

ケミルミネッセンスによる一重項酸素の測定

活性酸素の一つである一重項酸素は通常の酸素（三重項）に失活する際に微弱な光を生じる。その際の発光スペクトルを図 1 に示した。本報告では【1】一重項酸素に特異的な 1270nm の発光を捉える近赤外領域発光検出装置と【2】瞬時測光方式微弱発光スペクトル測定装置を用いた一重項酸素の検出について述べる。

【1】 近赤外領域発光検出装置 CLA-NIR2 を用いた検出

可視領域では一重項酸素以外の様々な有機物からの発光が確認されているが、1270nm 近辺で光る物質は一重項酸素以外に無いため、この波長での光検出が一重項酸素生成の証明になると言われている。

一重項酸素は次亜塩素酸ナトリウム（NaOCl）溶液に過酸化水素を添加することで発生する。本実験では上記方法で生成した一重項酸素由来の発光検出と、一重項酸素の消去剤であるアジ化ナトリウム（NaN₃）を入れた際の発光減少の測定を行った。

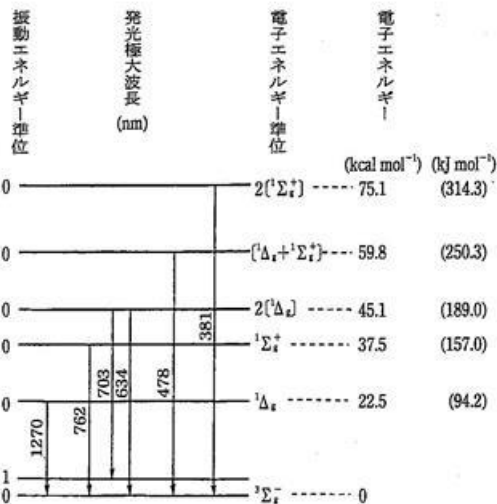
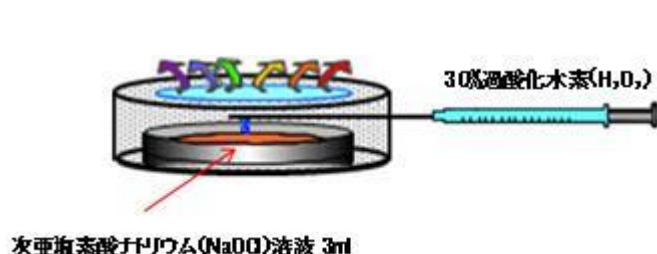


図 3.5 酸素分子の基底状態と励起状態のエネルギー
[今井一洋編, "生物発光と化学発光 基礎と実験", 廣川書店(1990)p.114]

図 1 一重項酸素の発光スペクトル

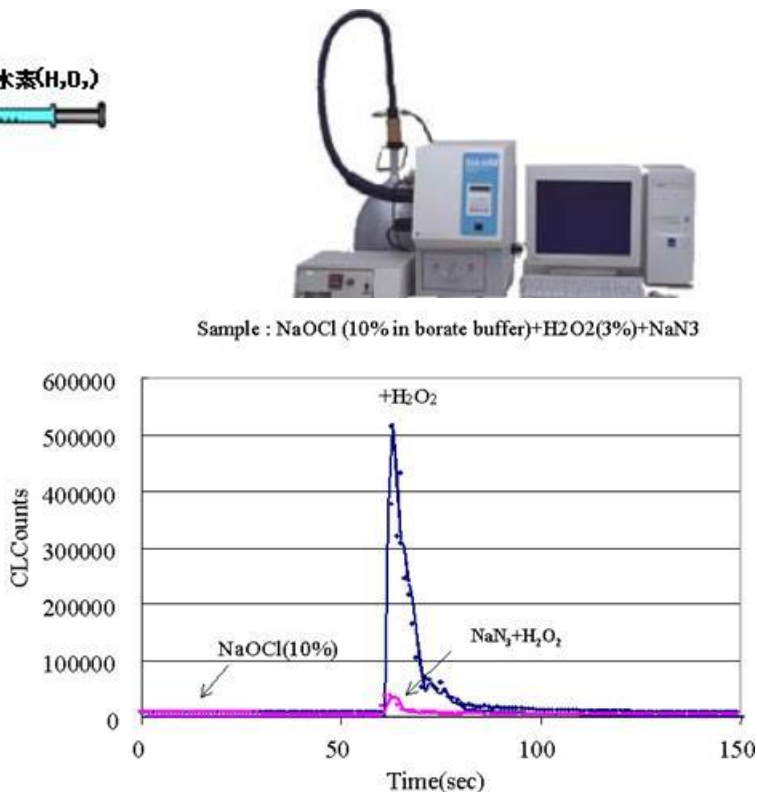
<測定方法> 使用装置：CLA-NIR2 試料室：CLS-MX3

ステンレスシャーレに次亜塩素酸ナトリウム（濃度 10%、ホウ酸緩衝液 50mM、pH10.0 で希釈）を入れ攪拌型の試料室にセットした。その後、外から 3%の過酸化水素（H₂O₂）を添加し、生じる一重項酸素による化学発光を検出した。次に次亜塩素酸ナトリウムとアジ化ナトリウム溶液（100mM）をステンレスシャーレにセットし、同様に過酸化水素を添加した時の発光を検出した。



グラフの青線は次亜塩素酸ナトリウムに過酸化水素を添加した際の発光量である。添加（測定開始 60 秒後）直後に一重項酸素由来の強い発光が検出された。一方、赤線はアジ化ナトリウムをあらかじめ入れていた結果である。添加直後も発光量は少なく、一重項酸素を消去していることが分かる。

