

報 文

ルミノール反応に基づく還元物質の化学発光

久保 博昭^{®*1}, 斉藤 雅俊^{*1}, 持井 祐子^{*1}, 鳥 羽 陽^{*1},
西 川 隆^{*2}, 猪俣 朋子^{*3}, 吉村 吉博^{*3}, 中澤 裕之^{*3}

Chemiluminescence of reducing agents based on the luminol reaction

Hiroaki KUBO, Masatoshi SAITOH, Yuko MOCHII, Akira TORIBA*, Takashi NISHIKAWA**,
Tomoko INOMATA, Yoshihiro YOSHIMURA and Hiroyuki NAKAZAWA***

* School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1, Shirokane, Minato, Tokyo 108-0072

** School of Medicine, Kitasato University, 1-15-1, Kitasato, Sagami-hara-shi, Kanagawa 228-0829

*** Faculty of Pharmaceutical Science, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa, Tokyo 142-8501

(Received 8 May 1998, Accepted 1 June 1998)

The chemiluminescence reaction of luminol with reducing agents was studied by a flow-injection analysis. We found that reducing agents directly produce a chemiluminescence with luminol in the presence of hexacyanoferrate(III) and hexacyanoferrate(II) as a catalyst in an alkaline solution.⁸⁾⁹⁾ To explain the chemiluminescence of luminol with reducing agents, ESR measurements were performed. ESR showed that superoxide anion radicals were generated from uric acid, dihydroxyacetone, hydroxylamine, cortisone and glucose in an alkaline solution by using 5,5'-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) as a spin-trap agent. The ascorbate radical was observed for ascorbic acid without DMPO. For phenacyl alcohol, a new radical without DMPO was observed. It is reported that the superoxide anion radical is a crucial intermediate in luminol chemiluminescence and that the chemiluminescence is generated in the presence of free radicals.⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾ Therefore, it was suggested that these radicals resulted from the reducing agents in the alkaline solution participate in luminol chemiluminescence. The detection limits ($S/N=3$) of uric acid, phenacyl alcohol, hydroxylamine, ascorbic acid, dihydroxyacetone, cortisone and glucose were 40, 60, 70, 200, 430, 440 and 75 ng, respectively.

Keywords : chemiluminescence; ESR; flow injection analysis; luminol; reducing agents.

1 緒 言

ルミノールによる化学発光が1928年に報告¹⁾されて

から、分析分野でルミノールは過酸化水素、酸化物質、そして金属イオンの測定に使用されている。

最近、化学発光を用いた分析法の総説が幾つか報告^{2)~6)}されているが、還元物質によるルミノールの直接的な化学発光については触れられておらず、還元物質に作用する酸化酵素を用いて過酸化水素を発生させてから間接的に測定している。又、ルミノールによる化学発光

*1 北里大学薬学部: 108-0072 東京都港区白金5-9-1

*2 北里大学医学部: 228-0829 神奈川県相模原市北里1-15-1

*3 星薬科大学: 142-8501 東京都品川区荏原2-4-41

の機構も報告⁷⁾され、酸素から生じたスーパーオキシド陰イオンラジカルが重要な役割を演じていることが知られている。

著者らは、最近、グルコース、尿酸、アスコルビン酸等の還元物質が、アルカリ性の下で触媒存在下で直接ルミノールと反応して化学発光することを見だし報告した⁸⁾⁹⁾。しかし、還元物質のルミノールによる化学発光機構については報告していない。今回、フローインジェクション法 (FIA) と電子スピン共鳴法 (ESR) によって解明できたので報告する

2 実験

2.1 試薬

ルミノールナトリウム塩、グルコース、アスコルビン酸、尿酸、コルチゾン、ジヒドロキシアセトン、ヒドロキシルアミン塩酸塩は和光純薬製、フェナシルアルコールは東京化成製、5,5-ジメチル-1-ピロリン *N*-オキシド (DMPO) は同仁化学製、ヘキサシアノ鉄(II) 酸カリウム三水和物、ヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウム、水酸化ナトリウム、酢酸ナトリウムは関東化学製を用いた。水はすべて Milli-Q Labo (日本ミリボア製) によって精製した超純水を使用した。

還元物質の標準溶液は、グルコースは 1 mg/ml の水溶液、アスコルビン酸は 5 µg/ml 水溶液、ヒドロキシルアミン塩酸塩、フェナシルアルコールは 1 µg/ml の水溶液、尿酸は 1 µg/ml の 0.1 mM 酢酸ナトリウム溶液、ジヒドロキシアセトン、コルチゾンは 10 µg/ml の 2% アセトニトリル溶液になるように調製した。

