

15. 化学発光

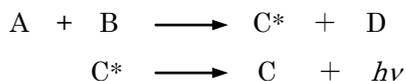
【目的】 ルミノールおよびルシゲニンの反応に伴う発光を観察し、その原理を学ぶ。

【解説】

1. 化学発光

分子の電子構造は、通常はもっともエネルギーが低く、安定な状態（基底状態）にある。これに光をあてると、その光を吸収して、よりエネルギーの高い状態（励起状態）へ変化する。ただし、励起状態のままずっと存在できるわけではなく、自然に基底状態へもどる。その際に、余分なエネルギーを光として放出する。

この分子の励起状態は、光をあてなくても、化学反応の途中で生成することがある。たとえば、反応物質 A と B とから、生成物 C と D ができる反応の途中に C の励起状態 C*が生じる場合がある。このとき、C*から C へ変わる際に光 ($h\nu$) を放射する。これが、化学発光である。



2. 量子収率

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。

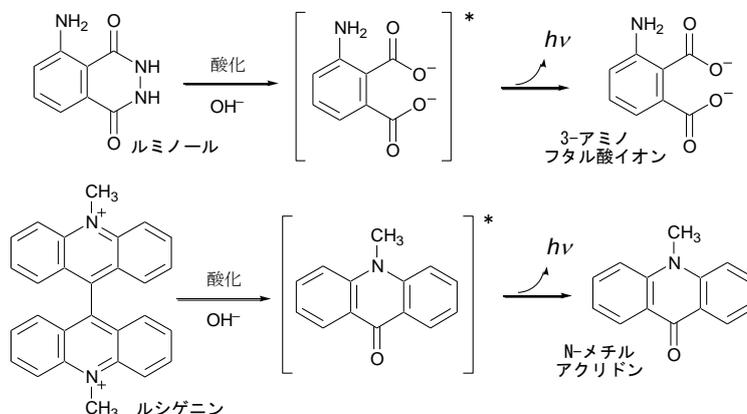
$$\Phi_{CL} = \Phi_C \times \Phi_E \times \Phi_F \quad (1)$$

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。しかし、化学発光については、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。

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。ルミノールの発光に関わる 3-アミノフタル酸イオンの 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-メチルアクリドンの Φ_F も 0.1 程度である。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。

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

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．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．

3. 蛍光性色素の光の吸収と発光

色素は可視部の光を吸収して，基底状態から励起状態へ電子構造が変わる．同じ励起状態であっても，分子の形や振動モードが変化することによって，エネルギーのより低い形になってから，基底状態にもどる．このため，吸収する光のエネルギーよりも，放出される光のエネルギーの方が小さい（光の波長が長い）．例として，ローダミンBの発光および吸収スペクトルを右図に示す．

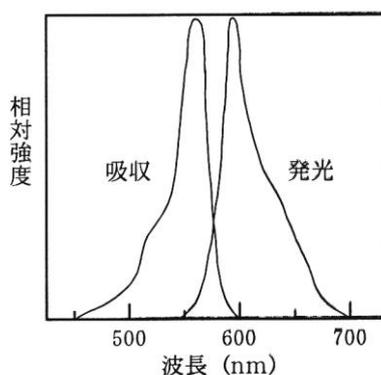


図1. ローダミンBの発光および吸収スペクトル

4. ルミノールの反応機構

ルミノール (H_2Lum) は中性の分子であり，アルカリ溶液中ではプロトン H^+ 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です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 (Lum) が生じる．これに，過酸化水素から生じた HOO^- イオンが付加して，過酸化物ができる (図 3)．この過酸化物は，溶存酸素によっても生じうる．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 4)．その途中で，環状過酸化物中間体を経由すると推定される．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，それが励起状態から基底状態へ落ちるときに，光が放出される．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．

