

微弱発光測定法を用いた高感度分析

—材料の微量酸化劣化を捉える—

山田 理恵

1 はじめに

近年、SDGsの観点から環境負荷低減に寄与する新たな技術開発が大学、民間企業共に加速している。安定で高精度、高品質材料の開発、海洋プラスチック対策、リサイクル促進のための新技術が求められ、従来法より一段進んだ高感度分析手法が必要となっている。そこで本技術報告ではフォトン（光子）レベルの微弱発光測定法について述べる。本装置は約40年前に東北大学との産学連携で開発され製品化（ケミルミネッセンスアナライザー）された。材料の進化と共に年々新たな研究成果が報告されており、反応メカニズム解明や解析手法が各段に進んでいる。ここでは微弱発光反応の基礎から応用例について報告する。

1.1 発光とは

世の中にはさまざまな発光現象がある。物質が励起状態になり基底状態に落ちる際に光としてエネルギーを放出する現象を「発光」と呼ぶ。図1に様々な励起源と発光現象名を示した(実際にはより複雑な系を経由する)。

図2にはそれぞれの励起源と発光例を示した。ケミ

ルミネッセンス (CL) はケミカル (chemical) + ルミネッセンス (luminescence) から成る言葉で血液検出に用いられるルミノール発光やコンサートやお祭りで用いられるケミカルライトなどの「強い光」、酸化反応やラジカル反応由来の「弱い光」がある。当社のケミルミネッセンスアナライザーはこの化学発光を主に検出することから命名された装置であるが、世界でも最高感度レベルのフォトン（光子）の測定装置として化学発光に限らず様々な微弱な光を捉えることが出来る。

1.2 微弱発光測定法

光を用いた分析手法を示した(図3)。一般的に用い

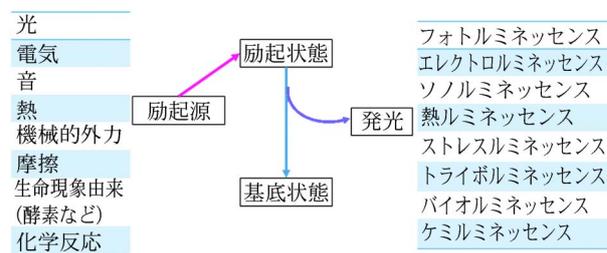


図1 発光の励起源と種類

種類	励起源	現象	例
フォトルミネッセンス	光	蛍光, 燐光, 遅延蛍光, 蓄光	蛍光, 燐光物質, 蓄光塗料, クロロフィル, 酸化チタン
エレクトロルミネッセンス	電気	発光	LED, 有機 EL
ソノルミネッセンス	音	発光	超音波によるキャビテーション
熱ルミネッセンス	熱	発光	放射被ばく材料(結晶)の加熱時発光
ストレスルミネッセンス	機械的外力	発光	延伸・圧縮・破壊
トライボルミネッセンス	摩擦	発光	物理的刺激, 破碎時 粘着テープ剥離時, 繰返し摩擦
バイオルミネッセンス	生命現象由来	発光	(強い発光) ホタル, クラゲ (弱い発光) 血液, 臓器, 種子, 植物, 生体試料
ケミルミネッセンス	化学反応	発光	(強い発光) ルミノール発光, ケミカルライト, 発光試薬 (弱い発光) 酸化反応, ラジカル反応

図2 励起源と発光例

方法	光源	概要	測定感度	Example
可視紫外 (UV/VIS) 赤外 (IR) 吸収スペクトル測定	必要	サンプルが吸収した光を測定	Low Middle	UV/VIS, IR Spectrometer
蛍光測定 (フォトルミネッセンス)	必要	サンプルからの蛍光を測定	Middle High	Fluorescence Spectrometer
微弱蛍光測定 (ケミルミネッセンス, ソノ、トライボ、バイオ ルミネッセンス等)	無	サンプルからの微弱蛍光を測定	High Ultra High	Chemiluminescence Analyzer

