

# 生体活性物質への電解化学発光法の適用について

桜 幸子\*

臨床薬学の立場からは、病気治療のために体内に注入された薬物濃度モニタリング（主として血中濃度）の必要性から生体活性物質や薬物の微量分析が望まれ、生理学の立場からも生体活性物質の微量分析定量が望まれている。現行では、あらゆる分析法が試みられているが、その中でも目的成分の代謝物や類似物質の混入しない分析値が得られることと同時に代謝物などの定量も行える利点のあるHPLCの重要性は大きい。その検出器として、すでによく用いられている光吸収、電気化学、蛍光法は検出感度が最大nmolからpmolである。それ以上の高感度化を可能とする一つの方法として電解化学発光法（ECL）がある。従来の蛍光法は試料光を照射することによって発光させるため、迷光の影響はさげたいが、ECLでは、暗箱の中で電解生成した物質が化学発光（CL）するので原理的にさらに高感度になるはずである。

ECLは元来、電極上にカチオンとアニオンの両ラジカンを発生させて、この2種のラジカルの消失反応によって一重項励起状態を作り出し、発光させることを意味する（式1）。<sup>1)</sup> 例えば、Pt電極上に、



カチオンラジカル生成用の正電位、アニオンラジカル生成用の負電位を短時間に交互に印加するとか、相対する2つのPt電極に、一方にカチオンラジカル、もう一方にアニオンラジカル生成させ、これらのラジカルが溶液中

を拡散して、反応（1）を行う。このような原理を分析目的とした例に、HPLCのフローセルとして、2つのPt電極を相対峙して配置し、そのすぐそばにフォトンカウンターを置いた。<sup>2,3)</sup> この際、サンプルは、ナフタレン、ピレン、ペリレン、クリセンなどの芳香族縮合環化合物の混合物で、HPLC(ODSカラム)にて分離し、ECLを測定した。

しかし、このようなECL法は次のような制約をもっている。

1) この種のラジカルな一般的に水溶液中で不安定である。 2) 正負の両ラジカルを生成させる化合物は縮合環化合物に限られる。 3) そのような化合物は水に不溶である。 4) 多くの臨床検査は血液、だ液、尿が対象であるので体液中の薬物や生体活性物質の検出は水溶液系でない適用範囲がせまい。<sup>4)</sup> 水溶液中でのECL法は、電気化学的に酸化〔又は還元〕し、その生成物が他の物質と化学反応することによって発光する方法を用いる。

水溶液中のECL法の適用の一つは、Bardによるルテニウムビピリジン錯体、 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ の使用である。<sup>5)</sup> pH6.0溶液中で、電解酸化された（式（2））生成物はシウ酸と化学反応（酸化還元反応）をする（式（3））。その反応生成物の一部が、電解酸化されたルテニウム錯体と反応して励起種を生成する（式（4））。これが発光する（式（5））。

---

\*アメリカ紀文研究開発所 本論文は、藤永太一郎博士の叙勲を記念して御寄稿頂きました。尚、桜幸子博士は、1992年11月14日、米国ノースカロライナ州チャペルヒルにて御逝去されました。ここに、謹んで御冥福をお祈り致します。

TABLE 1. Standard oxidation-reduction potentials of some reactions at pH 7, 25°C

Reaction	E <sub>0</sub> ' (V)
$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+} + e^- \rightarrow \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	0.825 <sup>*a</sup>
-----	
Dehydroascorbic acid + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → Ascorbic acid	0.058 <sup>*d</sup>
Fumaric acid + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → Succinic acid	0.031 <sup>*d</sup>
Glutathione + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → 2 Reduced form glutathione	-0.10 <sup>*d</sup>
Oxaloacetic acid + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → Malic acid	-0.166 <sup>*d</sup>
Pyruvic acid + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → Lactic acid	-0.185 <sup>*d</sup>
NAD <sup>++b</sup> + H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → NADH	-0.32 <sup>*d</sup>
NAPD <sup>++c</sup> + H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → NADPH	-0.324 <sup>*d</sup>
N <sub>2</sub> + 4H <sup>+</sup> + 4e <sup>-</sup> → N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	-0.643 <sup>*e</sup>
2CO <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-0.904 <sup>*e</sup>

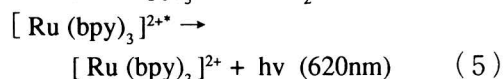
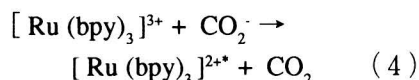
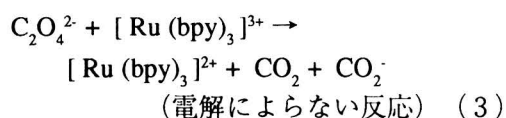
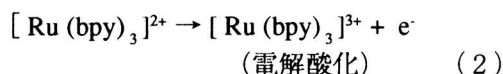
\*a: calculated from CV in Ref. 5.

\*b: Nicotinamide adenine dinucleotide

\*c: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

\*d: Ref. 7.

\*e: calculated from the data in Ref. 8.



上述のELCが可能となるためには、(3)式の酸化還元反応が成立すること、(3)式で生じた生成ラジカルが、式(4)で $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ を生成させる事である。Bardらは、化学発光(CL)にて、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ とヒドラジンの発光を試みた。<sup>6)</sup>これを電気化学的に考察すると、以下ようになる。式(2)の標準酸化還元電位E<sup>0</sup>は0.825Vである。(Ret.5より計算)。pH7におけるヒドラジンのE<sup>0</sup>は-0.643Vである(Table1)。この両者より計算すると、式(3)に相当する反応は可能である(ルテニウム錯体は還元さ

れ、ヒドラジンは酸化される)。又、最近、トリプトファン(Trp)をシヨウ酸の代りに用いて、電解酸化されたルテニウム錯体のECL法が発表された。<sup>9)</sup>さらに、シヨウ酸の代りに、トリプロピルアミン(TPA)を用いる場合には、ルテニウム錯体の電解酸化の際、TPAも酸化され、さらにプロトンを一つ失ってラジカル(TPA<sup>·</sup>)となる。TPA<sup>·</sup>が、式(3)と(4)の反応を起こし、ECLが観測できた。<sup>10)</sup>この時、ルテニウム錯体に側鎖をつけてエステルとし、蛋白質、ハプテン、核酸を標識する事により、ECL-抗原抗体反応を可能とした。<sup>11)</sup>以上のように、既に発表されたもの以外にも、このECL法に使いそうな可能性のある反応系をTable1に示した。特に、NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>を含む反応系は、これらが酵素反応の補酵素であることを考えると、このECL法の適用範囲がさらに広がる(例:アルコールデヒドロゲナーゼ-NAD<sup>+</sup>にてアルコールの検出)。

