

Title	ルミノールとルシゲニンの化学発光の機構と反応条件
Sub Title	Mechanism and condition of the chemiluminescence of Luminol and Lucigenin
Author	大場, 茂(Oba, Shigeru) 向井, 知大(Mukai, Tomohiro)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2010
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of the natural science). No.48 (2010. 9) ,p.31- 57
JaLC DOI	
Abstract	慶應義塾大学日吉キャンパスにおける文系学生を対象とした化学実験のテーマの1つに、ルミノールとルシゲニンの化学発光に関する実験がある。しかし、反応条件（溶媒、pH の範囲、酸化補助材など）について不明な点があった。そこで文献検索を行って反応機構の要点をまとめ、実験操作を見直すことにした。ルミノールの発光については、溶媒がDMSO（ジメチルスルホキシド）のときには酸化補助剤が不要であるが、水溶液のときには必要である。これは、アルカリ条件下でDMSO 中ではルミノールがジアニオンになり、溶存酸素によって自動的に酸化されるが、水溶液中ではモノアニオンの形でとどまるため、酸化補助を入れてラジカルを発生させないと、反応が先に進まないからである。酸化補助剤がヘモグロビンとK3 [Fe (CN) 6] のときとで、ラジカルが発生機構が異なる。ルシゲニンの反応については、pH が高すぎると（pH > 13）酸素による急激な分解反応が起こってしまう。追加実験を行って調べた結果、ルシゲニンの化学発光を肉眼で観察するための最適のpH は11程度であり、適正なpHの範囲が比較的せまいことがわかった。
Notes	研究ノート
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20100930-0031

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

ルミノールとルシゲニンの化学発光の機構と反応条件

大場 茂・向井知大

Mechanism and Condition of the Chemiluminescence of Luminol and Lucigenin

Shigeru OHBA and Tomohiro MUKAI

概要

慶應義塾大学日吉キャンパスにおける文系学生を対象とした化学実験のテーマの1つに、ルミノールとルシゲニンの化学発光に関する実験がある。しかし、反応条件（溶媒、pHの範囲、酸化補助材など）について不明な点があった。そこで文献検索を行って反応機構の要点をまとめ、実験操作を見直すことにした。ルミノールの発光については、溶媒がDMSO（ジメチルスルホキシド）のときには酸化補助剤が不要であるが、水溶液のときには必要である。これは、アルカリ条件下でDMSO中ではルミノールがジアニオンになり、溶存酸素によって自動的に酸化されるが、水溶液中ではモノアニオンの形でとどまるため、酸化補助剤を入れてラジカルを発生させないと、反応が先に進まないからである。酸化補助剤がヘモグロビンと $K_3[Fe(CN)_6]$ のときとで、ラジカルが発生機構が異なる。ルシゲニンの反応については、pHが高すぎると（ $pH > 13$ ）酸素による急激な分解反応が起こってしまう。追加実験を行って調べた結果、ルシゲニンの化学発光を肉眼で観察するための最適のpHは11程度であり、適正なpHの範囲が比較的せまいことがわかった。

1. はじめに

化学発光は不思議な現象であり、それを観察することは理屈ぬきに心を惹かれる。¹⁾ 実験操作は非常に簡単である。しかし、試験管の中で起こっている化学反応は複雑であり、実験条件に左右される。たとえば、ルシゲニンの実験で濃アンモニア水の代わりに3M NaOHを用いる

慶應義塾大学化学教室（〒223-8521 横浜市港北区日吉4-1-1）: Department of Chemistry, Keio University, Hiyoshi 4-1-1, Kohoku-ku, Yokohama 223-8521, Japan. [Received Mar. 18, 2010]

と、過酸化水素を加えた時点で発光が観察されなくなる。また、発光させるために、ルミノールについては過酸化水素の他に酸化補助剤を必要とする。しかし、その理由はルミノールの化学構造式をみただけではわからない。そこで、実験条件や反応機構について文献検索を行って調べ、また必要に応じて実験を行い反応条件を最適化することにした。

2. 実験操作と量子収率

2-1. 実験操作

実験操作は以下の通りである。50 ml 三角フラスコにルミノールを約13 mg (ミクロスパーテルで1杯) 入れ、水-エタノール混合液 (体積比で1 : 1) を15 ml 加えて懸濁させる。この溶液1 ml を試験管にとり、3M 水酸化ナトリウム水溶液1 ml と3 %過酸化水素水1 ml を加える。この試験管を暗所に置き、別の試験管に入れた0.1 %ヘモグロビン水溶液 (または3 %フェリシアン化カリウム水溶液) 1 ml を加えて、発光の様子を観察する。同様に、ルシゲニン溶液 (エタノール飽和溶液にさらに粉末を加え懸濁させたもの) 1 ml に濃アンモニア水1 ml を加えた試験管を暗所に置き、3 %過酸化水素水1 ml を加えて発光させる。また別途、ルシゲニン溶液に蛍光色素 (ローダミン B あるいはフルオレセイン) をあらかじめ添加しておいた場合の光の色の違いについても観察する。

2-2. 化学発光の量子収率

化学反応に伴い、光が発せられる基本的な原理は以下の通りである。酸化されやすい物質が酸化剤と反応し、分子中の結合の一部が切れてより安定な物質へと変化する。これは発熱反応であり、余剰エネルギーの大部分は熱として放出されるが、その一部が生成物にとどまり、電子的な励起状態が生じる。そして最低一重項励起状態から、ただちに光を放出して基底状態になる。この光放出にともなう分子の状態変化は、蛍光の放出過程と同じである。よって、化学発光のスペクトルを測定することで、どの物質が光を発しているかがわかる (その物質の蛍光スペクトルと一致する)。ルミノールの化学発光では3-アミノフタル酸イオンが、またルシゲニンの場合はN-メチルアクリドンが光を放出する化学種として特定されている (表1)。

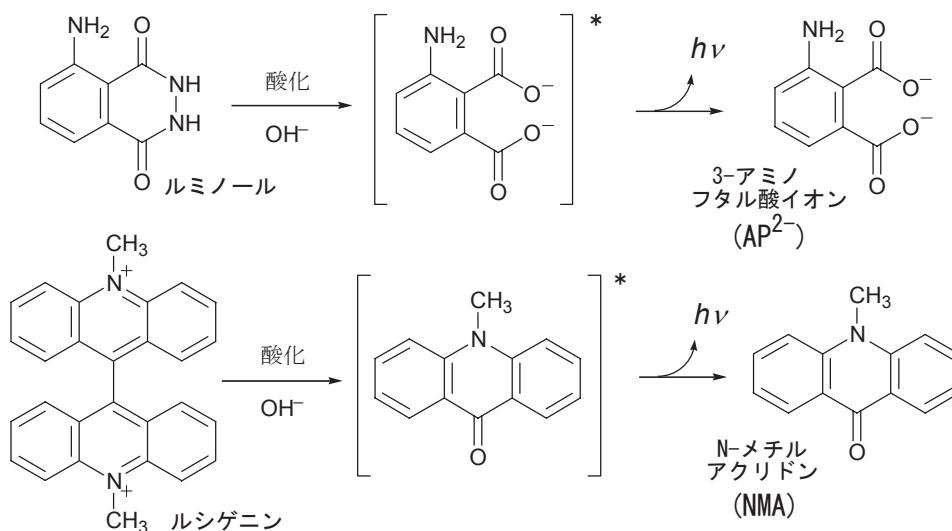
化学発光 (Chemiluminescence, CL) の量子収率 Φ_{CL} は、反応出発物の物質量に対して、放出される光子の物質量 (積算した値) の比であり、次式のように表わすことができる。¹⁾

$$\Phi_{CL} = \Phi_C \times \Phi_E \times \Phi_F \quad (1)$$

ここで、 Φ_C は化学発光を起こす生成物の収率であり、 Φ_E はその生成物が励起状態として生成する比率、 Φ_F はその励起状態から失活するときに光を放出する割合である。つまり、効率良くすべて反応して励起分子が生じ ($\Phi_C = \Phi_E = 1$)、そして励起分子がもれなく光を放出する ($\Phi_F = 1$) 場合に、化学発光の量子収率 Φ_{CL} は1となる。蛍光などの生物発光は酵素が介在して反応が起こるため、量子収率が比較的高くなる。たとえば蛍では0.41、ウミホタルでは0.28である。(蛍の量子収率は0.88とされていたが、最近訂正された)。³³⁾しかし、化学発光について

表 1. 化学発光の量子収率 ϕ_{CL} および発光分子の蛍光量子収率 ϕ_F

反応出 発物質	化学発光の量子収率 ϕ_{CL}	蛍光の量子収率 ϕ_F	
		発光分子	量子収率
ルミノール	(A) DMSO 中で酸化剤は酸素のみ（過酸化水素も添加しない）場合 ⁷⁾ ϕ_{CL} = 約0.05 (B) 水溶液中に電子線を照射して $OH^\cdot$ ラジカルを発生させる（酸素を除去して過酸化水素は添加する）場合 ⁸⁾ ϕ_{CL} = 約0.1	3-アミノフタル酸イオン (AP^{2-})	(A) DMSO 中 ⁷⁾ ϕ_F = 0.05 ~ 0.1 (B) 水溶液中 ⁸⁾ ϕ_F = 約0.30 (pH: 7~11)。pH>11では、かなり減少する。
ルシゲニン	(C) 水溶液中で酸化剤が酸素のみの場合 ⁹⁾ pH=11 ~ 15の範囲で ϕ_{CL} は pH に依存しないが、ルシゲニンの初期濃度と直線的な関係にある。ルシゲニンの初期濃度が $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ のとき、 ϕ_{CL} = 0.0001。 (D) 水溶液中で酸化剤として酸素が存在せず、過酸化水素のみの場合 ¹⁰⁾ ϕ_{CL} はルシゲニンおよび過酸化水素の初期濃度に依存しない。 ϕ_{CL} = 約0.005 (pH: 9 ~ 10), 約0.013 (pH: 11 ~ 15)。	N-メチルアクリドン (NMA)	(E) トルエン中 ¹¹⁾ ϕ_F = 約0.1



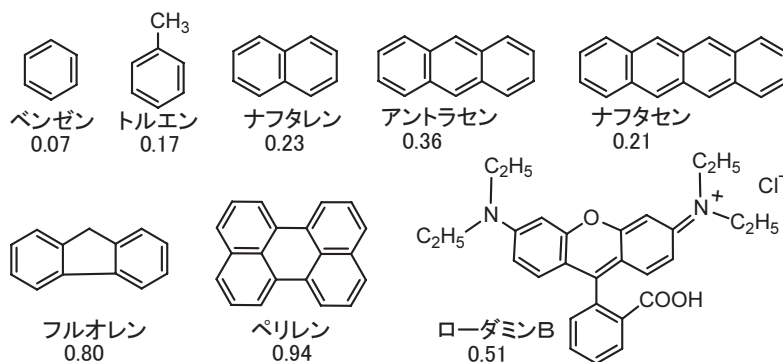


図1. 芳香族化合物の構造とその蛍光量子収率 ϕ_F .²⁰⁾ 蛍光収率は使用する溶媒の種類にも依存する。図中のデータはローダミンBについてはエタノール，その他の化合物についてはシクロヘキサン溶液についての値である。