ルミノール試液は、0.4 mM ルミノールナトリウム塩と 100 mM ヘキサシアノ鉄(II) 酸カリウム三水和物を含む 200 mM 水酸化ナトリウム溶液。ヘキサシアノ鉄(III) 試液は、0.15 mM ヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウム水溶液。

3 装置及び操作

ポンプは Model S-4000 (相馬光学)、インジェクターは Model U6K (Waters)、化学発光検出器は Model S-3400 (相馬光学)、レコーダーは National recorder VP-6621A (松下電器) を用いた。本研究に用いた FIA システムの概略を Fig. 1 に示す。ルミノール試液とヘキサシアノ鉄(III) 試液は各々 1 ml/min で送液した。標準溶液は 5 µl を注入した。

ESR の測定は JES-REIX Spectrometer (日本電子) を用い 9.5 GHz で操作した。還元物質の濃度は 1 mg/ml にし、5 µl の DMPO を添加して ESR を測定した。

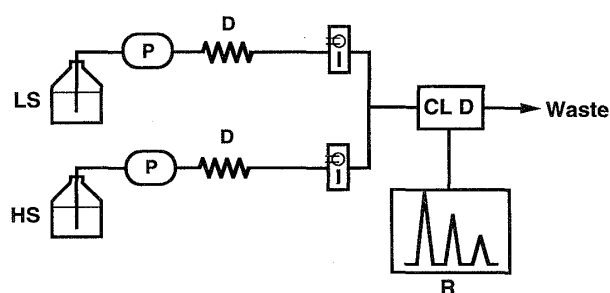


Fig. 1 Flow diagram of chemiluminescence FIA system

LS: luminol solution, HS: hexacyanoferrate(III) solution; P: pump; D: damper; I: injector; CLD: chemiluminescence detector; R: recorder

4 結果及び考察

既報⁸⁾⁹⁾では、3 台のポンプでルミノール試液、ヘキサシアノ鉄(III) 試液及びキャリア液を送液し、標準溶液をキャリア液に注入し最適条件を検討した。今回、2 台のポンプでルミノール試液とヘキサシアノ鉄(III) 試液を送液したが、各々の試液の濃度は既報の最適条件における最終混合溶液濃度と同じ濃度になるようにした。各々の試液の系に標準溶液を注入したとき、系によって化学発光強度が変化したので、その結果を Fig. 2 に示す。尿酸とグルコースではヘキサシアノ鉄(III) 試液に注入したほうがルミノール試液に注入した場合よりも化学発光強度はわずかに高かった。ヒドロキシルアミン、アスコルビン酸、コルチゾン、ジヒドロキシアセトン、フェナシルアルコールではルミノール試液に注入したときに化学発光強度が増大した。これは、尿酸とグルコースを除いた還元物質とルミノール試液中の試薬が、ヘキサシアノ鉄(III) 試液と混合する前に反応した結果と思われる。そこで、還元物質を系に設置したループタイプのインジェクターに注入し、ループ中での各試液との混合時間を変化させた。その結果を Fig. 3 に示す。ルミノール試液の系では尿酸、フェナシルアルコール、アスコルビン酸の化学発光強度は時間とともに減少した。コルチゾン、ジヒドロキシアセトン、ヒドロキシルアミンは、一時、化学発光強度は増大したがその後減少した。グルコースの化学発光強度は時間とともに増大した。しかし、ヘキサシアノ鉄(III) 試液の系ではすべての還元物質の化学発光強度に変化は見られなかった。このことは、還元物質がルミノール試液中の試薬と反応してルミノールの化学発光強度を変化させる反応生成物を生成したと考えられる。

