

## フローインジェクション/化学発光計測法に基づく化学センサー

石井 幹太<sup>1)</sup>・山田 正昭<sup>2)</sup>

1) 明治大学工学部工業化学科：〒214 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1

2) 東京都立大学工学部工業化学科：〒192-03 東京都八王子市南大沢1-1

---

### Chemical Sensors Using Flow Injection Techniques with Chemiluminescence Detection

Mikita ISHII<sup>1)</sup> and Masaaki YAMADA<sup>2)</sup>

1) Department of Industrial Chemistry, School of Science and Technology,  
Meiji University; Higashimita 1-1-1, Tama-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 214

2) Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Tokyo Metro-  
politan University; Minami-ohsawa 1-1, Hachioji, Tokyo 192-03

This review is described for chemical sensors using flow injection (FI) techniques with chemiluminescence (CL) detection, namely for CL sensors. The items are composed of introduction, trend of the technique, technical achievement and conclusion. The CL sensor is developed on the basis of a highly sensitive sensing for small amounts of some key substances such as hydrogen peroxide. Also, the sensor contributes to a saving on resources by an immobilization of CL reagents and to a remote sensing by employing an optical fiber as a CL light carrier.

---

#### 1. はじめに

フローインジェクション分析法 (FIA) では、手動操作で得難い高速反応の制御を可能ならしめる利点が特長の一つとして挙げられる。化学発光 (CL) 反応の FIA との組み合わせもその一例で、FIA/CL法は精確度を維持した高感度な分析法の一つとなっている。

ところで、最近では化学計測でのセンサー研究が活発になってきている。危険な場所での計測や省力化あるいは省資源化などが主な理由で、熱センサーや pH センサーや酵素センサーなど、それぞれ物理センサーや化学センサーおよびバイオセンサーとなって数多く開発されている。とりわけ光ファイバーの進歩と相まって、最近では光フ

ファイバーセンサーの開発が活発におこなわれており、その総説<sup>1)</sup>も報告されている。光ファイバー法は光を取り扱うことから、F I A / C L法に基づくセンサー（以下C Lセンサーと略記する）のように光検出を対象としたセンサーに応用され、特に感度の優れた蛍光検出化学センサー<sup>2) - 5)</sup>への利用が主である。これらはセンサー学の進歩や展望<sup>6)</sup>あるいはデータブック<sup>7)</sup>となって民間レベルで紹介されるまでになっている。センサーの中でも化学センサーやバイオセンサーは試薬や試料の連続流れでの計測を行うものが多く、基本的にはF I A法の原理が採用されている。

本稿では、センサーの目的要因の一つである高感性に着目して、高感度分析法の一つとして定着しつつあるC L分析法を検出系に応用したF I A型の化学センサーについて紹介したい。なお、使用目的をクロマトグラフィーなどの検出器に定めたC Lシステムについては本稿では割愛した。また、生物発光センサーと称するもののうち化学発光的センサーの色彩の強いものも若干C Lセンサーとして取り挙げたことを付記しておく。

## 2. C Lセンサーの開発の近況

化学センサーとは化学物質を計測対象としたセンシング機器および化学試薬あるいは化学反応を計測手段に利用して構築された計測機器を総括したものと定義できる。化学センサーの開発に臨んでは、①省資源化に役立つこと、②省力化（自動化やコンピュータ化も含む）に役立つこと、③分析処理能力が大きいこと（迅速化も含む）、④感度に優れること、⑤装置設計が容易でコンパクト（軽量化も含む）であること、⑥連続使用に対して安定かつ堅牢であること、⑦安価であること、⑧遠隔操作が可能なこと、⑨装置制御が容易なことなど、おおそ化学分析機器の総括にも相当する要素が要求される。従って、化学センサーは化学分析機器のユートピアといっても過言でなく、高度な知的要素が導入されることになる。しかし、実際はこれらの要素を全て満たしたケースは皆無の状況で、これらの完結化に向けて努力が続けられている。大半は上述した要素の80%程度が解決され、実用化されている。①では試薬の固定化など、②では自動分析化など、③では迅速応答化など、④では高感度分析法のセンサーへの組み込みなど、⑤ではF I A法の採用など、⑥ではセンサー素材の開発など、⑦では装置の簡易化など、⑧では光ファイバーの利用など、⑨ではコンピューターの利用などが化学センサーの開発のために検討され、また利用されている。

C Lセンサーは、C L反応が一般的に高速であるので、効率よく、かつ精確にC L現象を捕らえるにはF I A技法の採用を不可欠とする。C L検出法は、上述したセンサー開発要素の全てを満たさないまでも、C L法の高感度性の特長を生かして超微量物質を対象とした化学計測への応用の付加価値の高さ故、化学センサーとしての応用が検討されている。とりわけ試薬の固定化などによる省資源化やフロースルー法の高性能化のために光ファイバー法の利用などが主に検討されている。また、C Lセンサーに限らず、いかなる検出系を適用しようともF I Aに基づくセンサーでは試薬等の

消費を余儀なくされるので、省資源的観点から試薬と試料の新規な導入法の考案<sup>9)</sup>も必要となってくる。また、現在のコンピューターの進歩と相まって、開発したCLセンサーのコンピューター用ソフトウェアの研究<sup>10)</sup>も行われ始めている。

### 3. センサー化の技法

#### 3.1 フロースルー方式

CLセンサーの多くはフロースルー方式を用いている。フロースルー方式では試薬類が計測の後に排出されることになるので、多くは試薬の固定化など省資源化に焦点が当てられてCLセンサーの開発が行われている。その代表例をFig.1<sup>10)</sup>に示す。