は，光を伴わない分解反応も競争的に起こり，そちらの方が一般的に優勢である。このため，量子収率は効率の比較的高いルミノールやルシゲニンなどでさえ0.02～0.2程度である。^{2), 3)} 量子収率 Φ_{CL} は，もちろん実験条件（溶媒の種類，pH，触媒の有無など）によって変わってくる。

ルミノールの化学発光においては，反応で生成する3-アミノフタル酸イオン (AP^{2-}) が光の発生源である。この場合， Φ_C はルミノールを出発原料としての AP^{2-} の収率， Φ_E は生成した AP^{2-} 中での励起状態の割合， Φ_F は AP^{2-} が励起状態から失活するときに光を発する比率ということになる。励起分子が失活する際に，必ず発光するとは限らない。光の放出を伴わない状態変化も起こりうる（無輻射遷移）。このことを考慮する必要があるため，因子 Φ_F が式(1)の中に入っている。今，対象としている分子に特定の波長の光をあてて励起し，放出される蛍光（入射光より波長が長い）の強さを測定することで，吸収された入射光が蛍光へ変換される比率を求めることができる（分子による光の吸収と放出については付録参照）。これを蛍光量子収率と呼ぶが，まさに Φ_F がその収率である。代表的な芳香族化合物について，蛍光収率を図1に示した。これを見るとわかるように， Φ_F が0.5を超えるものは比較的小さい。ルミノールの発光に関わる AP^{2-} の Φ_F も水溶液中で約0.3であるし，ルシゲニンの分解で生成するN-メチルアクリドン (NMA) の Φ_F も0.1程度である（表1）。

もし，反応系に蛍光色素などが共存し，反応で生じた励起分子のエネルギーがそれに移動して，その蛍光物質から光が発せられる場合，量子収率は次のような式になる。²⁾

$$\Phi_{CL} = \Phi'_C \times \Phi_{trans} \times \Phi_{FL} \quad (2)$$

ここで， Φ'_C は反応の際に活性中間体が生成する量子収率である（(1)式の Φ_C とは異なる）。 Φ_{trans} は活性中間体からのエネルギー移動により，蛍光物質の励起状態が生成する効率であり， Φ_{FL} はその蛍光収率である。この場合，化学発光のスペクトルは，蛍光物質の蛍光スペクトルと同じになる。

化学発光に限らず、分子の励起状態の寿命は非常に短く、ピコ (10^{-12}) からマイクロ (10^{-6}) 秒程度である。⁴⁾ したがって、化学発光の持続時間とは、発光を起こす励起分子を生成する反応速度で決まることになる。量子収率 Φ_{CL} が同じならば、励起分子生成の反応速度が高いほど発光持続時間は短くなるが、そのかわり光は強くなる。

2-3. 反応機構を議論する際の注意

化学発光を伴う反応は、非常に単純化して示されることが多いが、実際は多様な反応が同時に起こっている。また反応条件（溶媒、pH、酸化剤）によって、反応機構が変わってくる。もし、主要な反応経路が1つだけであるならば、その反応速度に対する試薬濃度の依存性から、反応途中に生じる錯合体を推定することができよう。しかし、ルミノールやルシゲニンの場合、発光を伴う反応が副反応であり、また酸化剤として溶存酸素も関与してくるため、反応機構を突き止めるのは容易ではない。そのような状況下でこれまでも、これらの発光の反応機構を研究した論文がいくつか発表されているが、反応式の中には推論も多く含まれている。研究者の中でコンセンサスが得られた、完成した反応式があるわけでもない。本稿では、実験データに基づいて提案された反応機構のうち、主要と思われる部分を注意深く取り出してまとめることにした。

化学発光は、分析手段としての応用範囲が広い（付録参照）。^{2), 3)} 目的物質の濃度と発光強度との直線関係（検量線）をもとに、検査液中の濃度を求めるわけである。このような分析方法を発表している論文は数多いが、反応機構が完全にわかっているわけではないので、あくまでも経験的な分析法といえる。それらの論文の中に、反応機構を解説している場合もあるが、試料溶液の濃度、pH、過酸化水素添加の有無、酸化補助剤の種類等によって主に起こる反応が違ってくる。このため、反応機構を議論する際には、反応条件との対応に注意する必要がある。ルミノールの化学発光は金属元素の微量分析にも応用されている。それらの論文の中には、金属イオンなどを慣習的に「触媒」と記述しているものもあるが、金属原子が非可逆的に酸化される場合もあるので、「触媒」という用語の使い方に注意する必要があることが指摘されている。⁵⁾ 本稿ではこれを踏まえて、「酸化補助剤」という用語を用いることにした。

3. ルミノールの反応機構

3-1. 過酸化水素によるルミノールの酸化

ルミノール (H_2Lum と表すことにする) は中性の分子であり、アルカリ溶液中ではプロトンがとれて陰イオン $HLum^-$ になる (図2)。このため、ルミノールは中性の水には溶けにくいがアルカリ性になると溶けやすくなる。そして $Fe(III)$ 錯体などの酸化補助剤を加えると、 $HLum^-$ イオンから電子がうばわれて $HLum^{\cdot}$ ラジカルができる。これが不均一化反応を起こし、ジアザキノン化合物が生じる (図3)。これに、過酸化水素から生じたヒドロペルオキシイオン HOO^- が付加して、過酸化物ができる (図4)。¹²⁾ この過酸化物は、 $HLum^{\cdot}$ ラジカルに

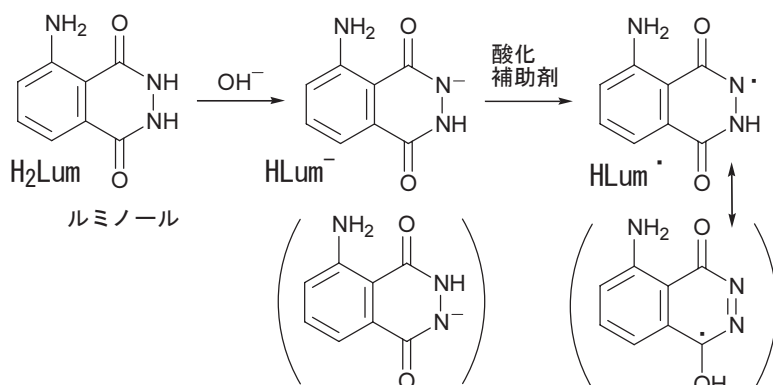


図2. プロトン性溶媒中での塩基性条件下における、ルミノールラジカル生成 (反応は図3または図5へ続く)。¹²⁾ 酸化補助剤の反応については、表2を参照。

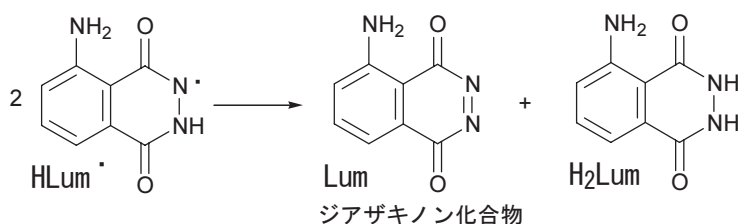


図3. ラジカルの不均一化によるジアザキノン化合物の生成 (反応は図4へ続く)¹²⁾

スーパーオキシドアニオン $\text{O}_2^{\bullet-}$ (溶存酸素から生じる) が付加することでもできる (図5)。⁸⁾ 最後に、過酸化物が窒素を放出して分解する過程で発光が起こる (図6)。その途中で、環状過酸化物中間体を経由するのではないかと考えられている。光を発しているのは3-アミノフタル酸イオン (AP^{2-}) であり、それが励起一重項状態から基底状態へ落ちるときに、余剰エネルギーが光として放出されるわけである。^{12), 13)} ただし、過酸化物中間体から生じる AP^{2-} はすべて励起状態というわけではなく、最初から基底状態のものも生成する (式 (1) で $\phi_E < 1$)。なお、図6では窒素脱離の段階で H^+ も取れるように書いてあるが、過酸化物生成のもっと早い段階でプロトンがはずれている可能性もある。

ルミノールの発光について、量子収率の観点から最適の pH は10～11であることがわかっている。⁵⁾ pH=8程度では発光が起こらない。このことから、過酸化物 $\text{HLum}(\text{OO})^-$ にプロトンが結合して $\text{HLum}(\text{OOH})$ になると、その後は別の反応経路をたどるために発光しないものと推定される (図7)。⁸⁾ なお、ルミノールの反応機構について、完全にわかっているわけではない。ジアザキノン化合物 (Lum) から3-アミノフタル酸イオン (AP^{2-}) に至る分解過程については、別の反応機構も提案されている (付録参照)。

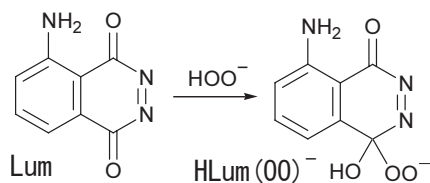
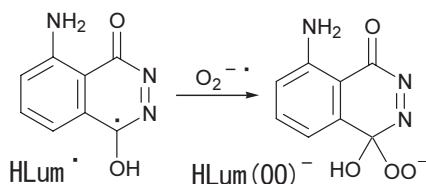
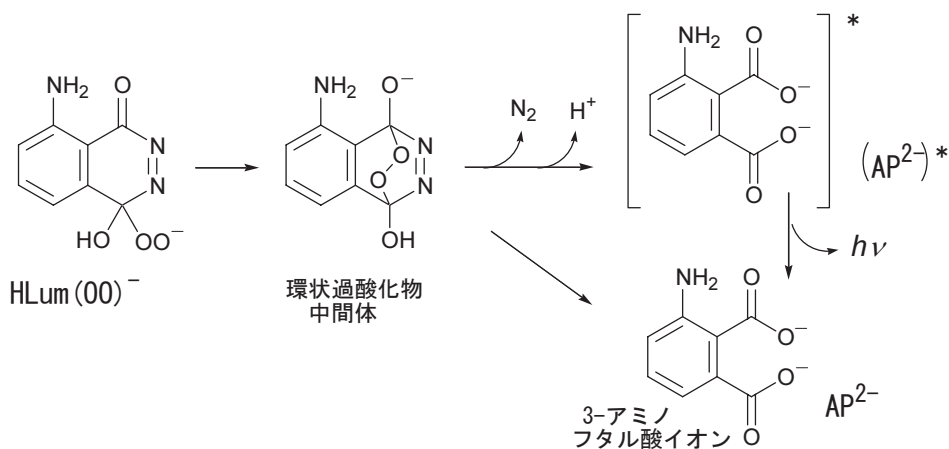
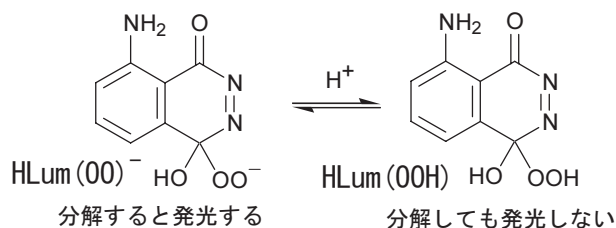