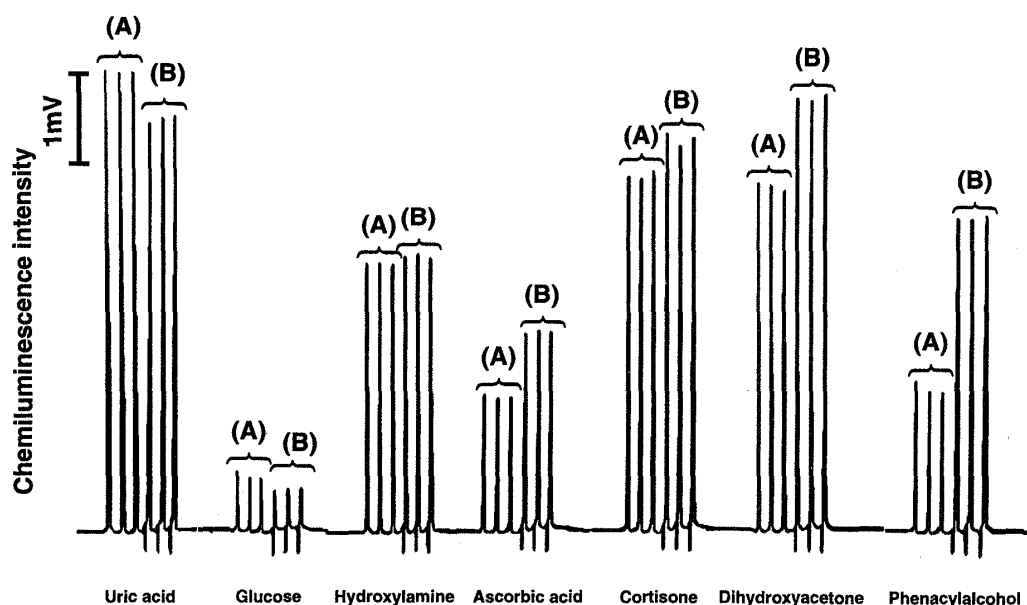


Fig. 2 Chemiluminescence of reducing agents injected into the hexacyanoferrate(III) solution stream (A) and the luminol solution stream (B)

Injection amount: uric acid, 5 ng; glucose, 5 μ g; hydroxylamine, 5 ng; ascorbic acid, 25 ng; cortisone, 50 ng; dihydroxyacetone, 50 ng; phenacyl alcohol, 5 ng

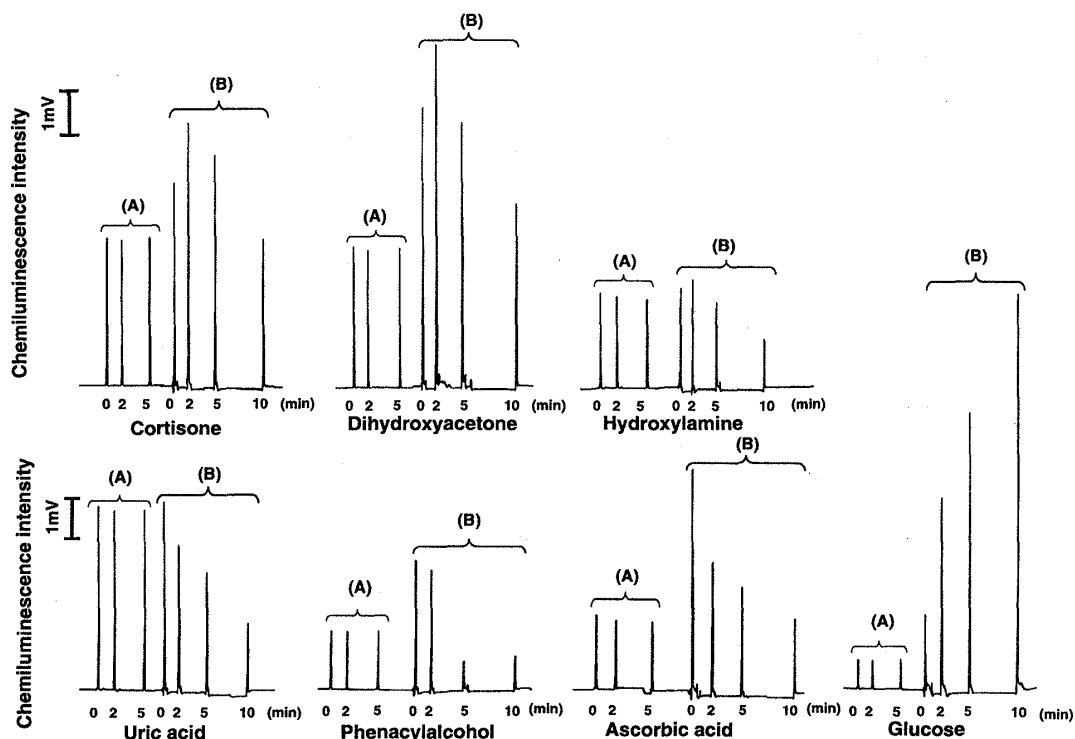


Fig. 3 Chemiluminescence for time course of reducing reagents in the loop type injector of the hexacyanoferrate(III) solution stream (A) and the luminol solution stream (B)