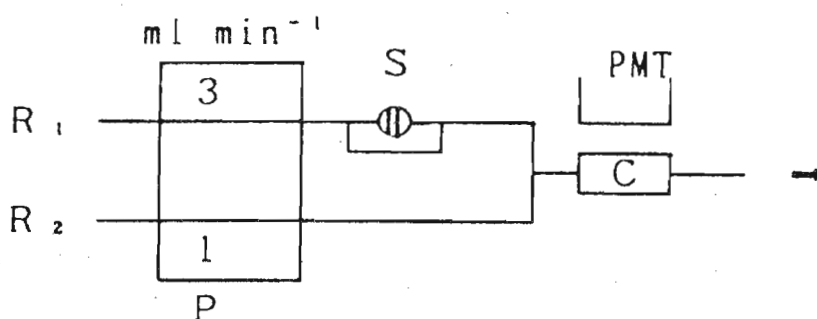


Fig.1 Schematic diagram of flow system

$R_1$ :  $H_2O$ ,  $R_2$ :  $H_2O$  or 1M NaOH, P: Peristaltic pump, S: Sample injector ( $20\mu l$ ), C: Pyrex tube ( $5 \times 26$  mm) packed with ion-exchange resin, PMT: Photomultiplier tube.

この計測技法ではCL反応の高速性（これは当然のことながら迅速分析にも寄与することになる）のためにオン検出器（on-detector）の技法が採用されている。Fig.1の例では、一般的なCL検出ではCL反応を検出器の手前で行わせる（本質的にはオン検出器が理想的であるが装置設計上困難な場合が多いのが実状である）が、検出器に反応セルを直結した系（反応セルに相当する部分がイオン交換カラムとなっている）になっており、イオン交換体に固定化した触媒によってCL反応が促進され、かつまた効率の良いCLの検出手法ともなっている。一方、オン検出器の形態がCLセンサーでは好ましいことであるが、前述したように装置設計上困難な場合が多いので、CL反応は反応として、また検出は反応場（例えばFIAでの混合コイルを反応セルとして利用するなど）を検出器として併用できる工夫が行われている。その代表例が光ファイバー法で、CLセンサーが光を検出媒体としていること、また光ファイバーは光を遠隔地に漏れ損失を少なくして送れることなどの利点から採用されている。そ

のシステム例を過酸化水素用CLセンサーについてFig.2<sup>11)</sup>に示す。当然のことながらCL反応によって生じたCLを捕捉するために反応場に直結した光ファイバーが設けられているが、反応によって生じる光の揺らぎを最少にする（CLの強度的安定性を保つことで、測定における再現性とも関係する）ために反応場、すなわち反応セルの工夫が行われている。ここではFig.3<sup>11)</sup>に示したような形態で5-10 $\mu$ lの反応セルが用いられており、T-PVCの光透過性も83%（波長：425nm）と良好である。この微量容量セルの利用によって試料処理能力が90/h-200/hまで向上できている。

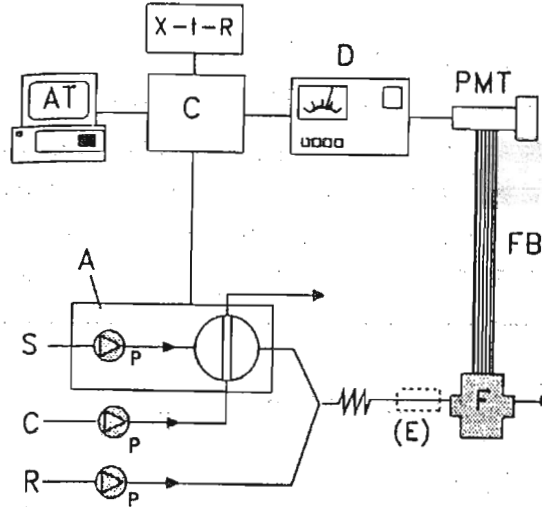


Fig.2 PIA system and fiber optic chemiluminescence detection

AT: AT 286 personal computer, X-t-R: Penrecorder, C: Control unit, D: ORIEL detection system model 7070, PMT: Photomultiplier tube, FB: Fiber bundle, F: Flow cell, P: Pump, S: Sample, C: Carrier, R: Reagent, A: Injection system, E: Enzyme reactor.

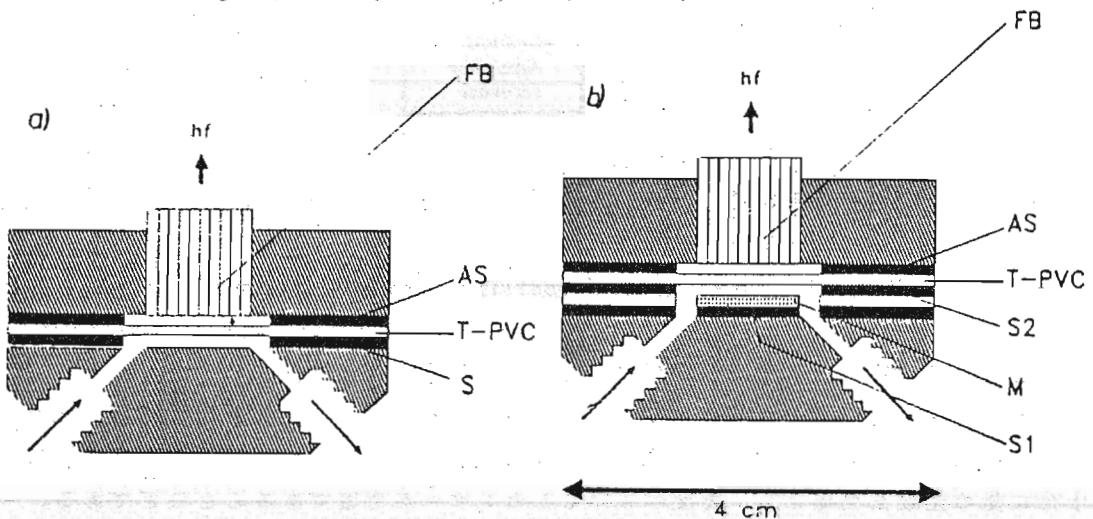


Fig. 3 Flow cell(a) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor(b)

FB: Fiber bundle, AS: Aluminium spacer, T-PVC: Transparent PVC foil,  
S, S1 and S2: Teflon spacer, M: Enzyme membrane, hf: Light quantums.