 図4. HOO^- による過酸化物の生成 (反応は図6へ続く)¹²⁾

 図5. スーパーオキシドアニオン $\text{O}_2^{\cdot-}$ による過酸化物の生成 (反応は図6へ続く)⁸⁾

 図6. ルミノールの過酸化物が分解して、化学発光が起こる過程。^{12), 13)} 光を発している化学種が3-アミノフタル酸イオンであることは確実であるが、ジアザキノン化合物の分解過程については、別の反応機構も提案されている (図21)。

 図7. pHが8程度の場合にルミノールの化学発光が起こらない理由。pHがあまり高くないと、ペロオキソ OO^- にプロトンが結合し、これが分解しても化学発光が起こらないためと推定される。⁸⁾

表 2. ルミノールの酸化補助剤とその反応

含まれて いる金属 原子*	化合物	生じる主な反応 (金属錯体については、中心元素のみを示している)
Fe(II)	ヘモグロビン, Fe(NH ₄ SO ₄) ₂	$\text{Fe(II)} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \text{O}_2^{\cdot -}$ $\text{Fe(II)} + \text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Fe(III)}-\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow [\text{Fe(IV)=O}]^{2+} + \text{OH}^{\cdot} + \text{H}^+$ $\text{HLum}^- + \text{OH}^{\cdot} \rightarrow \text{Lum}^{\cdot -} + \text{H}_2\text{O}^{15)}$
Fe(III)	K ₃ [Fe(CN) ₆]	$\text{HLum}^- + \text{Fe(III)} \rightarrow \text{HLum}^{\cdot} + \text{Fe(II)}^{**}$
	ヘミン	$2\text{Fe(III)} + \text{OH}^- \rightarrow \text{Fe(III)}-\text{O}-\text{Fe(III)} + \text{H}^+$ $\text{Fe(III)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(V)=O} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Fe(V)=O} + \text{Fe(III)} \rightarrow \text{Fe(IV)}-\text{O}-\text{Fe(IV)}$ $\text{HLum}^- + \text{Fe(IV)}-\text{O}-\text{Fe(IV)} \rightarrow \text{HLum}^{\cdot} + \text{Fe(IV)}-\text{O}-\text{Fe(III)}$ $\text{HLum}^- + \text{Fe(IV)}-\text{O}-\text{Fe(III)} \rightarrow \text{HLum}^{\cdot} + \text{Fe(III)}-\text{O}-\text{Fe(III)}^{12)}$

* 酸化補助剤として、Fe(II) や Fe(III) の他に Co(II), Ni(II), Cu(II), Cr(III) など多くの金属錯体が使われる。¹⁴⁾ 多くの金属イオンは H₂O₂ の添加を必要とするが、Fe(II) については酸化剤として O₂ さえあれば、H₂O₂ を添加しなくても強い発光が起こる。¹⁵⁾

** K₃[Fe(CN)₆] の場合、過酸化水素の添加を必要としない。文献¹⁶⁾ では、Lum²⁻ が Lum⁻ へ酸化されると考えているが、Lum²⁻ が生じていれば(DMSO 溶媒中と同様に) 酸化補助剤がなくてもアルカリ性条件下 O₂ によって自動的に酸化されるはずである。したがって、表に示したように HLum⁻ が酸化を受けると考える方が妥当である。

3-2. 酸化補助剤の役割

ルミノールは、アルカリ水溶液と過酸化水素水を加えた段階では光らず、ヘモグロビンあるいは K₃[Fe(CN)₆] 液を入れて初めて発光が起こる。その理由は、反応の初期段階として、ルミノール陰イオン HLum⁻ を 1 電子酸化して HLum[·] (あるいはそれからプロトンが脱離した Lum[·]) ラジカルを生じさせないと、反応が先に進まないからである。酸化補助剤として、Fe(II) と Fe(III) 錯体の場合の反応式を表 2 に示した。鉄以外にも、Co(II), Ni(II), Cu(II), Cr(III) など、多くの金属が酸化補助剤として働く。¹⁴⁾ なお、これらの金属イオンは、アルカリ条件下で水酸化物として沈殿しないように、錯体の形にしておく必要がある。¹⁾

ヘモグロビンは血液中のタンパク質であり、酸素を体内に運搬するが、その活性中心は鉄原子を含むポルフィリン骨格であり、それをヘムと呼ぶ。ヘモグロビン中の鉄原子は Fe(II) の状態であり、血液中ではこれが酸化されないように、酵素によって守られている。ヘモグロビンに限らず、Fe(II) 化合物はアルカリ溶液中の溶存酸素と反応し、スーパーオキシドアニオン O₂^{· -} さらにはヒドロキシラジカル OH[·] を生じさせる。この OH[·] がルミノール陰イオンを酸化する。その一方、Fe(II) は Fe(IV)=O まで非可逆的に酸化される。¹⁵⁾ なお、OH[·] は水溶液中に電子線などの放射線を照射することで、発生させることもできるので、これを利用してルミノールの化学発光の反応機構が研究されている。⁸⁾

酸化補助剤が K₃[Fe(CN)₆] の場合については、錯体が安定な正八面体形構造を有しており、

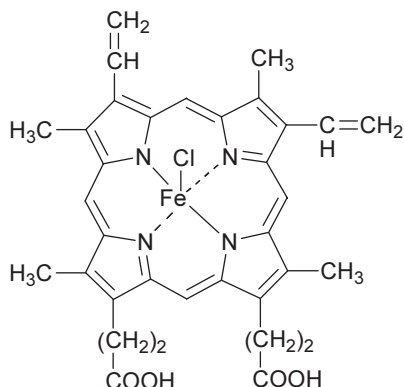


図8. ヘミンの分子構造。塩化物イオンが配位しており、鉄はFe(III)の状態である。

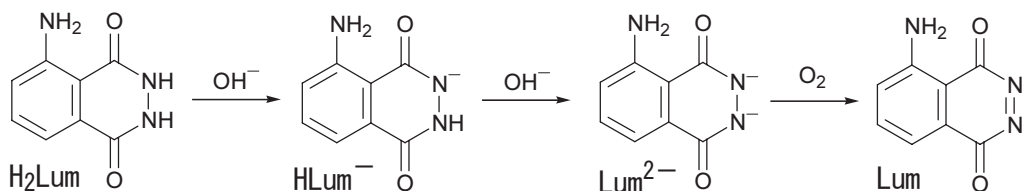


図9. 非プロトン性溶媒 (DMSO等) 中での、塩基性条件下におけるルミノールジアニオンの発生と、その酸化によるジアザキノン化合物の生成。¹⁾ この後は、酸素により過酸化物が生成し (図5), そして化学発光が起こる (図6)。水溶液中の反応と違い、酸素以外に酸化剤の添加は必要がない。

中心金属原子に酸素が結合する余地がない。このため、Fe(III) 錯体それ自身が酸化剤として働いてFe(II)となる。¹⁶⁾ ヘミンは図8に示すような鉄のポルフィリン錯体であり、中心金属はハロゲンイオン (通常はCl⁻) が配位して、Fe(III)の状態になっている。これがアルカリ条件下で、酸素原子が架橋した二核錯体となり、ルミノール陰イオンの酸化に寄与する。¹²⁾ なお、ヘモグロビンでは、タンパク質の中にヘムが埋まっているため、このような二核錯体の形成は起こらないと推定される。

3-3. 非プロトン性溶媒中での反応

前節までに述べたルミノールの反応機構は、溶媒が水やアルコールのようなプロトン性溶媒 (解離してH⁺を放出しやすい溶媒) のときの話である。DMSO (ジメチルスルホキシド) などの非プロトン性溶媒中では、酸化剤の添加は不要で、空気中から酸素が供給されれば、後はルミノールをアルカリ条件下に置くだけで化学発光が起こる。^{6), 7)} この非プロトン性溶媒中でのルミノールの反応初期段階を図9に示した。アルカリ条件下のルミノールは、ジアニオンへと誘導される。水などのプロトン性溶媒中ではモノアニオンで止まっていたのと対照的である。ジアニオンは酸素によって酸化を受けて、ジアザキノン化合物へと変化する。¹⁾ 過酸化水素を加えなくても、過酸化物が生成するのは、DMSO 溶液中で酸素からスーパーオキシドアニオ

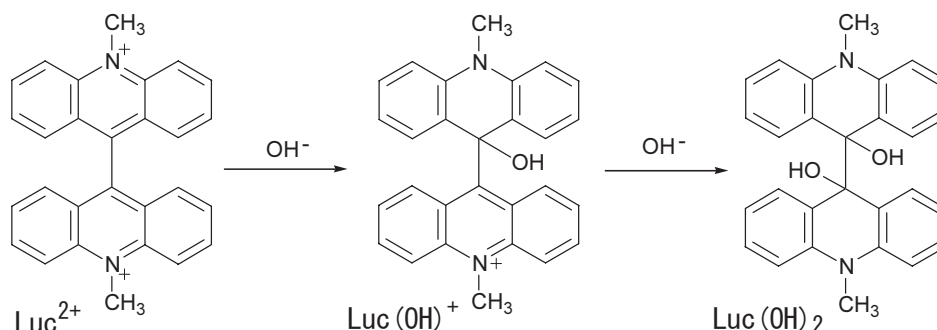


図10. アルカリ条件下におけるルシゲニンの変化。ルシゲニンは硝酸塩であり、 $\text{Luc}^{2+}(\text{NO}_3^-)_2$ と表わせる。pHが12以下では Luc^{2+} と擬似塩基 Luc(OH)^+ との間で可逆的な平衡が成り立つ（反応は図11へ続く）。pH>13では、さらに Luc(OH)_2 へと非可逆的に変化する（反応は図12へ続く）。⁹⁾

ン $\text{O}_2^{\cdot-}$ が生じるためと推定される（図5，図6）。¹⁷⁾ 同位体 ^{18}O の濃度を高めた酸素を使って化学発光を起こさせると、かなりの割合で反応生成物 AP^{2-} 中に取り込まれることが、実験で確認されている。⁶⁾

4. ルシゲニンの反応機構

4-1. 強アルカリ条件下での酸素によるルシゲニンの酸化

ルシゲニンは通常は硝酸塩であり、2価の陽イオンとして存在する。これを Luc^{2+} と表記することにする（図10）。アルカリ条件下において、水酸化物イオンが付加して擬似塩基が形成される。紫外可視吸収スペクトルのpH依存性をもとに、この擬似塩基 Luc(OH)^+ の解離平衡定数が求められている。⁹⁾ それによると、pH<12においては、 Luc^{2+} と Luc(OH)^+ との間で可逆的な平衡がなりたつ。しかし、さらにpHが高くなると（pH>13）、水酸化物イオンがもう1つ結合して Luc(OH)_2 となる。ルシゲニンは酸素が存在すれば、過酸化水素を加えなくても分解する。それには、図11，12に示すようなラジカル生成反応がかかわっている。