水溶液中でのECLのもう一つの試みはルミ

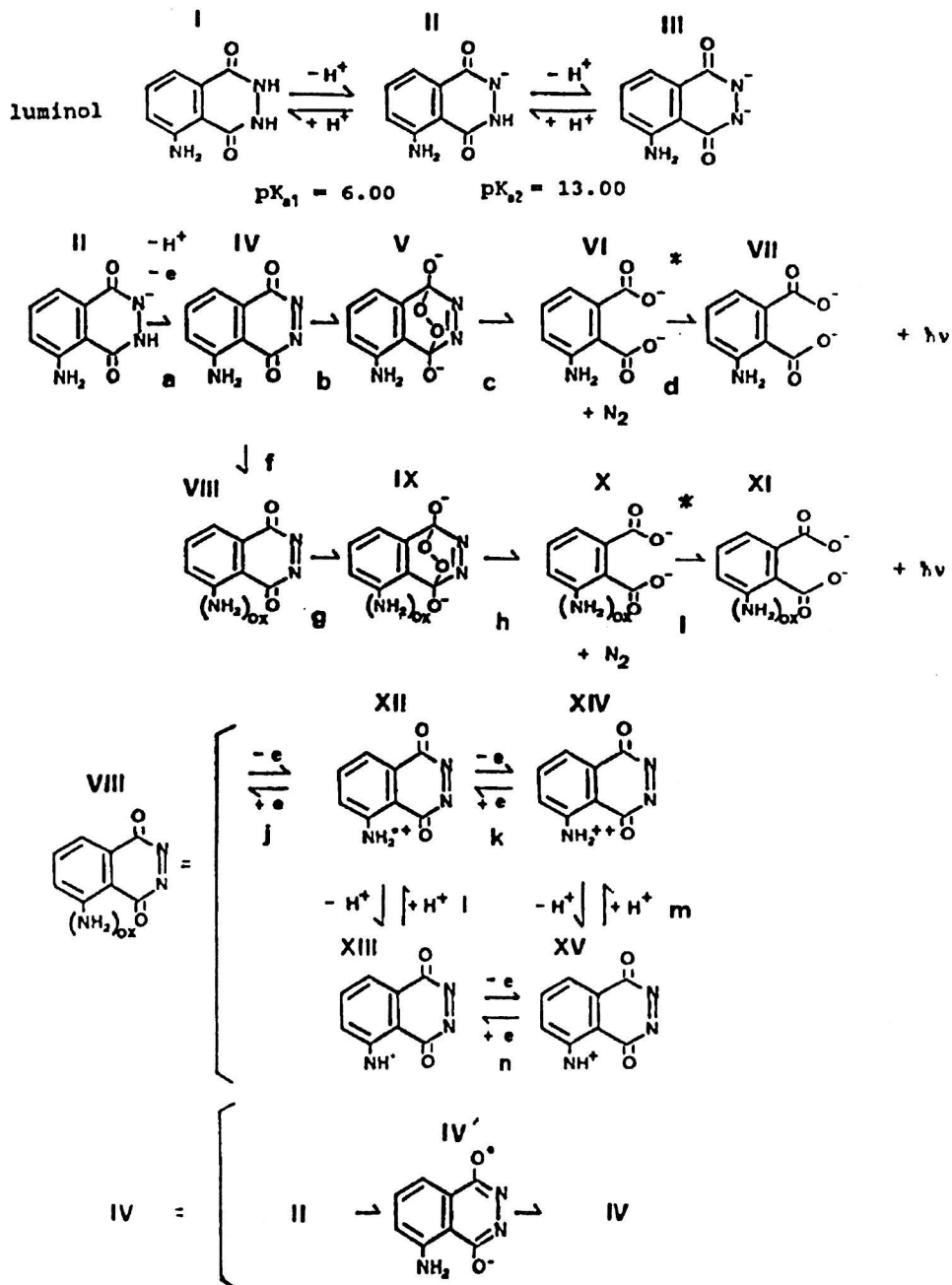


Fig. 1. Structural formulae and reactions. I-III = luminol; IV = diazaquinone; V = endoperoxide; VIII = diazaquinone derivative with an oxidized amino group. Processes (a) and (f) are electrolytical oxidation. This diagram was prepared from the information in refs. 8-13.

ノールである。ルミノールを電解酸化し、 $O_2$  又は  $H_2O_2$  と反応して発光体を生成する（応して発光体を生成する応して発光体を生成する応して発光体を生成する応して発光体を生成する（Fig.1）。主として、アルカリ溶液中の ECL 反応機構が研究され<sup>12-14</sup>、微量の  $Co^{2+}$ （接触反応剤）の検出にも利用された。又、ルミノールのアミノ基に化学修飾して、アミノ酸やペプチドを標識することにより、これらの ECL 検出も発表された。<sup>15,16</sup>

筆者は、ルミノールの ECL 法を I  $H_2O_2$  および II 過酸化脂質検出に適用する事、その際、中性 pH 溶液の適用（従来の ECL は、アルカリ溶液で行われた）と電極材料の選択を検討した<sup>17-20</sup>。又、III ルテニウム錯体に依らない Trp の ECL も検討した。<sup>21</sup>

実験：電気化学計測は、Fuso Model 312 ポーラログラフ、北斗 HB-104 ファンクションジェネレーターを用いた。作用電極は径が 3 mm の Pt か グラムシーカーボン (GC) のディスク電極、対極は白金、参照電極は SCE

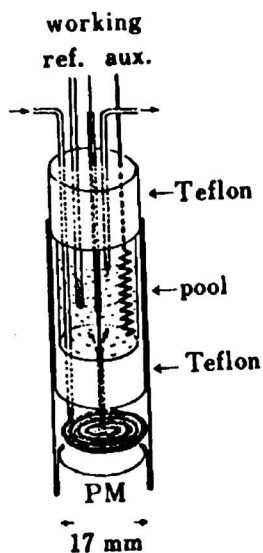


Fig. 2 ECL cell for FIA.

を用いた。測定溶液は  $25.0^\circ C \pm 0.1^\circ C$  に保った。ECL の計測は、この電気化学計測器に、島津の分光器 RF-510、又はアロカのバイオルミネッセンスリーダー BLR-102 を組み合わせで行った。フロー系の測定では、東洋ソーダ CCPD ポンプで送液し、ECL-フローセルにて検出した。検出セルは、Fig.2 のようにテフロンチューブ内に作用電極 (Pt かカーボンファイバー) を挿入し、アロカの BLR-102 内の光増倍管の真上に設置した。対極 (Pt) と参照電極 (Ag/AgCl:  $-0.044$  V vs. SCE) もセル内に設置した。

### I : $H_2O_2$ について<sup>17,18</sup>

I-1 : カーボン電極上の  $H_2O_2$  ルミノール-ECL<sup>18</sup>

ルミノールの反応図は Fig.1 に示してある。<sup>22-27</sup> ルミノール (I-III) には 2 ケの pKa ( $pK_{a1} = 6.00$ ,  $pK_{a2} = 13.00$ ) があり、<sup>22</sup> これ

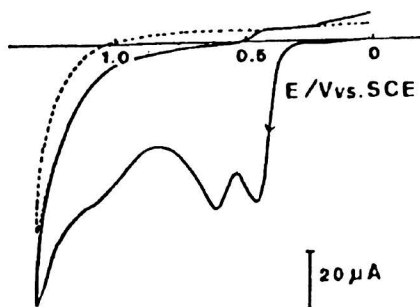


Fig. 3 CV of 3.82 mM luminol at a glassy carbon electrode in phosphate buffer solution (pH 7.4). Scan rate:  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

より中性溶液中ではモノアニオン (II) の形で存在する。酸化剤酸化による化学発光 (CL) では、ルミノールはジアザキノン (IV) に酸化され、さらに  $H_2O_2$  と反応して、エンドペルオキシド (V) か、ヒドロペルオキシドになり、3-アミノフタル酸 (VII) に分解する際に光を発つことは知られている。この CL 反応を ECL で行わせるため、II  $\rightarrow$  IV の過程を電解酸化することを試みた。そのために、まず、ルミノールの中性溶液中でのサイクリックボルタンメトリー (CV) を測定し