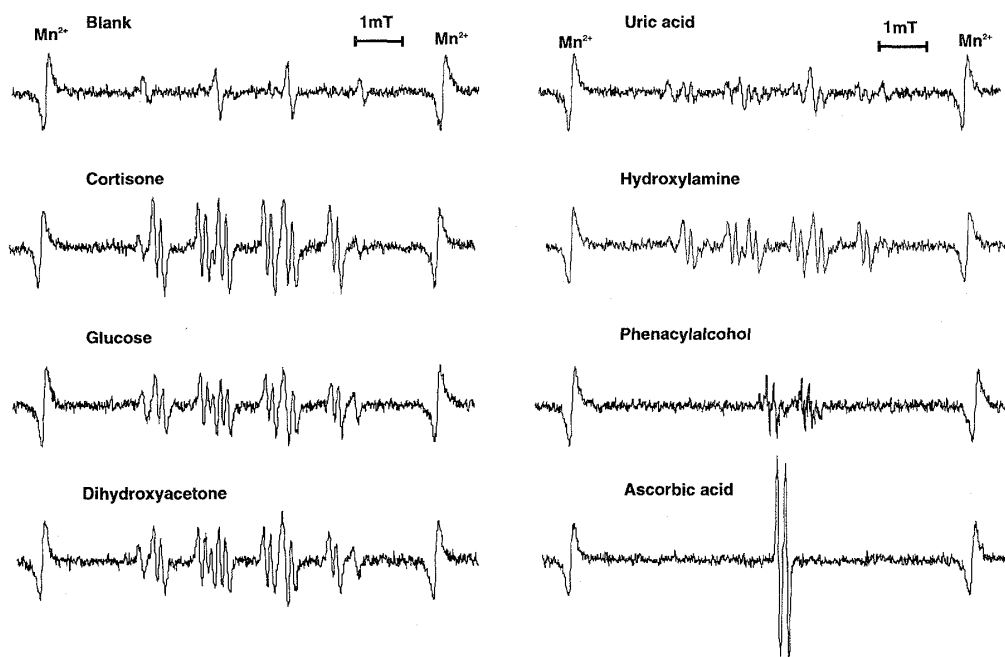


Fig. 4 ESR spectra for reducing agents

Blank: DMPO in 200 mM NaOH. Uric acid, glucose, hydroxylamine, cortisone and dihydroxyacetone were dissolved in 200 mM NaOH and then DMPO was added. Phenacyl alcohol and ascorbic acid were dissolved in 200 mM NaOH.

ルミノール試液中のルミノール、ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム、水酸化ナトリウムと還元物質との反応を各々の試薬が含まれていない条件で経時的に検討した。その結果、還元物質はルミノール試液中の水酸化ナトリウムと反応することが分かった。そこで、還元物質を水酸化ナトリウム溶液中で経時的に変化させた後、ルミノール試液の系にその溶液を注入したとき、ルミノール試液系のインジェクターに注入して滞留した時間と同様に、時間とともにグルコースの化学発光強度は増大したが、他の還元物質は減少した。水酸化ナトリウム溶液中で経時的に変化させると化学発光強度に変化が見られたことは、還元物質から化学発光強度を変化させる反応生成物が生じたと思われる。次に、水酸化ナトリウム溶液中での還元物質の反応をESRで検討した。Fig. 4に200 mM水酸化ナトリウム溶液中での各々の還元物質との反応をESRで測定した結果を示す。尿酸、ヒドロキシルアミン、グルコース、コルチゾン、ジヒドロキシアセトンではスピントラップ剤であるDMPOを用いることによってスーパーオキシド陰イオンラジカルが生成していることが分かった。アスコルビン酸とフェナシルアルコールからは、DMPOを用いなくてもアスコルビン酸ラジカルと構造不明の新しいラジカルが各々生じた。

フェナシルアルコールからのラジカル発生機構と構造解析は現在検討中である。

ルミノールの化学発光は、ルミノールの酸化によって生じたルミノールラジカルが、スーパーオキシド陰イオンラジカルと反応して不安定な最終過酸化物となり、これが分解するときに光が発生すると報告⁷⁾されている。

