

# 微視的不均一溶液を反応場を利用するフロー化学発光計測

林 純二郎、山田 正昭

東京都立大学工学部 〒192-03 東京都八王子市南大沢1-1

---

Flow Chemiluminescence Sensing  
in Microheterogeneous systems as Reaction Media

Junjiro Hayashi, Masaaki Yamada

Faculty of Technology, Tokyo Metropolitan University, Hachioji,  
Minami-ohsawa, Tokyo 192-03

---

- 1.はじめに
- 2.化学発光 (CL) 反応とフローCL計測
- 3.CL反応場としての微視的不均一溶液系
  - 3.1 微視的不均一系
    - 3.1.1分子集合体
    - 3.1.2包接化合物
  - 3.2 微視的不均一系の反応場としての効果
- 4.微視的不均一系を利用するフロー計測
  - 4.1バッチ法によるCL計測
  - 4.2フロー法によるCL計測
- 5.おわりに
- 6.文献

## 1. はじめに

化学反応により生じたエネルギーが光エネルギーに変換された結果生じる化学発光 (CL) は、一般になんらかの酸化反応に関与していることが知られている。しかしながら、発光量子収率は二、三の高いものでも0.02-0.3程度で、大部分は非常に低い ( $\ll 10^6$ )。一方、ホタルや夜行虫に代表される生物発光 (BL) は非常に発光量子収率は高くホタルでは0.88という報告がなされている[1]。BLもCLも化学反応の結果得られる励起体からの発光であり、BLの高い発光量子収率はすばらしい機能を持った酵素に由来している。酵素は、微視的に特異な環境をもつ活性部位を反応場として酵素中に形成しており、酵素により触媒されるBL反応では励起分子の生成効率及びその発光効率が非常に高くなる。この事は、ある種の微視的に不均一な系 (Microheterogeneous systems) をCL反応場に利用することで、CL量子収率が大きく改善される可能性を示唆している。

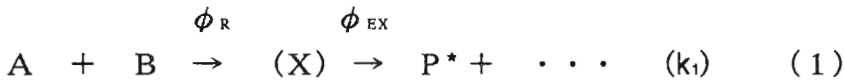
CL反応を利用する分析法の最大の特徴はその高感度性にあり、その応用分野は臨床化学、生化学、薬学、免疫化学、微生物学、環境化学など多岐に渡っている[2,3]。CLを利用する高感度な分析法は、同じく発光を測定する蛍光分析法と比較して、その励起過程が異なる (励起光源が不要である) 事に由来する利点を持っているにも関わらず、蛍光分析法ほど一般的には利用されていない。現在よく分析に利用されるルミノール、ルシゲニン、及びシュウ酸ジエステルは上述した発光収率の高い部類のCL反応系に属する。しかしながら、これらのCL系だけでは分析対象成分に限りがあると共に、各々には選択性が低いという難点がある。従って、CL検出を利用するFIA法がより広く認知されるためには、選択性の高い新規CL反応系を見いだし分析対象成分の拡大を図る必要がある。新規CL系の開発において、微弱なCLを放出する酸化反応系が数多く存在することに着目し、その低い発光収率や反応速度を分析に利用できる程度までに高めてやることが考えられる。すなわち、BLにおける酵素反応をまねることにより、微視的に不均一系を反応場として用いてCL反応効率を上げることである。

本稿では溶液中で自己会合して組織化された集合体を形成するミセル、ベシクル等の分子集合体、及びそのもの自身は自己会合しないが微視的に不均一な場を形成する包接化合物、高分子電解質を反応場に利用したCL計測及びフローCL計測について述べる。

## 2.化学発光 (CL) 反応とフローCL計測

ここではまず初めに、計測対象物質とCL反応の関係を、次にフロー系計測ではどんな因子が重要であるかを簡単に述べることにする。

下記のCL系においてA (あるいはF) の濃度を計測する場合を考える。一般に、基底状態の反応分子A及びBが化学反応によって反応中間体Xを経由して励起状態の分子P\*を生成するとき、



放出されるCLには次の二つの場合がある。

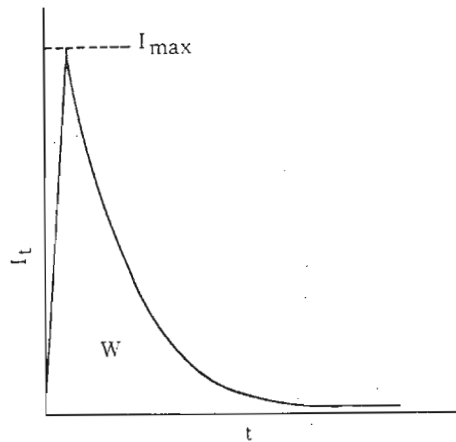
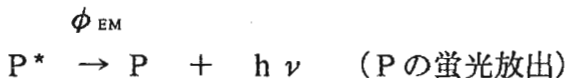
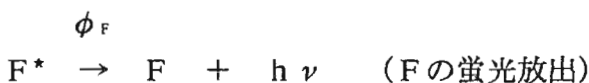
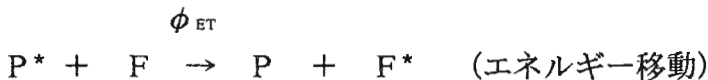


Fig. 2-1 A first order chemiluminescent reaction.  
 $I_t = \Phi_{CL} k_1 [A]_0 \exp(-k_1 t)$ ,  $I_{max} = \Phi_{CL} k_1 [A]_0$

(a) Pが蛍光性で、Pの蛍光が観測される。



(b) P\*のエネルギーにより励起されうるような蛍光物質Fが共存するとFの蛍光が観測される (Fを増感剤、このような発光を増感CLという)。



(a) の場合、ある時間 t における発光強度 I t は、

$$I t = -\phi_R \phi_{EX} \phi_{EM} d[A]/dt = -\Phi_{CL} d[A]/dt$$

であり、また全発光量 $W$ は

$$W = \int I_t dt = \Phi_{CL}[A]_0$$

と表される。ここでCL量子収率 $\Phi_{CL}$ は、 $X$ の生成収率 $\phi_R$ 、 $P^*$ の生成収率 $\phi_{EX}$ 、及び $P^*$ の蛍光量子収率 $\phi_{EM}$ の積として表される。 $[A]_0$ は $A$ の初期濃度である。これより、全発光量は $\Phi_{CL}$  ( $= \phi_R \phi_{EX} \phi_{EM}$ ) のみに依存するのに対して、発光強度は $\Phi_{CL}$ とCL反応速度 ( $P^*$ の生成速度) に依存することがわかる。また、(b)の場合にも同じことがいえる。

$$I_t = -\Phi_{CL} d[F]/dt$$

このときには $\Phi_{CL} = \phi_R \phi_{EX} \phi_{ET} \phi_F$  ( $\phi_{ET}$ は $P^*$ から $F$ へのエネルギー移動効率、 $\phi_F$ は $F^*$ の蛍光量子収率を表す) となる。

CL反応の速度が $A$ の濃度 $[A]$ に対して一次と考えられれば、 $I_t$ は時間 $t$ と共に次式に従って減衰する (Fig.2-1)。

$$I_t = \Phi_{CL} k_i [A] = \Phi_{CL} k_i [A]_0 \exp(-k_i t)$$

フロー計測においては $W$ でなく、 $I_t$ を測定することになるが、極大値 $I_{max}$ が測定されるような条件を決めることが多い。ここで、

$$I_{max} = \Phi_{CL} k_i [A]_0$$

と表されるので、 $A$  (あるいは $F$ ) を感度良く定量するためには $\Phi_{CL}$ が大きいだけでなく、 $k_i$ も大きいことが必要となる。 $\Phi_{CL}$ 及び $k_i$ はいろいろな要因により影響を受けるが、微視的に不均一な溶液を反応場を利用することにより $\Phi_{CL}$ 及び $k_i$ を大きくすることが期待できる。

### 3. CL反応場としての微視的不均一溶液系

微視的不均一系は、1) 界面活性剤や脂質により形成される分子集合体、2) 有機、無機化合物の重合体から形成される系の二つに大別される。これらの微視的不均一な系では、親水性あるいは疎水性を持った微視的な部位 (空孔、空洞、プール、ポケット、かご) や、静電的な効果によってその化学反応性などが変えられる電荷を持った表面が形成されており、これらの効果によって均一系には見られない化学反応性を発現する[4-7]。ここでは、自己会合して微視的不均一な場を作る分子集合体 (ミセル、二分子膜) と単独分子で微視的不均一な場を作る包接化合物 (シクロデキストリン) 及び高分子電解質について以下に述べる。