た。

Fig.3に示されるように、0.48V、0.60、0.98Vに酸化ピークが観測された。0.48Vの酸化ピークは電極への吸着に基づく酸化反応である事を種々の方法で証明した。酸化ピーク波高は電位スキャン速度に比例して、理論どおりであり<sup>28)</sup>、又、ルミノール濃度変化に伴う第一、第二酸化ピーク比の変化によっても証明できた (Fig.4)。0.01mM以下では、第一波のみ観測されたのに、濃度を濃くしていくと、第二波が現われ、ピーク比は減少した。拡散による第二波は濃度とともに増加するのに対し、吸着による第一波はある一定量電極上をおおってしまうとそれ以上分子の吸着がおこらないために、それほど増加しなくなるためである。又、濃度が薄い時には吸着波に典型的な還元波がみられた。第一波は吸着に基づき、第二波は拡散に基づく、一電子酸化反応 (II→IV) と結論づけた。第二波は、アミノ基に基づくものである。これは3-アミノフタル酸 (VII) の酸化ピーク電位 (0.88V) との比較、ルミノールのアミノ基

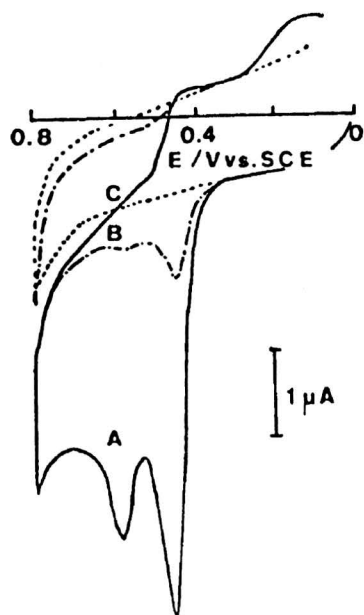


Fig.4 CV of 0.22 and 0.02 mM luminol at a glassy carbon electrode in phosphate buffer solution (pH 7.4). Scan rate: 20  $\text{mV s}^{-1}$ . (A) 0.22 mM luminol solution; (B) 0.02 mM luminol solution; (C) blank solution.

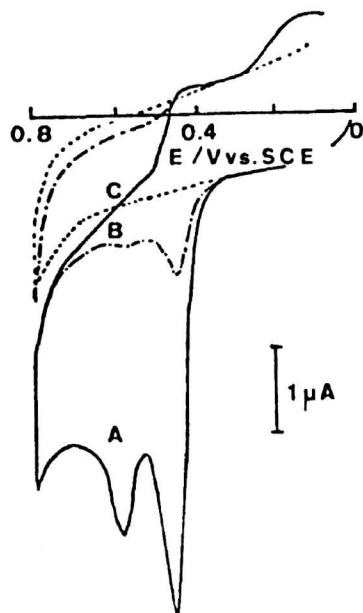
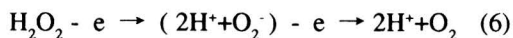


Fig.4 CV of 0.22 and 0.02 mM luminol at a glassy carbon electrode in phosphate buffer solution (pH 7.4). Scan rate: 20  $\text{mV s}^{-1}$ . (A) 0.22 mM luminol solution; (B) 0.02 mM luminol solution; (C) blank solution.

をペプチドで化学修飾すると第三波が観測されなくなるという報告<sup>29)</sup>と一致する。一般的に芳香族アミンは、1V近傍で酸化され、溶媒によってさらにプロトン化されることが知られている<sup>27)</sup>。Fig.1に示すようにその酸化生成物 (VIII) には種々の可能性 (XII-XV) があるが、本研究では、生成物を決定しなかった。

次に $\text{H}_2\text{O}_2$ の電気化学的な挙動をCVにて測定した (Fig.5)。酸化ピーク電位は1.12Vであった。この酸化反応は次式のとおりであると



推定されるが<sup>30,31)</sup>、電位電流曲線には、 $\text{O}_2$ の存在は明らかに表れない。この反応系の中間体として $\text{O}_2^-$ が存在する事は、本研究において、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 併用のECLによって証明された。

ルミノールと $\text{H}_2\text{O}_2$ の酸化電位の比較より、カーボン電極を用いる場合、電極上の印加電圧によってECLに関与する化学種が異なる (Table 2)。0.5Vから1.0Vの間では、ルミノールはジアザキノンに酸化されるだけで、

TABLE 2. ECL fluorophors depending on the electrode material and the applied potential ( $H_2O_2$ )

<u>Electrode:</u>	<u>Oxidation Product</u> at 0.7 V	<u>Oxidation Product</u> at 1.2 V
Analyte (Oxidation Analyte or Fluorophor)		
C:		
Luminol	diazaquinone (IV)	IV with oxidized amino group (VIII: XII-XV)*
$H_2O_2$	--	$O_2^{\cdot-}$ , $O_2$ , $H^+$
-----		
Fluorophor	IV + $H_2O_2$	VIII + ( $O_2^{\cdot-}$ , $O_2$ )
Pt:		
Luminol	diazaquinone (IV)	?
$H_2O_2$	$O_2^{\cdot-}$ , $O_2$ , $H^+$	?
-----		
Fluorophor	IV + ( $O_2^{\cdot-}$ , $O_2$ )	( ? + ? )

\* See Fig. 1 for compound numbering scheme.

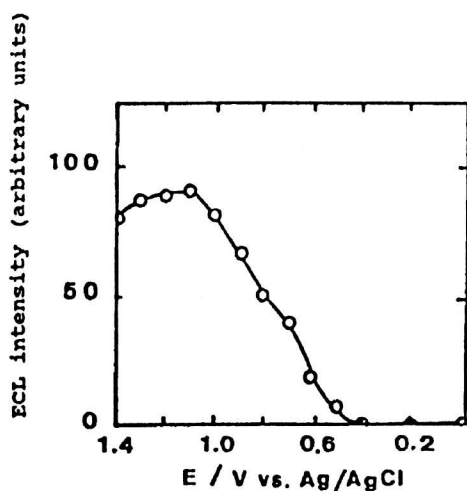


Fig. 6. Effect of applied potential on ECL intensity at a carbon electrode.  $17 \mu M$  luminol in phosphate buffer (pH 7.40), flow-rate  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $1.32 \text{ nmol}$  hydrogen peroxide.