又、ルミノールはフリーラジカルが存在していると発光するとも報告¹⁰⁾¹¹⁾されている。これらのことから還元物質からルミノール試液中の水酸化ナトリウムと反応して、スーパーオキシド陰イオンラジカルや還元物質自身のラジカルが発生し、それらのラジカルがルミノールと反応して化学発光が生じたと考えられる。

グルコースはほかの還元物質と異なり、水酸化ナトリウム溶液中で時間を変化させてからルミノール試液の系に注入しても、ルミノール試液中に滞留したのと同じく時間とともに化学発光は増大した。これはグルコースがアルカリ性溶液中で時間とともにゆっくりとラジカルが生じるという報告¹²⁾と一致している。

次に、ルミノール試液の系に注入した場合とヘキサシアノ鉄(III)試液の系に注入した場合の、各々の還元物質の検量線と検出限界を検討したところ、ルミノール試液の系に注入したほうが感度が良かったので、それを

Table 1 Calibration curves and detection limits for reducing agents

Reducing agents	Calibration curves (per injection)	Detection limits ($S/N = 3$)
Uric acid	$Y = 1.391X + 0.545$ ($r^2 = 0.996$)	200 pg~10 ng 40 pg
Phenacyl alcohol	$Y = 0.800X + 0.536$ ($r^2 = 0.997$)	200 pg~10 ng 60 pg
Hydroxylamine	$Y = 1.579X + 0.724$ ($r^2 = 0.999$)	200 pg~10 ng 70 pg
Ascorbic acid	$Y = 0.760X + 0.783$ ($r^2 = 0.996$)	400 pg~10 ng 200 pg
Dihydroxyacetone	$Y = 0.132X + 0.592$ ($r^2 = 0.998$)	2 ng~100 ng 430 pg
Cortisone	$Y = 0.119X + 0.725$ ($r^2 = 0.998$)	2 ng~100 ng 440 pg
Glucose	$Y = 1.185X + 0.718$ ($r^2 = 0.998$)	200 ng~10 μ g 75 ng

Table 1 に示す。検出感度は既報より向上したが、これは、ルミノールナトリウム塩を使用したことによりノイズが小さくなったことと、キャリアー液による希釈がなくなったためと考えられる。

文 献

- 1) H. O. Albrecht: *Z. Physik. Chem.*, **136**, 321 (1928).
- 2) K. Robards, P. J. Worsfold: *Anal. Chim. Acta*, **266**, 147 (1992).
- 3) S. W. Lewis, D. Price, P. J. Worsfold: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **8**, 183 (1993).
- 4) H. A. H. Rongen, R. M. W. Hoetelmans, A. Bult, W. P. Van Bennekom: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**, 433 (1994).
- 5) L. J. Kricka: *Anal. Chem.*, **67**, 499R (1995).
- 6) A. R. Bowie, M. G. Sanders, P. J. Worsfold: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **11**, 61 (1996).
- 7) K. Faulkner, I. Fridovich: *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 447 (1993).
- 8) H. Kubo, A. Toriba: *Anal. Chim. Acta*, **353**, 345 (1997).
- 9) A. Toriba, H. Kubo: *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **20**, 2965 (1997).
- 10) G. Merenyi, J. Lind, T. E. Ericksen: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **5**, 53 (1990).
- 11) C-P. Fleuret, J-P. Steghens, J-C. Bernengo: *Analyst* (London), **121**, 1539 (1996).
- 12) P. J. Thornalley, A. Stern: *Carbohydr. Res.*, **134**, 191 (1984).

要 旨

ヘキサシアノ鉄(II) 及びヘキサシアノ鉄(III) の触媒存在下におけるアルカリ溶液中での還元物質(グルコース, アスコルビン酸, 尿酸, コルチゾン, ジヒドロキシアセトン, ヒドロキシルアミン, フェナシルアルコール) のルミノール化学発光を FIA 法と ESR 法で検討した。還元物質(グルコース, 尿酸, コルチゾン, ジヒドロキシアセトン, ヒドロキシルアミン) によってアルカリ溶液中にスーパーオキシド陰イオンラジカルが発生し, アスコルビン酸からはアスコルビン酸ラジカルが, フェナシルアルコールからは構造不明のラジカルが生じた。これらのラジカルがルミノールの化学発光に関与することが分かった。尿酸, フェナシルアルコール, ヒドロキシルアミン, アスコルビン酸, ジヒドロキシアセトン, コルチゾン, グルコースの検出感度 ($S/N=3$) は, 各々 40, 60, 70, 200, 430, 440, 75 ng であった。