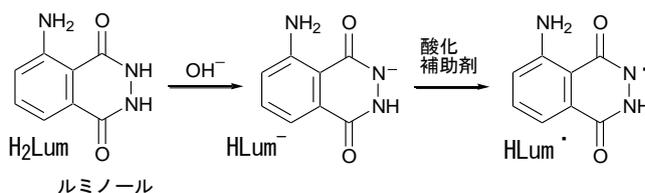


図 2. ルミノールラジカルの生成

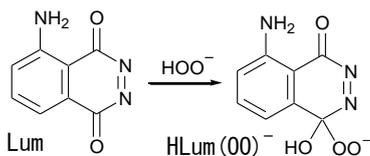


図 3. 過酸化物の生成

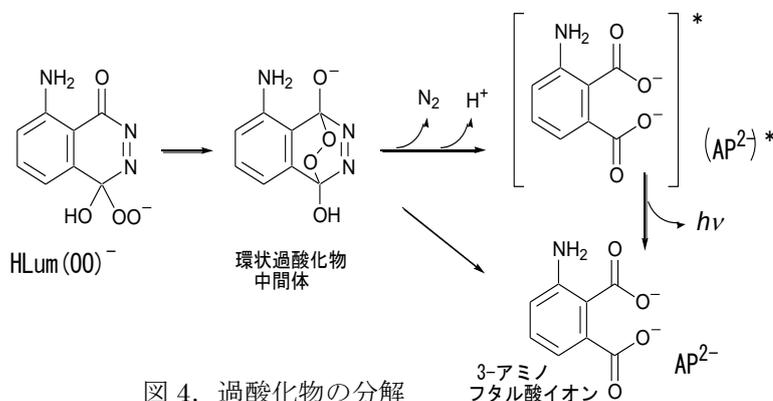


図 4. 過酸化物の分解による発光

5. ルミノールの酸化補助剤

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。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、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。

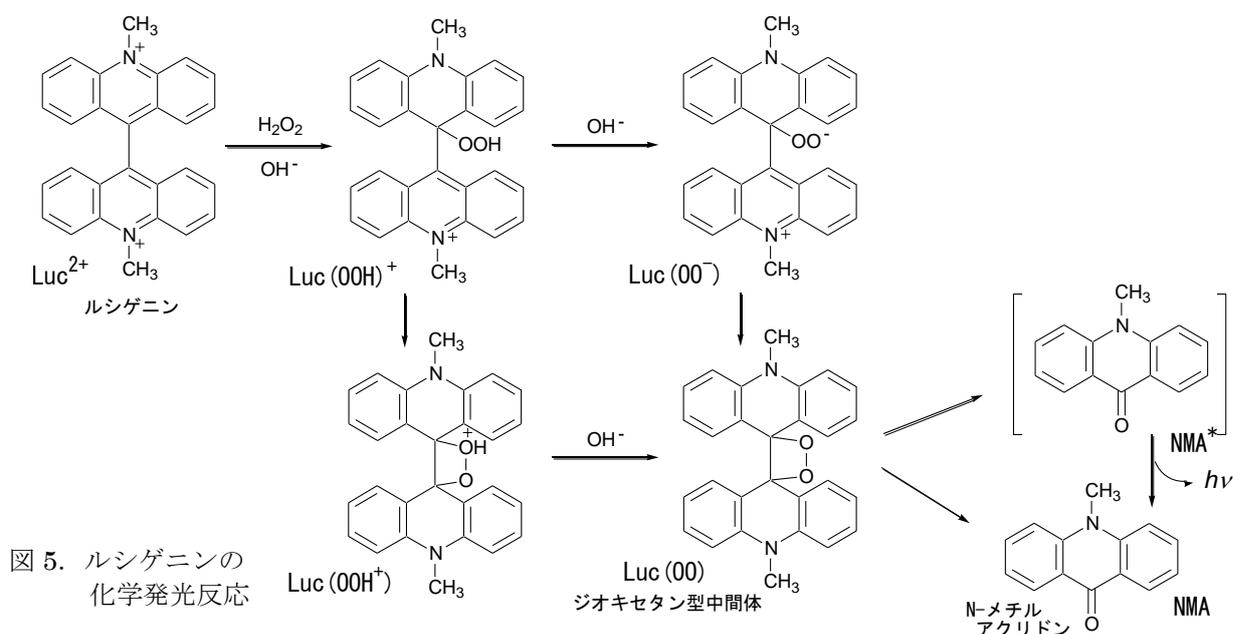
ヘモグロビンは血液中のタンパク質であり、酸素を体内に運搬するが、その活性中心は鉄原子を含むポルフィリン骨格であり、それをヘムと呼ぶ。ヘモグロビン中の鉄原子は Fe(II)の状態であり、血液中ではこれが酸化されないように、酵素によって守られている。ヘモグロビンに限らず、Fe(II)化合物はアルカリ溶液中の溶存酸素と反応し、スーパーオキシドアニオン $O_2^{\cdot-}$ さらにはヒドロキシラジカル OH^{\cdot} を生じさせる。この OH^{\cdot} がルミノール陰イオンを酸化する。その一方、Fe(II)は Fe(IV)=O まで非可逆的に酸化される。酸化補助剤が $K_3[Fe(CN)_6]$ の場合については、それ自身が酸化剤として働いて Fe(II)となる。

