บทความปริทัศน์

การประยุกต์ปรากฏการณ์ electrogenerated chemiluminescence (ECL) ของ $Ru(bpy)_3^{2+}$ ในเชิงเคมีวิเคราะห์

พงศธร อมรพิทักษ์สุข

การเปล่งแสง (Emission) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดกับโมเลกุลพิเศษบางประเภทเท่านั้นและสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประเภทดังกล่าวได้ (Skoog, 1995) เทคนิคการหาปริมาณสารโดยอาศัยปรากฏการณ์การเปล่งแสงได้แก่ การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence), ฟอสฟอเรสเซนซ์ (phosphorescence) และ เคมิลูมิเนสเซนซ์ (chemiluminescence)

ปรากฏการณ์อิเล็กโทรเจเนอเรเตต เคมิลูมิเนสเซนซ์ (electrogenerated chemiluminescence, ECL) หรือที่รู้จักในอีกชื่อหนึ่งว่า อิเล็กโทรเคมิลูมิเนสเซนซ์ (electro-chemiluminescence) (Bard, 1980) เป็นปรากฏการณ์เปล่งแสงอันเนื่องจากการลดระดับพลังงานของโมเลกุลในสถานะกระตุ้นที่เกิดจากการประลัยกัน (annihilation) ของสารต้นตอ (precursors) ที่เกิดมาจากการกระบวนการอิเล็กโตรไลซิสที่ขั้วไฟฟ้า ดังสมการ

$A + e^- \rightarrow A^-$	electro-reduction
$D \rightarrow D^+ + e^-$	electro-oxidation
$A^- + D^+ \rightarrow A + D^*$ หรือ	
$A^* + D$	electron-transfer
$D^* \rightarrow D + h\nu$ หรือ	
$A^* \rightarrow A + h\nu$	chemiluminescence

โดยที่ A^- และ D^+ เป็นสารต้นตอที่เป็นตัวรีดิวซ์และตัวออกซิไดซ์ที่แรงตามลำดับ สารที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้

วท.ม. (เคมีวิเคราะห์และเคมีอนินทรีย์ประยุกต์) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
Corresponding e-mail : ampongsa@ratree.psu.ac.th
รับต้นฉบับ 26 มิถุนายน 2545 รับลงพิมพ์ 1 ตุลาคม 2545

แสง (donor) อาจเป็นได้ทั้ง A หรือ D ก็ได้

จุดเริ่มต้นของการศึกษาปฏิกิริยา ECL สืบเนื่องมาจากการค้นพบการเปล่งแสงจากกระบวนการอิเล็กโตรไลซิสของสารละลาย Grignard ในอีเธอร์ที่ไร้น้ำ (anhydrous ether) ที่ขั้วไฟฟ้าแอโนดหรือแคโทดเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 500-1500 V โดย Dufford *et al*. (Greenway, 1994) ต่อมาใน ค.ศ. 1929 Harvey (Greenway, 1994) พบว่า ลูมินอล (luminol) สามารถเกิดปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนซ์ โดยกระบวนการอิเล็กโตรไลซิสในสารละลายอัลคาไลด์ที่ขั้วไฟฟ้าแอโนดได้ ถึงแม้ว่าหลังจากนั้นได้มีการศึกษาปฏิกิริยาดังกล่าวเรื่อยมา แต่ไม่ได้มีการศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยาอย่างชัดเจน จนกระทั่งถึง ค.ศ. 1964 ได้มีผู้คนให้ความสนใจศึกษากลไกของการเกิดปฏิกิริยา ECL มากขึ้น เป็นผลพวงมาจากในช่วงศตวรรษที่ 16 ได้มีนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจศึกษาพฤติกรรมและปฏิกิริยาระหว่างโพลีอะโรแมตริกไฮโดรคาร์บอน (polyaromatic hydrocarbon) กับ โลหะรูทีเนียม (Ru) อย่างแพร่หลาย และ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ เป็นสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยา ECL ได้ดี ทำให้นักวิจัยที่สนใจในปฏิกิริยา ECL มีความพยายามที่จะเข้าใจถึงกลไกของการเกิดปฏิกิริยา ECL มากขึ้น (Greenway, 1994)

ต่อมาพบว่าสามารถนำปรากฏการณ์ดังกล่าวมาเป็นหลักการพื้นฐานสำหรับพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทางเคมีได้และได้รับความสนใจเป็นอย่างมากใน ช่วง 20 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค ECL สามารถวิเคราะห์สารได้ในระดับต่ำและให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง ให้สภาพไวของการวิเคราะห์สูงโดยอาศัยเครื่องมือราคาไม่แพง และยังสามารถเพิ่มสภาพไวของการวิเคราะห์โดยการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้า วัสดุ ขนาด และตำแหน่งของขั้วไฟฟ้าได้ โดยตัวที่ทำหน้าที่ให้แสงมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ขึ้นกับความเหมาะสมและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น ลูมินอลและสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทรานซิชันบางชนิด เป็นต้น สารประกอบเชิงซ้อนที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้แสงที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ *tris*-(2,2′-bipyridine) ruthenium(II) ion หรือ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ อันเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเกิดโมเลกุลในสถานะกระตุ้น $*[Ru(bpy)_3]^{2+}$ มีค่าสูง (ϕ_{es} ~ 73.3 %) โมเลกุลที่อยู่ในรูปตัวรีดิวซ์และตัวออกซิไดซ์มีเสถียรภาพมาก ปฏิกิริยาเกิดผ่านกระบวนการที่มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอน 1 ตัว ซึ่งง่ายแก่การควบคุมศักย์ไฟฟ้า นอกจากนี้แล้วสามารถเกิดการเปล่งแสงได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิห้อง (Greenway, 1994; Knight, 1999; Guil-bault, 2001)