再現性においても3%以内の変動率で測定が可能となっている。これは微小容量の反応セルの工夫で瞬時のCL反応が行えること、およびCL分析法の持つ応答とノイズ比(S/N比)の良さの相乗効果が寄与した結果である。

### 3・1・2 試薬固定と光ファイバー法

流通方式のCLセンサーでは省資源化に焦点を当てて、主に試薬の固定化と光ファイバー法の導入が図られている。特に酵素反応系を利用するCLセンサーでは高価な酵素の固定化が主に検討されている。酵素の固定化(本稿では誌面の都合上、具体的な固定化法については省略する)には膜固定化法(Fig.3参照)とカラム内固定化法(Fig.4)<sup>1,2)</sup>との2種が主に用いられている。

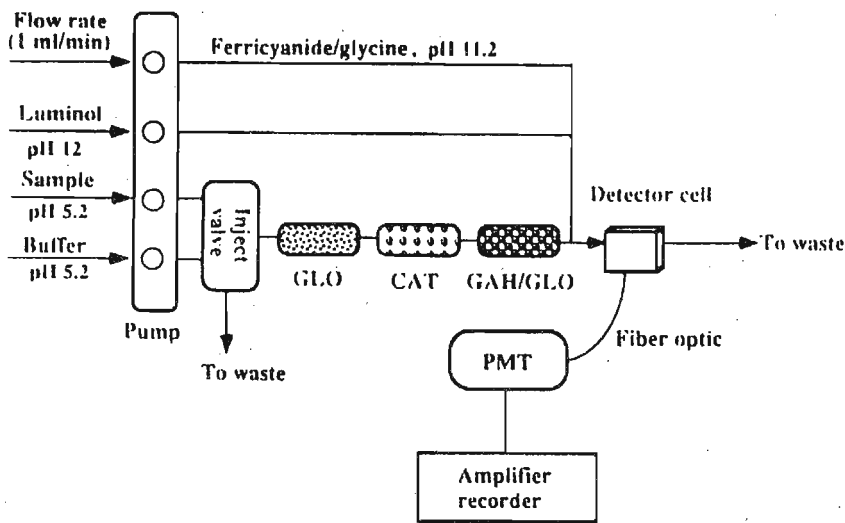


Fig. 4 Schematic diagram of the CL fiber-optic system

GLO, CAT and GAH/GLO: Immobilized enzyme columns.

前者の利点は電極膜としての利用など光検出の素子の種類の多様化やコンパクトなCLセンサーの考案などが可能なこと、また後者の利点は反応時間が比較的長い場合(例えば触媒的反応をセンサー開発に利用する場合など)にCL媒体となる化合物の十分な量の生成を可能とし、感度のよいCLセンサーを考案できることなどである。試薬類の固定化は酵素類にのみ留まらず、イオン交換樹脂<sup>1,2)</sup>のような固相反応場

にCL反応で使用する試薬類、例えば繰り返し使用する方がコンパクトかつシンプルなシステム設計が可能となる触媒<sup>10)</sup>・増感剤色素<sup>11)</sup>などの固定化が検討され、それぞれアドレナリンおよび遊離塩素用の実用的なCLセンサーが開発されている。

試薬の固定化では、カラム内固定化法と膜固定化法のいずれが適するかはCLセンサーに組み込むCL反応系の種類によって異なるが、L-グルタミンとL-グルタミン酸塩のCLセンサー化に向けての比較も試みられている<sup>14)</sup>。使用した実験スタイルがFig. 5<sup>14)</sup>である。膜固定化法に成る膜センサーはFig. 3に準ずるものを使用している。

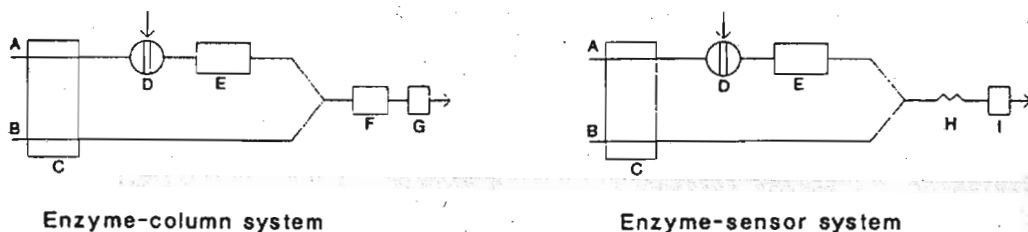


Fig. 5 Step-ups of the flow-injection systems for the chemiluminometric determination of L-glutamine and L-glutamate using peroxidase as catalyst

A: 0.1M phosphate buffer (pH 7.4 for L-glutamate and pH 6.5 for L-glutamine), B: Luminol reagent, C: Pump, D: Injection valve, E: Enzyme reactor (filled with co-immobilized glutaminase/glutamate oxidase for the determination of L-glutamine and filled only with glutamate oxidase for the determination of L-glutamate), F: Enzyme reactor filled with immobilized peroxidase (column-immobilization method), G: Flow-through cell, H: Mixing coil, I: Flow-through peroxidase sensor (membrane-immobilization method).