高いpH（>13）では、ルシゲニンの分解が急速に進む。それは次のような変化が起こるからと推定されている。⁹⁾ まず Luc(OH)_2 から Luc^{2+} へ1電子が移動して $\text{Luc}^{\cdot+}$ ラジカルが生じる（図12）。酸素 O_2 がラジカルから電子を1個受け取ることによって、スーパーオキシドアニオン $\text{O}_2^{\cdot-}$ も発生する。これらが結合することで、ジオキセタン型中間体 Luc(OO) ができる（図13）。それが分裂して2分子のN-メチルアクリドン（NMA）となるが、その一部が励起状態として生成するため、化学発光が起こる。この溶存酸素による酸化反応について、pH=13の水溶液での発光時間は約1秒、pH=14では0.1秒以下と報告されている。⁹⁾ 量子収率は0.0001程度である（表1）。つまり、分解の反応速度は非常に速いが、光放出を伴わない反応ルートを經由する方が圧倒的に多い。反応生成物として、NMAや Luc(OH)_2 の他に、図14に示すようなものも単離されている。⁹⁾ このことから、化学発光反応の他に、多様な非化学発光反応が

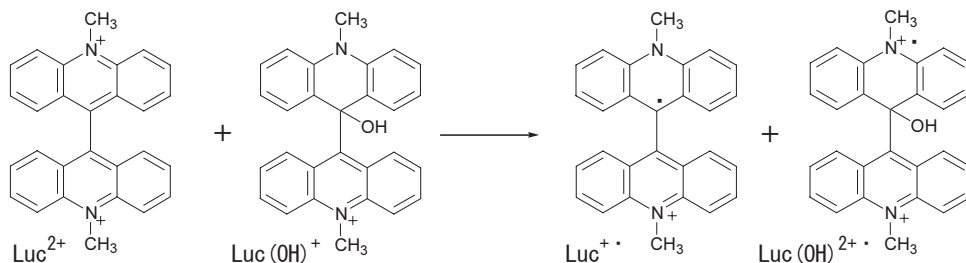


図11. pH < 12において推定される分子間電子移動反応。Luc(OH)⁺の窒素原子からルシゲニンLuc²⁺の窒素原子へ電子が1個移動してLuc^{+•}ラジカルが生じる(反応は図13へ続く)。⁹⁾

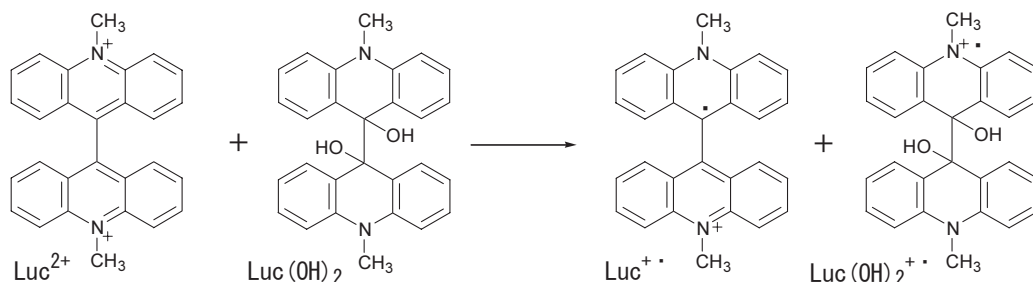


図12. pH > 13において推定される分子間電子移動反応。Luc(OH)₂の窒素原子からルシゲニンLuc²⁺の窒素原子へ電子が1個移動してLuc^{+•}ラジカルが生じる(反応は図13へ続く)。⁹⁾

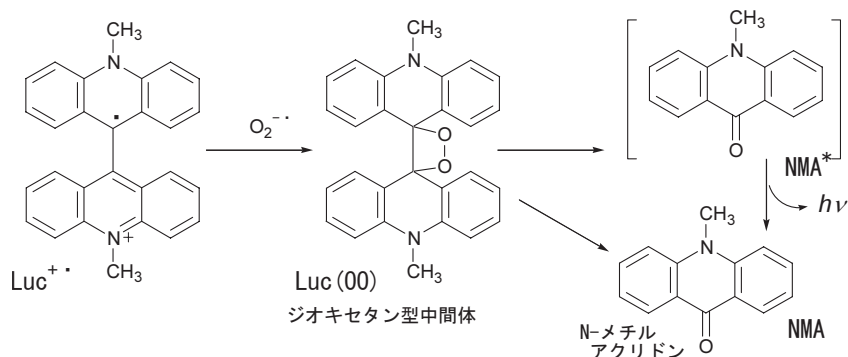


図13. 酸素から生じたスーパーオキシドアニオン $\text{O}_2^{\bullet-}$ による、ジオキセタン型中間体の生成。それが分裂することによって、ほとんどが基底状態のN-メチルアクリドン (NMA) となるが、ほんの一部分は励起一重項状態として生じる。それが失活する際に発光する。⁹⁾ ジオキセタン型中間体は、過酸化水素の反応からも生じる (図15)。

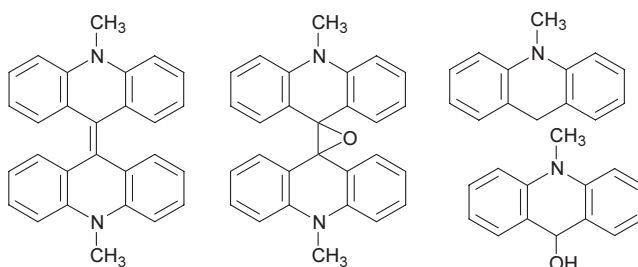


図14. アルカリ条件下におけるルシゲニンの分解反応生成物 (ただし NMA と Luc(OH)₂ は除く)⁹⁾

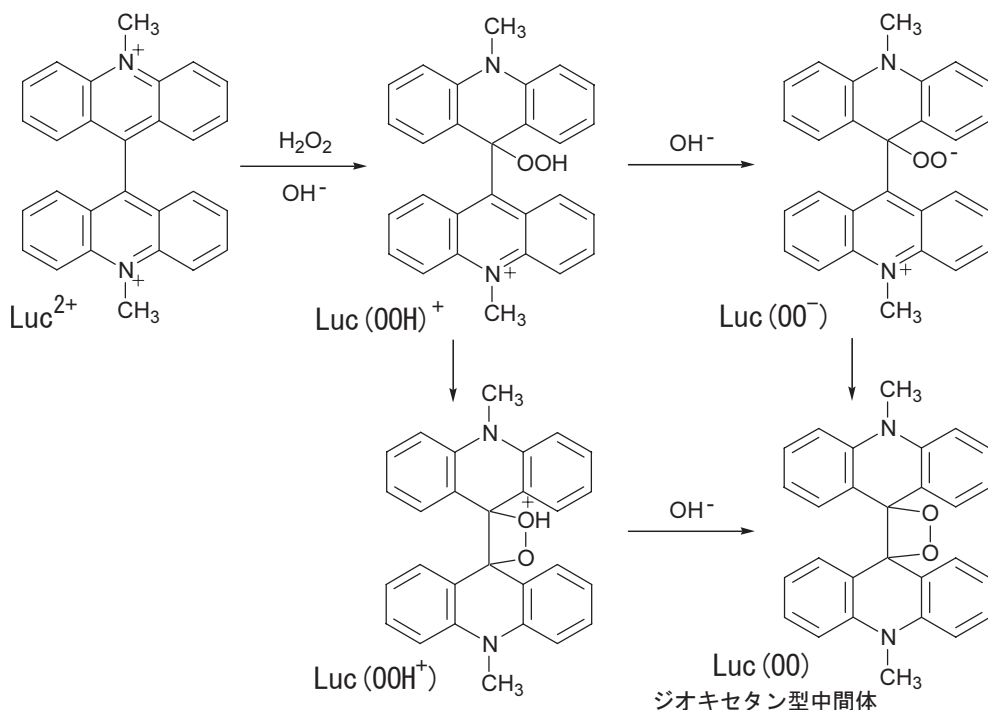


図15. ヒドロペルオキシイオンHOO⁻によるジオキセタン型中間体の生成機構。¹⁰⁾ ジオキセタン型中間体が開裂して発光が起こる過程は図13の右側の反応と同じ。ジオキセタン型中間体は、酸素による反応からも生じる (図13)。

同時に起こっていることがわかる。

4-2. アルカリ条件下での過酸化水素によるルシゲニンの酸化

強アルカリ条件下で酸素が存在すると、上記のような反応が起こってしまう。そこで、酸素を除去した状態で過酸化水素を加えたときの実験結果をもとに、反応機構が推定されている。¹⁰⁾ その反応の主要な部分を図15に示した。ルシゲニンに過酸化水素から生じたヒドロペルオキシイオン HOO⁻が結合して、ジオキセタン型中間体が生じる。それが分解して化学発光が起こるわけである。ただし、発光を伴わない別の反応も同時に起こっており、その推定されている反応式を図16に示した。このような非化学発光反応の方が優先的に起こるが、それでも発光の量子収率は pH=9 ~ 10では0.5%程度、pH=11で1.0%、pH >12では1.3%程度と報告されている。ただし、これはあくまでも反応液中の溶存酸素による影響を除いたときの話である。

では、酸素に触れた状態のルシゲニン溶液に、アルカリ条件下で過酸化水素を混ぜ合わせたときに、どのような反応が起こるのであろうか。今は化学発光反応に注目しているので、ジオキセタン型中間体が形成される反応経路だけを考えることにする。pHの範囲によって、ラジカルの発生を伴う経路の寄与が変わってくると推定されるが、それを表3にまとめた。高い