โดยที่กลไกของการเกิด $*[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ในระบบของการวิเคราะห์ มี 2 กลไกหลักๆ คือ 1) ตัวให้แสงเกิดจากการชนกันเอง และ 2) ตัวให้แสงชนกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่อยู่ในรูปตัวรีดิวซ์ ดังสมการ

$$[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{3+} + e^-$$
$$[Ru(bpy)_3]^{2+} + A(R) \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{+} + P$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + [Ru(bpy)_3]^{+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + *[Ru(bpy)_3]^{2+}$$
$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

หรือ

$$[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{3+} + e^-$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + A(R) \rightarrow *[Ru(bpy)_3]^{2+} + P$$
$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

โดยที่ A(R) คือ สารที่ต้องการวิเคราะห์ที่อยู่ในรูปตัวรีดิวซ์ และ P เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก A(R) โดยที่ปฏิกิริยาทั้ง 2 แบบให้การเปล่งแสงที่เกิดขึ้นเป็นแบบฟอสฟอเรสเซนซ์มีความยาวคลื่นสูงสุดที่ 620 nm เหมือนกัน (บางบทความรายงาน 610 nm) โดยความเข้มแสงที่วัดได้จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์

ปัจจุบันนี้สามารถใช้เทคนิค ECL ที่มีตัวให้แสงเป็น $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ มาใช้ในการวิเคราะห์สารในกลุ่มต่างๆ (Greenway, 1994; Knight , 1999; Guilbault, 2001) ได้ดังนี้

1. ออกซาเลต (Oxalate, $C_2O_4^{2-}$) และ กรดอินทรีย์ (organic acids) ออกซาเลตจัดเป็นสารตัวแรกที่มีการศึกษาโดยพบว่ากลไกของการเกิดปฏิกิริยา ECL เป็น ดังนี้

$$[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{3+} + e^-$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + C_2O_4^{2-} \rightarrow C_2O_4^{2-}\cdot + [Ru(bpy)_3]^{2+}$$
$$C_2O_4^{2-}\cdot \rightarrow CO_2^{-}\cdot + CO_2$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + CO_2^{-}\cdot \rightarrow *[Ru(bpy)_3]^{2+} + CO_2$$
$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

จากปฏิกิริยาข้างต้นจะเห็นได้ว่าโมเลกุลในสถานะกระตุ้นสามารถเกิดได้โดยตรงจากกระบวนการรีดักชันระหว่าง $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ กับ $CO_2^{-}\cdot$ นอกจากนี้ พบว่าปฏิกิริยา ECL สามารถเกิดผ่านกระบวนการประลัยจากปฏิกิริยารีดักชันของ $Ru(bpy)_3^{2+}$ กับ $CO_2^{-}\cdot$ ได้ดังสมการ

$$[Ru(bpy)_3]^{2+} + CO_2^{-}\cdot \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{+} + CO_2$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + [Ru(bpy)_3]^{+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + *[Ru(bpy)_3]^{2+}$$
$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

แต่ในกรณีของกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น ไพรูเวต (pyruvate) จำเป็นต้องเติม Ce(III) เพื่อไปออกซิไดซ์ไพรูเวตให้เป็นอนุมูลมัธยันตร์ (intermediate radical) ก่อน แล้วจึงเกิดปฏิกิริยากับ $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ ต่อไป ดังสมการ

$$Ce^{3+} \rightarrow Ce^{4+} + e^{-}$$
$$CH_3COCO_2^{-} + Ce^{4+} \rightarrow CH_3COCO_2\cdot + Ce^{3+}$$
$$[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{3+} + e^{-}$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + CH_3COCO_2\cdot + CO_2 + H_2O \rightarrow *[Ru(bpy)_3]^{2+} + CH_3CO_2H + H^{+}$$
$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

นอกจากนี้แล้วยังสามารถวิเคราะห์กรดอินทรีย์ตัวอื่นๆ ได้ เช่น กรดมาโลนิก (malonic acid) และ กรดแลคติก (lactic acid) เป็นต้น

2. แอมีน (Amine) เป็นสารกลุ่มที่มีการนำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิคนี้มากที่สุด โดยที่สารในกลุ่มนี้ได้แก่ แอลิแฟติก (aliphatic) และ ไซคลิกแอมีน (cyclic amine) กรดอะมิโน และ โปรตีน เป็นต้น โดยพบว่าสารในกลุ่มแอมีน ทั้งหมดจะเกิดปฏิกิริยา ECL กับ $[Ru(bpy)_2]^{2+}$ เป็นไปตามกลไกดังนี้

$$[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{3+} + e^{-}$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + R_2\text{-}N\text{-}C\text{-}H_2R' \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + R_2\text{-}N^{+}\cdot\text{-}C\text{-}H_2R'$$
$$R_2\text{-}N^{+}\cdot\text{-}C\text{-}H_2R' \rightarrow R_2\text{-}N\text{-}C\cdot\text{-}HR' + H^{+}$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + R_2\text{-}N\text{-}C\cdot\text{-}HR' + H_2O \rightarrow R_2\text{-}N^{+}=C\text{-}HR' + *[Ru(bpy)_3]^{2+} + H_3O^{+}$$
$$R_2\text{-}N^{+}=C\text{-}HR' \rightarrow R_2\text{-}NH + R'CHO$$
$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