アジ化ナトリウム以外のサンプルで同様の実験を行うことで、そのサンプルの一重項酸素消去能力（抗酸化能力）を測定できることが示唆された。



ケミルミネッセンスアナライザーへのお問い合わせは

東京支店：044-411-1263

利府事業所：022-356-6111

京都ラボ：東京支店へご連絡ください

TECHOKU 東北電子産業株式会社

本社：仙台市太白区向山 2-14-1 TEL022-266-1611
web <http://www.tei-c.com> mail sales@tei-c.com

【2】 瞬時測光方式微弱発光スペクトル測定装置を用いた一重項酸素の検出

次に同じ系で発生させた一重項酸素発光のスペクトル測定を試みた。一重項酸素の寿命は短く、数秒で発光も減衰することから、CCDカメラを使った瞬時測光方式極微弱発光スペクトル測定装置(CLA-SP3)を用いて測定を行った。

装置の構成を図2に示す。サンプルからの発光は回折格子で分光されCCDカメラで測定される。CCDカメラの各ピクセルと発光波長はあらかじめキャリブレーションされているので、瞬時にサンプルからの発光スペクトルを測定できる。カメラの検出波長は400~800nmで測定時間（露光時間）は任意に設定できるので発光量に応じて設定が可能である。

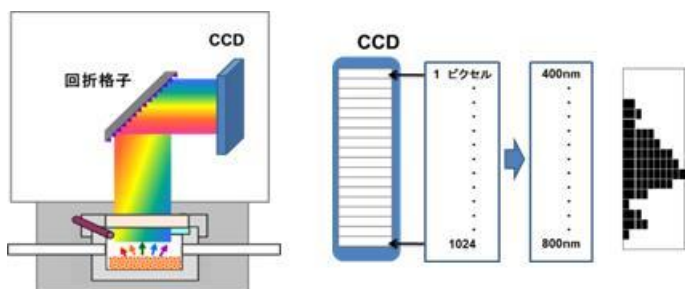
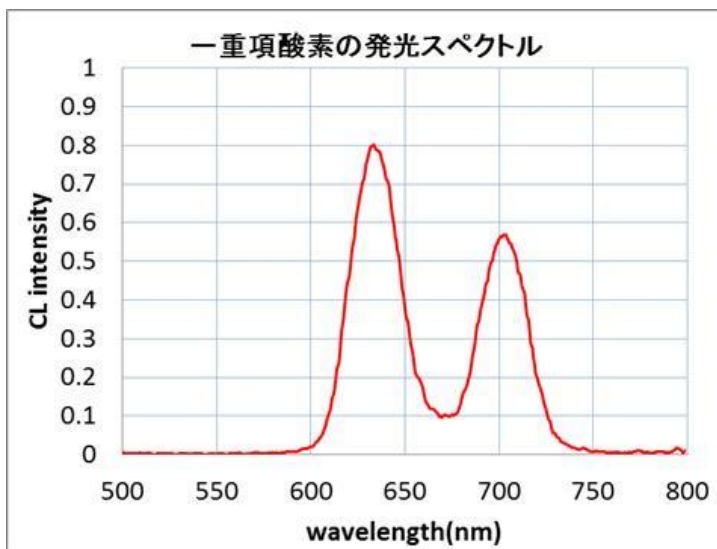


図2 CLA-SP2の構成図

＜測定方法＞ 使用装置：CLA-SP3 試料室：CLS-ST3

試薬は次亜塩素酸ナトリウム 3ml に 30%過酸化水素 500ul を外部よりインジェクトし、カメラの積算時間を 0.5 秒間として過酸化水素添加直後からの発光スペクトルを測定した。

その結果、634nm と 703nm の一重項酸素由来の発光が計測できた。



発光波長と励起酸素分子の遷移過程との関係

発行波長 Å	エネルギー kcal/mol	遷移過程	相対発光強度
15800 ^{a)}	18.1		0.008 ^{d)}
12700 ^{b)}	22.5	$1\Delta_g \rightarrow 3\Sigma_g^-$	1.00 ^{d)}
10700 ^{b)}	26.7		0.007 ^{d)}
8645 ^{b)}	33.1		
7700 ^{b)}	37.1	$1\Sigma_g^+ \rightarrow 3\Sigma_g^-$	
7619 ^{b)}	37.5		0.005 ^{e)}
7860 ^{c)}	36.4		
7032 ^{c)}	40.7	$2^1\Delta_g \rightarrow 2^3\Sigma_g^-$	0.75 ^{c)}
6334 ^{c)}	45.1		1.00 ^{e)}
6780 ^{c)}	49.3		0.01 ^{e)}
4780 ^{c)}	59.8	$1\Delta_g + 1\Sigma_g^+ \rightarrow 2^3\Sigma_g^-$	
3810 ^{c)} *	75.0		
3630 ^{c)} *	78.8	$2^1\Sigma_g^+ \rightarrow 2^3\Sigma_g^-$	
3440 ^{c)} *	83.1		
3270 ^{c)} *	87.4		

a) Kahn²⁸⁾; b) Browne ら²⁹⁾; c) Kahn ら³⁰⁾; d), e) 依田³¹⁾
 f) 励起状態; g) 基底状態 * 吸収ピーク。

図3

ケミルミネッセンスアナライザーへのお問い合わせは

東京支店：044-411-1263

利府事業所：022-356-6111

京都ラボ：東京支店へご連絡ください

TEIHOKE 東北電子産業株式会社

本社：仙台市太白区向山 2-14-1 TEL022-266-1611
 web <http://www.tei-c.com> mail sales@tei-c.com