図 3 光を使った分析手法の感度比較

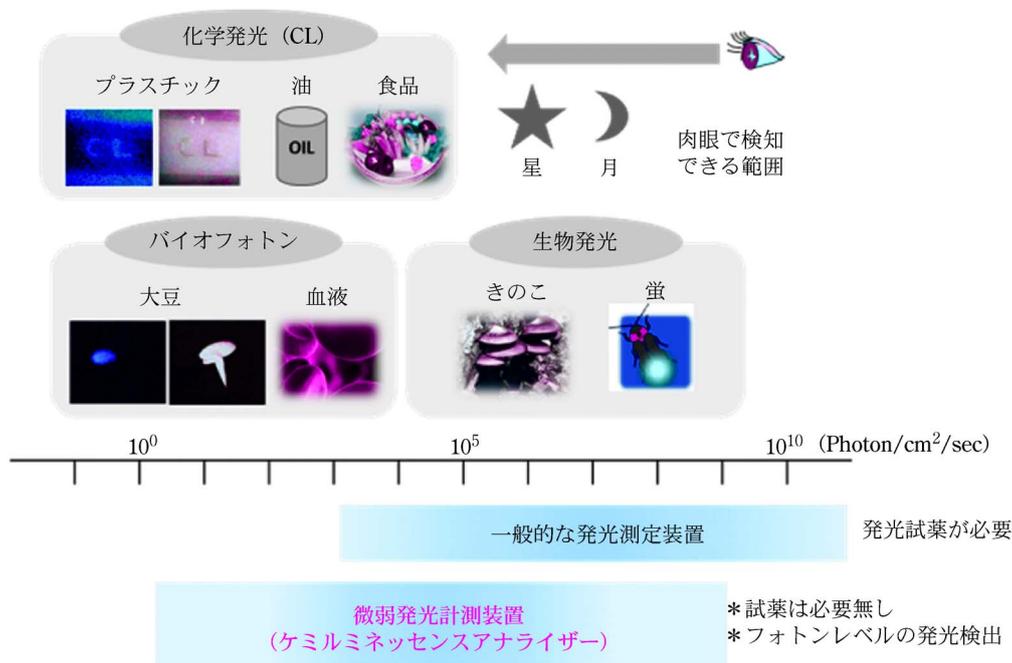


図 4 微弱発光の検出範囲

られている光の測定法は可視紫外 (UV/VIS) 分光法や赤外 (IR) 吸収スペクトル測定法、蛍光測定等である。これらは光源を必要とし、サンプルが吸収した光やサンプルからの蛍光を測定する方法であるが、微弱蛍光測定法は光源を必要とせず、暗室にサンプルをセットし、そこから発する光子 (光子) を検出する方法である。そのため光源由来の迷光や散乱光が無く、ベースレベルが抑えられ S/N 比が良くなる。微弱蛍光測定法が最も高感度である。

次に微弱蛍光測定で検出できる光の範囲を図 4 に示した。人の眼に見える光は星明り、ホテルの発光程度であるが、近年光検出デバイスの高感度化により様々なものが微弱な光を呈していることがわかってきた。一般的

な発光検出装置は発光試薬を用いて検出するものが多数であるが、ケミルミネッセンスアナライザーは試薬を必要とせず、サンプルそのものからの微弱な発光を検出する点が特徴である。

2 測定装置 (ケミルミネッセンスアナライザー) の概要

ケミルミネッセンスアナライザー外観写真を図 5 に示した。図 5-1 は高感度フォトンカウンティング用光電子増倍管 (PMT: Photo Multiplier Tube) を用いた約 50 フォトン/cm² レベルまで検出可能な微弱蛍光測定装置、図 5-2 は高感度カメラ (EM-CCD) を用いた微弱蛍光画像測定装置、図 5-3 は高感度カメラと明る

い分光器を組み合わせた微弱発光スペクトル装置装置である。

図 5-4 には試料室外観写真を示した。試料室は引出しタイプであり、加熱測定（～350℃）、雰囲気置換（酸素、窒素など）、攪拌、フロー、レーザー光源の組込等が可能である。これらの他にも様々な装置と組み合わせることも可能であり、特注対応であるが、水槽、引張試験機や動物試料室などと組み合わせた実績がある。

5 cmφ または 2 cmφ のシャーレに入るものであれば



図 5-1 微弱発光測定装置 (PMT タイプ)



図 5-2 微弱発光画像測定装置 (CCD タイプ)



図 5-3 微弱発光スペクトル測定装置 (CCD+分光器タイプ)



図 5-4 試料室

固体、液体、粉体等形状は問わず測定可能である。ただし微弱発光は比較法であることからリファレンスと測定サンプルの形状、表面積は同じであることが好ましい。測定時間は数分から数日まで可能であり、酸化過程や反応過程をリアルタイム計測する場合に有効である。

3 高分子材料の酸化劣化測定

3-1 プラスチックのサイクルと評価ニーズ

ケミルミネッセンスアナライザーは近年プラスチック、樹脂等の材料劣化評価に多く用いられている。図 6 に原料から成形加工、製品化、販売、リサイクルに至るまでそれぞれのステージにおける評価ニーズを示した。最近、これらの評価を目的に使用されることが増えている。

図 7 には材料が新品から劣化品に至る様々な化学的、物理的変化の評価方法を示した。従来の一般的な評価方法（機械的強度、色差、メルトフローレート (MFR)、赤外吸収スペクトル測定 (IR)、分子量、熱分析) では劣化がある程度進行しなければ変化を捉えることはできない。しかし微弱発光法では極初期の微量な酸化劣化を捉えることができる。そのため微弱発光法による酸化劣化測定は高分子材料の開発期間の短縮に繋がり、不良・故障の原因解明などにも有用である。

3-2 自動酸化スキームと微弱発光

図 8 には一般的に報告されている材料の自動酸化スキームと微弱発光の生成を図示した。未酸化材料 (RH) は光、熱などの刺激により R・(アルキルラジカル) を生じる。それは即座に酸素と結びつき ROO・(ペルオキシラジカル) となる。ROO・は左下図に示した 2 分子反応によりアルコール、励起カルボニル、一重項酸素を