両固定化法による違いは感度や定量範囲および再現性の検討によって比較され (Table 1)<sup>14)</sup>、本CL反応系では明らかに膜固定化法に成る一層CLセンサー化された方法が、感度や再現性およびシステムのコンパクト化に関して優れていることを実証している。

光ファイバー法の導入はオン検出器での検出を要することから、試薬の固定化を伴う場合が多い。それぞれFig. 2, 3に示したシステムおよび検出器が汎用されている。光ファイバー法で注意事項は、光ファイバーと光電子増倍管の光受光部が光漏れのないように接続されること、光ファイバーの切断面をきれいに保ちかつ密着するように接続される必要がある。光ファイバーについての実用例は多くあるが、その素材については詳しく記載されていない場合が多い。おそらく基材は石英であって、その中にゲルマニウムなどの光ファイバー成形材を混入したものが主たる材料と思われる。使用されている光ファイバーは外径数mmで、長さが1m程度のものが多い。

Table 1 Comparison between enzyme reactor(column-immobilization method) and CL sensor(membrane-immobilization method) in relation to range of sensitivity

Sample	System	Range of linearity (mM)	Reproducibility (RSD, %)
L-Glutamate	Enzyme reactor <sup>a)</sup>	0.025-1.0	2.2
	Enzyme reactor <sup>b)</sup>	0.001-1.0	5.0
	CL sensor <sup>c)</sup>	0.0001-0.0625	1.9
L-Glutamine	Enzyme reactor <sup>a)</sup>	0.05-5.0	2.4
	CL sensor <sup>c)</sup>	0.001-2.5	2.1

a): Microperoxidase from equine heart was used as catalyst for the chemiluminescence reaction, b): 0.1M hexacyanoferrate(II) was used as catalyst for the chemiluminescence reaction, c): Microbial peroxidase from *Arthromyces ramosus* was used as catalyst for the chemiluminescence reaction.

### 3・1・3 電解化学発光法

試薬固定法と同様に電解CL法は電位の挿引を行うので、基本的には電極センサーと同じに考えられる。光と電極を扱うことから光ファイバーの利用が行われており、それを組み込んだユニークなCLセンサーが考案されている。代表的なCLセンサーがFig. 6<sup>16)</sup>である。低部にある液導入部から導入された試料および反応試薬溶液は電位差計で電位調整されたプラチナ網電極で電解CLが行われる。得られたCLは網電極内にある光ファイバーセンサーを経て光電子増倍管で検出され目的成分が測定される。

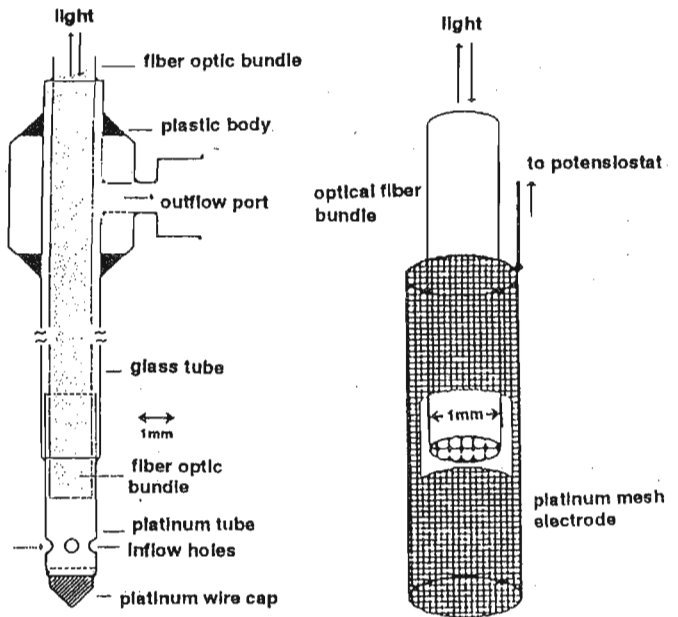


Fig. 6 Simplified sketch of fiber-optic/electrochemical probe for electro-generated CL measurements and flow injection analysis

### 3・2 循環方式

#### 3・2・1 全循環方式

試薬類の省資源化は先に述べた試薬の固定化が現状では主流であるが、発想を新たに使用する試薬類を排出せず、できるだけ多数の測定に使用するためのクローズドシステム（全循環方式）の構築例<sup>16) 17)</sup>がある。試薬の有効利用はもとより、排出液を出さない化学計測は化学センサーの理想とするところである。山田らはCL反応が終了した残液が未使用のCL試薬と反応しないならば循環できることに着目して、Fig. 7<sup>16)</sup>に示したような全循環方式の銅(II)測定用のCL/FIAシステムを構築しているが、省資源性などを考慮するとCLセンサーと称してもよい。試薬の安定性についても検討した結果、少なくとも

一ヶ月以上の期間で安定であると報告している。またFig. 1に示した条件での $1 \times 10^{-6}$ Mの銅(II)の測定で、最初の750試料までは同じ大きさのCL応答を維持でき、さらに250試料の測定後では、わずかに最初のCL強度の約10%程度しか変化しないことがわかり、約1000の試料測定をわずか100mlの試薬溶液で可能としている。このような測定型は呈色試薬を用いる吸光光度法のように呈色が災いする手法では使用できないものであり、CL法のように発光を検出する手法にのみ可能なものである。

#### 3・2・2 ユニット循環方式

全循環方式のCLセンサーのように、測定後に排出する試薬類が新規の反応試薬等と反応する場合には、全くのクローズド式にせず、一部を排出しながら大部分の試薬類は循環させて測定用に待機させるセミクローズド（ユニット循環方式と称することにする）CLセンサー（Fig. 8）<sup>18)</sup>も開発されている。この方式ではCL法などの発光法検出に限らず、吸光光度法などの光検出系も利用できる利点がある。とりわけ本形式は全循環式と同様、食品の毒性試験など迅速でいつ何時にでも測定できるCLセンサーとして有用である。