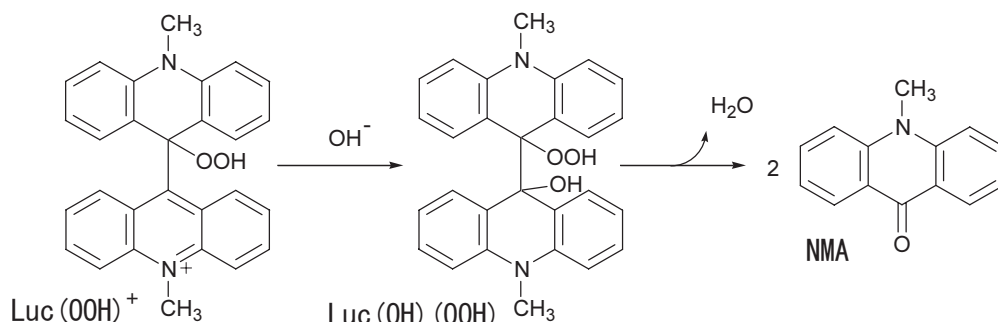


図16. アルカリ条件下で過酸化水素によるルシゲニンの非化学発光反応。¹⁰⁾ 発光反応 (図15) に比べて、こちらの非化学発光反応の方が優先的に起こる。

表3. ルシゲニンの酸化反応におけるジオキセタン型中間体形成の反応経路。⁹⁾ ただし、酸素が存在するアルカリ条件下。

pH の範囲 (概略)	過酸化水素の役割	ジオキセタン型中間体形成に主に寄与すると推定される反応経路
13以上	H ₂ O ₂ を入れなくても急速にルシゲニンの分解反応が進む。	分子間電子移動反応によって生じた Luc ⁺ と、酸素由来の O ₂ ⁻ とのカップリング (図13)。
10～11	H ₂ O ₂ を加えることで化学発光反応が開始する。	過酸化水素由来の HOO ⁻ による Luc(OOH) ⁺ を経由する反応経路 (図15)。

pH (>13) では、ルシゲニン溶液を塩基性にした段階で、酸素による分解反応が急速に起こってしまう。⁹⁾ よって、過酸化水素を加えることで反応を開始させ (量子収率の高い) 発光を観察するためには、最低限 pH は12以下に保つ必要がある。ただし、pH を10以下にすると量子収率が下がる (表1)。したがって、量子収率の観点から、ルシゲニンの化学発光における最適の pH は11～12であるといえる。

4-3. 溶媒依存性

前節までのルシゲニンに関する議論は、溶媒として水を用いることを前提としていた。アルカリ条件下での過酸化水素によるルシゲニンの化学発光について、水溶液にエタノールなどの極性溶媒を混合したときの効果が調べられている。¹⁸⁾ それによると、溶媒としての水にメタノール、エタノール、1-プロパノール、DMSO などの極性溶媒を5%以上混ぜると、発光スペクトルのピークが短波長側に徐々にシフトしていく。その理由は、溶媒として水だけを使うと、発光スペクトルは分解生成物である NMA からの蛍光 ($\lambda_{\text{max}} = 430 \sim 450 \text{ nm}$) の他に、ルシゲニンからの蛍光 ($\lambda_{\text{max}} = 502 \text{ nm}$) も合わさるが、エタノールなどを加えていくとルシゲニンからの蛍光が次第に弱まるからである。つまり、アルコールなどは、NMA からルシゲニンへのエネルギー移動を抑制する (ルシゲニンが蛍光色素として働くのを抑える)。

ルシゲニンの対イオンは通常 NO_3^- であるが、これを SCN^- や I^- にかえると、電荷移動錯体を形成する。溶液も 500 nm より長波長側に電荷移動吸収帯を示すが、溶媒によるその強度の違いは $\text{H}_2\text{O} < \text{エタノール} < \text{DMSO}$ である。¹⁹⁾ つまり、水溶液中ではエタノール中に比べて、対イオンから Luc^{2+} への電荷移動がおこりにくい。これは、ルシゲニンの 2 価のイオンの形の方が、水溶液中で有利であるためと説明されている。このことから、電子移動を伴う反応によって、溶媒は水よりもエタノールの方が適しているといえる。

5. 実験条件の検討

5-1. ルミノールの発光

これまでの学生実験の慣習として、ルミノール液を三角フラスコに調製した後、使用直前まで水冷することにしていた。また、過酸化水素水とヘモグロビン液も、教卓前に配置する際にはそれらの滴びんを水冷している。しかし、その冷却の目的が不明確であった。そこで、ルミノール液を水冷しておいた場合と、水冷せずに室温のまま保った場合とで、発光の様子を比較してみた。その結果、冷却するよりも室温のままにしておいた方がよく光ることがわかった。つまり温度を下げると、反応が遅くなり光が弱くなってしまうのである。なお、ルミノール液に過酸化水素水、およびヘモグロビン液を加えると発光するが、反応後の試験管の上部にはビールのような細かい白い泡がたまる。ルミノール液を入れずに、過酸化水素水とヘモグロビン液だけを混ぜても、同じような泡が生じる。このことから白い泡は、過酸化水素がヘモグロビンにより分解して発生した酸素であることがわかった。よって、水冷の意味は、過酸化水素の分解を抑えることにあった。夏期のように室温が高いときには、このような対策は必要かもしれない。しかし、少なくともルミノール液の水冷は、化学発光を肉眼で観察する目的には則さないことがはっきりした。

発光の強弱を判定する際に、条件の違う溶液が入った試験管を並べて同時に光らせて、比較する方法をとった。肉眼での観察だけではデータ化しにくいので、デジカメの動画として記録した。これにより、発光持続時間の計測、ならびに発光の強さの比較がしやすくなった。光の強さを数値化することまでは無理であるが、表 4 および表 5 のように、強い◎¹>やや強い◎²>>弱い○、の 3 段階で示すことにした。

酸化補助剤としてヘモグロビンを用いたときに、塩基性の強さがルミノールの発光にどのように影響するかを調べた (表 4)。3M NaOH を 1 ml 入れるところを、0.5 ml あるいは 0.25 ml にしてみたところ、0.5 ml のときが一番強く光ることがわかった (表 4 中の a3)。3M NaOH の代わりに濃アンモニア水を使用すると、発光がかなり弱くなった (a1)。酸化補助剤の濃度の影響を $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ について調べた。この溶液の濃度を半分にしても光がやや弱まるだけで発光時間はあまり変わらないが (b5)、濃度を 1/10 に下げると光がかなり弱まり、発光時間も非常に短くなった (b6)。添加する過酸化水素の濃度の影響についても調べた。過酸化水素の濃度を 3 % から 0.3 % にすると、ヘモグロビンを酸化補助剤とする場合に発光がかな

表 4. ルミノールの発光の試薬濃度依存性 (水-エタノール液 (1 : 1), 室温20℃)

No.	酸化補助剤 1 ml		アルカリ溶液			H ₂ O ₂ 1 ml	発光の強さ*と大体の発光持続時間#
	種類	濃度 (%)	種類	濃度 (M)	量 (ml)	濃度 (%)	
a1	ヘモグロビン	0.1	NH ₃ aq	濃**	0.5	3	○ 7 秒
a2			NaOH	3.0	1		◎ ²
a3					0.5		◎ ¹ 26 秒
a4					0.25		◎ ²
a5					0.5	0.3	○ 6 秒
a6						0.0	×
b1	K ₃ [Fe(CN) ₆]	3	NH ₃ aq	濃**	0.5	3	○ 7 秒
b2			NaOH	3.0	0.5	3	◎ ¹ 7 秒
b3						0.3	◎ ² 8 秒
b4						0.0	○ 1 秒
b5		1.5				3	◎ ² 5 秒
b6		0.3					○ 1 秒

* 酸化補助剤添加時の発光の強さ (◎¹ > ◎² ≫ ○)

** 滴ビンに保存されていた濃アンモニア水溶液

発光持続時間とは、ルミノールの場合は光始めてからほぼ完全に消えるまでの時間。

表 5. ルシゲニンの発光の試薬濃度依存性 (エタノール液, 室温20℃)

No.	アルカリ溶液 1 ml		反応液の pH	発光の強さ*と大体の発光持続時間#
	種類	濃度 (M)		
c1	NH ₃ aq	濃**	11.1**	◎ ² 2 分
d1	NaOH	3	14	×
d2		3×10 ⁻¹	13	×
d3		3×10 ⁻²	12	×
d4		3×10 ⁻³	11	◎ ² 2 分
d5		3×10 ⁻⁴	10	○ 2 分

* 過酸化水素添加時の発光の強さ (◎² ≫ ○)

** 滴ビンに保存されていた濃アンモニア水溶液。それを 3 倍希釈して、pH メーターにより測定した値。

発光持続時間とは、ルシゲニンの場合は光始めてからかなり弱くなるまでの時間。

り弱くなるが (a5), K₃[Fe(CN)₆] を用いる場合は発光の強さはそれほど低下しない (b3)。過酸化水素を添加しないと、ヘモグロビンでは発光が起こらないが (a6), K₃[Fe(CN)₆] では弱いながら発光する (b4) ことを確認した。

なお、最適な濃度条件 (a3, b2) で一旦発光させ、それが終了した反応液にヘモグロビンや $K_3[Fe(CN)_6]$ (1 ml) を数回追加すると、そのたびに最初のときと同程度の強さで発光する。それとは対照的に、一旦反応させた液に過酸化水素を追加しても発光は起こらない。このことから、発光を一度起こさせても、未反応のルミノールが残っており、酸化補助剤は反応により消費されていることがわかった。 $K_3[Fe(CN)_6]$ の溶液は黄色であるが、発光後の反応液は無色になっていることから、 $[Fe(CN)_6]^{3+}$ が変化したことがわかる。

5-2. ルシゲニンの発光

濃アンモニア水の代わりに 3M NaOH を使うと、過酸化水素水を加えた段階でルシゲニンは発光しない (表 5)。これは、アルカリ性が強すぎてルシゲニンが急速に分解されるためである。事実、部屋を暗くしてルシゲニン溶液に 3M NaOH を加えた段階で発光することを確認した (発光持続時間は約 1 秒)。次に、3M NaOH を順次希釈して 3×10^{-1} から 3×10^{-4} M までを用意し、発光の様子を調べた。その結果、 3×10^{-3} M まで希釈すると (表 5 中の d4)、過酸化水素水を加えた段階でよく光ることがわかった (発光時間は 2 分程度)。さらにその 1/10 に希釈すると (d5)、発光が弱くなってしまう。 3×10^{-2} M では (過酸化水素水を加えた段階で) 発光しない (d3)。以上のことから、ルシゲニン反応液の pH の最適値は約 11 であることがわかった。なお、アンモニアの解離平衡定数が $K_b = [NH_4^+][OH^-] / [NH_3] = 1.81 \times 10^{-5}$ (25 °C) であることをもとに、濃アンモニア水 (濃度 28%) の pH を計算すると 12.2 となる。濃アンモニア水は反応の際に他の溶液と混ざり、3 倍に希釈されることになるが、その反応液の pH を計算すると 12 となる (濃度が下がっても、解離度が上がるため、pH はあまり変わらない)。しかし、アンモニアは揮発しやすいため、実際の溶液の濃度は不明であった。そこで滴びんに入っていた濃アンモニア水を pH メーターで測定してみたところ、11.2 であった。濃度 28% を仮定して計算した値よりも、 OH^- 濃度が予想通り低くなっていた。また、それを 3 倍希釈後の pH の測定値は 11.1 であり、4 倍希釈後でも 11.1 であった。これにより、ルシゲニンの発光を観察するための最適の pH は約 11 であり、また濃アンモニア水を多少希釈しても pH はあまり変わらないことが確かめられた。

6. 考察

6-1. 適切な pH の範囲

ルミノールの実験で、3M NaOH の添加量を変えてみたところ、0.5 ml のときが一番強く光った (表 4)。アルカリ条件下にするのは、ルミノールからプロトンを放出させてモノアニオンにし (図 2)、また過酸化水素からプロトンを引き抜いて、 HOO^- イオンを付加させるためである (図 4)。非化学発光反応を抑える意味もある (図 7)。3M NaOH を 0.5 ml 添加すると反応液が 3.5 ml (つまり 7 倍希釈) になることから、反応液の pH を計算すると 13.2 となる。これがルミノールの発光を肉眼で観察するときの pH の最適値といえる。濃アンモニア水を用