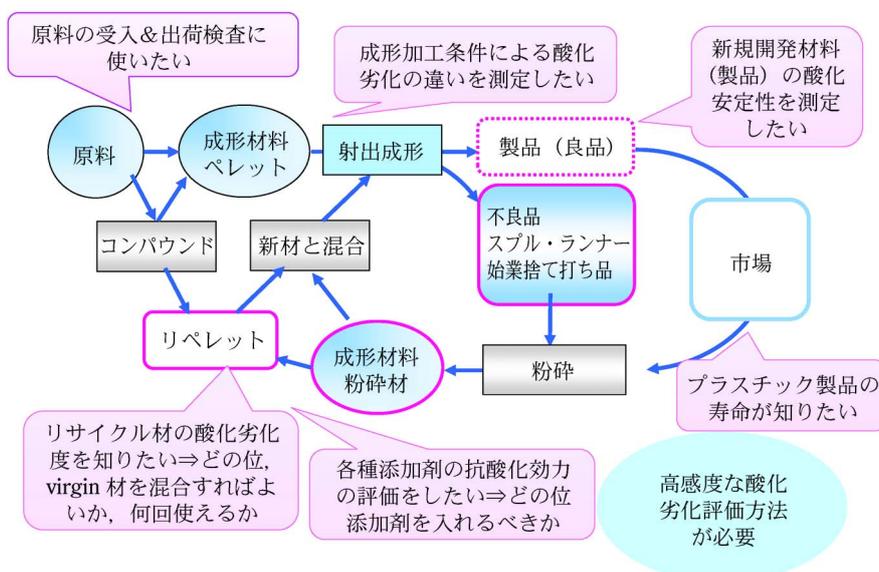


図 6 プラスチックのサイクルと評価ニーズ

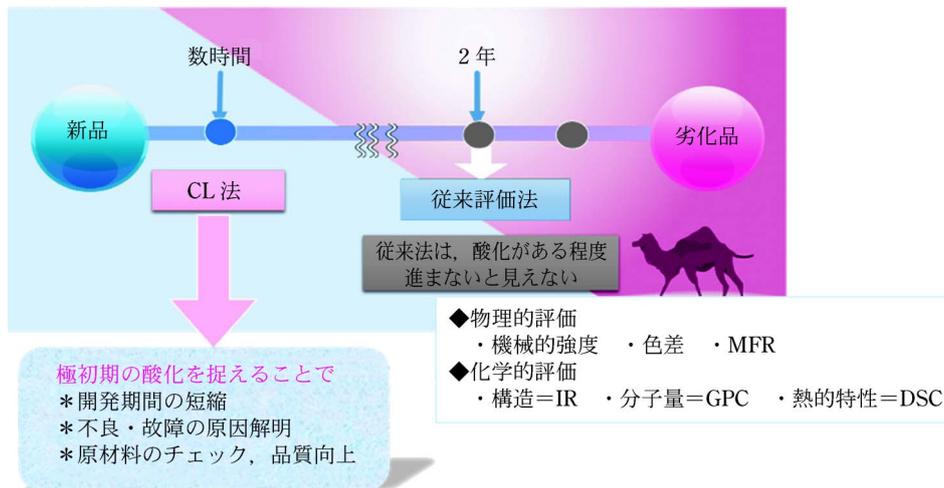


図7 劣化促進過程と評価法

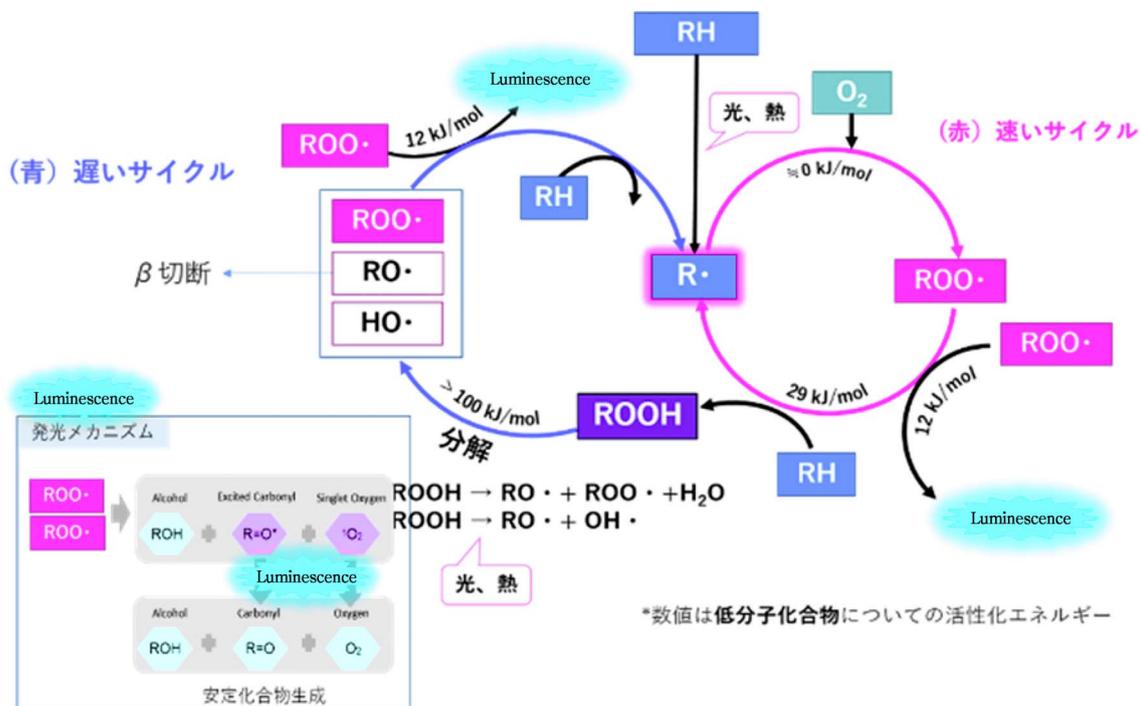


図8 自動酸化スキーム

生じ、励起カルボニル、一重項酸素は基底状態へ戻る際に微弱な光を呈する。したがって酸化反応が進むほど ROO・ が生成し、発光が増加する。ROO・ はすべてが 2 分子反応せず一部は ROOH（パーオキシド、過酸化化物）となって材料中に蓄積していく。これは加熱などの刺激により分解し、ROO・ を生じることで、微弱な光を呈する。

このスキームを基に、微弱発光法による酸化劣化測定で観察される現象を以下にまとめた。

(1) 不活性ガス（窒素等）中の加熱測定では右の早いサイクルは回らず、左の遅いサイクルだけが動き、ROOH が分解して光る。

(2) 酸素下加熱測定では両方のサイクルが動き、サン

プル内に蓄積された ROOH 由来の発光に、同時に進行する酸化反応由来の発光が加算される。

(3) 長時間加熱酸素測定を行い、酸化を更に促進させると材料内のラジカル量が増加し、反応スピードが増加し、内在抗酸化剤が消費され、酸化スピードが格段に上がるポイントが現れる。これを酸化誘導時間（OIT：Oxidation Induction Time）と呼ぶ。

3.3 微弱発光測定の経時変化挙動

微弱発光法による時間変化挙動を図9に示した。3.2項の自動酸化スキームより初期ピークは材料内に蓄積されていた過酸化物量に比例し、②の平坦部の強度、およびOITは材料の“酸化しやすさ”の指標となる。測定