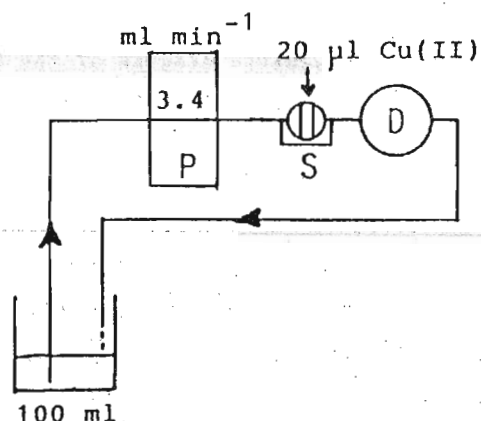


Fig. 7 Diagram of the cyclic flow-injection system with CL detection for Cu(II) determination

Operating conditions:  $1 \times 10^{-3}$ M  $\beta$ -nitro-styrene,  $1 \times 10^{-2}$ M NaOH,  $5 \times 10^{-3}$ M CTAB,  $4 \times 10^{-5}$ M fluorescein; flow rate 3.4 ml/min ; 20  $\mu$ l injections.



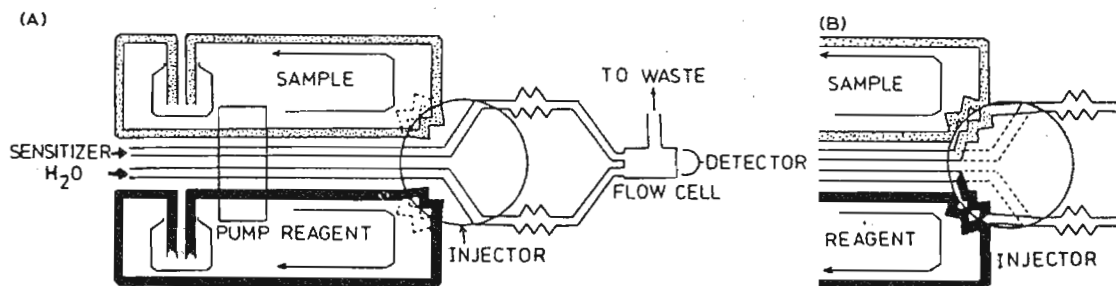


Fig.8 Schematic diagram of the flow manifold; (A)load position;  
(B)injection position

#### 4. 応用

CLセンサーとして構築された計測システムを測定対象物質毎に以下に述べる。また、それらをまとめたものがTable 2である。対象とした化合物の種類はまだ少ないものの、CL法の高感度性とFIA法の簡易性や反応制御の容易さが相まって、高感度かつ迅速および装置設計の容易なCLセンサーが構築されている。

##### a. エチルアルコール<sup>9)</sup>

本CLセンサーは生物発光センサーと呼ばれているものであるが、ルミノールの過酸化水素による酸化反応に基づくCLを利用している。生物発光と言われる理由はエチルアルコールやグルコースなどの測定を酵素を用いて行うことに由来する。本質的にはルミノールCLを利用するのでCLセンサーの一種である。エチルアルコール計測の場合は、エチルアルコールにNAD<sup>+</sup>を添加して適当な酸化剤の存在下、アルコール脱水素酵素による分解反応を行わせて過酸化水素を定量的に生成させる。本CLセンサーは5 mMのエチルアルコールを定量できる。また、CLセンサーが汎用的になっていることもあり、全自動化を図るコンピューターソフトの開発も行われた。エチルアルコール、尿素およびグルコースなどが同時に全自動測定できるようになっている。

##### b. アドレナリン<sup>10)</sup>

マンガン(III)-ポルフィリン錯体(触媒)を固定化した陰イオン交換樹脂を固相反応場として、試薬の固定化による省資源化を図ったCLセンサーである。CL反応は強塩基性樹脂で著しく促進され、イオン交換性のない樹脂を使用した場合に比べて約750倍を越えるCL増感効果が得られている。本CLセンサーは血管収縮止血剤中のアドレナリン量の分析でも、その測定結果が薬剤表示値とよく一致する正確度の高いセンサーである。測定下限は $10^{-8}$ Mレベル(20  $\mu$ l注入)で、測定値の標準偏差(RSD)は $5 \times 10^{-8}$ Mの試料注入で3.5%(n=10)である。また、少な

くとも60試料の連続測定が可能である。測定所用時間は1分以内/1試料である。

#### c. 過酸化水素<sup>11)</sup>

本CLセンサーはルミノールの酸化によるCL反応を利用したセンサーで、酸化剤となる過酸化水素の量に比例してCL強度が増すことを定量原理としている。過酸化水素はグルコースの酵素分解反応で生ずることから、本CLセンサーに膜固定化酵素を組み込みグルコースセンサーとしても利用できる工夫がこらしてある。本CLセンサーに対する妨害成分についても検討されており、過酸化水素1 $\mu$ g当たりに対して例えばNi(II)などの金属イオンがその約1/10程度存在しても測定値に影響がないとされている。本CLセンサーは10週間以上も安定であり、実際10週間に1000回の過酸化水素測定ができています。測定下限は過酸化水素で $10^{-8}$ Mレベルである。RSDも3%で良好である。

#### d. グルタミン<sup>12) 14)</sup>

グルタミンのCL測定は以下の反応による。 $\text{glutamine} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{GAH, pH 5.2}) \rightarrow \text{glutamate} + \text{NH}_3$ ;  $\text{glutamate} + \text{O}_2 \rightarrow (\text{GLO, pH 5.2}) \rightarrow \alpha\text{-ketoglutarate} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{NH}_3$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{luminol} \rightarrow (\text{ferricyanide, pH 10.7}) \rightarrow 3\text{-aminophthalate} + \text{N}_2 + \text{hv}$ また、当然のことながらグルタミン酸塩の測定も可能である。基本的には目的成分の酵素分解反応によって生じた過酸化水素とルミノールとの反応である。ヒト細胞培地中のグルタミン測定などに本CLセンサーが使用されている。本CLセンサーの測定下限はグルタミンの場合 $10^{-6}$ Mレベルで、RSDは約4%である。本CLセンサーの検体処理能は高く30試料/1時間で、また300試料の連続測定の可能な安定なCLセンサーである。