## 3.1 微視的不均一系

### 3.1.1 分子集合体

#### 正ミセル (水性ミセル)

長鎖アルキルアンモニウム塩のように、一つの分子内に親水基と疎水基の両方を含む、いわゆる両親媒性物質（界面活性物質）を溶媒に溶解させると、ある濃度（臨界ミセル濃度：CMC）以上で自己会合してミセルを形成する。水溶液中で形成されるミセルは、正ミセル（あるいは水溶性ミセル）と呼ばれ、親水基をバルク水相側に向け、疎水鎖部が寄り集まった形でミセル殻を形成している。正ミセル形成の主な原動力は両親媒性分子の疎水鎖による疎水結合である。正ミセルは、極性環境中に親水性反応場を形成するが、反応場としての反応はほとんどが親水基界面での電気二重層（stern層）において起こっている。

#### 逆ミセル

一方、ヘプタン等の疎水性溶媒中に両親媒性物質を溶解させると、正ミセルとは逆向きにその親水基をミセル殻の内部に向けた形の逆ミセルが形成される。逆ミセルは、その内殻に親水基によって水分子を保持した内水相を形成する。逆ミセル形成の主な原動力はこの水分子と親水基間の水素結合である。逆ミセルは、その内水相中に比較的多量の水分子を保持することができ、またその可溶化された水の量に応じてミセル殻を形成する両親媒性分子数（会合数）が変化しミセル殻自体の大きさも変化する。また、内水相中の水は、親水基近傍でのイオン-双極子（あるいは双極子-双極子）相互作用により分子運動を束縛された結合水相と、中心部のバルク水とほぼ同じ物性を持った自由水相の二つの状態に大別される（二層構造モデル）。そのため、逆ミセルの反応場としての性質は、内水相中の含水量、すなわちミセルサイズに大きく依存する。また、逆ミセル溶液に溶解する水量を大きくしてゆくと（CMC以下の条件で）、W/Oマイクロエマルションを形成する。

#### 二分子膜

リン脂質などの生体脂質やある種の合成両親媒性物質を、溶媒に溶解すると分子二重層の膜、二分子膜を形成する。二分子膜形成物質の濃厚溶液は種々のタイプの液晶相（主にラメラ液晶）を形成し、さらにこの溶液に水を加えると液晶構造が壊れて、多層の二分子膜で覆われている大きな（直径1000-8000Å）小胞体（リポソーム：マルチラメラベシクル）が生成する。この小胞体溶液に超音波を

照射すると多層の二分子膜が一枚ずつ剥がれ、より小さな（直径250-2500Å）単層構造のベシクル（ユニラメラベシクル）が形成する。ベシクルを形成する両親媒性物質の疎水鎖部が秩序を持った構造をしているのに対して、ミセル系では規則的な集合構造を持っていない点が大きく異なる。相転移温度以下の領域では疎水鎖部は結晶化（ゲル化）しており膜の流動性が低い、すなわち堅牢な膜を形成する。相転移温度の上下（結晶相 → 液晶相）で反応速度や活性化エネルギーが急激に変化する例が知られている。反応基質は、二分子膜相の疎水性鎖部、親水性基近傍、ベシクル内部の水相、ベシクル外部の水相に可溶化し、微視的に不均一な反応場を形成する。また、近年疎水性溶媒中で両親媒性分子が水溶液中のものと逆向きに配向しているベシクル、逆ベシクルの形成が報告されている[8,9]。これも、新しい反応場として期待されるものである。

### 3.1.2 包接化合物

#### シクロデキストリン（CD）

CDは、グルコース単位が環状に主に6-8個結合した円柱状の包接化合物であり、その結合しているグルコース単位数によって、 $\alpha$ 体（6個）、 $\beta$ 体（7個）、 $\gamma$ 体（8個）として知られている。CD分子の内部は、直径4.9-7.9Å（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 体）、高さ7.9Åの疎水的雰囲気を持つ空洞である。一方CD分子の環部分（空洞の上下の入口）は、水酸基により親水的雰囲気を有している。ホスト分子としてのCDは、ゲスト分子の分子容積、極性等により選択的な包接をおこなう。ホスト分子は、その分子の親水性部をCD分子の外側に突き出したような形でCD分子に包接される。その結果、ホスト分子の疎水性部はCD分子に保護され、親水性部と溶液中の反応基質との間での選択的な反応を行う事ができる。また、CD分子の環部に特定の官能基を導入することによって、包接された分子とその官能基との反応性を高める事ができる。

#### 高分子電解質

高分子電解質は水溶液中で解離して、巨大イオンを形成する。高分子電解質間では種々の分子間相互作用（クーロン力、水素結合力、疎水結合力、電荷移動結合力、ファンデルワールス力等）により安定な巨大分子集合体、ポリイオンコンプレックスと呼ばれるものが形成される。例えば、反対電荷の高分子電解質を混合すると、規則正しい構造を持った集合体が形成される。このように形成されたポリイオンコンプレックス自身は、特異な性質を持った反応場を提供する。さ

らに、種々の官能基を有した高分子電解質によるポリイオンコンプレックスを設計することによって、さらに新しい機能性を持った反応場を作ることができる。

### 3.2 微視的不均一系の反応場としての効果

ここまで、述べた微視的不均一系は、その界面あるいはその内部に特異的な微視的環境をもつ場を形成し、その溶液の物理化学的性質は通常のバルク溶媒（水、有機溶媒）のものとは著しく異なる。従って、集合体系中に可溶化（吸着、溶解）された反応分子が分子集合体の界面あるいは内部の特異的な場で反応することによって、均一溶媒中での反応では見られない種々の効果を発現する[4-7]。

微視的不均一系の反応場としての効果は、次の四つに分類される。

(1) 可溶化・・・これらの微視的不均一系は親水性および疎水性の両方の領域（界面、空間）をバルク溶媒中に形成するので、バルク溶液自身には不溶（あるいは難溶性）な分子を可溶化することができる。このため、反応基質の溶解度を高くできその結果反応速度を上げることができる。また、通常のバルク溶液中では不利な親水性基質と疎水性基質間の化学反応に対する有効な場となる。

(2) 濃縮効果・・・反応分子が微視的不均一系中に可溶化されることにより、その反応分子の局所的濃度が増加し見かけの反応速度が上がる。また、イオン性分子集合体の表面に同種の電荷のイオン性反応分子は吸着濃縮され、異種電荷のものは反発により接近が妨げられ反応基質の選択性が向上する。

(3) 微視的環境効果・・・微視的不均一系の親水部界面で形成される結合水相により、その微視的粘度、極性、pH（水の活量）などの微視的環境が変化し、化学反応性が均一溶液系のものと異なってくる。

(4) 閉じ込めの効果・・・可溶化された反応分子は、微視的不均一系との水素結合などの静電的相互作用あるいは疎水相互作用等による化学反応性が変化する。例えば、反応分子の分極、イオン化等による分子構造の変化が促進される、流動性の低い膜中などに可溶化される反応分子の配向性が高めらる、固定化された反応分子の運動性が制限される、あるいは反応分子の特定な部位が反応から保護されること等により反応速度、反応経路が変化する。

CL反応場としての微視的不均一系の利用は、これら四つの効果に基づいた反応の加速性、選択性を得ることにある。例えば、微視的不均一系を反応場にすれば反応経路を変え反応(1)の反応の活性化エネルギーを低下させたり、反応分子の濃度を局所的に高めP\*の生成速度を上げることが期待される。CL反応系では金属イオン触媒や、塩基性酸素酸化によるCL反応系が多く知られているが、これらは陽イオン性の分子集合体により反応が促進されることが期待され

る。また、反応分子が微視的不均一系との静電的相互作用等により分極、イオン化が促進され反応に有利な分子構造となる、あるいはCL反応で生成する反応中間体、励起状態分子などが分子集合体中の微視的環境により安定化しその反応速度、反応収率が向上する。CLは、化学励起された分子(P\*)からの蛍光あるいはりん光である。分子集合体中に存在しているP\*は、他分子との衝突による失活から保護される。増感CLの場合のようにP\*と蛍光物質間でのエネルギー移動の場としても微視的不均一系は有効となる。

#### 4 微視的不均一系を反応場として用いたCL計測例

微視的不均一溶液系をCL反応場に用いたCL計測の研究例はそれほど多くない。CL分析法において微視的不均一溶液を反応場として用いる目的は、液相中でのCL発光強度を上げる(通常の均一溶液系ではほとんどCLが検出されない系もある)、あるいはその他の分析化学的諸特性(選択性、応答の直線性、精度、多成分による干渉)の向上にある。CL反応場の基本的な特性あるいはその効果を調べるためには、いわゆるバッチ法が都合がよい。また、分析手法としての再現性、定量性等が重視される場合は、フロー法が適している。現時点での微視的不均一系を用いたCL法の研究では、ほとんどがバッチ法によるものである。ここでは、実際の利用例からいくつか選んで解説する。