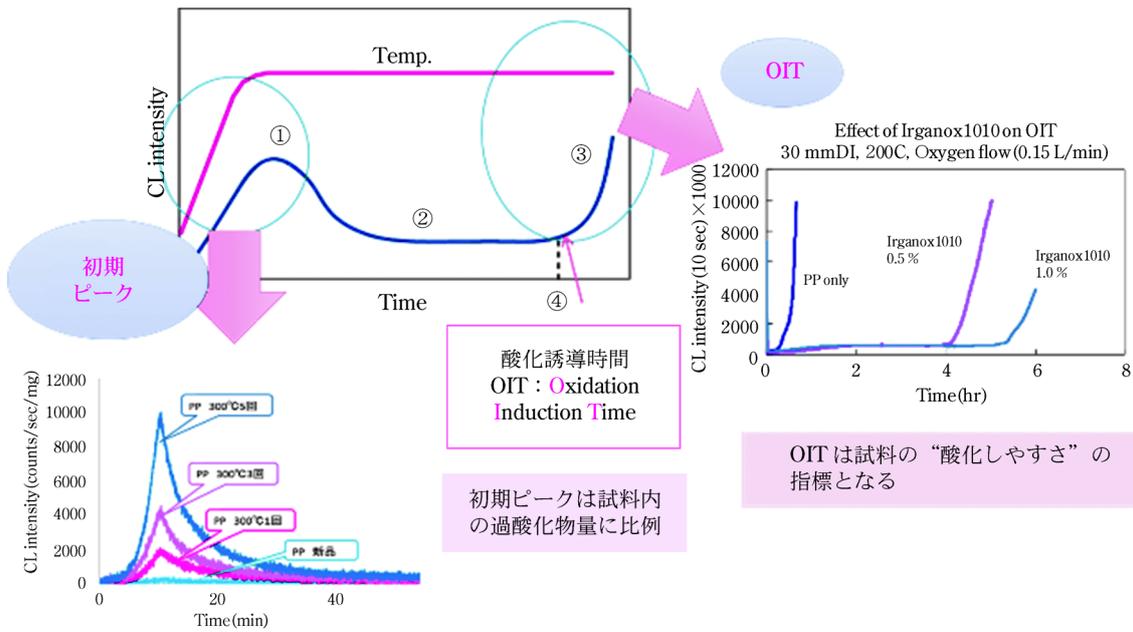


図9 微弱発光の経時変化挙動と実測例

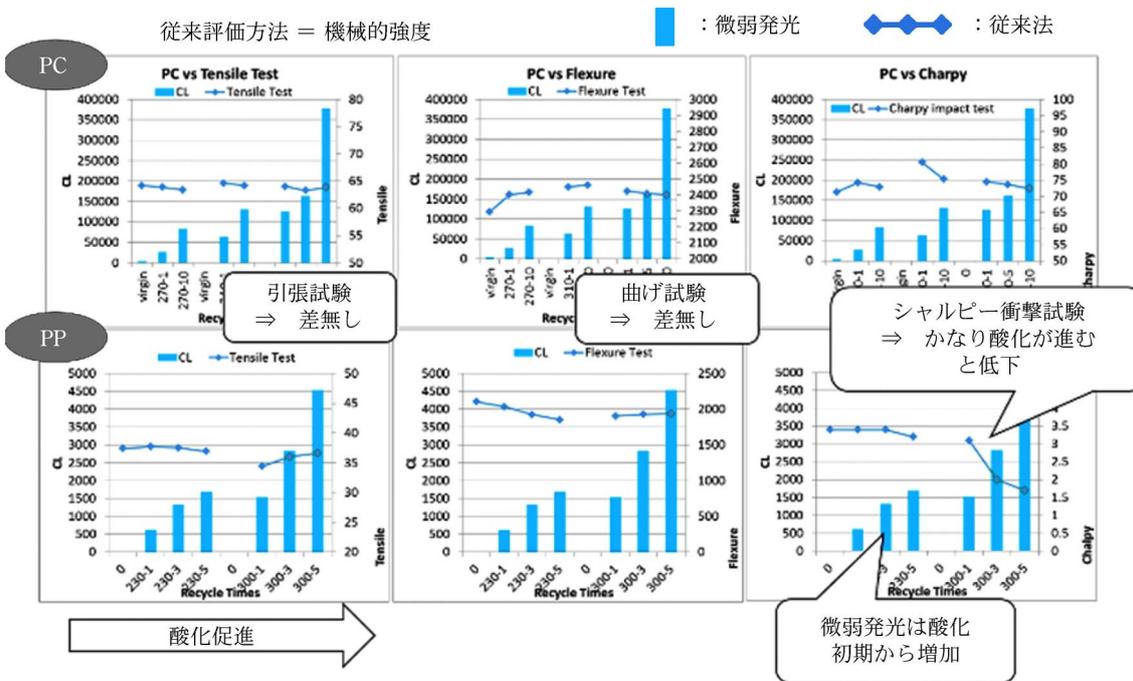


図10 微弱発光法と機械的強度試験との比較

例を図内に表示した。

左下は初期ピーク測定の実例である。サンプルはポリプロピレン (PP) を 300 °C で押出回数を 1, 3, 5 回と増やし酸化させたものである。一番下が未酸化品であり、そこから酸化の進行に伴い発光ピークは増加した。右図は OIT 測定の実例である。サンプルは同じく PP を用い、200 °C 酸素下で酸化促進させリアルタイムで酸化挙動をモニターした。その結果、抗酸化剤を含まない PP は 30 分程で急激な発光増加が見られたが、抗酸化剤を 0.5 % 含むサンプルは約 4 時間後、1 % 含むものは約 5.5

時間後に発光増加が見られた。OIT 測定は材料の酸化しやすさの指標となることから、抗酸化剤の効果判定や新製品の酸化安定性比較などに用いられている。

3.4 微弱発光法と機械的強度試験の比較

図 10 に微弱発光法と機械的強度試験との比較を示した。上段がポリカーボネート (PC)、下段がポリプロピレン (PP)、左から引張試験、曲げ試験、シャルピー衝撃試験である。棒グラフが微弱発光、折れ線が従来法の結果である。PC は 270 °C、310 °C、330 °C で 1, 10 回

押出, PP は 230 °C, 300 °C で 1, 3, 5 回押出を行い酸化させた。右へ行くほど酸化が進んだサンプルであり, 微弱発光は初期酸化の時点から増加が見られた。一方, 機械的強度試験ではほとんど差は認められず, 唯一, PP を 300 °C で押出 3, 5 回行ったもののみシャルピー衝撃試験で低下が認められた。この結果から, 微弱発光測定法では機械的強度試験では検出できない極初期の酸化を捉えられることが明らかとなった。同様に IR のカルボニル基 (C=O) のピークと比較しても微弱発光量の増加は早期に現れることが確認されている。

3.5 微弱発光スペクトル

図 5-3 微弱発光スペクトル測定装置を用いた PP の酸素雰囲気下, 酸化反応時の分光分析結果を図 11 に示した。積算時間 30 秒, 測定温度 180 °C で 1 分ごとに 120 分まで測定した。酸化に伴い, 400 nm 付近のピーク位置の長波長シフトと 550 nm 以上の長波長領域の強度増大が観測された¹⁾。