#### e. 遊離塩素<sup>13)</sup>

前述した陰イオン交換樹脂の固相CL反応場を活用した応用CLセンサーで、固定化CL増感剤色素を用いている。本CLセンサーはマンガン(II)などの金属については測定上妨害を受けないが、鉄(III)は僅かながら妨害を受ける。アンモニアと遊離塩素(HOCl)の反応でクロラミンが生成するが、クロラミンは本CLセンサーには応答しない。本CLセンサーは水道水の分析など環境分析に応用できる。本CLセンサーの検出下限は $10^{-6}$ Mレベルで、測定値の再現性はRSDで1.6%と良好である。分析所用時間は1試料当たり1分以内で、また6時間の連続使用にも耐え得る安定なCLセンサーである。

#### f. DNA<sup>15)</sup>

本CLセンサーは電解化学発光法を利用しており、フロースルー型の電解槽中でのCLを光ファイバー法で検出する手法を採用している。DNA測定の場合、電位の挿引による臭化エチジウムとの錯体形成で生じる蛍光を基にDNAの測定が行われる。本CLセンサーは蛍光を測定するが、CLも一部蛍光と一致する場合があります。蛍光とCLを等価に扱うセンサーである。DNAの検出下限は $10^{-8}$ Mレベルで、RSDは約3%である。

#### g. 銅(II)イオン<sup>16)</sup>

$\beta$ -ニトロステレン／水酸化ナトリウム／陽イオン界面活性剤ミセル（臭化セチルトリメチルアンモニウム）／フルオレセイン（増感剤色素）／銅(II)から成るCL反応系を組み込んだ銅(II)測定用CLセンサーである。本CLは界面活性剤ミセル中での $\beta$ -ニトロステレンの酸化反応を銅(II)が触媒することで生じる。また、本CLセンサーはセンサー化において循環式を採用しておりCLセンサーの模範となる例でもある。この形式のCLセンサーは省資源化や排出液を測定過程で系外に出さないなど環境にやさしいセンサーとして有用である。この形式のCLセンサーでは測定前後のCL試薬が混入後に反応しないことが必須条件である。このような循環できるCL反応系は今後大いに検討する必要があるであろう。本CLセンサーでの検出下限は0.1ng銅(II)で、1時間当たり200の試料分析が可能である。また、海水の実試料分析でも約2%のRSDの精度で500試料の連続測定が可能となっている。

#### h. シアン化物イオン<sup>17)</sup>

本シアン化物イオン(CN<sup>-</sup>)用CLセンサーは前述の全循環式(Fig.7参照)の1例で、陽イオン界面活性剤2分子膜ベシクル（臭化ジドデシルジメチルアンモニウム）／水酸化ナトリウム／ウラン／CN<sup>-</sup>から成るCL反応系を利用している。本CL反応では測定後の余剰のアルカリが未使用のCL試薬を消耗することになるので、CL試薬溶液中に中和剤として硫酸アルミニウムを添加し、溶液でなく固体様のアルミニウムフロックを形成させ余剰アルカリを除去できる工夫がされている。フロック形成法は循環式CLセンサーでアルカリのみが妨害となる場合に有用な妨害の除去法であろう。本CLセンサーのCN<sup>-</sup>検出下限は0.5pgで、測定におけるRSDは約2%である。また、試料処理能は1時間当たり360試料で、480試料の連続測定も可能である。

#### i. 二酸化イオウ<sup>18)</sup>

本二酸化イオウ(SO<sub>2</sub>)測定用CLセンサーはCe(IV)/DSM<sup>21)</sup>/RFS<sup>21)</sup>/SO<sub>2</sub>(c, d)についてはTable 2参照)のCL反応系を利用しており、色素のRFS以外は試薬を別回路に設置して循環して常時送液する形態(ユニット方式)を採用している(Fig.8参照)。試薬の固定化と違って、固定化し難い場合の試薬の省資源化の一例とも言える。このCLセンサーの形式は全循環式と比べて測定系に適用しやすいCL反応系は多い。本CLセンサーは幼年白ワイン用のSO<sub>2</sub>測定のために開発されたものであるが、理由は定かでないが赤ワインには適用できないとされている。本SO<sub>2</sub>CLセンサーの検出下限は5mg/lで試料処理能は1時間当たり40である。

#### j. グルコース<sup>19) 21)</sup>

比較的CL量子収率の高いCL反応系<sup>19)</sup>、すなわちbis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate(TCPO)/cetyltrimethylammonium bromide(CTAB)/過酸化水素/ペリレン(増感剤色素)系のCLで過酸化水素を測定対象としたCLセンサーである。前述した過酸化水素CLセンサーとはCL反応系は異なるものの、グルコースの酵素分解反応により生じた過酸化水素を検出することでグルコースを精度よく高感度に定量できる。TCPOと過酸化水素との反応で生成したジオキセタンが励起種となり、

それがペリレンへのエネルギー移動によってCLが生じるが、界面活性剤CTABミセルの増感作用も組み込まれたCLセンサーである。本CLセンサーは $10^{-7}$ Mレベルのグルコースの検出が可能で、RSDが0.3%と精度も良好である。また、本CLセンサーは長期に亘って安定で、8カ月間100試料の測定もできる。一方、電解化学発光を利用してグルコースを定量できるCLセンサー<sup>21)</sup>もある。すなわち、 $\text{NAD}^+$ の $\text{NADH}$ への変換反応を利用し、