##### 4.1 バッチ法でのCL計測

###### 正ミセルを用いたCL計測

###### 1) 血清中のグルコースの定量[14]

ルミノール反応と酸化酵素(グルコースオキシダーゼ、GOD)反応を組合せ、血清中のグルコースの高感度、高選択的な化学発光センサー(オプトロード)の開発が行われている。この原理は、基質であるグルコースとGODとの反応により生成した過酸化水素がルミノール試薬と反応し生じた化学発光を検出して、間接的にその基質の定量を行うというものである。酸化酵素は膜に固定化され、反応溶液中に置かれたガラスファイバー先端に装着されている。この際、問題となるのは両反応系における至適pHの違いである。ルミノール反応は、通常強アルカリ性(pH10-11)水溶液中で行われるのに対して、酵素反応は通常中性付近の水溶液中でないとその酵素活性が失われる。そこで両反応系の至適pHの適合化の問題点をを臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)ミセル溶液を用いることで解決している。



Table 4-1 Summary of CL analyses using microheterogeneous systems as reaction media

Reaction Medium	CL reaction	Analyte	Detection limit	ref.
<i>[Normal micelles]</i>				
CTAB	Luminol/oxidase	glucose, L-amino acids	5.4x10 <sup>-6</sup> M 4x10 <sup>-6</sup> M	10
SDS	Luminol/Fe <sup>2+</sup>	lipid hydroperoxides	-	11
TDBAC	FMN/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Cr <sup>3+</sup> , Cr <sup>6+</sup>	5x10 <sup>-8</sup> M	12
CTAOH	Lucigenin/ catecholamines	catecholamines	1-50x10 <sup>-8</sup> M	13
CTAB	Luminol/(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) glucose oxidase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> glucose	2.4x10 <sup>-8</sup> M 3x10 <sup>-7</sup> M	14
CTAB	$\beta$ -nitrostirene/ NaOH/fluorescein	Cu <sup>2+</sup>	1x10 <sup>-7</sup> M	15
<i>[Reversed micelles]</i>				
CTAC (CHCl <sub>3</sub> /n-octane)	Luminol/ glucose oxidase	glucose, oxidase activity		16
CTAC (CHCl <sub>3</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> )	Luminol/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6.4x10 <sup>-7</sup> M	17
CTAC (CHCl <sub>3</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> )	Luminol/iodine	iodine	50pg/ml	18
CTAC (CHCl <sub>3</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> )	Luminol/ chlorauric acid	gold	10pg/ml	19
SDS, CTAB, Brij 96, Triton x-100	CPPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			20
(BuOH*/toluene)	(peroxyoxalate CL)			
AOT (heptane)	Schiff base/ Fenton's reagent	primary amines, amino acids	1.5x10 <sup>-8</sup> M 1.4x10 <sup>-7</sup> M	21
<i>[vesicle]</i>				
DODAC	Mn <sup>2+</sup> /adrenaline	adrenaline	1x10 <sup>-8</sup> M	22
DODAC	Co <sup>2+</sup> / phenylpyruvic acid	phenylpyruvic acid	1x10 <sup>-7</sup> M	23
DDAB	eosin Y/NaOH	H <sup>+</sup>	2x10 <sup>-6</sup> M	24
DDAB	TCNQ/OH-/eosin Y	Mn <sup>2+</sup>	1x10 <sup>-8</sup> M	25
DODAC(CH <sub>3</sub> CN)	TCNQ/OH-/ rhodamine B	S <sup>2-</sup>	5x10 <sup>-8</sup> M	26
DDAB	uranine	CN <sup>-</sup>	2x10 <sup>-9</sup> M	27
<i>[CD]</i>				
$\beta$ -CD	ABMI(isoluminol)			28
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -CD	Lucigenine/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			29
$\beta$ -CD	Lucigenine/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2x10 <sup>-6</sup> M	30
<i>[Polymer]</i>				
BSA, PEI	ABMI(isoluminol)			31
hemin/VP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /buffer(pH7)			32
ion exchange resin	Mn <sup>2+</sup> /adrenarine	adrenaline	3x10 <sup>-6</sup> M	33

Fig.4-1に示すように、化学発光強度に対する反応溶液のpH依存性は、水溶液中ではその至適値が約10-11にあるのに対して、CTABミセル溶液では7.75と中性側にシフトしている。pH7.25におけるCTABミセル溶液でのCL応答値は水溶液のもの約7倍高くなっている。また、Fig.4-2に示すようにミセル溶液のpHによるCL寿命が変化し、pHが高くなるに従い寿命が長くなることが示されている。

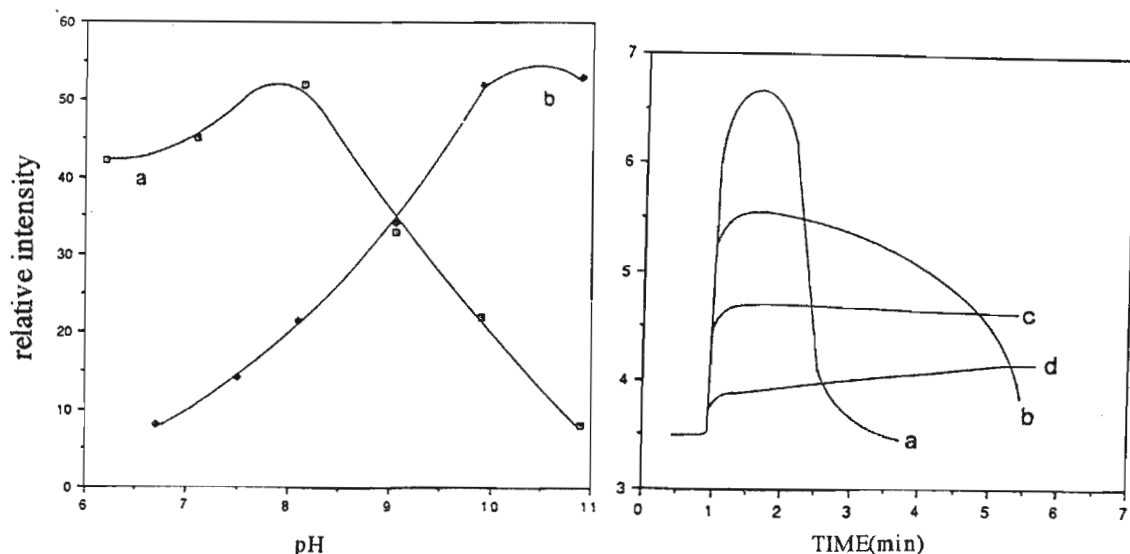


Fig.4-1 Effect of pH on the luminescence intensity: (a) in micellar CTAB solution; (b) in aqueous buffer solution.

Fig.4-2 Dependence of the decay of the luminescence signal on pH: (a) phosphate buffer (pH8.1); (b) borax buffer (pH9.05); (c) borax buffer (pH9.9); (d) borax buffer (pH10.9).

ルミノール自体は疎水性が高いためCTABミセルに可溶化されており、酵素反応により生じた過酸化水素との反応はミセル界面で行われ、この系でのミセルはルミノール反応に対する場を提供していると考えられる。詳細なミセル効果については本論には述べていないが、CTABの陽イオン親水基と親水基周辺の水分子との静電相互作用による分極のために、ミセル界面では塩基性が局所的に増加することが、至適pHを酸性側にシフトさせる主たる原因であろう。またその結果、ミセル界面でのルミノール反応の中間体である四員環ペルオキシドイオン生成、あるいは発光種である励起状態の3-アミノフタル酸アニオンの生成の促進などによる反応性の増加が考えられる。

(2) 過酸化脂質の定量[11]

ウミホタル (Cypyridina) ルシフェリン類似化合物であるCLAを発光物質として用いた種々の過酸化脂質の定量が検討されている。この発光反応は、二価鉄により過酸化脂質 (ROOH) が還元分解され、生成したアルコキシラジカル (RO·) とCLAとの反応による励起状態のCLA酸化体 (CLA<sub>ox</sub><sup>\*</sup>) が生成して発光するというものである。

[Scheme of CLA CL reaction]

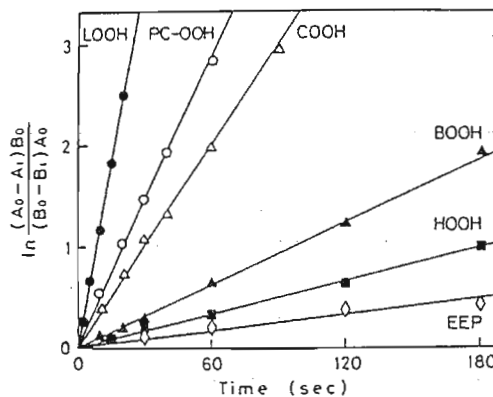
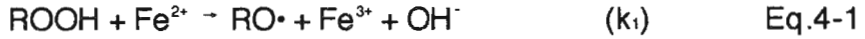


Fig.4-3 Second-order kinetic plots of the oxidation of Fe<sup>2+</sup> by peroxides in SDS micelles

A<sub>0</sub>, A<sub>t</sub>, B<sub>0</sub>, and B<sub>t</sub> represent the concentrations of peroxides and FeSO<sub>4</sub>, respectively, at times zero and t.