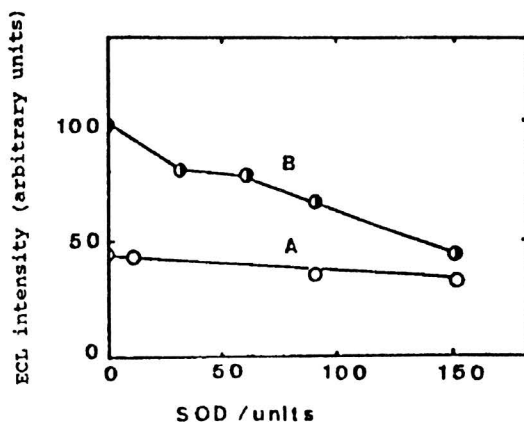


Fig. 7. Effect of superoxide dismutase on ECL intensity at a carbon electrode.  $23 \mu M$  luminol in phosphate buffer (pH 7.4), flow-rate  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $1.32 \text{ nmol}$  hydrogen peroxide. (A) ECL at applied potential of 0.7 V; (B) ECL at 1.2 V at a carbon electrode.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と反応して励起体 (V) を生成する。この場合は単純な発光体である。一方、1.0V以上の酸化電位では、ジアザキノン (IV) のアミノ基まで酸化され (VIII)、さらにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>自身も酸化されて (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、発光体は複雑になる。

Fig.6は、電極への酸化電圧とECLのシグナルの関係である。ルミノールの酸化の生じない0.5V以下ではECLはみられないが、IVへの酸化とともにECLは急激に増加した。IVのアミノ基の酸化とO<sub>2</sub><sup>-</sup>の生成する1.2Vでは、IVしか生成しない0.7VよりもECL強度は2、3倍も強かった。

Fig.7は、このECL系にSOD酵素を用いた場合を示す。SODは、 $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$  (7)のようにO<sub>2</sub>をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に変える酸素である。O<sub>2</sub>が発生していると推測される1.2Vの

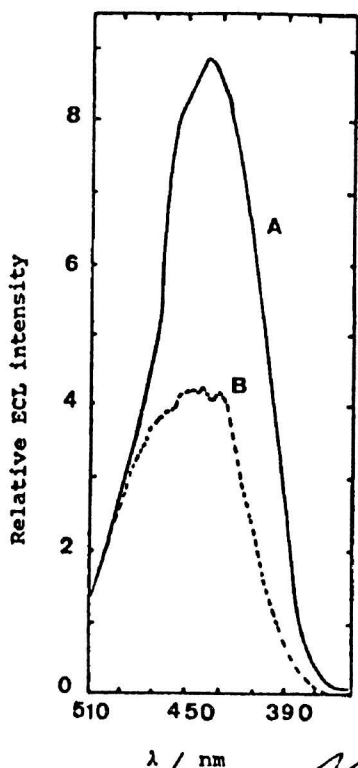


Fig. 8. Spectra of luminol-hydrogen peroxide ECL at a carbon electrode. 1.27 mM luminol and 2.94 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in phosphate buffer of pH 7.40. (A) Shimadzu Model RF-510 spectrophotometer equipped with a Fusco Model 212 polarograph and a Hokuto Model HB-104 function generator were used for measurements of ECL spectra. Applied potential: (A) 0.7 V; (B) 1.2 V.

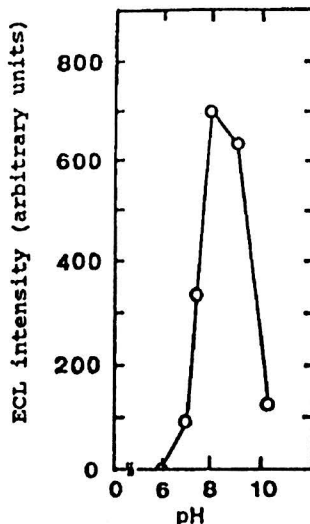


Fig. 9. Effect of pH on ECL intensity. 17 μM luminol in phosphate buffer (pH 7.40), flow-rate 0.5 ml/min, applied potential 0.7 V at a carbon electrode, 1.32 nmol hydrogen peroxide.

電位では、SODの影響をうけて、その添加量の増加とともにECL強度が減少し、ついに、O<sub>2</sub>が関与しない0.7Vでの発光強度に近づいた。これで、1.2Vでは、O<sub>2</sub>が関与している事が判明した。

Fig.8は、ECLスペクトルを示す。電極電位が0.7Vの場合は、鋭い曲線が再現性よく測定され (極大波長: 438nm)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とIVの単純なECLを裏付けた。電極電位が1.2Vになると、スペクトルは鋭くなく、極大波長は440nmであった。この実験条件下では、ルミノールの種々の酸化体 (XII-XV) とO<sub>2</sub><sup>-</sup>の発光が生ずるので、複雑となる。

Fig.9は、測定系のpHの影響をみたものである。pH7.4から9.0 (中性領域) が最も感度がよかった。従来のCLおよび、これまで報告のあったルミノールのECLでは、アルカリ溶液 (pH10-11) を用いていた。酸素を用いて基質をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に変換して、ECL測定する可能性 (酵素カラムの併用) を考えると、中性溶液で測定できる方が、はるかに利用面は大きい。

### 1-2: 電極材料の選択<sup>17, 18)</sup>

以上は電極がカーボン (C) の場合であつ

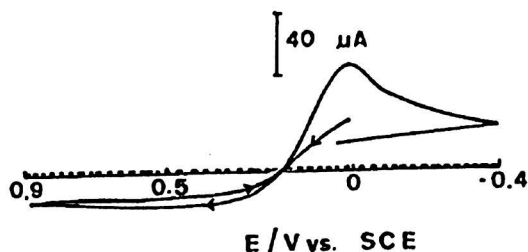
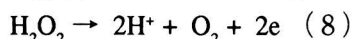


Fig.10 CV of 4.40 mM hydrogen peroxide at a platinum electrode in phosphate buffer solution (pH 7.4). Scan rate: 20 mV s<sup>-1</sup>.

たが、次にPtにかえた場合を検討する。中性 (pH7.4) 溶液中で、Pt電極上では、ルミノールの酸化ピークは0.54Vにあり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の酸化ピークは0.46V (Fig.10) であった。Ptは、24h、0.5M硫酸中につけて、きれいな表面にしたものでは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はかなり正電位 (0.89V) と報告されている。<sup>32)</sup>しかし、中性溶液中で正電位と負電位の間を何度もスキャンすると、Pt表面が酸化され、酸化被膜、Pt(OH)<sub>2</sub>が生成される。このものは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を接触酸化させるので全体的には式(8)



の反応が生じているようにみえる。したがって、みかけ上、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は0.46Vで酸化される。この現象は、パラジウム (pd)、金の電極を用いてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を酸化する際にも観測されている。<sup>33)</sup>又、式(8)の中間体として、O<sub>2</sub>を含む事が推察され(式(16))、Pt電極上でのルミノール-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のECLはジアザキノンとO<sub>2</sub>によると報告されている。<sup>25, 34, 35)</sup>

したがって、Pt電極でのECLは、0.7Vの時はジアザキノン (IV) とO<sub>2</sub>の反応による (Table 2)。1.2Vのときは、IVのアミノ基がさらに酸化されたものとO<sub>2</sub>になるであろうが、Pt電極の中性pH溶液中の使用電位窓をこえるため、前者のCVは観測できなかった。又、ECLはノイズが大変大きく、観測が不可能であった。

筆者は、電極材料として、CとPtのみ検討したが、最近、この両者を含む種々の材料でルミノールのECL (ただし、アルカリ溶液) が検討された。<sup>36)</sup>それによると、Pd、金、PbO<sub>2</sub>を用いた場合に最も強いECLがみられた。もし、これらの電極表面を清浄するのが

簡単で、再現性よくできるのであれば、今後、考慮すべき電極材料である。

## II: 過酸化脂質

### II-1: 過酸化脂質の酸化について

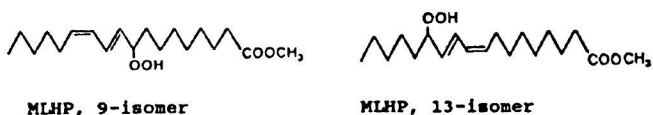
過酸化脂質 (LP) は、がん、老化、種々の病気をひきおこすプロスタグランジンの生成にかかわっているため、大変注目を集めている。<sup>37-45)</sup>したがって血液のような生理的液体中におけるLPの分析は大変重要である。