ในทำนองเดียวกันกับปฏิกิริยาของออกซาเลต โมเลกุลในสถานะกระตุ้นสามารถเกิดผ่านกระบวนการประลัยจากปฏิกิริยารีดักชันของ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ กับอนุมูลที่มีความว่องไวสูง ได้ดังสมการ

$$[Ru(bpy)_3]^{2+} + R_2\text{-}N\text{-}C\cdot\text{-}HR' \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{+} + R_2\text{-}N^{+}=C\text{-}HR'$$
$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + [Ru(bpy)_3]^{+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + *[Ru(bpy)_3]^{2+}$$
$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

นอกจากนี้แล้วสารในกลุ่มแอมีนดังกล่าว สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ที่ขั้วไฟฟ้า และสามารถเกิดปฏิกิริยา ECL ได้ดังสมการ

$$R_2\text{-}N\text{-}C\text{-}H_2R' \rightarrow R_2\text{-}N^{+}\cdot\text{-}C\text{-}H_2R' + e^{-}$$
$$R_2\text{-}N^{+}\cdot\text{-}C\text{-}H_2R' \rightarrow R_2\text{-}N\text{-}C^{\bullet}\text{-}HR' + H^{+}$$
$$R_2\text{-}N\text{-}C^{\bullet}\text{-}HR' \rightarrow R_2\text{-}N^{+}=C\text{-}HR' + H^{+}$$

3. สารประกอบอื่นๆ นอกจากสารทั้ง 2 กลุ่มแล้ว ยังพบว่า สารประกอบอื่นๆ สามารถเกิดปฏิกิริยา ECL กับ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ได้ เช่น peroxodisulphate ($S_2O_8^{2-}$) โดยอาศัยกลไก ดังแสดง

$$[Ru(bpy)_3]^{2+} + e^{-} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{+}$$
$$[Ru(bpy)_3]^{+} + S_2O_8^{2-} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + S_2O_8^{3-}$$
$$S_2O_8^{3-} \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{-}\cdot$$
$$[Ru(bpy)_3]^{2+} + SO_4^{-}\cdot \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{3+} + SO_4^{2-}$$

$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + [Ru(bpy)_3]^{+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + *[Ru(bpy)_3]^{2+}$$

$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

ลักษณะของตัวเซลล์ที่ใช้ในการตรวจวัดแสงในเทคนิค ECL ประกอบด้วยองค์ประกอบหลักๆ (Figure 1) ที่สำคัญ 3 ส่วนคือ

1. ขั้วไฟฟ้า 3 ขั้ว ประกอบด้วย

1.1 ขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode, WE) ทำหน้าที่ให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อให้เกิดสารต้นตอที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาด้วยกระบวนการอิเล็กโตรไลซิส โดยทั่วไปขั้วไฟฟ้าทำงานมักมีลักษณะแบนเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาเป็นการเพิ่มความเข้มแสงที่เกิดขึ้น และวางในทิศทางตรงข้ามให้ใกล้กับอุปกรณ์รับแสงเพื่อให้แสงที่เกิดขึ้นถูกตรวจวัดให้ได้มากที่สุด โดยส่วนมากขั้วไฟฟ้าทำงานที่นิยมใช้กันคือ ขั้วไฟฟ้าทอง (Au) ขั้วไฟฟ้าแพลทินัม (Pt) ขั้วไฟฟ้ากล๊าสซีคาร์บอน (glassy carbon electrode) และขั้วไฟฟ้าอินเดียม/ทินออกไซด์ (indium/tin oxide, ITO) เป็นต้น

1.2 ขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode, CE) โดยส่วนมากนิยมใช้ขั้วไฟฟ้าแพลทินัม หรือ ขั้วไฟฟ้ากล๊าสซีคาร์บอน

1.3 ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode, RE) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงที่นิยมใช้งานได้แก่ ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์/ซิลเวอร์คลอไรด์ (Ag/AgCl) นอกจากนี้แล้วเพื่อให้การออกแบบตัวเซลล์เป็นไปได้ง่ายและกะทัดรัด มักนิยมใช้ขั้วไฟฟ้าเสมือนขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Quasi-reference electrode) เช่น ขั้วไฟฟ้าแพลทินัม หรือ ขั้วไฟฟ้าทอง เป็นต้น แต่การใช้งานของขั้วไฟฟ้าเสมือนขั้วไฟฟ้าอ้างอิงจำเป็นต้องมีสารมาตราฐานเพื่อปรับค่าศักย์ไฟฟ้าที่ให้แก่ขั้วไฟฟ้าทำงาน