表 6. 標準電極電位 (V) ²¹⁾

$\text{O}_2 + \text{e}^-$	$=$	$\text{O}_2^{\cdot-}(\text{aq})$	$- 0.284$
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	$=$	H_2	$+ 0.000$
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + \text{e}^-$	$=$	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	$+ 0.361$
$\text{Fe}^{3+}(\text{単イオン}) + \text{e}^-$	$=$	Fe^{2+}	$+ 0.771$
$\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	$=$	H_2O_2	$+ 0.695$
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	$=$	$2\text{H}_2\text{O}$	$+ 1.763$
$\text{Au}^+ + \text{e}^-$	$=$	Au	$+ 1.83$

いと、反応液の pH は約11となるが、発光は弱くなる。ただし、ルミノールの発光量子収率が最大となるのは pH = 10.5 ~ 11であり、これよりも pH が高いと 3-アミノフタル酸イオンの蛍光量子収率が落ちるため、化学発光の量子収率も下がることがわかっている。¹⁵⁾ 要するに、実験では反応を速く起こさせて明るく光らせているが、そのエネルギー変換効率は劣るということである。

ルシゲニンをアルカリ性条件下におくのは、水酸化物イオンを付加させてラジカルの発生を誘導すること (図11, 図12), ならびに過酸化水素からプロトンを引き抜いて HOO^- イオンを付加させるためである (図15)。NaOH の濃度を変えて実験を行うことにより、反応に適する pH の範囲が非常に限られていることがわかった (表 5)。ルシゲニンの発光を肉眼で観察するときの pH の最適値は11といえる。濃アンモニア水を3M NaOH で置き換えると、過酸化水素水を加えた段階で発光しないが、それは pH が高すぎるためであった。塩基性が強すぎると (pH > 13), ルシゲニンが酸素によって急速に分解され、その段階で発光反応も起こってしまうからである (表 3)。⁹⁾

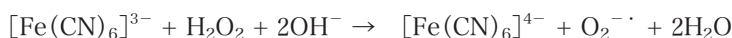
6-2. 酸化補助剤の必要性

ルミノールは、NaOH と H_2O_2 を加えた段階では光らず、これにヘモグロビンなどの酸化補助剤を入れた段階で光る。アルカリ条件下におけるルミノールの反応は、大きく 2つの段階に分けることができる。まず、ルミノールのヒドラゾ基 ($-\text{NH}-\text{NH}-$) から水素がとれてジアザキノン化合物 Lum へ酸化する過程 (図 2, 図 3) (第一段階), そして次にそれが過酸化物となり、分解して 3-アミノフタル酸イオンになり発光する過程 (図 4, 図 6) (第二段階) である。過酸化水素は、第二段階の反応を推進する。しかし、アルカリ条件下で過酸化水素が存在しても、第一段階の反応は起こらない。これはどうしてであろうか。過酸化水素が $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ よりも強い酸化剤であることは、標準電極電位のデータから明らかである (表 6)。ただし、過酸化水素が酸化剤として働く過程で H^+ を消費する (あるいは OH^- を生成する)。よって、強塩基性水溶液中では、 H^+ の濃度が極端に低いため、過酸化水素が酸化剤としての役割を果たせないということである。

ルシゲニンの方は、酸化補助剤を必要としない。アルカリ条件下 (pH= 約11) において、過酸化水素から生じた HOO^- イオンがルシゲニンに付加して、ジオキセタン型中間体ができる (図15)。これは、ルシゲニンが2価の陽イオンであり、しかも OH^- や HOO^- イオンが付加しやすい構造をしているからである。それに比べてルミノールの方は、ジアザキノン化合物の形までもっていかないと、 HOO^- イオンが付加しない (図4)。そのために、酸化補助剤を加えてラジカルを発生させてやる必要がある (図2)。Fe(III) 錯体は直接、酸化剤として働く。ヘモグロビンなど Fe(II) 錯体は、酸素に電子を与えてスーパーオキシドアニオン $\text{O}_2^{\cdot-}$ を発生させる (表2)。この O_2 の1電子還元が比較的容易に起こることは、表6の標準電極電位の値からも理解できる。さらに $\text{O}_2^{\cdot-}$ からヒドロキシラジカル $\text{OH}^\cdot$ が生じ、それがルミノールモノアニオンを酸化する。つまり、ヘモグロビンは直接、ルミノールの酸化に関わっているわけではない。なお、酸化補助剤のかわりに電極を用いて、ルミノールの化学発光を起こさせることもできる (付録参照)。

6-3. Fe (II) と Fe (III) の関係

ルミノールの発光反応では、酸化補助剤として Fe(II) でも Fe(III) 錯体でも使える。発光反応をさせた後に、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を追加すると、同程度に発光しそれを数回くりかえすことができる。ヘモグロビンの場合も同様に、反応液に追加するとくりかえし発光が起こせる。このことから、酸化補助剤を加えて1回発光させても、反応液には未反応のルミノールがかなり残っていることがわかる。ここで疑問に思うことは、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の役割である。 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ が酸化剤として働いた後は、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ として反応液に残っているはずであり、Fe(II) 錯体とルミノールが共存しているのかかわらず、発光が継続して起こらないのは、なぜであろうか。この疑問を解決するために、まず試薬の濃度を計算してみよう。ルミノールの懸濁液を実験手順どおりに調製したとすると、その濃度は4.9 mM ($\text{mM} = 10^{-3}\text{M}$) となる。3 % $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ と3 % H_2O_2 の比重を両方とも1.0と近似すると、溶液の濃度はそれぞれ91 mM と221 mM と計算される。よって、ルミノールに対して酸化補助剤と過酸化水素がかなり過剰に加えられていることがわかる。それなのに、ルミノールが反応せずに残り、酸化補助剤が消費されてしまっている。過酸化水素が存在しないときに、ルミノール1モルに対して $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ が2.7モル反応して $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ へ変化することが報告されている。¹⁶⁾ したがって、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ がルミノール陰イオンの酸化反応 (表2) に関与するだけでなく、過酸化水素と反応を起こしていると推定される。強塩基性条件下では、例えば次のような反応が考えられる。



ルミノール液に添加する過酸化水素の濃度を3 %から0.3%に下げて $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を加えたところ、やや強度は落ちるものの強く発光した (表4, b3)。この発光後の反応液 (無色) に $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を1 ml 追加したところ、最初の発光よりもかなり弱くなり、また再発光後の反応液は黄色であった。よって、過酸化水素は酸化補助剤を消費させるが、それと同時に非化学

表 7. ルミノールの $K_3[Fe(CN)_6]$ による発光に対する $K_4[Fe(CN)_6]$ の影響 (水-エタノール液 (1 : 1), 3M NaOH 0.5 ml, 3 % H_2O_2 1 ml, 室温 20°C)

No.	酸化補助剤の成分と添加量		発光の強さ*と大体の発光持続時間#
	0.091 M $K_3[Fe(CN)_6]$	0.091 M $K_4[Fe(CN)_6]$	
e1	1 ml	—	◎ ¹ 7 秒
e2	反応 (e1) 後に 1 ml 追加**	—	◎ ¹
e3	—	反応 (e1) 後に 1 ml 追加	○ 1 秒
f1	—	1 ml	○ 1 秒
f2	—	反応 (f1) 後に 1 ml 追加	○
f3	反応 (f1) 後に 1 ml 追加	—	◎ ¹ 7 秒
g1	0.5 ml	0.5 ml	◎ ² 4 秒
g2	0.5 ml (+水 0.5 ml)	—	◎ ² 4 秒

* 酸化補助剤添加時の発光の強さ (◎¹ > ◎² > ○)** 反応 (e1) 後に 3 % H_2O_2 を 1 ml 追加しても発光しなかった。

発光持続時間とは、ルミノールの場合は光始めてからほぼ完全に消えるまでの時間。

発光反応によるルミノールの消費を防いでいる。また、酸化補助剤がヘモグロビンの場合には、過酸化水素を添加しておかないと、そもそも化学発光が起こらない。ルミノール液にヘモグロビンを先に加えておき、過酸化水素を添加して発光させることもできる。しかし、 $K_3[Fe(CN)_6]$ の場合は、過酸化水素を加える前にルミノール液に入れてしまうと、その時点でルミノールとの反応が起こってしまう (過酸化水素がなくても発光する)。

ルミノールの反応で、酸化補助剤として $K_4[Fe(CN)_6]$ を最初に用いると、弱いながらも発光する (表 7, f1)。これは、酸素により酸化されて生じた $[Fe(CN)_6]^{3-}$ が多少含まれているためと推定される。 $K_4[Fe(CN)_6]$ を添加して反応させた後、さらに $K_3[Fe(CN)_6]$ を加えて発光させても (f3)、最初から $K_3[Fe(CN)_6]$ を添加したとき (e1) と発光強度が変わらなかった。また、酸化補助剤として $K_3[Fe(CN)_6]$ と $K_4[Fe(CN)_6]$ の混合液を用いても (g1), $K_3[Fe(CN)_6]$ の濃度を同じにした溶液を添加したとき (g2) とで光の強さや持続時間はほぼ同じであった。よって、反応液中に $[Fe(CN)_6]^{4-}$ が共存しても、 $[Fe(CN)_6]^{3-}$ による発光反応を抑制しないことがわかった。

ヘキサシアノ鉄錯体 $[Fe(CN)_6]^{3-}$ および $[Fe(CN)_6]^{4-}$ は置換不活性であり、それらが混在すると K^+ イオンなどを介在して、Fe(II)-Fe(III) 錯体間で電子移動が速く起こることがわかっていてる。Fe(II) 錯体は、配位子や溶媒によって配位子置換反応速度が大きく異なる。²²⁾ $K_4[Fe(CN)_6]$ は中心金属が Fe(II) であっても、置換不活性なためヒドロキシラジカル生成反応 (表 2) に寄与しないと推定される。

6-4. 溶媒の選択

学生実験においてルミノールについては、水：エタノール（1：1）の混合溶媒を用いている。溶媒として水だけを使って実験してみたところ、同程度によく光ることがわかった。ただし、エタノールを混合させた方が、ルミノールの粉末がダマになりにくく分散させやすい。なお、初めは懸濁しているが、それに水酸化ナトリウム溶液を添加した時点で完全に溶けるため、その後の反応には影響しない。溶媒にDMSOを使うと、過酸化水素の添加なしにルミノールを発光させることができる。しかし、発光の量子収率は水に比べてDMSOでは約半分に落ちるし、またこの溶媒は18°Cで凍ってしまうことや多少とも毒性があることを考えると、学生実験向きとはいえない。