3.6 微弱発光画像測定

図 5-2 の微弱発光画像測定装置 (CCD タイプ) を用いたポリプロピレン (PP) の抗酸化剤有無サンプルの発光画像測定結果を図 12 に示した。

抗酸化剤を含まないサンプルは発光が高く, 抗酸化剤

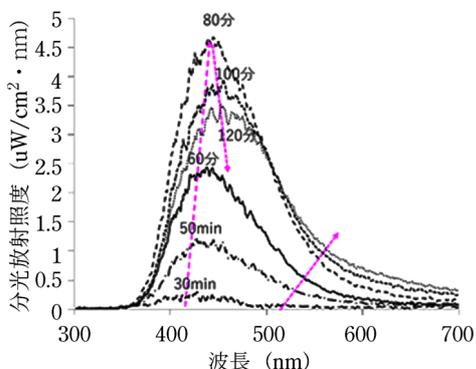


図 11 ポリプロピレンの加熱酸化時の発光スペクトル¹⁾

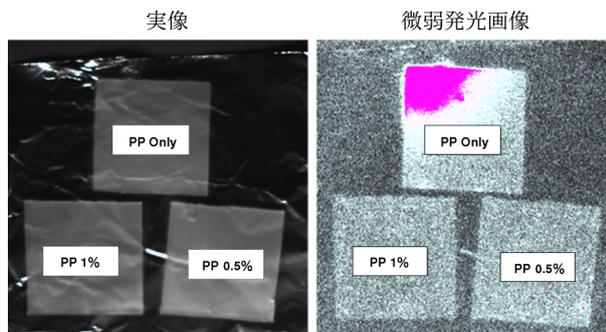


図 12 PP の発光画像 (左: 実像, 右: 発光画像, 疑似カラー表示) 上: 抗酸化剤無し, 右下: 抗酸化剤 0.5 %, 左下: 抗酸化剤 1 %

を含むサンプルは発光が低いことから酸化が抑えられていることがわかった。画像測定は視覚的で分かりやすく, 100 個までの多検体を同時に比較することも可能である。

4 食品・生化学材料の酸化劣化測定

ここまでプラスチックの酸化劣化と微弱発光現象についてのメカニズム, 評価方法を述べてきたが, 本現象は他の多くの有機物にも同様に生じ, 微弱発光計測により極初期の酸化劣化評価が可能である。

実際, ケミルミネッセンスアナライザーは当初“古くなったインスタントラーメンが光る”ことから「食用油の劣化評価装置」としてスタートしている。そこで食品・生化学等の応用例について以下に述べる。

4.1 食用油の酸化と微弱発光

図 13 に食用油の微弱発光現象を示した。なたねサラダ油を 40 °C で 3 日間空气中で攪拌しながら酸化させ, その後 3 mL をシャーレに採り 100 °C で微弱発光の経時変化を測定した。その結果, 未酸化油に比較して酸化油は高い発光を示した。空气中での攪拌日数を変えた発光の面積値は公定法である過酸化値 (POV : Peroxide Value) と高い相関が見られた。

本サンプルの発光スペクトルを測定した結果, 420~440 nm に高い発光が認められた。食用油も図 8 の自動酸化スキームによる発光が提唱されており, 発光種は励起カルボニルと推測されている²⁾。

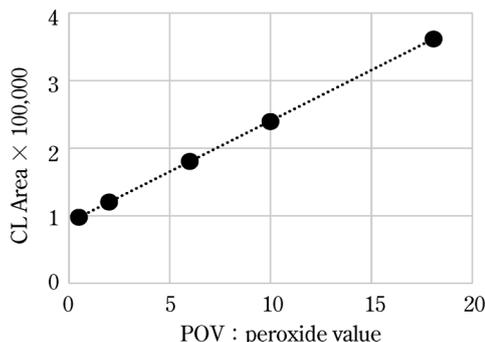
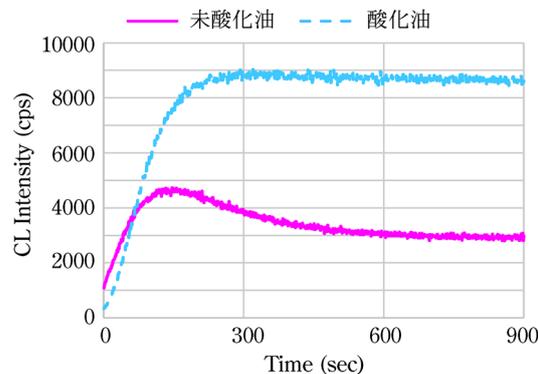


図 13 酸化油 (青) と未酸化油 (赤) の微弱発光の経時変化 (上) と POV との相関 (下)

4・2 錠剤の光劣化と微弱発光

図 14 に異なるメーカー (A-F 社) で同一成分を含む錠剤の光劣化と微弱発光を示した。未照射 (コントロール), 室内散光, 4000 ルクス照射試料の比較を示した。上図は 150 °C 窒素下で測定した A, D, E, F 社製の錠剤の微弱発光画像, 下図は 1 分間の発光量積算値を示した。光照射により発光の増加率に違いが見られ, 同一成分を主成分とする錠剤でもメーカーにより光安定性の差が見られた。