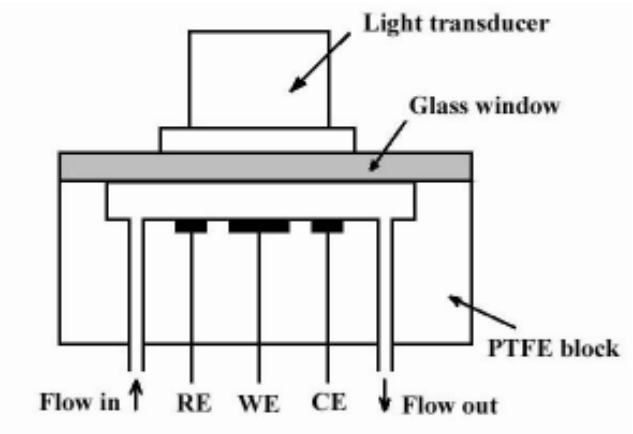

Figure 1. Structure of ECL flow cell

2. อุปกรณ์ตรวจวัดแสง (light transducer) ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสัญญาณแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า เพื่อส่งต่อไปยังระบบบันทึกผลและประมวลผลต่อไป อุปกรณ์ตรวจวัดแสงที่นิยมใช้กันมี 2 ชนิด คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube, PMT) และ ซิลิกอนโฟโตไอโอด ดีเทคเตอร์ (silicon photodiode detector, SPD) ถึงแม้ว่า PMT มีข้อดีคือ ไวต่อแสง แต่ PMT มีข้อเสียในเรื่องของการที่ต้องใช้เครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) ที่มีกำลังสูงมาก คือ 800-1000 V มีขนาดใหญ่ ราคาแพง และถูกทำลายได้ง่ายต่อแสงที่มีความเข้มสูง ในขณะที่ SPD จะมีข้อดีคือใช้เครื่องจ่ายไฟฟ้าที่มีกำลังไม่สูง ~ 12 V มีราคาถูก การออกแบบทำได้ง่าย มีขนาดเล็กและสามารถพกพาได้ ตลอดจนมีความแข็งแรง นอกจากนี้พบว่าช่วงความยาวคลื่นที่ SPD ให้ค่าสภาพไวที่เหมาะสม (optimum sensitivity) ตรงกับช่วงของความยาวคลื่นสูงสุดของการเปล่งแสงของ $*[Ru(bpy)_3]^{2+}$ พอดี ทำให้มีสภาพไวของการตรวจวัดที่ดี แต่ในปัจจุบันพบว่ามีผู้ใช้งาน SPD ไม่มากเท่ากับ PMT

3. หน้าต่าง (window) ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นระหว่างช่องที่ให้สารละลายไหลผ่านกับอุปกรณ์ตรวจวัดแสง โดยมากเมื่อใช้ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ เป็นตัวให้แสงจะสามารถใช้แผ่นแก้วเป็นหน้าต่างได้ อันเนื่องจากแสงที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วงที่ตามองเห็น (λ_{max} = 620 nm)

การทำงานของเทคนิคนี้ (Figure 2) เริ่มต้นด้วยการผ่านสารละลายที่มีทั้งตัวให้แสงและสารที่ต้องการวิเคราะห์ หรือให้มาผสมกันภายในเซลล์ แล้วให้ศักย์ไฟฟ้าที่ประมาณ +1.3 V (*vs.* Ag/AgCl) เพื่อให้ Ru(II) เกิดปฏิกิริยาอิเล็กโทร-ออกซิเดชัน (electro-oxidation) กลายเป็น Ru(III) แล้วเกิดปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนซ์ โดยการชนกับโมเลกุลอื่น ดังปฏิกิริยาที่ได้กล่าวมาแล้ว หลังจากนั้นทำการวัดแสงที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 620 nm

นอกจากนี้ พบว่าสามารถประยุกต์ใช้เทคนิค ECL ร่วมกับระบบการวิเคราะห์แบบต่างๆ เพื่อเพิ่มสภาพไวของระบบการวิเคราะห์นั้นๆ ได้ เช่น

1. ระบบโฟลอินเจคชันอะนาลิซีส (flow injection analysis, FIA) และตัวตรวจวัด (sensor)

โดยสามารถต่อระบบการวิเคราะห์แบบ FIA เข้ากับ ECL flow cell (Figure 3) ในระบบการวิเคราะห์แบบนี้จะอาศัย ปั๊มป์ (pump) เป็นตัวทำให้สารละลายตัวพา (carrier solution) เคลื่อนที่ภายในระบบท่อที่มีขนาดเล็กซึ่งไหลด้วยอัตราเร็วที่คงที่อย่างต่อเนื่อง โดยมากนิยมใส่ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ลงไปในสารละลายตัวพา เพื่อลดจำนวนท่อ (tube) ของระบบ FIA ลง ทำการฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ ผ่านวาล์วสำหรับฉีดสารละลาย (injection valve) เมื่อโซนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ไหลเข้าสู่โฟลเซลล์แบบ ECL (ECL flow cell) แล้ว จึงให้ศักย์ไฟฟ้าเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ECL และทำการวัดแสงที่เกิดขึ้น