従来の検出法を以下に述べる。チオバルビツール酸 (TBA) 法はLPが分解して生ずるマロンジアルデヒド (MA) を測定する。<sup>46)</sup>したがって、MAを生じるものは何でも反応するので、LPへの選択性に欠ける。LPのもつ共役ジエンのUV吸収を用いる方法<sup>47)</sup>は広く使われているが、LPの還元体と区別できない (同じ吸収を持つ)。メチレンブルー法<sup>48)</sup>、ジクロロフルオレセイン法<sup>49)</sup>、セサモル・ダイマー法<sup>50)</sup>、ジフェニル・ノーピレニルフォスフィン法<sup>51)</sup>はLPの酸化反応を利用している。LP自身が反応してしまうことと、わずらわしい化学操作が欠点である。電解還元法<sup>51, 52)</sup>は、LPの還元電流を測定する。溶液中には、溶存O<sub>2</sub>が多量に含まれていて、-0.5Vで容易に還元されるため、極微量のLPサンプルの還元電流を測定するためには、多大の努力で除酸素をしておかないと大きい妨害原因となる<sup>53, 54)</sup>。LPの化学発光 (CL) 法<sup>55, 56)</sup>では、Fig.1の酸化剤としてキトクロムCのような酸素を用いて、使い捨てにしている。又、アルカリ性溶液でなければならない。筆者は、酸化剤使用の代わりに電解酸化を用いるECL法をルミノール-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系で検討したが、この方法をLPに適用できるかどうかを検討した。<sup>19, 20)</sup>LPのモデルとして、リノール酸メチルヒドロペルオキシド (MLHP) を用いた。

MLHPはリノール酸メチルを37℃で3日間自動酸化させて、薄積クロマトグラフにて2回精製した。<sup>58)</sup>この方法によって得られたMLHPは等量の9位と13位の異性体を含む (Fig.11)。



**Methyl linoleate hydroperoxide (MLHP) isomers**



**Possible MLHP oxidation products**

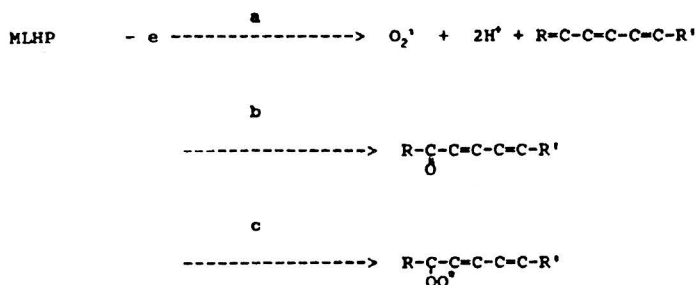


Fig.11. Methyl linoleate hydroperoxide (MLHP) isomers and their oxidation products: (A) MLHP; (B) conjugated triene; (C) oxodienic; (D) radical.

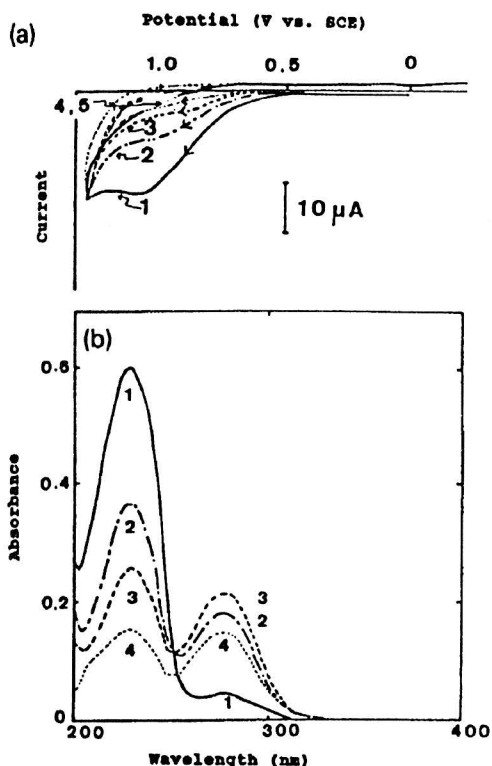


Fig.12 (a) CV of 3.78 mM MLHP at a glassy carbon electrode in phosphate buffer (pH 7.4)-50% AN solution and results of oxidation at 1.3 V with a large carbon electrode. Oxidation time: (1) 0; (2) 20; (3) 40; (4) 60 min; (5) residual current. Scan rate: 20 mV s<sup>-1</sup>. (b) UV absorption change after oxidation of 3.78 mM MLHP at 1.3 V with a large carbon electrode in phosphate buffer (pH 7.4)-50% AN solution. Oxidation time: (1) 0; (2) 20; (3) 40; (4) 60 min.

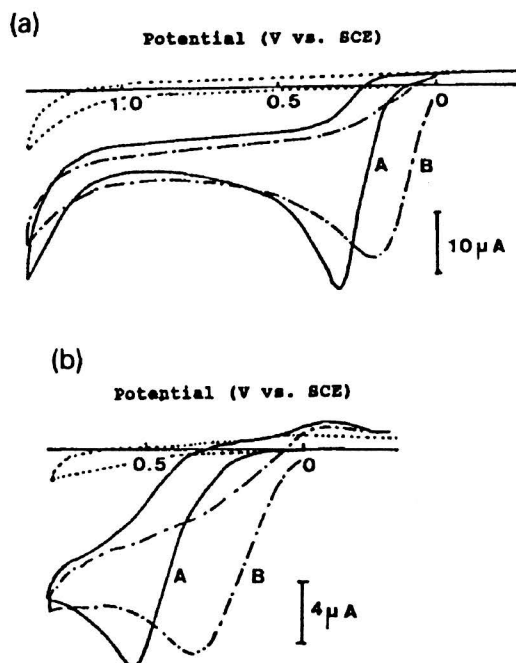


Fig.13. (a) CV of uric acid and ascorbic acid at a glassy carbon electrode in phosphate buffer (pH 7.4)-30% acetonitrile solution. Scan rate, 20 mV s<sup>-1</sup>. (A) 2.98 mM uric acid; (B) 3.22 mM ascorbic acid. (b) CV of uric acid and ascorbic acid at a platinum electrode in phosphate buffer (pH 7.4)-acetonitrile 30% solution. Scan rate, 20 mV s<sup>-1</sup>. (A) 2.98 mM uric acid; (B) 3.22 mM ascorbic acid.