表 1. 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	$Fe(II) + O_2 \rightarrow Fe(III) + O_2^{\cdot-}$ $Fe(II) + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow Fe(III) - H_2O_2 \rightarrow [Fe(IV)=O]^{2+} + OH^{\cdot} + H^+$ $HLum^- + OH^{\cdot} \rightarrow Lum^{\cdot-} + H_2O$
Fe(III)	$K_3[Fe(CN)_6]$	$HLum^- + Fe(III) \rightarrow HLum^{\cdot} + Fe(II)$

6. ルシゲニンの反応機構

ルシゲニンは通常は硝酸塩であり、2価の陽イオン (Luc^{2+}) として存在する。アルカリ条件下におくと、ラジカルが発生しやすい。このため、高い pH (>13) では、ルシゲニン溶液をアルカリ性にした段階で、溶存酸素による分解反応が急速に起こってしまう。pH が 11 から 12 程度であれば、過酸化水素を加えることで反応を開始させることができる (図 5)。ルシゲニンに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 $Luc(OO)$ ができる。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、発光が起こる。



[実験]

1. ルミノールの発光

①溶液の準備

50 ml 三角フラスコにルミノールを約 13 mg (ミク로스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、よく振り混ぜて懸濁させる。

A 液 (3 本): 試験管に先に作ったルミノール溶液¹⁾ と 3%過酸化水素水 (H_2O_2) をそれぞれ 1 ml ずつ入れ、3M 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) を 0.5 ml 加えて振り混ぜる。

B-1 液: 試験管に 0.1%ヘモグロビン水溶液を 1 ml 入れる。

B-2 液: 試験管に 3%フェリシアン化カリウム水溶液 (0.09 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) を 1 ml 入れる。

B-3 液: 試験管に 0.1%ヘモグロビン水溶液を 1 ml と、フルオレセイン溶液を 0.5 ml 加える。

②発光の観察

暗所にて、A液が入った試験管 3 本に B-1, B-2, B-3 液をそれぞれ入れて振り混ぜ、発光の様子を観察する。 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 液 (B-2 液) の色と、それを A液に混ぜて反応させた後の色との違いも記録する。

2. ルシゲニンの発光

①溶液の準備

ルシゲニンのエタノール溶液が滴びんに用意してある。びんの底に沈んでいる粉末²⁾ を懸濁させるために、必要に応じて超音波洗浄機にかける。

C-1 液: 試験管に (懸濁させた) ルシゲニン溶液と濃アンモニア水³⁾ を 1 ml ずつ加える。

C-2 液: 試験管にルシゲニン溶液、濃アンモニア水、ローダミン B 溶液を 1 ml ずつ加える。

C-3 液: 試験管にルシゲニン溶液、濃アンモニア水、フルオレセイン溶液を 1 ml ずつ加える。

②発光の観察

試験管 (C 液 3 種類) を暗所に置き、3% H_2O_2 を 1 ml ずつ加えて発光の様子を観察する。

[課題]

- (1)ルミノールと、(2)ルシゲニンの実験で、それぞれ発光している化学種を構造式で答えなさい。
- 上記の化学種が発光する際に、その光のエネルギーはどこから来るのか、説明しなさい。
- フルオレセインやローダミン B などの蛍光性色素を加えると、化学発光の色が変わる。その理由を説明しなさい。