นอกจากนี้แล้วยังสามารถนำ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ซึ่งเป็นตัวให้แสงมาตรึงลงบนผิวของขั้วไฟฟ้าทำหน้าที่เป็นเครื่องตรวจวัด โดยอาศัยความเป็นรูพรุนของตัวขั้วไฟฟ้าเองหรือใช้ตัวกลาง เช่น พอลิเมอร์ (polymer) เป็นต้น ตัวกลางพอลิเมอร์เป็นที่นิยมใช้กัน เนื่องจากสามารถดัดแปลงใช้งานได้ง่ายและสะดวก (Nieman, 1992) โดยตัวที่นิยมใช้กันคือ Nafion® เพราะว่า $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ สามารถตรึงอยู่ภายในโพรงของ Nafion® ได้ดีเนื่องจากเกิดแรงดึงดูดกับประจุลบในโครงสร้างของ Nafion® นอกจากนี้แล้วยังช่วยลดการใช้สารให้แสงและทำให้ความซับซ้อนของระบบการวิเคราะห์ลดลงอีกด้วย

2. ระบบโครมาโทกราฟี (chromatography)

สามารถใช้เทคนิคนี้เป็นเครื่องตรวจวัด (detector) คู่กับระบบโครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography) เช่น โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) (Figure 4) หรือ คาปิลลารีอิเล็กโทรฟอเรซีส (capillary electrophoresis, CE) โดยใช้ ECL เป็นเครื่องตรวจวัดเพื่อเพิ่มสภาพไวของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟี

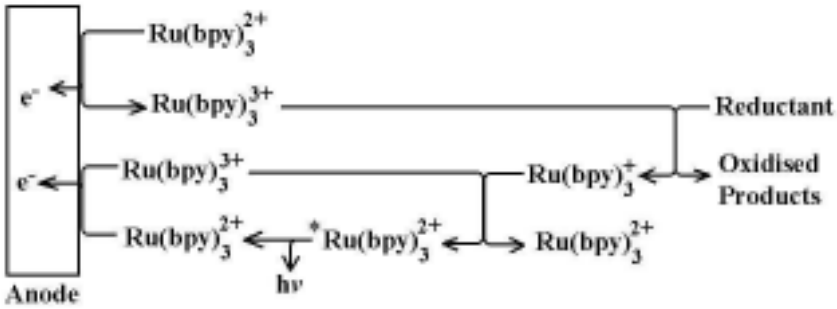

Figure 2. General mechanism for ECL reaction of $Ru(bpy)_3^{2+}$ with a reducing analyte

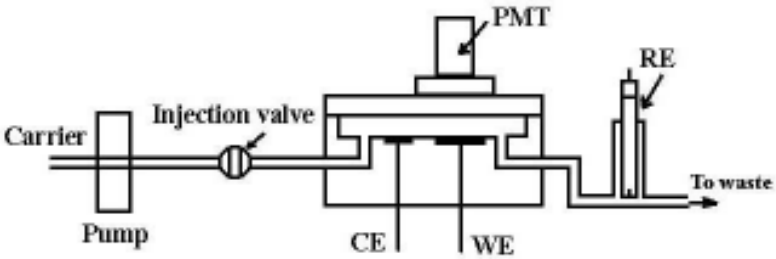

Figure 3. Schematic diagram of experimental apparatus used for FIA.

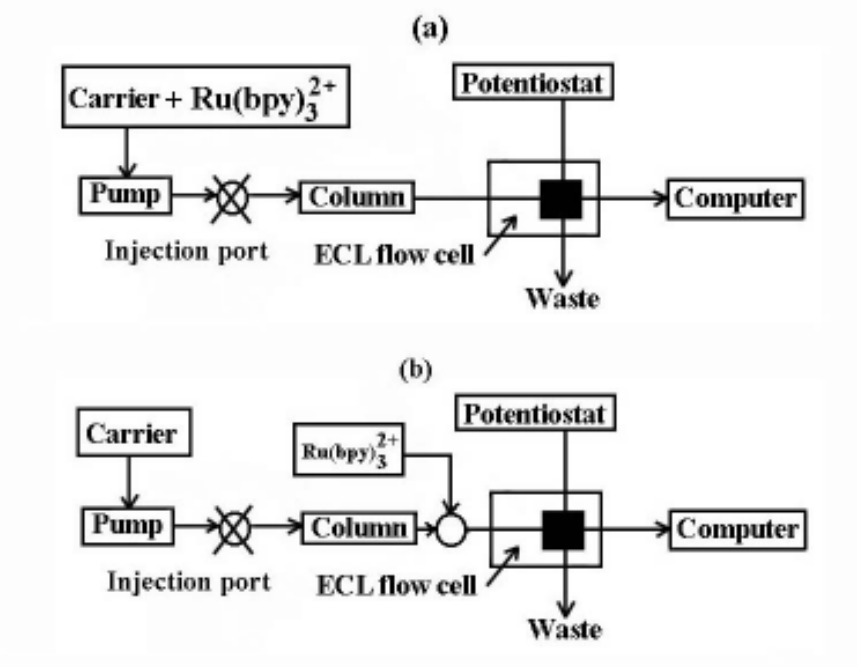

Figure 4. Schematic diagram of experimental apparatus used for HPLC; (a) mobile phase addition and (b) post column addition methods

การใช้เทคนิค ECL ควบคู่กับระบบ HPLC นั้นต้องมีการเติม $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ลงไปในระบบ HPLC สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

2.1 เติมลงไปหลังจากที่สารออกจากคอลัมน์แล้ว เรียกว่าวิธีโพสต์คอลัมน์แอดดิชัน (post column addition method)