Fig.12aは50%アセトニトリル (AN) - pH7.4溶液中のMLHPのCVを示す。MLHPは水に不溶なので、CVは50%AN、フロー系では30%ANを用いた。MLHPの酸化ピークは1.10Vであった。大きい径のカーボン電極 (3 cm×8mmOD) にMLHPが充合酸化される電位 (1.3V) を印加して、MLHPの酸化を試み、各20min毎にそのCVを測定した。酸化時間を経るにつれて、MLHPの酸化波高は減少し、60min後には、CV上では検出できなくなった。同時にその溶液のUVスペクトルを観測した (Fig.12b)。232nmの吸収はMLHPの酸化とともに減少し、一方で、272nmの吸収が増加した。Fig.11に示すように、MLHPの酸化生成物の可能性は、 $O_2$  と共役トリエン (B)、オキソジエン (C)、又はラジカル (D) である。<sup>59)</sup>Fig.12bのスペクトル変動の様子と、232nmの吸収は共役ジエンに依ること、275nmの吸収は共役トリエン (B) とオキソジエン (C) の可能性があること、オキソジエンは存在しないこと [2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによる呈色反応<sup>60)</sup>により証明]、 $O_2$  は存在する (SOD酵素のECLに及ぼす効果) ことから、結論として、MLHPの酸化生成物は、 $O_2$ 、共役トリエン、プロトンとなった。

### II-2：カーボン電極でのECL

MLHP測定と同じ組成の溶液中のルミノールのCVは、pH7.4水溶液中のCVとはほぼ同じ (GC電極で、0.45、0.59、1.14Vの3つの酸化ピーク) 挙動を示した。第一波は吸着により、第二波は拡散により、ともにジアザキノン生成 (II→IV) であり、第三波は、さらにアミノ基の酸化 (VIII) が生じる。波高は、ANの含量増加とともに増加したが、これは、ANの粘度 (0.375cP)<sup>61)</sup>が水の約1/3に相当することによる。

MLHPのECLは、 $H_2O_2$ の場合と同様に観測された。GC電極での電極電位とECL発光体との関係も $H_2O_2$ の場合とよく似ていた (Table 3)。又、MLHPの還元体を合成して、<sup>62)</sup>このECL観測を行った。還元体はFig.1

の (IV→V) の過程に寄与できないという推定どおり、ECL発光はみられなかった。これは前述のUV法の欠点を補うものである。

### II-3：電極材料の選定

電極をPtにかえたところ、ルミノールのジアザキノンへの酸化電位はCの場合とほぼおなじ、0.56Vであった。一方、MLHPは、 $H_2O_2$ と同様にPt(OH)<sub>2</sub>被膜の接触酸化のために低い電位 (0.74V) で酸化が生じた。このことは、ルミノールをジアザキノンに酸化するために印加する電極電位 (0.7V) で、MLHPも酸化され、その際、 $O_2$  を発生する (Fig.11) 事を意味している。 $H_2O_2$ の場合と同様に電極材料と電位を選ぶことによって、ECL発光種を選択できる (Table 3)。

次に血液中に含まれる成分で、このECL法を妨害しそうなもの (尿酸、アスコルビン酸、トコフェロール)<sup>63)</sup>の検討をした。尿酸、アスコルビン酸のC、Pt電極上でのCVをFig.13に示す。ともに、ルミノールの酸化電位よりかなり正電位であった。MLHPサンプルと同量かそれ以下の含量の場合には、これらは、ECL-フローインジェクション法に妨害を与えなかったが、サンプルよりはるかに多量に存在すると、ECLシグナルは減少した。これは、これらの妨害物質がFig.1のルミノールの酸化を妨げたものと思われる。実際の血中でのこれらの成分はNLHPに比して多量 (6~40倍) に存在するので、これらは前処理で除いておく必要がある。トコフェノールの酸化電位は1.3V以上の電位であった。トコフェノールの存在は、ECL強度をわずかに増加させた。この妨害原因は究明できなかったが、これもMLHPの3倍ほど、<sup>63)</sup>血中に存在するので、測定前に除去する事が望ましい。

### III：トリプトファン (Trp) のECL

ついで、筆者はアルカリ性溶液中でECLが知られているTrpで、ECLが可能か検討した。<sup>21)</sup>Fig.14に示すように、Trpは2ヶのpKa値 (2.38、9.39)<sup>70)</sup>をもっているので、0.1MNaOH (pH13) 中ではアニオン (I')

TABLE 3. ECL fluorophors depending on the electrode material and the applied potential (MLHP)

<u>Electrode:</u>	<u>Oxidation Product</u> at 0.7 V	<u>Oxidation Product</u> at 1.2 V
Analyte (Oxidation Analyte or Fluorophor)		
C:		
Luminol	diazaquinone (IV)	IV with oxidized amino group (VIII:XII-XV)*
MLHP	--	Conjugated triene, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sup>+</sup>
-----		
Fluorophor	IV + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	VIII + O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Pt:		
Luminol	diazaquinone (IV)	?
MLHP	Conjugated triene, O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sup>+</sup>	?
-----		
Fluorophor	IV + O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	( ? + ? )

\* See Fig. 1 for compound numbering scheme.

になっている。Trpはペルオキシニ硫酸カリウムのような酸化剤とブロム化剤 (1, 3-ジブロム-5,5-ジメチルヒダントイン:DDH) の存在下で、酸化中間体を経て、励起体 (エンドペルオキシドIV; ジオキセタンとも呼ばれる) になり発光する。本研究は、酸化剤の代りに電極でTrpを酸化するECLを試みた。

Trpは0.1MNaOH中、Pt電極上で0.78Vで酸化され (Fig.15)、C電極上では、0.44Vで酸化された。この酸化過程は、一電子酸化でプロトンを1ヶ失い、Trp (I) からTrp (II) への変化であった。一方、DDHは両電極とも1.0Vまで酸化されなかった。

両電極とも、酸化電圧をかけない時は発光がみられず、Trpが酸化されるに足る電圧

(ただし1.0V以下) を加えると発光した。その発光スペクトルは4つの発光ピーク (404、434、490、544nm) をもっていた (Fig. 16)。きわだって鋭いピークの434nmの発光はジオキセタン (IV、Fig.14) による。<sup>72)</sup>もう一つの鋭いピークの544nmの発光はヒドロペルオキシド (III) のインドール環による。<sup>66,73)</sup>ECLスペクトルに4つのピークがみられるように、種々の発光体が存在する事は、TrpのCL生成物の薄尺クロマトグラフがいくつかの発光スポットを示した報告<sup>64)</sup>と一致する。

#### IV: その他

人体の炎症においては、いくつかの生化学的なCLが含まれていることが知られてい

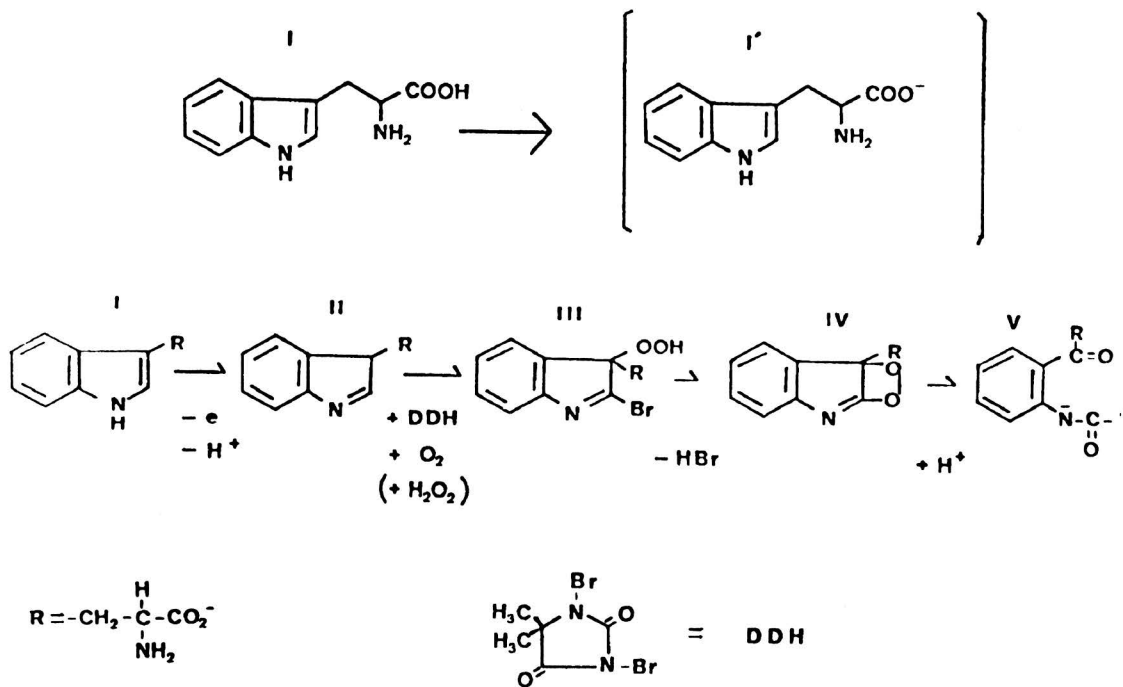


Fig.14. Schematic diagram of tryptophan reactions.