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+} \rightarrow \text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+} + \text{e}^- \rightarrow (\text{ + Reductant}) \rightarrow [\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^* \rightarrow \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+} + \text{h}\nu$ ; ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ についてはTable 2参照)の電解CLを利用する。この電解CLセンサーは $10 \mu\text{M}$ のグルコースの検出が可能で、1時間当たり60試料の測定ができ、加えてRSDも1.1%と良好である。

#### k. ATP<sup>20)</sup>

本CLセンサーはルシフェリンとATPおよび酸素を蛍ルシフェラーゼと $\text{Mg}^{2+}$ の共存下で反応させたときに生じるCLを利用しており、発光波長は560nmである。センサー化に当たっては光ファイバー法が利用されており、CL検出には膜固定化酵素が使用されている。本CLセンサーは50fMのATPを検出でき、1日間で100試料の測定処理能もある。また、RSDは4.5%程度と測定の精度はやや低い傾向にあるが、半日で35試料の測定を可能とする安定性のよいCLセンサーである。

#### l. シュウ酸塩<sup>22)</sup>

本CLセンサーは前記した $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の電解CLに準ずる $\text{Ru}(\text{bpy})(\text{ndbpy})(\text{ClO}_4)_2$ (Table 2参照)の電解CLセンサーである。また、電極面にLangmuir-Blodgett(LB)膜法を応用している。また、本CLセンサーはシュウ酸塩イオンの検出下限が $10^{-6}$ Mレベルで、1時間当たり240試料の分析が可能な高試料処理能CLセンサーでもある。

#### m. ウルシオール<sup>23) 24)</sup>

漆の主成分であるウルシオール用のCLセンサーで、漆かぶれのモニター用として開発されている。漆かぶれは低濃度の漆でも生じることから、感受性試験のためには高感度な監視システムが必要となる。本CLセンサーではCL反応を高める反応場として超臨界流体二酸化炭素が用いられており、その溶媒特性を利用することで $10^{-6}$ M<sup>23)</sup>および $10^{-8}$ M<sup>24)</sup>のウルシオールの検出がそれぞれ異なったCL反応系を用いて確立されている。前者の場合はアルカリと過酸化水素の反応によって生成する活性酸素が、後者の場合は超臨界流体の二酸化酸素と試料溶媒としてのアセトンとの活性複合体の生成がCL反応の促進のための重要物質となっている。本CLセンサーは共に1時間当たり120試料の迅速測定が可能な特長を有する。

#### n. ヒポキサンチン<sup>25)</sup>

ルシフェリンのCLを利用したCLセンサーで、イオン交換セルロースビーズなどの固定相に各種酵素を固定化してCL反応を進める形態のセンサーである。キサンチン酸化酵素やコレステロール酸化酵素などの使用により、その酵素に対応する化合物

のCLセンサーが構築されている。ヒポキサンチンの場合、本CLセンサーは0.02 μMの検出能を有し、50試料の連続測定も可能である。マグロ筋肉中のヒポキサンチンの測定などに応用されている。

Table 2 CL sensors developed

Analyte	Sample	CL system	Method	Analytical figure of merits				Literature
				DL	SF	OSTA(Sam/In)	RSD	
Urea/Ethanol	Cultivation media	Luminol/K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /enzymes/ethanol or urea	F	ca. 5mM (Ethanol)	—	—	—	9)
Adrenaline	Medicine	Mn(II)-porphyrin/adrenaline/NaOH/ IIE <sup>a)</sup>	F <sup>1)</sup>	3x10 <sup>-6</sup> M	60h <sup>-1</sup>	60	3.5%	10)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Standard	Luminol/alkali/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	F	10 <sup>-8</sup> M	200h <sup>-1</sup>	500	3%	11)
Glutamine/ L-Glutamate	Mammalian cell culture	Luminol/enzymes/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /glutamine or glutamate	F	10 <sup>-6</sup> M (Glutamine)	30h <sup>-1</sup>	300	3.9%	12)14)
HOCL	Tap water	Uranine/ IIE/HOCL	F	2x10 <sup>-6</sup> M	60h <sup>-1</sup>	6h <sup>1)</sup>	1.6%	13)
DNA	Standard	Luminol/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /DNA/ethidium bromide	F	10 <sup>-6</sup> M <sup>m)</sup>	—	—	ca. 3%	15)
Cu(II)	Sea water	β-nitrostyrene/NaOH/surfactant/fluorescein/Cu(II)	CS <sup>1)</sup>	0.1ng	200h <sup>-1</sup>	500	2.2%	16)
CN <sup>-</sup>	Standard	Uranine/surfactant/CN <sup>-</sup> /NaOH	CS	0.5pg	360h <sup>-1</sup>	480	2.1%	17)
SO <sub>2</sub>	Wine	Ce(IV)/DSM <sup>b)</sup> /RFS <sup>c)</sup> /SO <sub>2</sub>	SCS <sup>k)</sup>	5.0mg/l	40h <sup>-1</sup>	—	2.5%	18)
Glucose	Standard	TCPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /fluorescer/CTAB <sup>d)</sup> /enzyme/glucose	F	3x10 <sup>-6</sup> M	ca. 20h <sup>-1</sup>	100/8 months	0.3%	19)
	Standard	Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> /NAD <sup>+</sup> F/enzyme/glucose	F	10 μM	ca. 60h <sup>-1</sup>	—	1.1%	21)
ATP	Standard	Luciferin/O <sub>2</sub> /enzyme/Mg <sup>2+</sup> /ATP	F	50fmol	100/day	35/half day	4.5%	20)
Oxalate	Standard	Ru(bpy) <sub>2</sub> (ndbpy)(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> <sup>f)</sup> /oxalate	F	10 <sup>-6</sup> M	ca. 240h <sup>-1</sup>	—	—	22)
Urushiol	Standard	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /NaOH/uranine/urushiol/acetone	F	1.0x10 <sup>-6</sup> M	ca. 120h <sup>-1</sup>	—	6.2%	23)
	Standard	acetone/urushiol/SCF-CO <sub>2</sub> <sup>g)</sup>	F	1.0x10 <sup>-6</sup> M	ca. 120h <sup>-1</sup>	—	ca. 3%	24)
Hypoxanthin/ cholesterol etc.	Tuna muscle	<i>Cypridina</i> luciferin <sup>h)</sup> /enzyme/hypoxanthin	F	0.02 μM	ca. 30h <sup>-1</sup>	50	—	25)