2.2 เติมผสมลงไปกับสารละลายตัวพาหรือเฟสเคลื่อนที่ (mobil phase) เรียกว่าวิธีโมบาล์ยเฟสแอดดิชัน (mobile phase addition method) วิธีนี้จะมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีแรก คือ การออกแบบเครื่องมือไม่ซับซ้อน ลดการเกิดการกว้างของแบน (band broadening) ให้สภาพไวที่ดีกว่า และให้ช่วงของความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์สูงกว่าวิธีแรก แต่ทำให้ค่าเวลารีเทนชัน (retention time) มีค่าเพิ่มขึ้น (Nieman, 1996)

ECL flow cell ที่ใช้สำหรับ HPLC และ CE มีความคล้ายคลึงกัน เว้นแต่เมื่อต่อเข้ากับระบบ CE จะไม่สามารถทำการเติมตัวให้แสงผสมกับสารละลายตัวพาได้เหมือน HPLC เนื่องจากจะมีปัญหาของสนามไฟฟ้าในคาปิลลารีคอลัมม์ (capillary column) เข้ามารบกวน ดังนั้นโดยมากจะทำการเติม $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ลงไปหลังจากที่สารตัวอย่างออกจากคอลัมน์แล้ว (Fang, 2002) (Figure 5)

3. การวัด ECL โดยทางอ้อม (Indirect ECL)

ตัวอย่างที่ได้ยกมาแล้วทั้งหมดเป็นการวัดแสงจากปฏิกิริยา ECL ที่เกิดจากตัวให้แสงทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์ แต่ในบางกรณีสารที่ต้องการวิเคราะห์ไม่สามารถทำปฏิกิริยา ECL กับสารให้แสงได้โดยตรง เช่น กลูโคส, เอธานอล และ คลอเรสเตอรอล เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสารตัวอื่นที่สัมพันธ์กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ในปฏิกิริยานั้นและสามารถเกิดปฏิกิริยา ECL กับ

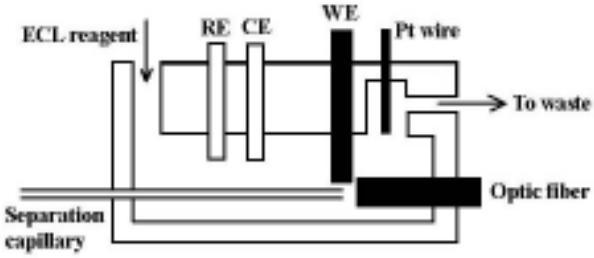

Figure 5. Schematic diagram of microfluidic device

$[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ได้ มาใช้แทน เช่น NADH เป็นต้น (NADH เป็นสารประกอบในกลุ่มแอมีนตติยภูมิ (tertiary amine) สามารถเกิดปฏิกิริยา ECL กับ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ได้) โดยที่ NADH มักทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) ในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซน์ (enzymatic reaction) ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส (Martin, 1996) โดยใช้เอนไซน์ 2 ชนิด ดังสมการ

$$\text{glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{glucose-6-phosphate} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{gluconolactone-6-phosphate} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

เมื่อ HK คือ hexokinase และ G6PDH คือ glucose-6-phosphate dehydrogenase และ NADH ที่เกิดขึ้นจะเกิดปฏิกิริยา ECL กับ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ต่อ ดังนี้

$$\text{NADH} \rightarrow \text{NADH}^{+\bullet} + e^-$$

$$\text{NADH}^{+\bullet} \rightarrow \text{NAD}^\bullet + \text{H}^+$$

$$[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{3+} + e^-$$

$$[Ru(bpy)_3]^{3+} + \text{NAD}^\bullet \rightarrow *[Ru(bpy)_3]^{2+} + \text{NAD}^+$$

$$*[Ru(bpy)_3]^{2+} \rightarrow [Ru(bpy)_3]^{2+} + h\nu$$

4. การวิเคราะห์เชิงวิทยาอิมมูน (Immunoassay) และวิธีดีเอ็นเอโพรบแอสเสย์ (DNA probe assay) (Blackburn, 1991; Knight, 1999; Guilbault, 2001)

เทคนิคทั้ง 2 แบบนี้ นิยมใช้ตัวให้แสงที่เป็นอนุพันธ์ของ $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ในปัจจุบันมีใช้กันหลายตัว เช่น TAG-NHS EsterTM และ TBR (Figure 6) เป็นต้น

มีรายงานว่า เทคนิค ECL สามารถทำการทดลอง ภายใต้สารละลายที่มี pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาวิทยาเชิงอิมมูน (immunoreaction) นอกจากนี้พบว่า สารแปลกปลอมในตัวอย่างทางชีวภาพและออกซิเจนไม่ส่งผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ (Guilbault, 2001)

ในการวิเคราะห์เชิงวิทยาอิมมูนจะต้องทำการตรึงไบโอติน (biotin) บนแอนติเจน (antigen) หรือ