このCL反応を陰イオン界面活性剤ミセル (ドデシル硫酸ナトリウム: SDS) 溶液中で行わせると強いCL応答が得られるのに対して、陽イオン界面活性剤ミセル (臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム: TTAB) ではほとんどCL応答が得られない。また、SDSミセルではRO·のESR応答が得られるのに対してTTABミセルではその応答はほとんど得られない。種々の酸化脂質に対して、CL応答値の高いものほどEq.4-1の二分子反応速度定数 (k<sub>1</sub>) が大きい。この場合のミセル効果はFig.4-4に示される反応基質の可溶化位置で説明される。過酸化脂質はSDSミセルに可溶化され、その親水性OOH基をミセル界面に向けている。一方、ミセル親水部との静電的相互作用により二価鉄イオンのミセル界面での局所濃度が高くなる。この結果、RO·の生成が促進され、またCLAもミセルに可溶化されているため、これらの基質によるCL反応が有効に促進されると

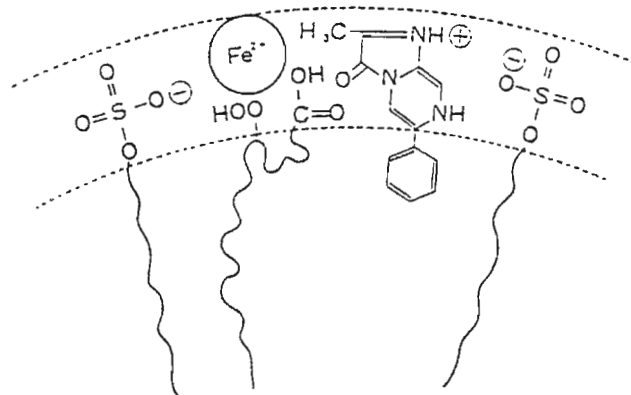


Fig. 4-4 Diagram of localization of chemiluminescence reactants, CLA, Linoleic acid hydroperoxide and Fe<sup>2+</sup>, in the surface region of SDS micelles.

### 逆ミセルを用いたCL計測

#### (3) L-アミノ酸の定量[17]

逆ミセル中に酵素を取り込むことにより有機溶媒中での酵素活性を保つことができ、有機溶媒系の反応に酵素を利用できる。ルミノール反応をCTAB逆ミセル溶液中（クロロホルム、シクロヘキサン混合溶媒）で行うと、通常の水溶液系では触媒の存在無しでは発光がほとんど認められない温和なpH領域（pH 7.8-9.1）で反応が進行する。そこで、逆ミセル中にL-アミノ酸オキシダーゼを可溶化し、酵素反応の結果生成した過酸化水素をルミノール反応により検出するL-アミノ酸の定量が報告されている。

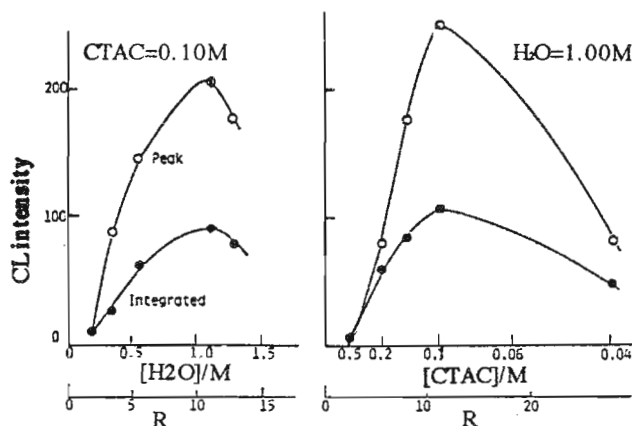


Fig. 4-5 Dependence of the CL intensity upon the R value (i.e., [H<sub>2</sub>O]/[CTAC]).

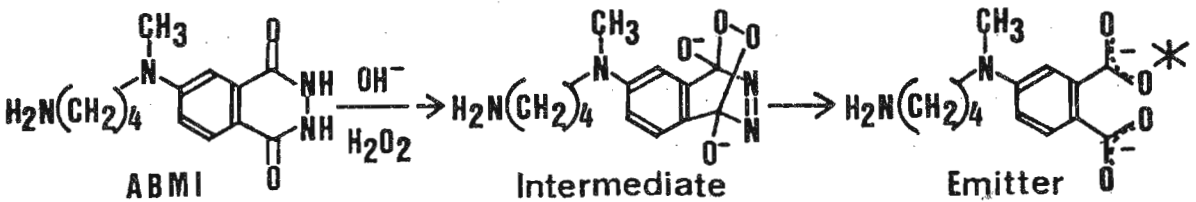
Conditions were [luminol]=1.96x10<sup>-5</sup>M, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=6.40x10<sup>-4</sup>M, pHw9.00 (0.10M borate), delay time 5 s, and run time 30 s (for integrated signal).

この系では、アミノ酸、酵素は逆ミセルの内水相中に存在し、そのためルミノール反応は、ミセル親水基周辺の界面でおこる。CTAC逆ミセルによるルミノール反応の至適pHの酸性側へのシフトは、CTACの親水性頭部の正電荷のための水の分極により、親水基界面領域の塩基性が増加するためと考えられている。逆ミセルの反応場としての物性を考えるときの重要なパラメーターである $W_0$ 値 ( $=[\text{H}_2\text{O}]/[\text{CTAC}]$ : ミセルサイズを決定する) は、ルミノール化学発光強度に大きく依存し $W_0=11.1$ で最もCL強度が高くなっている。

### シクロデキストリン (CD) を用いたCL計測

#### (4) イソルミノール化学発光[28]

アミノイソブチルイソルミノール (ABI 誘導体) は、高感度な化学発光イムノアッセイ試薬である。その中のアミノブチルエチルイソルミノール (ABMI I) の化学発光強度が $\beta$ -CD溶液中で増幅されることが報告されている。



Scheme of ABMI CL reaction.

ABMIのCL強度は、種々の水溶液中での $\beta$ -CD濃度に依存している。しかし、あるCD濃度でCL強度は最大値となりある値より高い濃度では、CL強度は減少してゆく。一方、発光種であるフタル酸ジアニオン ( $\text{P}^{2-}$ ) の蛍光強度は、CD濃度の増加と共に増加しある濃度以上で一定になる。この蛍光強度の増加は $\text{P}^{2-}$ がCDに包接されていることを示している。これらより、CDによるCL増幅の効果は、発光種のCDによる蛍光強度の増加だけではなく、発光中間体の生成過程に影響していると考えられる。

CL強度 ( $I_{\text{CL}}$ ) は、反応に参与したABMI分子数 ( $N$ ) と反応中間体の生成収率 ( $\phi_{\text{ES}}$ ) と発光種の蛍光量子収率 ( $\phi_{\text{FL}}$ ) の積で表される。

$$I_{\text{CL}} = N \cdot \phi_{\text{ES}} \cdot \phi_{\text{FL}}$$

Fig.4-7から、 $\beta$ -CDは $\phi_{\text{FL}}$ より $N \cdot \phi_{\text{ES}}$ の項に影響していることがわかる。

また、NはCD濃度に関係とすると、ここでの反応場としてのCDは、 $\phi_{es}$ すなわちCL反応の反応中間体の生成過程に大きく影響していることが示唆されている。