I : tryptophan, III : hydroperoxide, IV : dioxwtane, and V : acylamideketone.

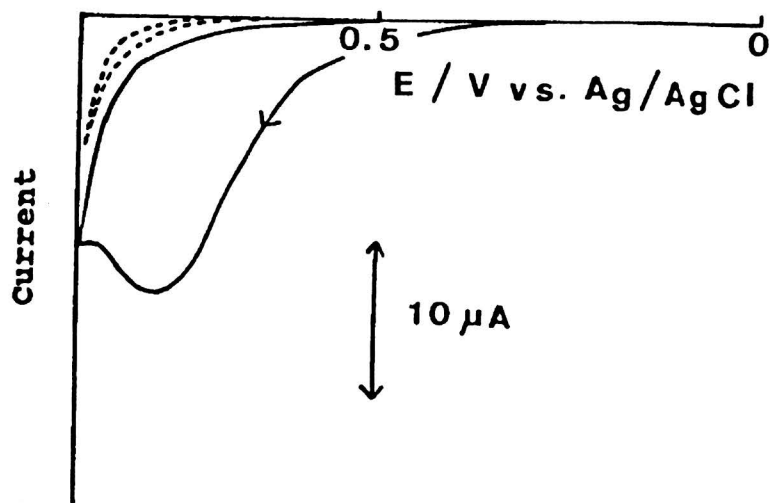


Fig.15. CV of 8.00 mM tryptophan at a platinum electrode in 0.1M NaOH solution.

Scan rate: 20 mV/s

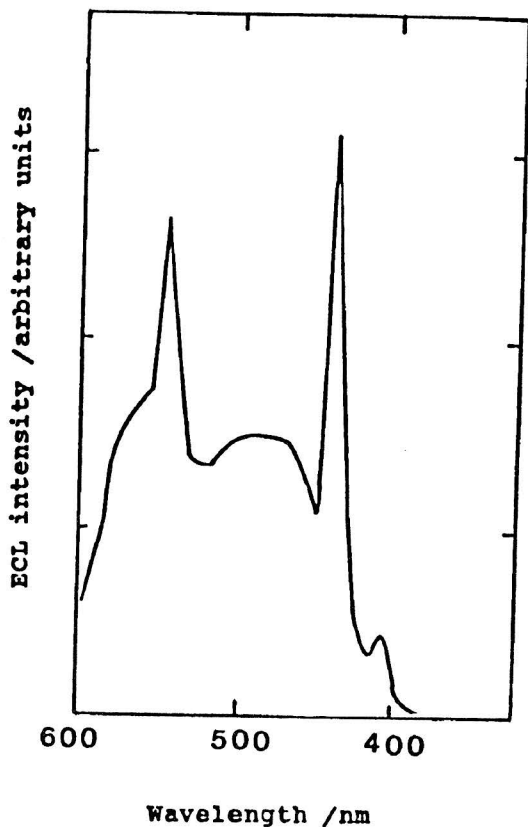


Fig. 16. ECL Spectrum of tryptophan at a platinum electrode. 0.16 mM tryptophan and 5.7 mM DDH in 0.05 M NaOH with saturated air. The applied potential: 0.8 V.

る。<sup>74)</sup>例えば、白血球が異物、化学物質、がん前駆体等を食菌する時、 $O_2$ 、一重項酸素、ヒドロキシラジカル、ヒドロペルオキシド、インドールからのオキセタンが発生して発光するとされている。しかし、その発光メカニズムはまだはっきりと解明されていない。 $O_2$ には前述 (I)、(II) のルミノールECLが適用可能である。

インドール環のTrpの代謝物は、動物、植物、微生物にたくさん存在し、中には、セロトニンのように脳細胞に関与する大切なものがある。<sup>75)</sup>これらも、Trpと同様にFig. 14のようにECL測定できる可能性がある。これらの基礎研究は、食菌佐用の発光メカニズム解明

に一役買うであろう。又、インドールに似た環をもつ薬物 (カルバマアゼピン、メトトレキセート、テトラサイクリン) もCLが知られている。<sup>76)</sup>これらの薬物は抗がん剤など重要な薬物<sup>77)</sup>であり、これらにもECLが適用可能である。

## REFERENCES

1. A. J. Bard and L. R. Faulkner, Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, N. Y., 1980, pp. 621-629.
2. C. Blatchford and D. J. Malcome-Lawes, J.Chromatogr., 3 21, 227 (1985).
3. C. Blatchford, E. Humphreys and D. J. Malcome-Lawes, J. Chromatogr., 329, 281 (1985).
4. For example: N. Tatumi, Handbook of Seijou-chi (Handbook of Clinical Normal Value, in Japanese), Katetsuken, Kumamoto, Japan, 1984.
5. I. Rubinstein, C. R. Martin and A.J. Bard, Anal. Chem., 55, 1580 (1983).
6. W. K. Nonidez and D. E. Leyden, Anal. Chim. Acta, 96, 401 (1978).
7. Japan Biochemistry Society ed., Seikagaku Data (Biochemistry Data in Jpn), I, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 1979, pp. 6-10.
8. M. Ishibasi and T. Fujinaga ed., Teiryō Bunseki Jikkenhou (Quantitative Analytical Chemistry, in Jpn.), Fusarbo, Tokyo, 1967, pp. 333-335.
9. K. Uchikura and M. Kirisawa, Chemistry