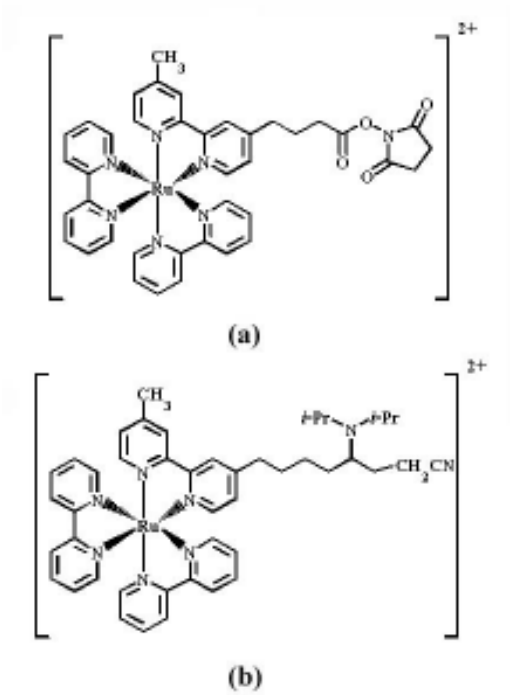

Figure 6. Structure of; (a) TGA-NHS Ester™ and (b) TBR.

แอนติบอดี (antibody) และ streptavidin บน magnetic bead micro-particle หลังจากนั้นทำการผ่านสารละลายที่มีแอนติเจนหรือแอนติบอดี ที่ตรึงอยู่กับสารประกอบเชิงซ้อนของ Ru(II) เรียบร้อยแล้ว การเลือกที่จะตรึงตัวให้แสงบนแอนติเจนหรือแอนติบอดี ขึ้นกับรูปแบบของวิธีวิทยาเชิงอิมมูน ได้แก่ แบบแซนวิส (sandwich) แบบแข่งขัน (competition) หรือแบบการแทนที่ (displacement) ดังแสดงใน Figure 7 เมื่อเกิดการจับกันอย่างจำเพาะเลือกแล้ว (selective binding) ทำการผ่านเข้าสู่เซลล์เม็ด bead ดังกล่าวจะถูกตรึงบนขั้วไฟฟ้าโดยการให้สนามแม่เหล็กแก่ขั้วไฟฟ้า แล้วทำการผ่านสารละลายไตรโพรพิลแอมีน (tripropylamine, TPA) เข้าสู่เซลล์เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ECL กับ Ru(II) แล้วให้แสงออกมา (Figure 8)

นอกจากนี้แล้วยังสามารถประยุกต์ในงานวิธีดีเอ็นเอโพรบแอสเสย์ (DNA probe assay) โดยใช้คู่กับเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณสาย DNA ที่ต้องการวิเคราะห์ทำให้สภาพไวของการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น ส่วนสาย DNA อีกด้านหนึ่งทำการตรึงสารประกอบเชิงซ้อนของ Ru(II) ไว้ (Figure 7f)

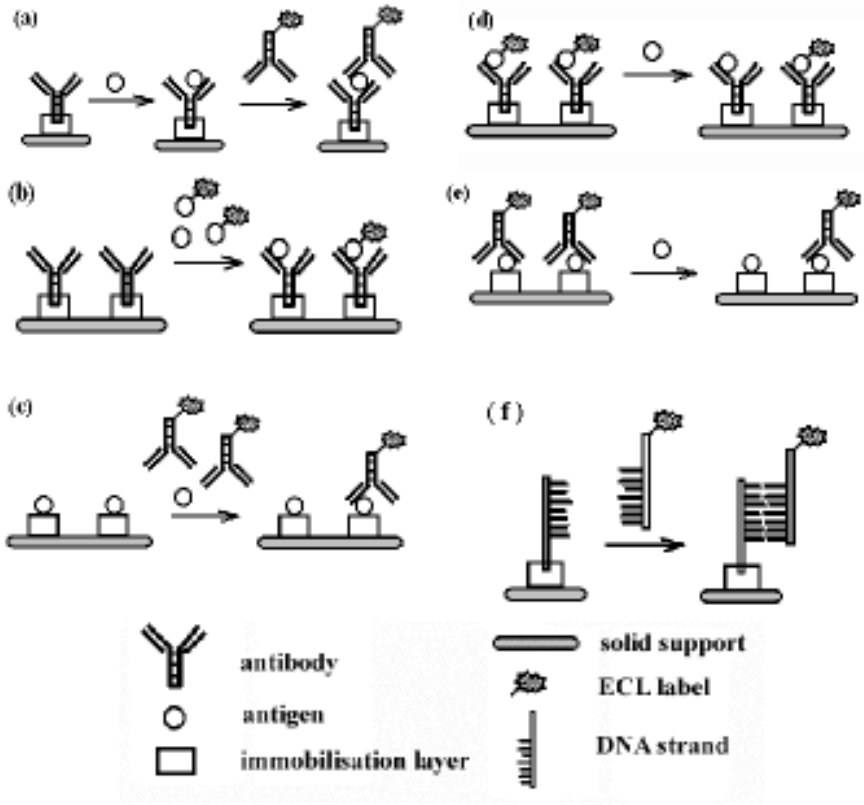

Figure 7. Various systems can be used for ECL immunoassay; (a) sandwich assay; (b) competition assay with immobilised antibody; (c) competition assay with immobilised antigen; (d) displacement assay; (e) displacement assay with immobilised antigen and (f) DNA-probe assay