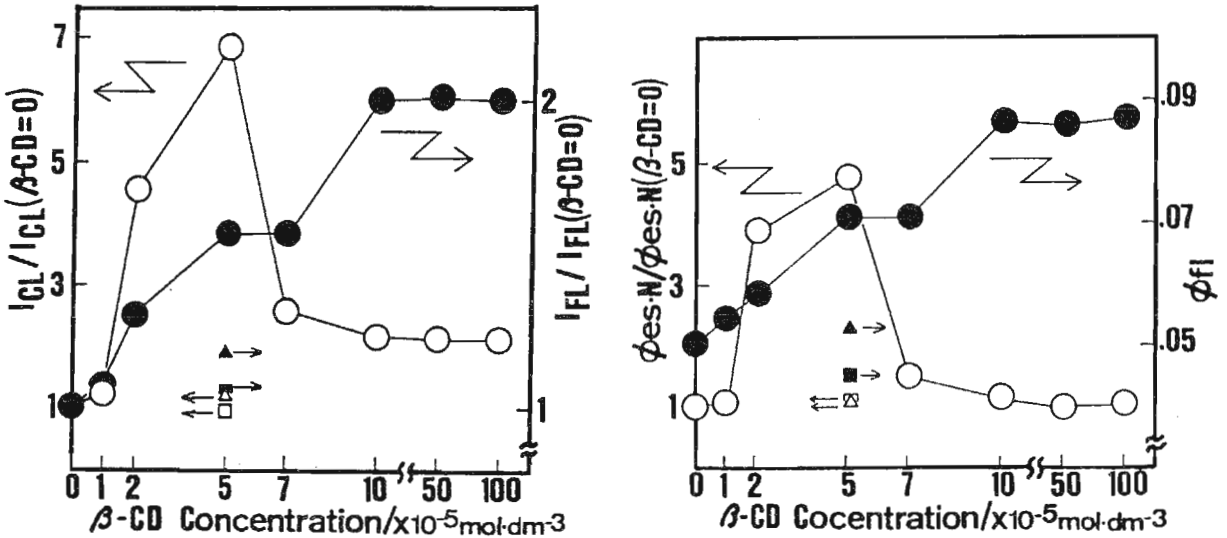


Fig. 4-6 Relationship between the chemiluminescence intensity ( $I_{cl}$ ), the fluorescence intensity ( $I_{fl}$ ) and  $\beta$ -CD concentration.  $\Delta$ :  $\alpha$ -CD,  $\square$ :  $\gamma$ -CD

Fig. 4-7 Relationship between the product  $\phi_{es}N$ ,  $\phi_{fl}$  and  $\beta$ -CD concentration,  $\Delta$ :  $\alpha$ -CD,  $\square$ :  $\gamma$ -CD

### 高分子電解質を利用するCL計測

#### (5) 水可溶性高分子中のルミノール化合物のCL[31]

ルミノール反応を血清アルブミン (BSA) 及びポリエチレンジアミン (PEI) の水溶性高分子 (WSP) 溶液で行うと、これらのCL強度が大きく増幅されることを見だし、CL反応に対するWSPの効果について検討している。

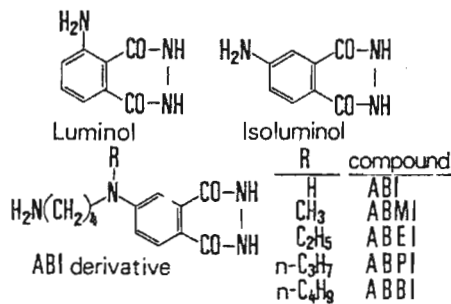


Fig. 4-8 Chemical structures of luminol and its analogs

CL強度はWSP濃度の増加にしたがって増加し、WSPを添加しないものと比較してBSAで約300倍、PEIで10倍以上の増幅率が得られている。230 nmの吸収スペクトルの長波長側へのシフトから、ルミノール化合物の陰イオン体は、WSPの疎水性領域に結合していることが示唆された。

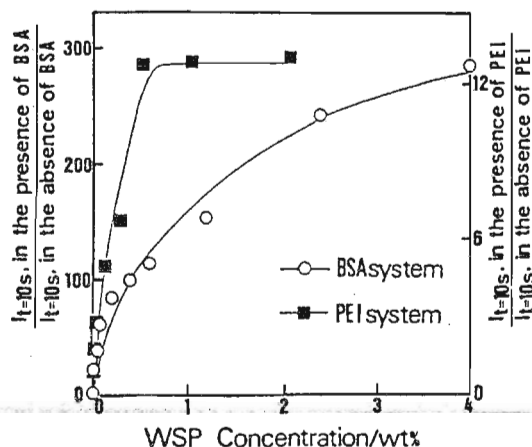


Fig. 4-9 Effects of BSA and PEI on the initial Chemiluminescence intensity

[Luminol]= $8 \times 10^{-5}$  M in 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]=0.1$  M,  $[\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8]=2.5 \times 10^{-4}$  M, [BSA]=0.1 wt%, [PEI]=0.1 wt%

また、Table 4-2からわかるように、BSAは各ルミノール化合物に対する $\phi_{\text{FL}}$ にはほとんど影響していない。これは、反応中間体生成収率 $\phi_{\text{ES}}$ の増加に寄与していることを示唆している。

Table 4-2 Effect of BSA on  $\Phi_{\text{FL}}$  and on CL intensity(I).  $\Phi_{\text{FL,BSA-free}}$ , and  $\Phi_{\text{FL,BSA}}$ , and initial I ratio

Compound <sup>a)</sup>	$\phi_{\text{FL,BSA-free}}$	$\phi_{\text{FL,BSA}}$ <sup>b)</sup>	$I_{\text{BSA}}/I_{\text{BSA-free}}$ <sup>c)</sup>
Luminol	0.16	0.17	66.7
Isoluminol	0.034	0.030	40.3
ABI	0.040	0.050	5.3
ABMI	0.053	0.045	10.3
ABEI	0.044	0.043	9.7
ABPI	0.038	0.043	4.5
ABBI	0.039	0.040	5.5

a) [Compound]= $1.6 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  in 0.1 mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . b) [BSA]=0.10 wt%. c) I in the presence of BSA to I in the absence of BSA at 10 s after the initiation of the reaction.

一般に、イソルミノールのアミノ基に電子供与基を導入すると $\phi_{\text{ES}}$ が大きくなることより、BSAによるCL増幅の効果は、BSA分子中の多くの塩基性基のた

めにルミノール化合物の分子内CIEEL(chemically induced electron exchange luminescence) 機構が有利となるためと考察している。

#### 4.2 分子集合体を利用するフローCL計測例

##### ミセル系

(1) フルオレセイン増感CL系による銅イオンの定量(循環式フロー法) [15]

$\beta$ -ニトロスチレンは $\text{Cu}^{2+}$ 触媒存在下フルオレセイン色素を含んだアルカリ性のCTABミセル溶液中で化学発光する。そこで、このCL反応系により $\text{Cu}^{2+}$ の高感度、高選択的な定量を行うための循環式フロー法を提案している。

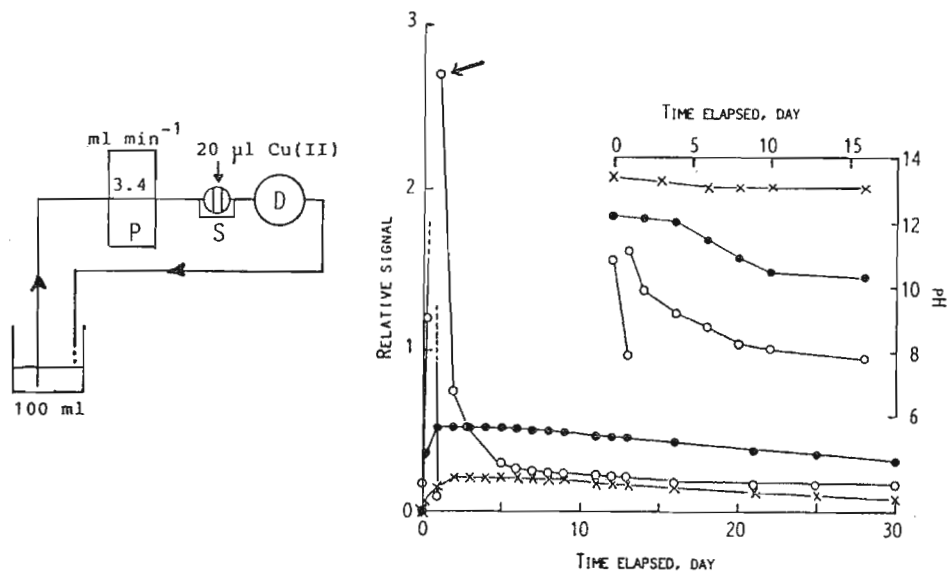


Fig. 4-10 Diagram of the cyclic flow-injection system with chemiluminescence detection

Fig. 4-11 Effect of age of reagent solution on the relative signal for copper.

