

学 位 論 文 題 名

Mechanism of the Photosensitized Chemiluminescence
of 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione(Luminol)
and 2-methyl-6-phenylimidazo [1,2-a]
pyrazin-3(7H)-one(CLA)

(ルミノール及び CLA の光増感化学発光機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

光増感化学発光は今日まで化学発光物質と一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) との反応に起因する化学発光であるという説が有力であるが、光増感剤の種類によって発光挙動、発光収率が大きく変化することなど $^1\text{O}_2$ 機構(Type II 機構)のみでは説明できない不可解な点が多く完全な結論はでていない。そこで本研究では化学発光のなかでも高発光収率であるルミノール (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) とウミホタル・ルシフェリン類似体の1つである CLA (2-methyl-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one) の光増感化学発光機構について動的測定結果から検討を行った。

光増感剤には Eosin-Y、Rose Bengal、及び Fluorescein のいずれかを使用した。測定は室温で行い、ルミノール系はアルカリ (pH=11-13)、CLA 系は中性 (pH=5-9) 付近で測定を行った。ルミノールまたは CLA と増感剤の混合溶液を増感剤の最長吸収帯である 500nm 付近を XeCl エキシマーレーザー励起による色素レーザー (FWHM : 30 ns、出力 0.15mJ / pulse) で励起し、ルミノール系では光増感反応に由来する励起一重項 3-アミノフタル酸 (APA) からの化学発光を 420nm で、CLA 系は OCLA (3-acetamido-6-phenylpyrazine) からの化学発光を 380nm で観測した。

動的解析の結果、ルミノールの光増感化学発光は μs -order の速い成分 (k_1 、 k_2) と、 ms -order の遅い成分 (k_3 、 k_4) の2成分から成ることが分かった。速い成分の rise 速度 k_1 にはルミノール濃度 ($[\text{LH}]_0$) 依存性があり ($k_1 = (2.8 \times 10^5 + 1.1 \times 10^8 [\text{LH}]_0 \text{ M}^{-1}) \text{ s}^{-1}$)、これは同 $[\text{LH}]_0$ 条件下における $^1\text{O}_2$ の decay 速度と一致した。一方速い成分の decay 速度 k_2 は $[\text{LH}]_0$ 及び増感剤の種類に関係なく一定で、報告されているルミノール peroxide 中間体 (L-OOH) の decay 速度 ($1.7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$) と一致した。また化学発光強度の $[\text{LH}]_0$ 依存性は、理論的に予想される Type II 機構由来化学発光強度の $[\text{LH}]_0$ 依存性と一致した。これらの結果より速い化学発光は Type II 反応由来の化学発光であると考えられる。すなわち、増感剤励起三重項か

ら $^1\text{O}_2$ へのエネルギー移動により生成する $^1\text{O}_2$ がルミノールと反応して L-OOH を生成し、この L-OOH が分解し一重項励起 APA が生成した結果化学発光が生じたものと考えられる。遅い発光成分に関しては (1) 化学発光の rise 成分 k_3 がルミノール一電子酸化体 ($\text{L}\cdot$) と $^3\text{O}_2$ との反応で生成するルミノール中間体 ($\text{L-OO}\cdot$) の decay 速度 ($2.1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) と一致すること (2) 化学発光強度の $[\text{LH}]_0$ 依存性は理論的に予想される電子移動反応機構 (Type I 機構) 由来化学発光強度の $[\text{LH}]_0$ 依存性と一致すること (3) 励起三重項増感剤がルミノールと拡散律速に近い 2 次反応速度定数 ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) で反応することから、ルミノールと三重項増感剤での電子移動反応に由来する化学発光であると考えられる。これまで Type I 反応、すなわちルミノールが三重項増感剤によって酸化され生成する $\text{L}\cdot$ は、同時に Type I 反応で生成する増感剤アニオンラジカルと $^3\text{O}_2$ の反応で生成するスーパーオキシド (O_2^-) と反応し励起一重項 APA を生成し化学発光を示すと考えられていたが、本研究より $\text{L}\cdot$ は O_2^- とではなく $^3\text{O}_2$ と反応することにより化学発光を生じることが明らかになった。また Type I 及び Type II 反応で生成するルミノール中間体は全く異なっているが最終的には発光種の APA を生成すること、さらに Type I 及び Type II 機構での発光量子収率は pH=13 においてそれぞれ約 10^{-3} 及び 10^{-5} であり、Type I 機構が圧倒的に大きいことが判明した。

CLA 光増感化学発光に関しては速い decay (k_1)、やや速い rise-decay (k_2, k_3)、及び遅い decay (k_4) の 3 成分から成る化学発光が観測され、またそれぞれの速度定数は CLA 濃度、 $^3\text{O}_2$ 濃度 ($[^3\text{O}_2]_0$) に関係なくほぼ一定で、pH=6.77 において $k_1=30 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2=34 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_3=28 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_4=2 \text{ s}^{-1}$ であった。各発光強度の $[^3\text{O}_2]_0$ 依存性より、速い発光は Type II 機構、やや速い rise-decay 発光は Type I 機構由来であることが判明した。なお k_1 、 k_2 、及び k_3 の各値は増感剤三重項や一重項酸素の decay 速度 ($10^5 - 10^6 \text{ s}^{-1}$) よりも明らかに小さいことから、それぞれ CLA 中間体の decay 速度を示しているものと考えられる。これまで $^1\text{O}_2$ が関与する CLA の Type II 化学発光機構は Type I 化学発光機構と同じであると考えられていたが、本研究より異なる反応機構を経て化学発光を示すことが明らかになった。また遅い decay の発光に関しては decay 速度 k_4 が O_2^- の失活速度にほぼ一致することから、CLA が Type I 反応で生成した O_2^- によって酸化された結果生じる化学発光であると考えられる。