1) 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か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ようにする。

2) もし、ルシゲニンの粉末がびんの底にほとんど沈殿していないならば、試薬を追加する必要がある。

3) ルシゲニンの発光で、 H_2O_2 添加時に発光させるための最適な pH は約 11 である。このため、濃アンモニア水の代わりに、 3×10^{-3} M NaOH を用いることもできる。

15-2. ライトスティック

【目的】 スティックの発光強度が温度によって変わる様子を調べ、反応速度と光の強度との関係を学ぶ。

【解説】

1. シュウ酸エステルの分解反応

電池が不要な光源として、化学発光を利用したケミカルライトが開発された。これはシュウ酸エステルの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）。詳しい反応機構は不明だが、シュウ酸エステルの分解過程でジオキセタンジオンが生じ、それがさらに二酸化炭素へ分解するときに溶液中に存在する蛍光色素へエネルギーが移動する（図 1）。そして蛍光色素の励起状態が生じ、それが基底状態に戻るときに光（ $h\nu$ ）が放出される。発光の持続時間がとても長いのは、シュウ酸エステルの分解反応が非常に遅いためである。サリチル酸ナトリウムは、触媒として加えられている。それは弱い塩基であり、 H_2O_2 から HOO^- を生じさせるので、シュウ酸エステルの分解反応を促進する。

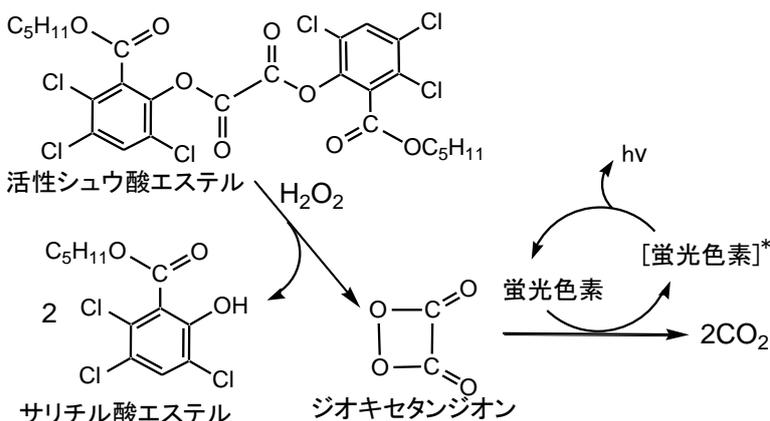


図 1. 活性シュウ酸エステルの分解と色素による発光

2. ライトスティックの仕組み

プラスチック製の外筒の中に、ガラス製のアンブル（内筒）が入っている。①内筒には活性シュウ酸エステルと蛍光色素の溶液が入っており、内筒と外筒の間にはサリチル酸ナトリウムを添加した過酸化水素溶液が入っている。外筒を軽く折り曲げることによって、中のアンブルを割り、2つの液を混ぜ合わせることで化学発光が開始する。蛍光色素の種類（図 3）によって、発する光の色が異なる。ブルー、グリーン、黄色は単一の蛍光色素が使われているが、ピンクとオレンジは 2 種類の色素を混ぜることで、それぞれの色の光が作り出される。なお、発光の量子収率が決まっているので、温度が高いと光は強くなるが、持続時間は短くなる。

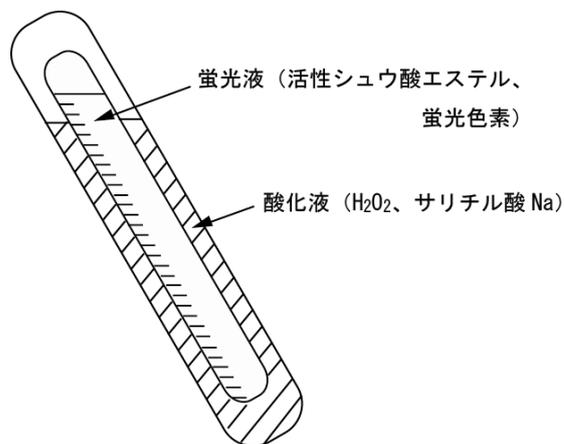


図 2. ライトスティックの構造

1) 湿気で劣化するため、市販品はアルミパックで密封包装されている。直射日光と湿気を避けて、室温保存で有効期限は 4 年間となっているが、購入後 2 年を目処に使った方がよいとのこと。