Abbreviations: DL, Detection limit; SF, Sampling frequency; OSTA(Sam/In), Operational stability (minimum sample injection number); RSD, Relative standard deviation.

a) Ionic ion-exchange resin; b) Disulfiteomercurate; c) Riboflavin sulphate; d) Cetyltrimethylammonium bromide; e) Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II); f) Ruthenium(II)bis(2,2'-bipyridine)(4,4'-dinonadecyl-2,2'-bipyridine) perchlorate; g) Super critical fluid-CO<sub>2</sub>; h) 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-α]pyrazin-3-one; i) Flow-through system; j) Closed system; k) Semi-closed system; l) 1x10<sup>-6</sup>M free chlorine with continuous flow sensing mode; m) As for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection.

## 5. まとめ

CLセンサーについての最近の動向を技術的に新規性のある報告を選び紹介したが、構築されたCLセンサーの大半は、CL計測に基づく高感度性は評価できるものの、いわゆるセンサーとしての要素を十分に備えたCLセンサーとはなっていない。省資源化に焦点を当てた試薬の固定化法や光ファイバー法が主である。また、報告者の主観に基づいてセンサーと言う技術用語が用いられており、その使用についても統一されていない。むしろセンサーと言う用語は現状では検出器に近いものとなっている。本文の中で、循環式FIAについて触れたが、このシステム形態がFIAを基盤としたセンサー形態と考えられる。但し、この場合も測定後の試薬の安定性等を考慮したとき、理想的な全循環方式のCLセンサーを構築することは現状ではかなり難しいことのように思われる。従って、今後のCLセンサーの開発は、必要な時に試薬と試料が使い、最少限の種類の試薬を循環させるユニット循環方式の形態で、試薬の固定化などを組み込んだCLセンサー開発が優先されよう。FIAを採用したセンサーは、CLセンサーに限らず、吸光度をモニターする化学センサーの場合も、測定後の試薬類と使用前の試薬類との反応性や安定性や試薬の固定化などを併せて検討しながら循環式のセンサー化を図る必要があろう。

## 6. 文献

- 1) L. J. Blum, S. M. Gautier: *Bioprocess Technol.*, 15, 213(1991).
- 2) D. Chen, M. D. L. DE Castro, M. Valcarcel: *Anal. Chim. Acta*, 234, 345(1990).
- 3) B. H. Weigl: *SPIE (Chemical, Biochemical, and Environmental Fiber Sensors III)*, 1587, 288(1991).
- 4) H. He, G. Uray, O. S. Wolfbeis: *Presenius J. Anal. Chem*, 343, 313(1992).
- 5) O. S. Wolfbeis: *J. Molecular Structure*, 292, 133(1993).
- 6) 東レリサーチセンター調査研究事業部編集: センサ・計測技術の新展開, (1993).
- 7) 東レリサーチセンター調査研究部門編集: センサ利用技術データブック, (1994).
- 8) J. Ruzicka, G. D. Marshall: *Anal. Chim. Acta*, 237, 329(1990); *J. of FIA*, 10(2), 164(1993).
- 9) M. Busch, W. Hobel, J. Polster: *J. Biotech.*, 31, 327(1993).
- 10) 吉村太志, 鈴木剛彦, 山田正昭, 保母敏行: *分析化学*, 41, 191(1992).
- 11) F. Preuschoff, U. Spohn, G. Blankenstein, K. H. Mohr, M. R. Kula: *Presenius J. Anal. Chem.*, 346, 924(1993).
- 12) M. V. Cattaneo, K. B. Male, J. H. T. Luong, *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 569(1992).
- 13) T. Nakagama, M. Yamada, T. Hobo: *Anal. Chim. Acta*, 231, 7(1990).
- 14) G. Blankenstein, F. Preuschoff, U. Spohn, K. H. Mohr, M. R. Kula: *Anal. Chim.*

Acta, 271, 231(1993).

- 15) D. A. VanDyke, H. Y. Cheng: Anal. Chem., 61, 635(1989).
- 16) M. Yamada, S. Suzuki: Anal. Chim. Acta, 193, 337(1987).
- 17) 石井幹太, 山田正昭, 鈴木繁喬: 分析化学, 36, 316(1987).
- 18) J. L. Burguera, M. Buruguera: Anal. Chim. Acta, 214, 429(1988).
- 19) M. S. Abdel-Latif, G. G. Guilbault: Anal. Chem., 60, 2671(1988).
- 20) L. J. Blum, S. M. Gautier, P. R. Coulet: J. Biotech., 31, 357(1993).
- 21) A. F. Martin, T. A. Nieman: Anal. Chim. Acta, 281, 475(1993).
- 22) T. Sawaguchi, A. Ishino, T. Matsue, I. Uchida, K. Itaya: DENKI KAGAKU, 57, 1209(1989).
- 23) M. Ishii, M. Takimoto, T. Miyakoshi, T. Nakamura: Proceedings of the 41st Annual Meeting of The Japan Society for Analytical Chemistry, Kyoto 1992, p. 96; Anal. Sci., (submitted).
- 24) M. Ishii, A. Kohta, T. Miyakoshi: Proceedings of the 42th Annual Meeting of The Japan Society for Analytical Chemistry, Hiroshima 1993, p. 515.
- 25) T. Kobayashi, K. Saga, S. Shimizu, T. Goto: Agric. Biol. Chem., 45, 1403(1981)