[NaOH]: (○)  $1 \times 10^{-3}$  M, (●)  $1 \times 10^{-2}$  M, (×)  $1 \times 10^{-1}$  M. Other conditions as in Fig. 4-10

Fig. 4-10のようなフロー系で、 $\beta$ -ニトロスチレン、水酸化ナトリウム、フルオレセインを含んだCTABミセル水溶液を反応溶液としてフロー系を循環させる。注入された $\text{Cu}^{2+}$ 水溶液(20 $\mu\text{l}$ )は試薬とのCL反応後、再び反応溶液中に送られ大過剰に存在している水酸化ナトリウムと反応し水酸化銅として沈澱する。そのため、フロー系中に導入された銅イオンは、常に反応溶液中で回収されることになる。この循環式フロー法では、安定した(繰り返し再現性の良い)CL応答を得るためには、試薬の安定性が重要となる。Fig. 4-11に示されるように水酸化ナトリ



ウムの濃度が最もその安定性に効いている。水酸化ナトリウム濃度が低いと安定性が悪くなり、濃度が高いとCL感度が低くなる。Fig.4-10に示す条件で $1 \times 10^{-6}$  Mの $\text{Cu}^{2+}$  (20 $\mu\text{l}$ ) 試料溶液の注入750回までは、CL応答に変化がなくまた、次の250回までは最初のCL応答値の90%と安定な定量が行えることが示されている。このCL反応機構については明確にはわかっていないが、種々の活性酸素消光剤によるCL応答の変化より、スーパーオキシドイオン ( $\text{O}_2^-$ ) 生成が関与したフルオレセイン色素増感CLが示唆されている。

## (2) FMN増感CL (クロムイオンの定量) [12]

$\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{6+}$  の存在下でフラビンモノヌクレオチド (FMN) は過酸化水素により酸化されて化学発光する。水溶液系では $\text{Cu}^{2+}$  による発光が最も強いが、陽イオンミセル溶液中ではそのCL強度が20-50倍弱められるが、 $\text{Cr}^{6+}$  では両溶液系共ほぼ同じ (0.5-1.3倍) CL強度を与える。

Table4-3 Effect of cationic micelles on the signal for Cr(VI) and Cu(II) in the FMN chemiluminescence systems

Surfactant <sup>b</sup>	Concentration <sup>c</sup> ( $10^{-2}$ M)	Relative signal <sup>d</sup>		Signal ratio <sup>d</sup> Cr(VI)/Cu(II)	Relative fluorescence intensity of FMN
		Cr(VI) <sup>e</sup>	Cu(II) <sup>e</sup>		
None		100 (110)	2500 (1900)	0.04 (0.06)	1.0
TTAB	5.0 (0.35)	51	90	0.6	0.36 (1.2) <sup>f</sup>
TDBAC	0.4 (0.037)	130 (85)	110 (70)	1.2 (1.2)	0.70
HTAB	2.0 (0.09)	56	71	0.8	0.44 (0.94) <sup>f</sup>
HEDAB	2.0	43	86	0.5	0.43
HPC	0.9 (0.09)	47	54	0.9	0.81 (0.53) <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Flow system and conditions as in previous work [9]. <sup>b</sup> TTAB = tetradecyltrimethylammonium bromide; TDBAC = tetradecyldimethylbenzylammonium chloride; HTAB = hexadecyltrimethylammonium bromide; HEDAB = hexadecylethylidimethylammonium bromide; HPC = hexadecylpyridinium chloride. <sup>c</sup> Values in parentheses are critical micelle concentrations. <sup>d</sup> Values in parentheses are in the absence of phosphate buffer. <sup>e</sup> 20- $\mu\text{l}$  injection of  $10^{-4}$  M solution. <sup>f</sup> For chloride counter ion. <sup>g</sup> For bromide counter ion.

ミセル溶液系では、FMN分子はその疎水性部分をミセル内部に入れた形で可溶化され、CL反応はミセル界面でおこっている。銅イオンの場合は陽イオンミセル界面との静電的反発のためCL反応性が低くなり、一方クロムはクロム酸塩アニオンの形で存在しているためCL反応に有利になっていると考えられている。ミセル溶液におけるFMNの蛍光強度はいずれも水溶液のものと較べて小さくなっている。これは、各界面活性剤のカウンターイオン ( $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ ) による動的蛍光消光のためで、特に臭素イオンによる消光が強い。

そこで、TDBAC (塩化テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム) ミ

セルを選びクロムイオンのフロー定量を行った。また、 $\text{Cr}^{3+}$ （ピーク高さ）に対するCL応答は $\text{Cr}^{6+}$ の約50%である。そのため、 $\text{Cr}^{3+}$ を過酸化水素により酸化し $\text{Cr}^{6+}$ にするための反応コイルをフロー系中に設けることにより同等のCL応答（ピーク面積）を与えるようにし、全クロム（ $\text{Cr}^{3+}$ および $\text{Cr}^{6+}$ ）に対する高感度な定量を行っている。

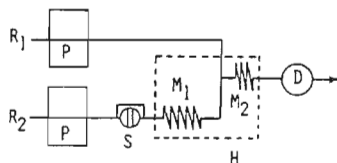


Fig. 4-12 Schematic flow diagram of the flavin mononucleotide chemiluminescence system

### ベシクル系

#### (3) エオシンY増感CL（水素イオン定量）[24]

キサントゲン系の色素であるエオシンY、水酸化ナトリウム、水素イオンを、臭化ジドデシルジメチルアンモニウム（DDAB）ベシクル溶液中で反応させると化学発光する。この反応を利用して、フロー法による微量水素イオンの定量が報告されている。このCL反応機構は解明されていないが、アルカリ溶液中での種々の活性酸素が生成（例えば $\text{O}_2^-$ ）し、そのラジカルアニオンが水素イオンとの反応に関与していると考えられる。Table 4-4には、本CL反応をミセル、ベシクル溶液中で行わせたときに得られるCL相対強度が示されている。いくつかのミセル系でもCL応答は見られるが、DDABベシクルは最も大きな応答を与えている。

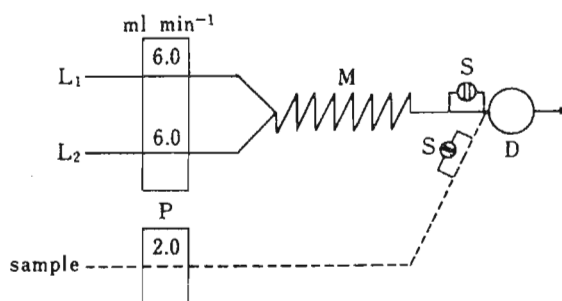


Fig. 4-13 Schematic diagram of the flow system for hydrogen ion determination

本CL系では種々の金属イオンに対しても若干正のCL応答を示す。そこでテトラエチレンペンタミン等のキレート化合物を添加することによりそれら金属イオ

ンによる干渉を抑えている。Fig.4-13に示すフロー系において $6 \times 10^{-6} \text{M}$ - $4 \times 10^{-3} \text{M}$ の範囲で水素イオンの選択的定量が行なわれている。

Table 4-4 Effect of Surfactants on the CL intensities of hydrogen ion

Surfactant ( $3 \times 10^{-3} \text{M}$ )	Relative molar CL intensity, %	Surfactant ( $3 \times 10^{-3} \text{M}$ )	Relative molar CL intensity, %
Cationic		Anionic	
DDAB <sup>a)</sup>	100	SDS <sup>g)</sup>	0
MTAB <sup>b)</sup>	13	Non-ionic	
STAC <sup>c)</sup>	13	Brij-35	20
CTAB <sup>d)</sup>	7	Tween 80 <sup>h)</sup>	0
CTAC <sup>e)</sup>	0	None	0
CEDAB <sup>f)</sup>	0		

a) didodecyldimethylammonium bromide (bilayer vesicle);  
 b) tetradecyltrimethylammonium bromide (micelle); c) octadecylammonium chloride (micelle); d) hexadecyltrimethylammonium bromide (micelle); e) hexadecyltrimethylammonium chloride (micelle); f) hexadecylethyl-dimethylammonium bromide (micelle); g) sodium dodecylsulfate, h) 0.1% solution. Condition : as in Fig. 1 except for concentration of surfactant.

#### (4) フェニルピルビン酸 (PPA) の定量[23]

PPAはコバルトイオンの存在下アルカリ性溶液中で酸化され化学発光する。

Table4-5 Effects of reaction media of the CL signal for PPA

medium	concn <sup>b)</sup>	CL signal <sup>c)</sup>
water		ND <sup>d)</sup>
methanol		0.6
acetonitrile		1.0
acetone		1.5
dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB)	50 (16)	2.1
didodecyldimethylammonium bromide (DDDAB)	0.6 (0.18)	56
tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB)	11 (3.5)	0.7
tetradecyldimethylbenzylammonium chloride (TDBAC)	1.1 (0.37)	1.0
hexadecyltrimethylammonium chloride (HTAC)	3 (0.9)	34
hexadecylpyridinium chloride (HPC)	3 (0.9)	0.7
hexadecylethyldimethylammonium bromide (HEDAB)	3	56
octadecyltrimethylammonium chloride (OTAC)	1 (0.34)	29
dioctadecyldimethylammonium chloride (DODAC)	1	150
sodium dodecyl sulfate (SDS)	24 (8)	ND
polyoxyethylene(23)dodecanol (Brij 35)	0.2 (0.06)	ND

<sup>a)</sup>Mixing order:  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  PPA+ $1 \times 10^{-2} \text{M}$  NaOH+medium+ $1 \times 10^{-4} \text{M}$  Co(II). <sup>b)</sup> $10^{-3} \text{M}$  (values in parentheses show critical micelle concentration). <sup>c)</sup>Normalized with respect to the signal (=1.0) when the reaction medium is acetonitrile. <sup>d)</sup>Not detected.