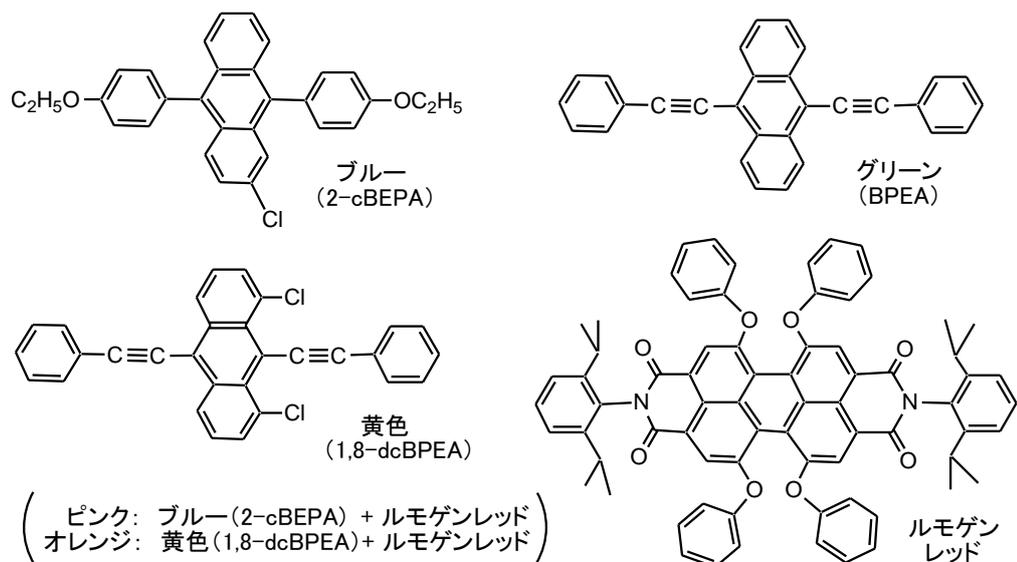


図 3. 蛍光色素²⁾

[実験] トレイに氷水を作る．また 40℃程度のお湯³⁾を用意する．暗所で以下の操作を行う．

- ①ライトスティック⁴⁾の外筒(プラスチック製)をポキッと音がする程度, 数か所を軽く折り曲げる(音がしたら, それ以上は折り曲げない)．⁵⁾ これにより内筒(ガラス製)が割れて, 反応が開始するので, スティック全体が光るように, 軽く振る．
- ②スティック全体を完全に氷水につけて冷やす(2~3分)．100 ml ビーカーにお湯を汲み, その中によく冷えたスティックを差し込む．細長いスティックは, その一部がお湯に入り, 残りの部分がビーカーの外に出た状態になるので, それらの光り具合を比べる．

2) 色素の略号は, 以下の通り化合物名を表す．2-cBEPA: 2-クロロ-ビス(エトキシフェニル)アントラセン．

BPEA: ビス(フェニルエチニル)アントラセン．1,8-dcBPEA: 1,8-ジクロロ-ビス(フェニルエチニル)アントラセン．

3) 外筒のプラスチックが溶けたり, CO₂が急激に発生して破裂するのを防ぐために, お湯は 40℃程度にとどめておく．なお, スティックは可燃性のため, バーナーを使わないこと．

4) ㈱ルミカ社製．発光時間はおよそ 4~6 時間．使用後は「プラスチック」ごみとして廃棄する．発光原液の成分は, 酸化液: 溶剤(フタル酸ブチルと tert-ブタノール), 過酸化水素(3~5%), サリチル酸ナトリウム．蛍光液: 溶剤(フタル酸ブチル), シュウ酸エステル(約 8%), 蛍光色素(0.12~0.16 M)．毒物及び劇物取締法で指定されている薬品は使用されていない．

5) 外筒のプラスチックにしわがでる程折り曲げたりすると, 液がもれてしまうことがある．