その他の例として (1) 紫黒米と白色米の紫外線耐性の比較³⁾, (2) ビールの保存期間による酸化劣化, (3) 大豆種子の酸化劣化と発芽率⁴⁾, (4) 整形外科用インプラントの酸化安定性⁵⁾, (5) 血液の発光と疾病, (6) 皮膚からの発光⁶⁾ など多数の報告がある。

	Control	室内散光	4000Lux
A			
D			
E			
F			

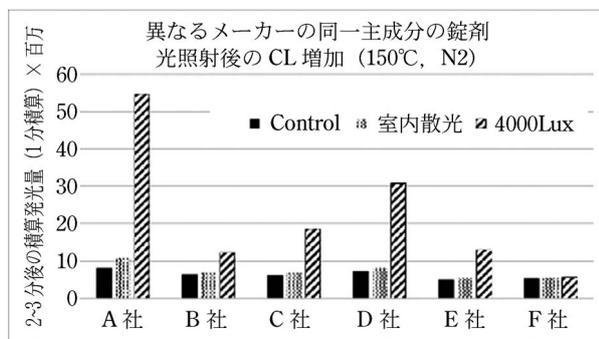


図 14 錠剤の光劣化と微弱発光

5 HPLC (高速液体クロマトグラフィー) との組み合わせによる高感度微量測定

図 15 に CL-HPLC のシステム概要と過酸化脂質検出時の発光スキームを示した。ヒト血中過酸化脂質 (PCOOH: リン脂質コリン過酸化物), 皮膚スクアレンの過酸化物, 過酸化水素などの分析に用いることができ, PCOOH の場合, 数百フェムトモル (fmol) の検出が可能である⁷⁾。

ヒト血中の PCOOH は高脂血症, 動脈硬化, 心筋梗塞のリスク指標, 薬剤効果の判定や疾病メカニズム研究などに用いられている。a, b 2 名のリン脂質過酸化物を $n=3$ で測定した結果, 数 pmol の濃度で再現性良く検出された (図 16)。

6 レーザ光源との組み合わせによる高感度蛍光分析

図 17 にレーザー光源試料室写真を示した。フォトンレベルの光検出にレーザー光源を組み合わせることで従来法よりも高感度な蛍光測定が可能となる。

図 18 に測定例を示した。上図はポリプロピレンの未酸化品, 200 °C 1, 5 回押出酸化品の蛍光画像である。酸化が進むほど蛍光強度が強くなった。下図には蛍光物質ヘマトポルフィリンの検量線を示した。約 20 fmol (フェムトモル) まで検出が可能であった。

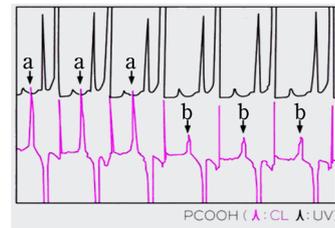


図 16 血中過酸化脂質の検出 (a, b 3 回測定) 上: UV 検出器; 下: 微弱発光 (CL)

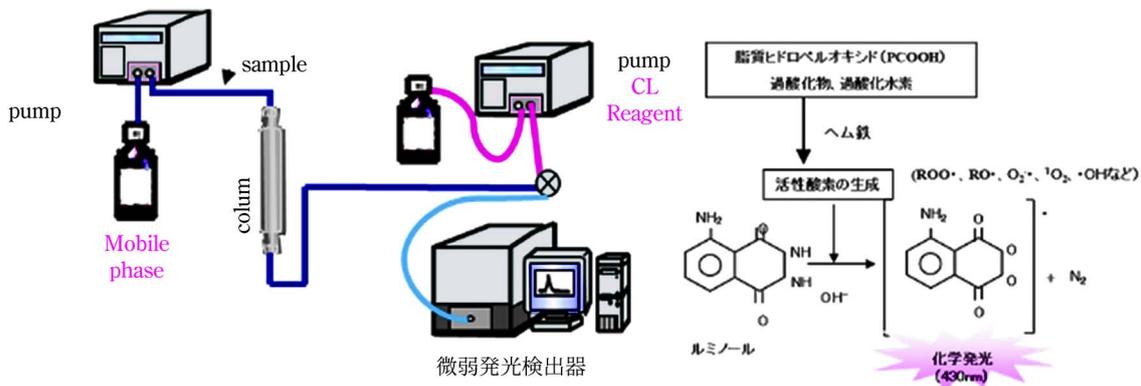


図 15 CL-HPLC (化学発光—HPLC システムと発光スキーム)