ルシゲニンについては、学生実験においてエタノール溶液を用いている。これは水溶液では、ルシゲニン自身が蛍光色素の役割をしてしまうことに関係している。反応溶液にローダミンBなどの蛍光色素を混ぜておくと、発せられる光の色が変わる。これは反応によって生じたエネルギーがその色素に移動して励起状態が生じ、そこから蛍光が放出されるからである。この分子間のエネルギー移動についての詳細な機構は明らかではないが、光子のやりとりが行われているわけではないと考えられる（光の吸収と再放出の機構では説明がつかない実験結果があるため）。¹⁸⁾

6-5. ジオキセタン中間体の構造と分解反応

ルシゲニンの化学発光は、ジオキセタン型中間体を経由することはほぼ間違いがない（図15）。その幾何構造がどのようなものであろうか。それそのものはもちろん単離されていないが、ジオキセタン部分を含む他の化合物の結晶構造解析は、これまでに数十件報告されている。^{23), 24), 25)} それによると、O-O結合距離（代表的な値1.51 Å）は、ジオキセタンの4員環内におけるC-C結合距離（1.58 Å）よりやや短く、C-O距離（1.47-1.48 Å）と同程度である。4員環は完全に平面ではなく、環内のC-C-O-Oねじれ角は10～20°程度となっている。一方、ルシゲニンに関連した結晶構造解析の例で参考になるものとして、2つのアクリジン環の接合部の炭素にナフタレン環の1，8-位が直接結合した化合物があった。²⁶⁾ これらの構造情報をもとに、ルシゲニンのジオキセタン中間体の立体構造を推定すると、図17ようになる。2枚のアクリジン環がわん曲して複葉飛行機形になることで、ジオキセタンの4員環が無理のない形をとれる。

化学結合が切れて励起状態の化学種が生じるとしても、余分なエネルギーを熱としてではなく光として放出する反応の条件とは何であろうか。ジオキセタン化合物を例にとると、この分解による光の放出は、カルボニル化合物の[2+2]光付加の逆反応のようにも見える。[2+2]光付加反応の例を図18に示した。この場合、一方の分子のπ電子系が光を受けて励起状態となり、もう一方の基底状態の分子のπ電子系とで結合が形成される。²⁷⁾（このような考え方にもとづき、化学発光の反応式を、生成物の基底状態と励起状態が1：1であるかの如く書いている論文もみられる）。しかし、種々のジオキセタン化合物について、分解反応が研

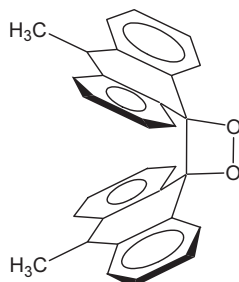


図17. ジオキセタン型中間体の推定立体構造。2枚のアクリジン環がわん曲して、複葉飛行機形になっている。

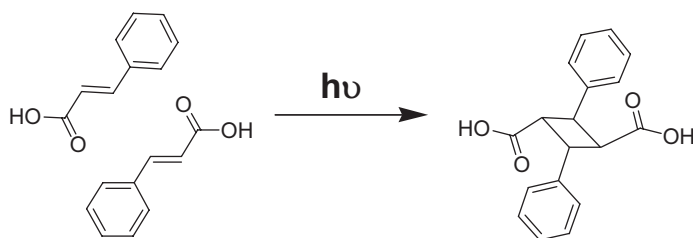


図18. [2+2] 光付加環化反応の例。trans-桂皮酸の光二量化は固相中でも起こる。一方の分子が光を吸収して励起状態となり、もう一方の分子（基底状態）との間で電子の移動が起こり、共有結合が形成される。²⁷⁾

究された結果、量子収率が生物発光に比べてかなり低いこと、また励起一重項状態と同程度に励起三重項状態も生じることがわかった。²⁷⁾ つまり、化学発光における分解反応は、光付加反応の単純なる逆反応ではないことが明らかとなった。励起分子が形成される反応機構として、結合の一部が切れてラジカルが発生し、さらに結合が切れて分解する過程で、電子が片方から他方へ移動するという CIEEL (Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence) 機構が有力となっている。²⁷⁾ 要するに、ラジカルがエネルギーの高い準位に電子を受け取れば、それは励起状態の分子に他ならないのである。

7. 学生実験への対応

7-1. 実験条件の修正

これまで実験準備上の慣習として、ヘモグロビン液と過酸化水素水の滴びんを、教卓前に並べ氷で冷やしていた。これはこれらの液を混合した際に、ヘモグロビンによる過酸化水素の分解によって細かい白い泡が発生するのを抑える（また試薬の変質を防ぐ）、という意図があった。調製後のルミノール液も氷冷するように指導していたが、これは誤りであった。冷却しない方が反応速度が増すため、より明るく光る。また、ルミノールの溶液調製時に超音波洗浄機に入れて、懸濁させていた。しかし、時間がたつと粉末が沈殿してくるため、あまり意味がな

かった（手で振り混ぜるだけで十分である）。それよりも、駒込ピペットでルミノール液を計り取るときに、液をピペットに何回が出し入れして攪拌させ、底に沈んでいる粉末もいくらか吸い取ることが重要である。また実験結果（表4）をもとに、添加する3M NaOHを1 ml から0.5 ml へ減らすことにした。

ルミノールの発光は比較的強いが持続時間はせいぜい26秒程度で、ルシゲニンの発光は1分を超えるが強度は弱い。この持続時間の長さのちがいは、励起状態が生成する酸化反応の速さの違いが反映している。ルシゲニンの実験では、濃アンモニア水をこれまで使用していた。これは、今回の実験で 3×10^{-3} M NaOHに置き換えられることがわかった。なお、ルミノールの溶液は、学生に調製させているが、ルシゲニンは事前に教員が用意しておいたものを使わせている。その理由は、ルシゲニンが非常に高価だからである（1 g 数万円）。教育効果を考えると、このままルシゲニンの実験を続けるのは疑問である。幸いなことに、ケミカルライトが市販されているので、それを利用しての実験を検討することにした（化学発光に関する教材については付録参照）。これは、シュウ酸エステルと過酸化水素による分解反応がエネルギー源で、添加してある蛍光色素から光が放出されるが、発光が数時間にも及ぶ（発光の量子収率も生物発光並に高い）。³⁾

7-2. 実験指導上の注意

試薬を試験管に通し、一通り用意させた後、部屋を暗くする。このとき、試験管に何をどこに入れたのか、わからなくならないように注意させる。過酸化水素を入れても光らないと訴える学生がたまにいる。これは、ルシゲニンと間違えて、ルミノール液を使うと起こる（ヘモグロビンなどの酸化補助剤を加えないため発光しない）。溶液を次々と試験管に加えるときは、よく振り混ぜさせる（溶液が不均一だと、溶液の上と下で光の色や強さが違ってくる）。

謝辞

ここで報告した化学発光に関する実験の改良は、慶應義塾大学調整費からの助成金を用いて行われた。予備実験に協力してくれた学生諸君に感謝する。

参考文献

- (1) 「教師のためのケミカルデモンストレーション2 化学発光・錯体」(B.Z. Shakhshiri 著, 池本勲訳, 丸善, 1997年)。
- (2) 「ケミルミネッセンス」(大澤善次郎著, 丸善, 2003年)。
- (3) 「バイオ・ケミルミネッセンス ハンドブック」(今井一洋, 近江谷克裕編著, 丸善, 2006年)。
- (4) 「光化学の世界」(徳丸克己著, 大日本図書, 1993年) pp.18-19。
- (5) Paul, D. B. (1978). "Recent analytical developments using chemiluminescence in solution," *Talanta* 25, 377-382.

- (6) White, E. H., Zafiriou, O., Kägi, H. H. & Hill, J.H.M. (1964). "Chemiluminescence of luminol: The chemical reaction," J. Am. Chem. Soc. 86, 940-941.
- (7) White, E. H. & Bursey, M. M. (1964). "Chemiluminescence of luminol and related hydrazides: The light emission step," J. Am. Chem. Soc. 86, 941-942.
- (8) Merényi, G. & Lind, J. S. (1980). "Role of a peroxide intermediate in the chemiluminescence of luminol. A mechanistic study," J. Am. Chem. Soc. 102, 5830-5835.
- (9) Maskiewicz, R., Sogah, D. & Bruice, T. C. (1979). "Chemiluminescent reactions of lucigenin. 2. Reactions of lucigenin with hydroxide ion and other nucleophiles," J. Am. Chem. Soc. 101, 5355-5364.
- (10) Maskiewicz, R., Sogah, D. & Bruice, T. C. (1979). "Chemiluminescent reactions of lucigenin. 1. Reactions of lucigenin with hydrogen peroxide," J. Am. Chem. Soc. 101, 5347-5354.
- (11) Brauer, H. D., Schmidt, R. & Hammerich, B. (1981). "Effects of pressure and temperature on the fluorescence quantum yield of N-methylacridone in solution interpreted in terms of the Eyring transition-state theory," Z. Naturforsch. A36, 489-493.
- (12) Bastos, E. L., Ciscato, L. F. M. L., Bartoloni, F. H., Catalani, L. H. & Baader, W. J. (2007). "Studies on PVP hydrogel-supported luminol chemiluminescence: 1. Kinetic and mechanistic aspects using multivariate factorial analysis," Luminescence 22, 113-125.
- (13) Faulkner, K. & Fridovich, I. (1993). "Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\cdot -}$," Free Radic. Biol. Med. 15, 447-451.
- (14) Cui, H., Meng, R., Jiang, H.-Y., Sun, Y.-G. & Lin, X.-Q. (1999). "Inhibition of luminol and lucigenin chemiluminescence by reducing organic compounds," Luminescence 14, 175-182.
- (15) Rose, A. L. & Waite, T. D. (2001). "Chemiluminescence of luminol in the presence of iron (II) and oxygen: Oxidation mechanism and implications for its analytical use," Anal. Chem. 73, 5909-5920.
- (16) Vieru, I.Y., Kozlov, Y.N. & Petrov, A.N. (1996). "Kinetics of luminol oxidation with ferricyanide in aqueous alkaline solution," Kinet. Catal. 37, 754-759.
- (17) Shi, M.-J. & Cui, H. (2006). "Electrochemiluminescence of luminol in dimethyl sulfoxide at a polycrystalline gold electrode," Electrochim. Acta 52, 1390-1397.
- (18) Larena, A. & Martínez-Urreaga, J. (1991). "Solvent effects in the reaction of lucigenin with basic hydrogen peroxide: chemiluminescence spectra in mixed polar solvents," Monatsh. Chem. 122, 697-704.
- (19) Maeda, K., Kashiwabara, T. & Tokuyama, M. (1977). "Mechanism of the