Table4-5にはこのCL反応に及ぼす反応場の影響を示してある。塩化ジオクタデシルジメチルアンモニウム (DODAC) ベシクル溶液は、このCL反応場として著しく有効であり、アセトニトリル均一溶媒中のものと較べて約150倍大きなCL応答を与えている。ミセル、ベシクルを含めて陽イオン界面活性剤は、すべてCL応答を与えている。

PPAはそのアニオン、あるいはジアニオンがこのCL反応に関与していると考えられ、ミセル、ベシクルが作る正電荷の界面はこのCL反応に有利な場を与えると解釈できる。

このCL強度の減衰を一次反応と仮定し発光量子収量 ( $\phi_{cl}$ )、反応速度定数 ( $k$ ) の定量的解析を試みている。その結果、CL反応におけるDODACベシクルの効果は主に  $\phi_{cl}$  の増加に寄与していることが示されている。

Table4-6 Effects of DODAC bilayer membranous aggregates and Co(II) catalyst on the present CL reaction

CL system <sup>b</sup>	CL parameter		
	$k, s^{-1}$	$\Phi_{CL}^c$	$I_{max}^c$
PPA + H <sub>2</sub> O + <i>t</i> -BuO <sup>-</sup> /DMSO <sup>d</sup>	1	1	1
PPA + Co(II) + <i>t</i> -BuO <sup>-</sup> /DMSO	0.02	70	1.4
PPA + Co(II) + OH <sup>-</sup> /DODAC	0.03	840	25
PPA + Co(II) + OH <sup>-</sup> /OTAC	0.03	210	6.3

<sup>a</sup>Based on batch experiments. CL decay curve:  $I_t = \Phi_{CL}k \cdot [PPA]_0 \exp(-kt)$ ,  $I_{max} = \Phi_{CL}k[PPA]_0$ . <sup>b</sup>DMSO was used as the homogeneous medium because of no light emission in aqueous medium. Each of the reagent solutions ( $10^{-4}$  M PPA,  $10^{-4}$  M Co(II),  $10^{-2}$  M alkali,  $10^{-3}$  M surfactant) was mixed in that order, as PPA emitted light without Co(II) in the *t*-BuO<sup>-</sup>/DMSO medium. <sup>c</sup>Normalized with respect to the value (=1) for the CL system, PPA + H<sub>2</sub>O + *t*-BuO<sup>-</sup>/DMSO. <sup>d</sup>Potassium *tert*-butoxide/dimethyl sulfoxide.

本CL系でのフロー法により、定量下限 $1 \times 10^{-7}$ M、相対偏差3.1%で高感度、高選択的なPAAの定量が行われ、尿中 $10^{-5}$ MレベルのPAAの定量が行われている。

### 逆ミセル系

#### (5) ヨウ素の定量[18]

水溶液中のヨウ素の定量法としてルミノールCL法が報告されている。しかしながら、水溶液系ではpHや濃度によってヨウ素がI<sub>2</sub>、IOH、I<sup>-</sup>、I<sup>3-</sup>等の形をとり、またアルカリ性溶液中で不可逆なヨウ素塩を形成するなどの短所がある。そこで、ヨウ素 (I<sub>2</sub>) を逆ミセル中に抽出しその内水相中でルミノールとのCL反応

を行わせ定量する方法が提案されている。

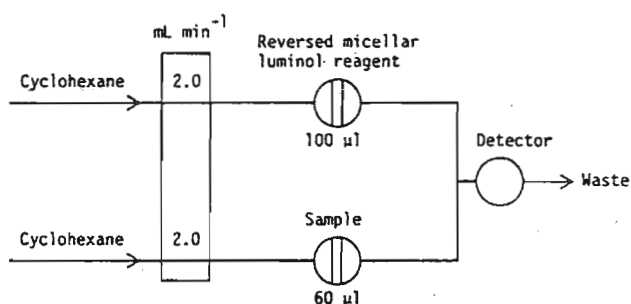


Fig. 4-14 Flow diagram for the determination of iodine with CL detection

シクロヘキサン-クロホルム溶媒中で形成させたCTAC逆ミセル中にルミノール水溶液 (pH11.5) を可溶化させ ( $W_0=[\text{H}_2\text{O}]/[\text{CTAC}]=10.1$ )、Fig.4-14に示すフロー系に注入する。また、もう一方の注入バルブからシクロヘキサン溶媒に溶解させた $\text{I}_2$ 試料を、両液がDでうまく混合するように注入してCLを測定する。ヨウ素の吸収スペクトルの測定より逆ミセル内水相中では $\text{I}^3$ と $\text{IO}^-$ の形で存在していることがわかる。 $\text{I}_2$ は水 (pH11.5) にはほとんど溶解しない。逆ミセルの内水相への $\text{I}_2$ の取り込みの効果は、内水相中の $\text{OH}^-$ イオンの活量の増加に伴う脱2水和過程に帰されると考えられる。本CL系を利用したフロー法により定量下限 $2 \times 10^{-10} \text{M}$ でヨウ素の定量が行えることが示されている。この報告は逆ミセルを用いることにより定量目的成分を選択的にその内水相中に取り込み (抽出、分離) 同時に内水相中で検出 (化学反応場としての利用) することを狙ったものである。

#### (6) シッフ塩基CL (アミノ化合物の定量) [21]

第一アミノ化合物はカルボニル化合物と脱水縮合反応により電子豊富なシッフ塩基を形成する。このシッフ塩基は過酸化水素と二価鉄とによるフェントン酸化により発光する。このCL反応系を用いると一連の第一アミノ化合物の選択的定量が行える。第一アミノ酸とのシッフ塩基生成は、AOT (ビス(2エチルヘキシル)スルホコハク酸塩: Aerosol OT) 逆ミセル溶液中で著しく促進される。

AOT逆ミセル中では内水相中にはアミノ酸、またミセル疎水性領域にはフェニルアセトアルデヒド (PAA) が存在し、AOT親水性基界面でシッフ塩基反応は起こっていると考えられる。また、シッフ塩基生成速度をその蛍光強度から解析すると正反応 (シッフ塩基生成) 速度定数は、 $W_0=10$ 付近より小さくなる

と急激に大きくなることがわかる。AOT逆ミセルは $W_0=7-8$ でマイクロエマルジョンと逆ミセルの境界があり、この点からミセル物性が急激に変わることが報告されている[34]。

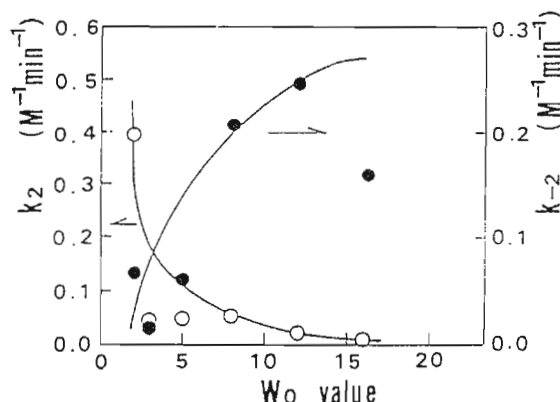


Fig.4-15 Rate constants,  $k_2$  and  $k_{-2}$ , as a function of  $W_0$

AOT逆ミセルの Schiff 塩基生成に対する効果としては、内水相中に可溶化しているアミノ酸分子（両性イオンとして存在）のアミノ基がAOT親水基の陰イオンとの静電相互作用により分極し、求核性が増加しているためと考えられる[35]。

アミノ酸混合試料分析には高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等による分離手段が必要であるが、本CL法とHPLCとの結合を行う前段階としてフロー法による各種アミノ酸の定量法を検討している。

Table4-7 Effects of Schiff base formation media

Amino compound	Concentration (M) <sup>c</sup>	Relative CL intensity <sup>b</sup>				
		Methanol	Normal micelle			Reverse micelle: AOT <sup>g</sup> (10 <sup>-1</sup> M)
			Brij-35 <sup>d</sup> (10 <sup>-2</sup> M)	SDS <sup>e</sup> (10 <sup>-2</sup> M)	CTAC <sup>f</sup> (10 <sup>-2</sup> M)	
<i>n</i> -Hexylamine	1.00 × 10 <sup>-4</sup>	100.0	n.d. <sup>h</sup>	0.9	n.d.	3.2
Isopropylamine	9.95 × 10 <sup>-5</sup>	138.2	n.d.	n.d.	6.0	1.8
Alanine	1.03 × 10 <sup>-4</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.9	11.4
Phenylalanine	1.01 × 10 <sup>-4</sup>	n.d.	n.d.	0.9	36.9	137.3

<sup>a</sup> Each Schiff base was prepared by incubating each amino compound and 0.01 M PAA for 60 min at 60 °C. <sup>b</sup> Intensities compared with that of *n*-hexylamine in methanol (= 100). <sup>c</sup> Based on final concentration of amino compounds accounting for all dilutions. <sup>d</sup> Polyoxyethylene (23) lauryl ether. <sup>e</sup> Sodium dodecyl sulphate. <sup>f</sup> Hexadecyltrimethylammonium chloride. <sup>g</sup> [H<sub>2</sub>O]/[AOT] ratio ( $w_0$ ) = 5.6. <sup>h</sup> No detectable intensity.