- Letters, 1991, 1373.
10. J. K. Leland and M. J. Powell, J. Electrochem. Soc., 137, 3127 (1990).
  11. G. F. Blackburn, H. P. Shah, J. H. Kenten, J. Leland, R. A. Kamin, J. Link, J. Peterman, M. J. Powell, A. Shah, D. B. Talley, S. K. Tyagi, E. Wilins, T-G. W and R. J. Massey, Clin. Chem., 37, 1534 (1991).
  12. K. E. Haapakka and J. J. Kankare, Anal. Chim. Acta, 138, 253 (1982).
  13. K. E. Haapakka and J. J. Kankare, Anal. Chim. Acta, 138, 263 (1982).
  14. K. E. Haapakka, Anal. Chim. Acta, 139, 229, (1983).
  15. M. Sato, T. Yamada and M. Horikawa, Denki Kagaku (Electrochemistry, in Jpn.), 51, 111 (1983).
  16. M. Sato and T. Yamada, Anal. Sci., 2, 529 (1986).
  17. S. Sakura and H. Imai, Anal. Sci., 4, 9 (1988).
  18. S. Sakura, Anal. Chim. Acta, accepted (1991).
  19. S. Sakura and J. Terao, Anal. Chim. Acta, accepted (1991).
  20. S. Sakura and J. Terao, Anal. Chim. Acta, accepted (1991).
  21. S. Sakura, Electrochimica Acta, accepted (1992).
  22. I. Kamiya, Kagaku Hakkou (chemiluminescence, in Jpn.), Kodan-sha, Tokyo, 1972, p. 55.
  23. M. M. Rauhut, A. M. Semsel and B. G. Roberts, J. Org. Chim., 31, 2431 (1966).
  24. P. B. Shevlin and H. A. Newfeld, J. Org. Chim., 35, 2178 (1970).
  25. K. E. Haapakka and J. J. Kankare, Anal. Chim. Acta, 138, 263 (1982).
  26. J. Lind, G. Merenyi and T. E. Eriksen, J. Am. Chim. Soc., 105, 7655 (1983).
  27. S. D Ross, M. Finkelstein and E. J. Rudd, Anodic Oxidation, Academic Press, N. Y., 1975, pp. 189-192.
  28. A. J. Bard and L. R. Faulkner, Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, N. Y., 1980, p. 527.
  29. M. Sato, T. Yamada and S. Miyahira, Rev. Polarogr., 31, 1B-3 (1985).
  30. M. Brezina and M. Wedell, Collect. Czech. Chem. Commun., 49, 2320 (1984).
  31. H. Imai, H. Yoshida, T. Masujima and M. Yanagitani, Bunseki Kagaku, 30, 419 (1981).
  32. J. J. Lingane and P. J. Lingane, J. Electroanal. Chem., 5, 411 (1963).
  33. Lo Gorton, Anal. Chimica Acta, 178, 247 (1985).
  34. E. H. White, O. Zafiriou, H. H. Kaji and J. H. M. Hill, J. Am. Chem. Soc., 80, 940 (1964).
  35. G. Merenyi and J. S. Lind, J. Am. Chem. Soc., 102, 5830 (1980).
  36. J. E. Vitt, D. C. Johnson and R. C. Engstrom, J. Electrochem. Soc., 138, 1637 (1991).
  37. J. F. Mead, Free Radicals in Biology, ed. by W. A. Pryor, Vol. 1, Academic Press,

- N. Y. , 1976, pp. 51-68.
38. W. Bors, M. Saran and D. Tait, Oxygen Radicals in Chemistry and Biology, de Gruyter, Berlin, 1984.
  39. R. J. Mehlhorn and G. Cole, Adv. Free Radicals Biol. Med. , 1, 165 (1985).
  40. B. N. Ames, Science, 221, 1256 (1983).
  41. P. A. Bowser, D. H. Nugteren, R. J. White, U. M. T. Houtsmuller and C. Prottey, Biochim. Biophys. Acta, 834, 419 (1985).
  42. K. Fukuzumi, Yukagaku (Oil Chemistry in Jpn.), 14, 119 (1965).
  43. P. J. O' Brien, Lipid Peroxides in Biology and Medicine, ed. by K. Yagi, Academic Press, N. Y. 1982, pp. 317-337.
  44. D. Harman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 78, 7124 (1981).
  45. D. Steinberg, S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo and J. L. Witztum, N. Engl. J. Med. , 320, 915 (1989).
  46. H. I. Kohn and M. Liversedge, J. Pharmacol. Exp. Ther. , 82, 292 (1944).
  47. K. S. Rao and R. O. Recknael, Exp. Mol. Pathol. , 9, 271 (1968).
  48. N. Ohisi, H. Ohkawa, A. Miike, T. Tatano and K. Yagi, Biochem. Int., 10, 205 (1985).
  49. R. Cathcart, E. Schwiars and B. N. Ames, Anal. Biochem., 134, 111 (1983).
  50. K. Kikugawa, T. Nakahara, Y. Taniguchi and M. Tanaka, Lipids, 20, 475 (1985).
  51. H. Meguro, K. Akasaka and H. Ohru, Methods Enzymol., 186, 157 (1990).
  52. K. Yamada, J. Terao and S. Matsusita, Lipids, 22, 125 (1987).
  53. J. Terao, S. S. Shibata and S. Matsusita, Anal. Biochem. , 169, 415 (1988).
  54. S. Sakura and H. Imai, Bunseki Kagaku (Analytical Chemistry in Jpn.), 33, E379 (1984).
  55. S. Sakura and H. Imai, Anal. Sci. , 1, 413 (1985).
  56. Y. Yamamoto, M. H. Brodsky, J. C. Baker and B. N. Ames, Anal. Biochem. , 160, 7 (1987).
  57. T. Miyazawa, K. Yasuda and K. Fujimoto, Anal. Lett. , 20, 915 (1987).
  58. J. Terao and S. Matsushita, J. Am. Oil Chem. Soc., 54, 234 (1977).
  59. T. Kaneda and N. Ueta Edt. , Kasannka Shishitsu Jikken Hou (Experimental Method For Lipid Hydroperoxides in Jpn.), Ishiyaku Publishing Co. Tokyo, 1983, pp. 36-39.
  60. E. B. Sanders and J. Schubert, Anal. Chem. , 43, 59 (1971).
  61. J. A. Riddick and W. B. Bunger, Organic Solvents, Wiley-Interscience, New York, 1970. p. 399.
  62. J. Terao and S. Matsushita, Agric. Biol. Chem., 39, 2027 (1975).
  63. Japan Biochemistry Society ed. , Seikagaku Data (Biochemistry Data in Jpn), I, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 1979, pp. 1548-1550.
  64. H. Imai, H. Yoshida, T. Masujima and T. Ouwa, Bunseki Kagaku (Analytical Chemistry in Jpn), 33, 54 (1984).

65. F. McCapra, D. G. Richardson and Y. C. Chang, Photobiochem. Photobiol., 4, 1111 (1965).
66. N. Sugiyama, M. Akutagawa and H. Yamamoto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 41, 936 (1968).
67. N. Sugiyama, H. Yamamoto, Y. Omote and M. Akutagawa, Bull. Chem. Soc. Jpn., 41, 1917 (1968).
68. I. Kamiya, Kagaku Hakkou (Chemiluminescence, in Jpn), Kodan-sha, Tokyo, 1972, p.p. 107-108.
69. I. Saito, S. Matsugo and T. Matsuura, J. Am. Chem. Soc., 101, 4757 (1979).
70. Japanese Biochemical Society, Ed., Seikagaku Data Book (Biochemical Data Book, in Jpn.), Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 1982, p. 31.
71. A. J. Bard and L. R. Faulkner, Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, N. Y., 1980, p. 164.
72. K. A. Zaklika, P. A. Purns and A. P. Schaap, J. Am. Chem. Soc., 100, 318 (1978).
73. N. Sugiyama and M. Akutagawa, Bull. Chem. Soc Jpn., 40, 240 (1967).
74. Y. Ushijima and M. Nakano, Enshou (Inflammation, in Jpn.), 3, 76 (1983).
75. Japanese Biochemical Society, Ed., Taisha Map (Metabolism Map, in Jpn.), Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 1989, p. p. 59-61.
76. T. Ouwa, T. Masujima, H. Yoshida and H. Imai, Bunseki Kagaku (Analytical Chemistry in Jpn.), 33, 568 (1984).
77. W. Sadee and G. C. M. Beelen, Drug Level Monitoring--Analytical Techniques, Metabolism, and Pharmacokinetics, John Wiley and Sons, N. Y., 1980.