以上本研究で得られた知見は多くの化学発光物質の発光機構及び多くの生物発光機構の解明、さらにより発光収率、活性酸素との反応性の高い化学発光物質の構築の手助けになるのはもとより、生体内および環境系における活性酸素に関する研究に大きく貢献することが期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	中村	貴義
副査	教授	太田	信廣
副査	教授	奥原	敏夫
副査	教授	中村	博
副査		竹村	健 (北海学園大学研究員)

学位論文題名

Mechanism of the Photosensitized Chemiluminescence of 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione(Luminol) and 2-methyl-6-phenylimidazo [1,2-a] pyrazin-3(7H)-one(CLA)

(ルミノール及びCLAの光増感化学発光機構に関する研究)

光増感化学発光は今日まで化学発光物質と一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) との反応に起因する化学発光であるという説が有力であるが、光増感剤の種類によって発光挙動、発光収率が大きく変化することなど $^1\text{O}_2$ 機構 (Type II 機構) のみでは説明できない不可解な点が多く完全な結論はでていない。そこで本研究では化学発光のなかでも高発光収率であるルミノール (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) とウミホタル・ルシフェリン類似体の1つであるCLA (2-methyl-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one) の光増感化学発光機構について動的測定結果から検討を行った。

光増感剤には Eosin-Y、Rose Bengal、及び Fluorescein のいずれかを使用した。増感剤の最長吸収帯である 500nm 付近を色素レーザー (出力 0.15mJ/pulse) で励起し、ルミノール系では 3-アミノフタル酸 (APA) からの発光を 420nm で、CLA 系は OCLA (3-acetamido-6-phenylpyrazine) からの発光を 380nm で観測した。

動的解析の結果、ルミノールの光増感化学発光は μs -order の速い成分 (k_1 、 k_2) と、 ms -order の遅い成分 (k_3 、 k_4) の2成分から成ることが分かった。速い成分の rise 速度 k_1 にはルミノール濃度 ($[\text{LH}]_0$) 依存性があり ($k_1 = (2.8 \times 10^5 + 1.1 \times 10^8 [\text{LH}]_0 \text{M}^{-1}) \text{s}^{-1}$)、これは同 $[\text{LH}]_0$ 条件下における $^1\text{O}_2$ の decay 速度と一致した。一方速い成分の decay 速度 k_2 は $[\text{LH}]_0$ 及び増感剤の種類に関係なく一定で、報告されているルミノール

peroxide 中間体 (L-OOH) の decay 速度 ($1.7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$) と一致した。また化学発光強度の $[\text{LH}^-]_0$ 依存性は、理論的に予想される Type II 機構由来化学発光強度の $[\text{LH}^-]_0$ 依存性と一致した。これらの結果より速い化学発光は Type II 反応由来の化学発光であると考えられる。すなわち、増感剤励起三重項から $^3\text{O}_2$ へのエネルギー移動により生成する $^1\text{O}_2$ がルミノールと反応して L-OOH を生成し、この L-OOH が分解し一重項励起 APA が生成した結果化学発光が生じたものと考えられる。遅い発光成分に関しては (1) 化学発光の rise 成分 k_3 がルミノール一電子酸化体 ($\text{L}^\cdot$) と $^3\text{O}_2$ との反応で生成するルミノール中間体 ($\text{L-OO}^\cdot$) の decay 速度 ($2.1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) と一致すること (2) 化学発光強度の $[\text{LH}^-]_0$ 依存性は理論的に予想される電子移動反応機構 (Type I 機構) 由来化学発光強度の $[\text{LH}^-]_0$ 依存性と一致すること (3) 励起三重項増感剤がルミノールと拡散律速に近い 2 次反応速度定数 ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) で反応することから、ルミノールと三重項増感剤での電子移動反応に由来する化学発光であることが判明した。また Type I 及び Type II 機構での発光量子収率はそれぞれ約 10^{-3} 及び 10^{-5} であり、Type I 機構が圧倒的に大きいことが判明した。

CLA 光増感化学発光に関しては速い decay (k_1)、やや速い rise-decay (k_2, k_3)、及び遅い decay (k_4) の 3 成分から成る化学発光が観測され、またそれぞれの速度定数は CLA 濃度、 $^3\text{O}_2$ 濃度 ($[^3\text{O}_2]_0$) に関係なくほぼ一定で、 $\text{pH}=6.77$ において $k_1=30 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2=34 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_3=28 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_4=2 \text{ s}^{-1}$ であった。各発光強度の $[^3\text{O}_2]_0$ 依存性より、速い発光は Type II 機構、やや速い rise-decay 発光は Type I 機構由来であることが判明した。なお k_1 – k_3 の各値は増感剤三重項や一重項酸素の decay 速度よりも小さいことから、それぞれ CLA 中間体の decay 速度を示しているものと考えられる。これまで $^1\text{O}_2$ が関与する CLA の Type II 化学発光機構は Type I 化学発光機構と同じであると考えられていたが、本研究より異なる反応機構を経て化学発光を示すことが明らかになった。また遅い decay の発光に関しては decay 速度 k_4 が O_2^- の失活速度にほぼ一致することから、CLA が Type I 反応で生成した O_2^- によって酸化された結果生じる化学発光であると考えられる。

以上本研究で得られた知見は多くの化学発光及び生物発光機構の解明、より発光収率、活性酸素との反応性の高い化学発光物質の構築の手助けになるのはもとより、生体内および環境系における活性酸素に関する研究に大きく貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (地球環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。