## イオン交換樹脂

### (7) アドレナリンの定量[33]

触媒を固定化したイオン交換樹脂をCL反応場としたCLセンサーの開発が行われている。アドレナリンは、強塩基性水溶液中で溶存酸素により酸化され化学発光する。このCL反応は、DODAC（塩化ジオクタデシルアンモニウム）二分子ベシクル溶液で行うと約1000倍、また $Mn^{2+}$ 触媒により更に40倍CLが増感される。そこで、各種のイオン交換樹脂あるいはその樹脂上に界面活性剤やMn(III)-ポルフィリン錯体を固定化し、これをアドレナリンCL反応場としたCLセンサーの開発を行っている。イオン交換樹脂自体のCL反応に対する効果では、陰イオン交換樹脂がCL増感効果を示し、特に強塩基性イオン交換樹脂ではその効果は大きい。これは強塩基性イオン交換樹脂が、局所的に疎水性場と共に塩基触媒としての場を提供しているためと考えられる。次に、強塩基性イオン交換樹脂に界面活性剤を固定化することによる増感効果を検討したところ、陰イオン界面活性剤（ジヘキサデシルリン酸ナトリウム）を吸着させた場合樹脂だけのものと比較して約3倍CL増感が認められた。

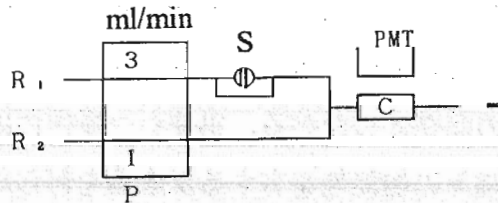


Fig.4-16 Schematic diagram of flow system

R<sub>1</sub>: H<sub>2</sub>O, R<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O or 1M NaOH, P: peristaltic pump, S: sample injector(20 $\mu$ l)  
C: Pyrex tube (5x26 mm) packed with ion-exchange resin, PMT: photomultiplier tube

しかしながら、これら樹脂上に固定化されている界面活性剤は、二分子膜特有の相転移点は観測されず、きちんと樹脂上に配向されて固定化されていないものと考えられる。また、 $Mn^{2+}$ を強塩基性イオン交換樹脂上に固定化するために、Mn(III)-ポルフィリン錯体を用いてCL増感効果を検討している。樹脂のみの場合と比較すると7.6倍の増感効果を示した。これらの結果より、Mn(III)-TPPS<sub>4</sub>(テトラキス(4-スルホホトフェニル)ポルフィリン)を強塩基性イオン交換樹脂 (IRA-410)に固定化したものをCLセンサー素子とした、Fig.4-16のようなフロー系によるアドレナリンの定量を行っている。

## 5. おわりに

種々の機能を発現する微視的不均一溶液のほとんどは、光学的に透明でありCL、蛍光、りん光等の分光学的計測に適している。しかしながら、微視的不均一溶液を利用したCL反応の研究は、始まったばかりでその報告例もまだ少ない。その中では、ミセル、ベシクル等の分子集合体を用いたものは、その分子集合体自身の物理化学的性質に関する研究が多くなされるためにCL計測の利用例は比較的多い。CL反応における微視的不均一溶液の効果としては、反応分子や反応中間体などの溶解性あるいは安定性の増加、効率のよいエネルギー移動、蛍光量子収量の増加、反応過程の変化によるCL量子収率の増加等によるCL反応性の促進（高感度化）、あるいは妨害物質の除去（隔離）による選択性の向上やCL応答の直線領域の増加等による分析性能の向上などが挙げられる。CL反応は一般に反応系が複雑なため、反応場の効果の解明は困難であるが、より効果的なCL反応場の構築のためにもこの方面の検討を精力的に行う必要があるだろう。また、種々の感応基を有した分子からなる微視的不均一系の開発により、さらにその機能性を増した反応場の構築も興味のあるところである。これはいわゆる高感度、高選択性CLセンサーの開発につながる。迅速かつ操作性に優れたFIA法に応用するためにも、これら種々の機能性を有する反応場を何らかの担体（表面）に固定化することが必要になる。また、微視的不均一系を形成するものとして、Langmuir-Blodgett膜、クラウンエーテル、ゼオライト、イオン交換膜等があるが、これらのCL反応場への利用は現時点ではあまりなされていないようである。しかしながら、これらの微視的不均一系はCL反応場として今後さらに利用、展開されていくものと考えられる。

## 6. 文献

- 1) 表 美守, 有機合成化学, 26, 464(1968)
- 2) 本田 一匡, 化学工業資料, 22, 111(1987)
- 3) 今井 一洋編集, 「生物発光と化学発光—基礎と実験」, 廣川書店(1989)
- 4) K. Kalayasundram, "Photochemistry in Microheterogeneous systems", Academic Press(1987)
- 5) 妹尾 学, 木瀬秀夫訳(J.H.Fendler, E.J.Fendler著), 「分子集合体とその触媒作



- 用」, 講談社(1978)
- 6) W. L. Hinze, N. Srinivasan, T. K. Smith, S. Igarashi, H. Hoshino, "Organized Assemblies in Analytical Chemiluminescence Spectroscopy: An Overview" in "Advances in Multidimensional Luminescence" Ed. by I. M. Warner et al. JAI Press(1990)
  - 7) 日本化学会編, 化学総説No.40, 「分子集合体—その組織化と機能」学会出版センター(1983)
  - 8) H. Kunieda, et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 147, 286(1991)
  - 9) H. Kunieda, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1051(1991)
  - 10) S. Igarashi, W. I. Hinze, *Anal. Chim. Acta*, 225, 147(1989)
  - 11) K. Fukuzawa, et al., *Chem. Phys. Lipids*, 48, 197(1988)
  - 12) H. Ohshima, et al., *Anal. Chim. Acta*, 232, 385(1990)
  - 13) T. Kamidate, et al., *Anal. Sci.*, 6, 645(1990)
  - 14) M. S. Abdel-Latif, G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, 221, 11(1989)
  - 15) M. Yamada, S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 193, 337(1987)
  - 16) A. J. W. G. Visser, J. S. Santema, "Analytical Applications of Bioluminescence and chemiluminescence" Ed. by L. J. Kricka, et al., p. 559, Academic Press(1984)
  - 17) H. Hoshino, W. L. Hinze, *Anal. Chem.*, 59, 496(1987)
  - 18) T. Fujiwara, et al., *Anal. Chem.*, 61, 2800(1989)
  - 19) Imdadullah, T. Fujiwara, T. Kumamaru, *Anal. Chem.*, 63, 2348(1991)
  - 20) R. B. Thompson, S. E. Shaw McBee, *Langmuir*, 4, 106(1988)
  - 21) J. Hayashi, M. Yamada, T. Hobo, *Anal. Chim. Acta*, 247, 27(1991)
  - 22) K. Matsue, M. Yamada, T. Suzuki, T. Hobo, *Anal. Lett.*, 22, 2445(1989)
  - 23) M. Kishida, Y. Makita, T. Suzuki, M. Yamada, T. Hobo, *Anal. Chem.*, 63, 2301(1991)
  - 24) 石井幹太, 大久保直子, 馬場民恵, 山田正昭, 鈴木繁喬, *分析化学*, 38, 53(1989)
  - 25) M. Yamada, S. Kamiyama, S. Suzuki, *Chem. Lett.*, 1597(1985)
  - 26) X. X. Qian, Y. Y. Guo, M. Yamada, S. Suzuki, *Talanta*, 36, 505(1989)
  - 27) M. Ishii, M. Yamada, S. Suzuki, *Anal. Lett.*, 19, 1591(1986)
  - 28) H. Karatani, *Chem. Lett.*, 377(1986)
  - 29) T. E. Riehl, C. L. Malehorn, W. L. Hinze, *Analyst*, 111, 931(1986)
  - 30) C. L. Malehorn, T. E. Riehl, W. L. Hinze, *Analyst*, 111, 941(1986)
  - 31) H. Karatani, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, 2023(1987)
  - 32) H. Karatani, *Chem. Lett.*, 1959(1987)
  - 33) 吉村太志, 鈴木剛彦, 山田正昭, 保母敏行, *分析化学*, 41, 191(1992)
  - 34) 第3回コロイドおよび界面化学特別討論会、講演要旨集p.51(1988)
  - 35) J. Hayashi, M. Yamada, T. Hobo, *Anal. Chim. Acta*, 266, 359(1992)