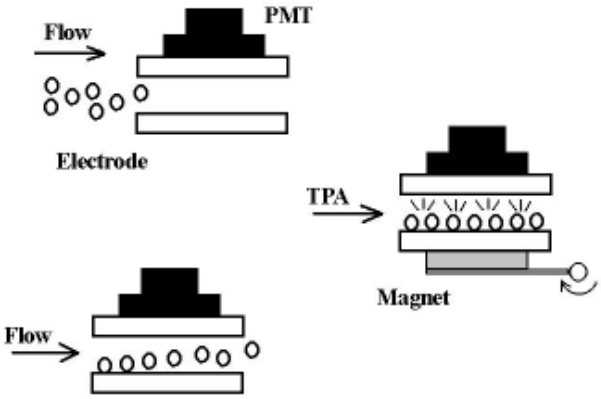

Figure 8. Detection process for immunoassay and DNA probe assay

โดยวิธีการตรวจวัดจะคล้ายคลึงกับวิธีวิเคราะห์เชิงวิทยาอิมมูน (Figure 8)

บทสรุป

จากที่กล่าวมาทั้งหมดแล้ว พบว่าสามารถประยุกต์ใช้ปรากฏการณ์ ECL ที่ใช้ตัวให้แสงเป็น $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ มาใช้เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประเภทต่างๆ ได้ และสามารถใช้คู่กับระบบการวิเคราะห์แบบอื่นๆ ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้แล้ว พบว่าเทคนิคดังกล่าวได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารได้หลายประเภท สามารถวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นในระดับต่ำได้ มีความเฉพาะเจาะจงและสภาพไวสูง นอกจากนี้แล้วตัวให้แสงและอนุพันธ์ดังกล่าวมีความเสถียรมาก

เทคนิค ECL สามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องตรวจวัดในระบบการวิเคราะห์ FIA, HPLC, LC และ CE

เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นเครื่องตรวจวัดในระบบไบโอเซนเซอร์แบบเอนไซด์ (enzymatic biosensor) และงานการวิเคราะห์เชื้อโดยเทคนิควิทยาอิมมูนและดีเอ็นเอโพรบแอสเสย์ ซึ่งเป็นที่นิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบัน

อย่างไรก็ตามเทคนิค ECL ยังมีข้อจำกัด เช่น ความเร็วของสารละลายตัวพาจะต้องช้า มีตัวแปรเสริม (parameter) ที่ต้องปรับเปลี่ยนมาก เนื่องจากต้องให้ได้สภาพที่เหมาะสมทั้งทางไฟฟ้าเคมีและเคมิลูมิเนสเซนซ์ ความซับซ้อนของกลไกของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างตัวให้แสงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ทำให้การพัฒนาเทคนิคนี้เป็นไปไม่ง่ายนัก ถึงแม้ว่าเทคนิคนี้จะมีความเฉพาะเจาะจงสูง แต่ก็อาจถูกการรบกวนจากตัวรบกวน (interfering species) ได้ นอกจากนี้แล้วยังพบว่าเครื่องมือที่ผลิตออกมาทางการค้ายังมีอยู่น้อยและมีข้อจำกัดในการใช้งานเฉพาะทางอยู่มาก

อย่างไรก็ตามการพัฒนาเพื่อแก้ไขข้อจำกัดเหล่านี้ยังคงได้รับการวิจัยเรื่อยมาเพื่อปรับปรุงเทคนิคการวิเคราะห์แบบ ECL ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Bard, A.J., Faulkner, L.R. 1980. Electrochemical method: Fundamental and Application. Canada: John Wiley & Sons.

Blackburn, G.F., Shah, H.P., Kenten, J.H., Leland, J., Kamin, R.A., Link, J., Peterman, J., Powell, M.J., Shah, A., and Talley, D.B. 1991. Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. Clin. Chem. 37: 1534-1539.

Fang, Z.L., Wang, S.L., Huang, X.J. 2002. Combination of flow injection with capillary electrophoresis 8: Miniaturized capillary electrophoresis system with flow injection sample introduction and electrogenerated chemiluminescence detection. Anal. Chem. Acta. 456: 167-175

Greenway, G.M., Knight, A.W. 1994. Occurrence, mechanism and analytical application of electrogenerated chemiluminescence: A review. Analyst. 119: 879-890.

Guilbault, G.G., Fahnrich, K.A., Pravda, M. 2001. Resent applications of electrogenerated chemiluminescence in chemical analysis. Talanta. 54: 531-559.

Knight, W.A. 1999. A review of recent trends in analytical applications of electrogenerated chemiluminescence. Trends Anal. Chem. 18, 47-62.

Martin, M.T., Jameison, F., Sanchez, R.I., Dong L., Leland, J.K., Yosy, L. 1996. Electrochemiluminescence-based quantitation of classical clinical chemistry analytes. Anal. Chem.68: 1298-1302.

Nieman, T.A., Downey, T.M. 1992. Chemiluminescence detection using regenerable tris(2,2′-bipyridyl)-ruthenium(II) immobilized in nafion. Anal. Chem. 64: 261-266.

Nieman T.A., Lee W.Y., Skotty D.R. Determination of Dansyl Amino Acid and Oxalate by HPLC with Electrogenerated Chemiluminescence Detection Using Tris(2,2′-bipyridyl)ruthenium(II) in the mobile phase. Anal. Chem. 68: 1530-1535.

Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. 1995. Analytical Chemistry. 6th ed. Florida: Saunders Collage Publishing.