- chemiluminescence of lucigenin. II. The charge-transfer structure of lucigenin and reaction of 10,10'-dimethyl-9,9'-biacridinium dication by electron transfer from nucleophiles," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 50, 473-481.
- (20) 「化学便覧」改訂5版基礎編II (丸善, 2004年) pp.758-760.
- (21) 「電子移動の化学」(渡辺正, 中林誠一郎著, 朝倉書店, 1996年) pp.42-49.
- (22) 「錯体化学」(山崎一雄, 中村大雄著, 裳華房, 1984年) pp.212-229.
- (23) Adam, W., Arias, L. A., Zhn, A., Zinner, K., Peters, K., Peters, E.-M. & von Schnering, H. G. (1982). "X-Ray structural parameters and the thermal stability of 1,2-dioxetans," *Tetrahedron Lett.*, 23, 3251-3254.
- (24) Kabe, Y., Takata, T., Ueno, K. & Ando, W. (1984) "Stereochemical studies of dioxetane formation with hindered olefins," *J. Am. Chem. Soc.* 106, 8174-8180.
- (25) Brouwer, A. C., Hummelen, J. C., Luider, T. M., van Bolhuis, F. & Wynberg, H. (1988). "Xanthenylideneadamantane 1,2-dioxetane. Preparation, properties and its potential use as an inherently thermochemiluminescent label," *Tetrahedron Lett.* 29, 3137-3140.
- (26) Kawai, H., Takeda, T., Fujiwara, K. & Suzuki, T. (2004). "Short nonbond and long C-C bond in naphthalene-1,8-diylbis (10-methylacridinium) and the corresponding hexaphenylethane derivative: a new electrochromic pair exhibiting dynamic redox properties," *Tetrahedron Lett.*, 45, 8289-8293.
- (27) 「有機光化学」(杉森彰著, 裳華房, 1991年)。
- (28) Baj, S. & Krawczyk, T. (2006) . "An investigation into the reaction of hemin-catalysed luminol oxidation by peroxy compounds," *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 183, 111-120.
- (29) Wróblewska, A., Reshetnyak, O. V., Kovalchuk, E. P., Pasichnyuk, R. I. & Błażejowski, J. (2005). "Origin and features of the electrochemiluminescence of limunol – Experimental and theoretical investigations," *J. Electroanal. Chem.* 580, 41-49.
- (30) Okajima, T. & Ohsaka, T. (2003). "Chemiluminescence of lucigenin by electrogenerated superoxide ions in aqueous solutions," *Luminescence* 18, 49-57.
- (31) 高山成明, 早川和一 「犯罪捜査に用いられる化学発光反応」*化学と教育*, 44巻, 502-505 (1996年)。
- (32) 戸谷義明 「愛知教育大学の学生による訪問科学実験のための生物発光化学発光の化学マジック実験法の検討」*愛知教育大学研究報告*, 55巻 (自然科学編), 45-53 (2006年)。
- (33) Ando, Y., Niwa, K., Yamada, N., Enomoto, T., Irie, T., Kubota, H., Ohmiya, Y. & Akiyama, H. (2008). "Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission," *Nature Photonics*, 2, 44-47.

参考

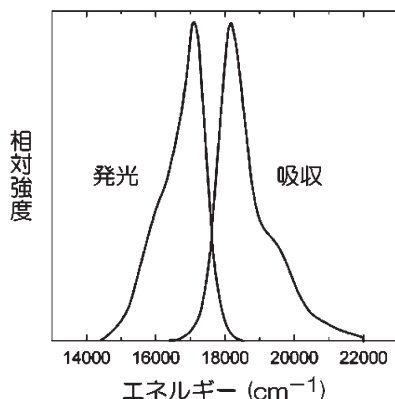
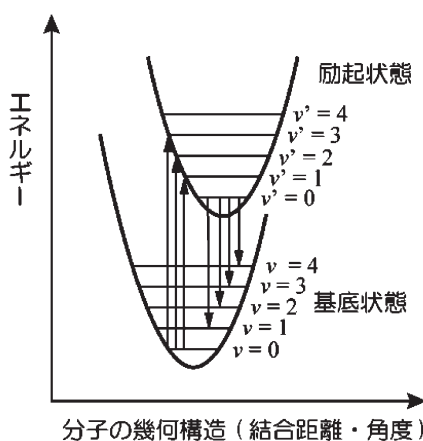
(1) 分子による光の吸収と放出

炎色反応によって金属元素の種類が同定できることは、よく知られている。また、太陽光のスペクトルには暗線があり、それは特定な元素が太陽に存在し、特定の波長の光を吸収しているからである。同一の原子により吸収される光の波長と、放出される光の波長は一致する。これは、原子中の電子が特定のエネルギー準位を持ち、光の吸収と放出に伴うエネルギー変化 ΔE には、次の関係が成り立つからである。 $\Delta E = h \nu = hc/\lambda$ 。ここで、 h はプランクの変数、 c は光速、 ν は光の振動数、 λ は光の波長である。

原子が結合して分子を形作ると、吸収する光のエネルギーと放出する光のエネルギーは違ってくる。例として、ローダミン B の吸収および発光（蛍光）スペクトルを図19に示す。¹⁾ どのような分子でも一般に、放出する光のエネルギーよりも、吸収する光のエネルギーの方が大きい。また、吸収スペクトルと発光スペクトルは、エネルギー軸に沿って近似的に鏡像関係にある。その理由はおおまかに、図20を用いて次のように説明することができる。^{4), 27)} 分子は電子状態が同じでも、異なる振動状態をとりうる。つまり、原子間の結合距離・角度が変わるような振動運動をしているが、その状態を図中でエネルギーの低い方から $v=0, 1, 2, \dots$ という準位（横線）で表している。分子は通常、エネルギーの低い状態にある。つまり電子的に基底状態であり、また振動状態も $v=0$ のレベルにある。これに光を照射すると、電子の励起状態へ上がるが、この電子遷移は非常に速く起こるので、分子の幾何構造は保たれたまま昇位する。このとき、電子の励起状態の異なる振動準位 ($v'=0, 1, 2, \dots$) へ到達することが可能なので、吸収される光のエネルギーは幅をもつ。電子が分子の結合性軌道（あるいは非結合性軌道）から反結合性軌道へ遷移するため、基底状態と励起状態とでは、エネルギーが最小となる幾何構造が異なる。したがって、光を吸収した分子は最安定な幾何構造へと変化し、また振動準位も最低レベル ($v'=0$) へ移動する。この過程でエネルギーを幾分失うが、それは溶媒などに熱として伝わることになる。光の放出は、励起状態の振動準位 $v'=0$ から基底状態へ向かう電子遷移によって起こる。このとき、行き着く先の基底状態の振動準位は $v=0$ だけでなく種々のレベルへの移動が可能である。このため、発光スペクトルにも幅が生じる。また、基底状態と励起状態とで、振動のエネルギー準位の間隔はほぼ等しいとみなせる。このため、 $v=0$ と $v'=0$ 間の遷移（0-0 遷移）のエネルギー値を境として、吸収と発光とで近似的な鏡像関係となる（図19）。

(2) 化学発光の応用例など

ルミノールの化学発光の反応機構について、まだ完全にわかっているわけではなく、別の反応機構も提案されている（図21）。²⁸⁾ 反応の過程でジアザキノ化合物が生成するところまでは共通である。この反応機構では環状過酸化中間体を仮定せず、窒素の脱離が比較的早く起こると考えている。なお、電極を用いて酸化させ、化学発光を起こさせることもできる。これを ECL (electrochemiluminescence) と呼ぶ。ルミノールとルシゲニンについて、その反応

図19. ローダミンBの発光および吸収スペクトル。¹⁾図20. 光の吸収と放出に伴う分子の状態変化。^{4), 27)} 曲線は分子の電子状態のエネルギーであり、それは分子の幾何構造に依存する。 $v = 0, 1, 2 \dots$ は振動準位であり、矢印は電子遷移を表す。

条件や反応機構が詳しく研究されている。^{29), 30)}

各種の金属イオンはルミノールの酸化補助剤として発光を助けるし、抗酸化性有機分子は発光反応を抑制するので、発光強度の変化から標的物質の濃度を求めることができる。微弱な光であってもフォトマル（光電子増倍管）のような検出器を使うと、比較的容易に測定できる。化学発光を用いた分析法のメリットは、反応に関与しない物質が混ざっていても測定が可能であること、つまり基本的に前処理が不要であること、また高感度であることがあげられる。分析の応用範囲は食品から医療に至るまで幅広い分野に渡っている。^{2), 3)} 例えば、毛髪中に残っている覚醒剤を蛍光物質に変換して、シュウ酸エステルの化学発光を利用して検出する方法が開発されている。³¹⁾

生物発光の教材として、キッコーマン（株）製のホタライトという実験キットが市販されている。また、過シュウ酸の反応による輝度の高いケミカルスティックが（株）ルミカ等から販

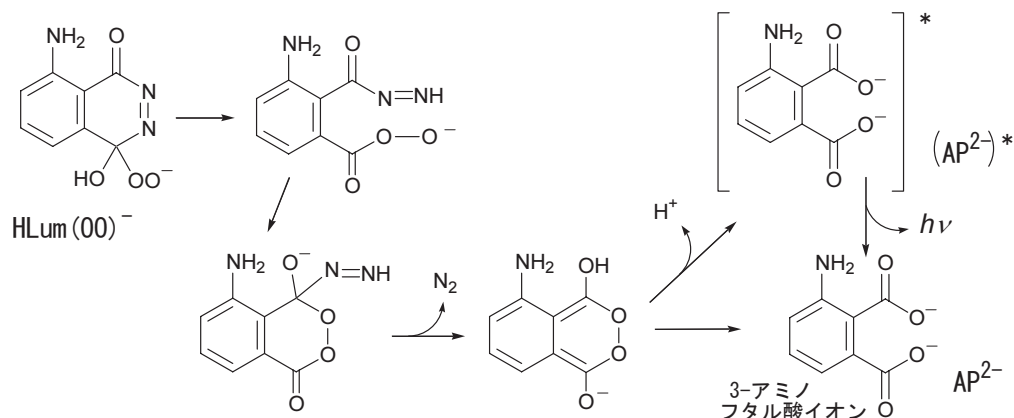


図21. ルミノールの過酸化物の分解反応について提案されている, 別の反応機構。²⁸⁾つまりこの案では, 窒素がまず脱離してから, O-O結合が切れて AP^{2-} の励起状態が生じると考えている。

売されており, これらを利用した実験例もいくつか報告されている。^{1), 3), 32)}

(3) 学生実験用各種溶液の調製

0.1%ヘモグロビン水溶液を作った後, 吸引ろ過で固体を除く(通常のろ過では非常に遅い)。ルシゲニン溶液は200 mgをエタノール1 Lの割合で溶かし, 100 mlビンに小分けした後, ルシゲニンを30 mg(小葉さじ一杯くらい)加える。つまり, ルシゲニンの粉末が若干沈殿するくらいで調製しておく。もし, ルシゲニンがびんの底にほとんど沈殿していないならば追加しておく必要がある。ローダミンBとフルオレセイン溶液はミクロスパーテル5~6杯をエタノール50 mlの割合でそれぞれ溶かす。また3% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 水溶液を作る。ヘモグロビン水溶液, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 水溶液, 過酸化水素水は冷蔵庫で保存する。