995, 6, 1325.
 5. Egashira, N.; Nabeyama, Y.; Kurauchi, Y.; Ohga, K. *Anal. Sci.* 1996, 12, 793.
 6. Rubinstein, I.; Martin, C. R.; Bard, A. J. *Anal. Chem.* 1983, 55, 1580.
 7. Xu, X. H.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 2627.
 8. Deaver, D. R. *Nature* 1995, 377, 758.
 9. Greenway, G. M.; Knight, A. W.; Knight, P. J. *Analyst*, 1995, 120, 2549.
 10. Brune, S. N.; Bobbit, D. R. *Anal. Chem.* 1992, 64, 166.
 11. Skotty, D. R.; Lee, W. Y.; Nieman, T. A. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1530.
 12. Chen, X.; Jia, L.; Wang, X.; Hu, G. *Anal. Sci.* 1997, 13, 71.
 13. Saito, K.; Murakami, S.; Yamazaki, S.; Muromatsu, A.; Hirano, S.; Takahashi, T.; Yokota, K.; Nojiri, T. *Anal. Chim. Acta* 1999, 378, 43.
 14. Wang, X.; Bobbitt, D. R. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 383, 213.
 15. Michel, P. E.; Fiaccabrino, G. C.; de Rooij, N. F.; Koudelka-Hep, M. *Anal. Chim. Acta* 1999, 392, 95.
 16. Zhao, C. Z.; Egashira, N.; Kurauchi, Y.; Ohga, K. *Anal. Sci.* 1997, 13, 33.
 17. Downey, T. M.; Nieman, T. A. *Anal. Chem.* 1992, 64, 261.
 18. Delcerro, M. A.; Cayuela, G.; Reviejo, A. J.; Pingarron, J. M.; Wang, J. *Electroanal.* 1997, 9, 1113.
 19. Gun, J.; Lev, O. *Anal. Chim. Acta* 1996, 336, 95.
 20. Onnerfjord, P.; Emneus, J.; Markovarga, G.; Gorton, L.; Ortega, F.; Dominguez, E. *Biosens. Bioelectron.* 1995, 10, 607.
 21. Alberutus, F.; Llerena, A.; Alpizar, J.; Cerda, V.; Luque, M.; Rios, A.; Valcarcel, M. *Anal. Chim. Acta* 1997, 355, 23.
 22. Cataldi, T. R. I.; Centonze, D.; Casella, I. G.; Desimoni, E. *J. Chromatogr. A* 1997, 773, 115.