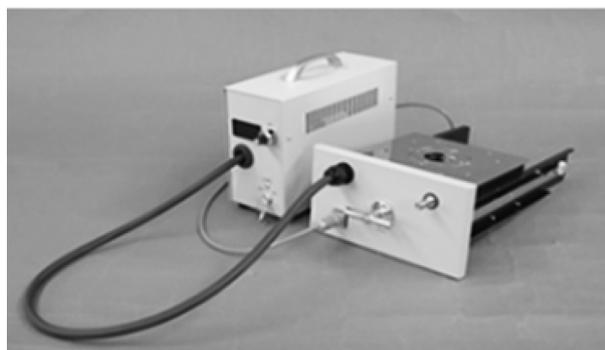


図 17 レーザ光源試料室

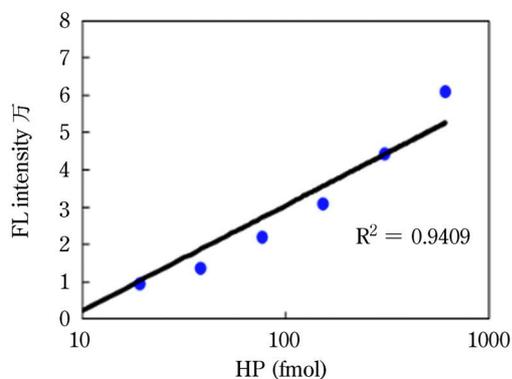
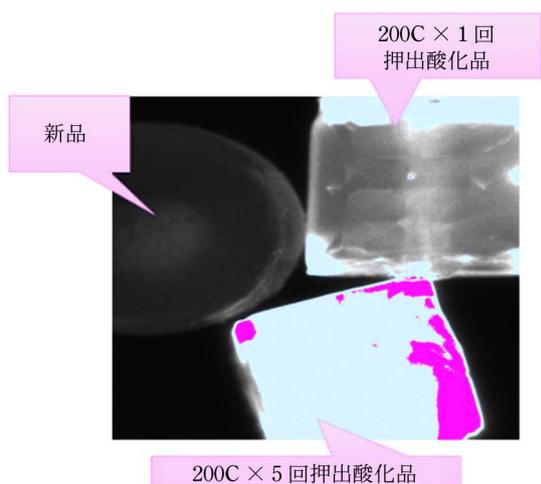


図 18 ポリプロピレンペレットの蛍光画像 (上), 蛍光物質 (HP) の蛍光検出検量線 (下)

7 まとめ

微弱発光測定法の概要および応用例について報告した。この他の応用例として触媒反応過程における微弱発光⁸⁾、ハイスループット化学発光イメージングと機械学習に基づく安定剤の処方⁹⁾、水のキャピテーション時の微弱発光¹⁰⁾、高分子材料の破碎時の発光など多数の応用例が報告されている。また最新の研究では、材料の光安定性評価法として UV 光照射後の光減衰測定よりラジカル生成速度を算出する方法も報告されている¹¹⁾。

微弱発光測定法は 1950 年代から研究されているが、近年、より現場で利用可能な分析手法として確立しつつある。2018 年には JIS K 7351 「プラスチックに含まれる過酸化物の微弱発光の高感度測定方法」として公示された。現在さまざまな分野の研究に活用されており、今後新たな知見が得られることが期待される。

文 献

- 1) 西村寛之, 細田 覚: プラスチックス, **8**, 24 (2017).
- 2) 笠原里栄子, 宮澤陽夫: 油化学, **47**, 201 (1998).
- 3) 大久長範, 金澤圭二, 山田理恵: *J. Miyagi Univ. Sch. Food Agri. Environ Sci.*, **4**, 61 (2010).
- 4) R. Saeki, T. Miyazawa, M. Usa, H. Inaba: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1603 (1990).
- 5) C. Jefferies, S. Al-Malaika, H. H. Sheena: *Polymer Deg. Stab.*, **183**, 109462 (2021).
- 6) Y. Gabe, D. Murase, S. Kasamatsu, S. Osanai, Y. Takahashi, A. Hachiya: DOL10.1111/srt 12944 (2020).
- 7) T. Miyazawa: *Proc. Jpn. Acad., Ser. B97* (2021).
- 8) T. P. N. Tran, A. Thakur, T. N. Nguyen, P. Mohan, T. Wada, P. Chammingkwan, T. Taniike: *Catalysis Today*, 2020, *in press*.
- 9) T. Taniike, T. Kitamura, K. Nakayama, K. Takimoto, N. Aratani, T. Wada, A. Thakur, P. Chammingkwan: *ACS Applied Polymer Materials*, **8**, 3319 (2020).
- 10) H. Soyama: *Ultrasonics Sonochemistry*, **70**, 105389 (2021).
- 11) S. Hosoda, T. Sato, M. Takahashi, I. Tanuma, R. Yamada: *Polymer Degradation and Stability*, **188**, 109575 (2021).

山田理恵 (RIE YAMADA)

東北電子産業株式会社 (〒982-0841 仙台市太白区向山 2 丁目 14-1)。東北大学農学部食糧化学科。博士 (農学)。微弱発光測定法による微少酸化劣化検出法の開発



会社ホームページ URL :

<http://www.tei-c.com/>

関連製品ページ URL :

<https://cl.tei-c.com/>