BUNSEKI KAGAKU Vol. 59, No. 1, pp. 51–56（2010）
© 2010 The Japan Society for Analytical Chemistry

報　文

電気化学発光プローブによる超音波反応場のキャラクタリゼーション

金　継業®[1]，粂田　宏明[1]，高橋　史樹[1]，鈴木　保任[2]

水に超音波を照射すると，キャビテーションの作用によりヒドロキシルラジカル（・OH）や過酸化水素（H_2O_2）などの活性酸素種が生成され，それらが種々の化学作用をもたらす．本研究ではルミノールの電気化学発光反応（electrochemiluminescence ; ECL）を用いて超音波反応場の化学作用を評価する新しいアプローチを提案した．28，45，100，490 kHz の各周波数の超音波を水溶液に照射し，生成した H_2O_2 を ECL によって測定した結果，ECL の強度は照射時間に依存して増大し，超音波の周波数が高いほど超音波反応効率（*SE* 値）が大きいことが分かった．超音波反応場で生成した・OH は一般的に反応性が高く，他のラジカル捕捉剤が存在しない場合，ラジカル同士が速やかに再結合し，最終的にはより安定な H_2O_2 となり，ECL により定量されていると考えられる．ECL 法で測定した *SE* 値は，従来の Weissler 法（ヨウ化カリウムを用いる方法）の結果と良好な相関関係があり，本法の有用性が認められた．更に，光ファイバーを用いた三電極複合型の ECL プローブを開発し，ロックイン検出の手法により 490 kHz 超音波反応場中における活性酸素種の *in situ* 検出に成功し，キャビテーションの閾値（しきい）や反応場におけるキャビテーションの空間分布に関する情報を測定できた．

1　緒　　言

超音波とは，ヒトには聞こえない 20 kHz から数 MHz の周波数領域の音波を指している．超音波はそれ自身には化学反応を引き起こすエネルギーを持っていないが，強力な超音波を液体に照射すると，キャビテーションと呼ばれる気泡が発生し，その成長，崩壊の過程において，短寿命の高温・高圧の局所反応場が形成される[1]．そこで水分子は熱分解し，反応式（1）で示すように・OH や H・などのラジカル種が生成する．超音波の化学作用の多くは，これらラジカルの寄与によるものとされている[2]．このようなラジカルの発生は常温と常圧下においても容易に実現できるため，近年，ナノ材料の創製，水質の浄化，遺伝子治療など応用的な分野への展開が試みられている[3)~6)]．また，グリーンケミストリーの観点から水を化学反応場として利用することへの期待も高まっている．その一方，超音波の化学作用は反応器の形状，超音波の周波数，超音波の照射方法などによって大きく異なり[7)8)]，超音波反応場を制御するという観点から，キャビテーションの強度と反応場中における空間分布を定量的に評価できる分析技術の開発が求められている．

・OH を直接定量できる方法としては電子スピン共鳴法（ESR）があるが，測定には高価な装置が必要である上に，分析の再現性がしばしば問題になっている．最近ヨウ化カリウム（KI）水溶液が超音波化学反応のドジメータとして利用され，超音波反応場で生成した・OH の定量に広く利用されている[7)~10)]．この方法は Weissler 法とも呼ばれており，以下の反応を利用している．

$$H_2O \xrightarrow{)))} \cdot OH + H\cdot \quad (1)$$

$$I^- + \cdot OH \longrightarrow OH^- + I\cdot \quad (2)$$

$$I\cdot + I^- \longrightarrow I_2\cdot^- \quad (3)$$

$$2I_2\cdot^- \longrightarrow I_2 + 2I^- \quad (4)$$

$$I_2 + I^- \longrightarrow I_3^- \quad (5)$$

KI 水溶液中で遊離した I^- イオンが・OH により酸化され，反応式（2）～（5）を経て，最終的に三ヨウ化物イオン（I_3^-）を生成する．I_3^- は 350 nm に極大吸収を示すため，その濃度は吸光光度法で簡単に求められる．また，I_3^- の濃度から・OH の生成量を間接的に見積もることができる．しかし，これらの方法は，分析感度がまだ不十分で，ラジカル発生の *in situ* 計測には適用できず，反応場におけるキャビテーションの空間分布に関する情報を得ることは難しい．

超音波反応場で生成した・OH は反応性が高く，反応場に他のラジカル捕捉剤が存在しない場合，反応式（6）に従い速やかに再結合し，最終的にはより安定な H_2O_2 となる[11)]．

[1] 信州大学理学部化学科：390-8621　長野県松本市旭 3-1-1
[2] 山梨大学大学院医学工学総合研究部工学学域物質工学系：400-8511　山梨県甲府市武田 4-3-11

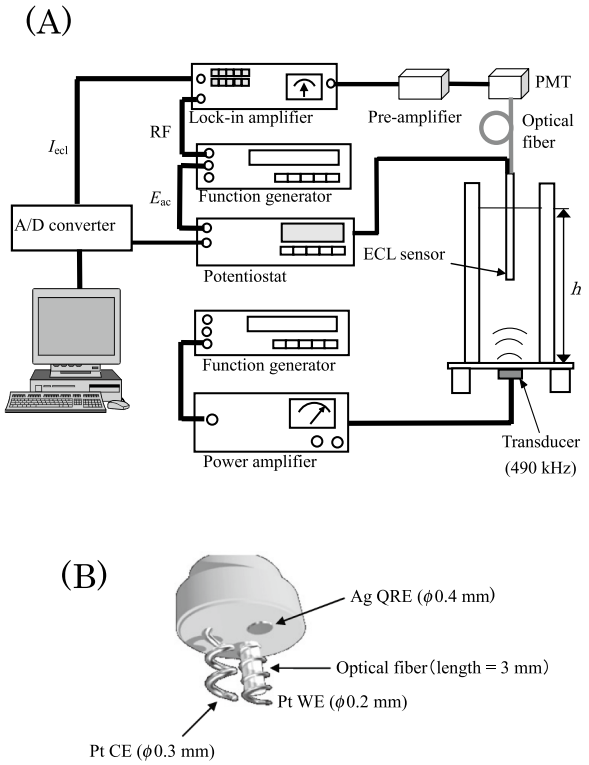


Fig. 1 (A) Schematic diagram of experimental apparatus for *in situ* ECL measurement ; (B) An ECL probe

$$OH\cdot + OH\cdot \longrightarrow H_2O_2\ (k = 5\times10^9\ M^{-1}\ s^{-1}) \qquad (6)$$

反応場で生成した極微量の H_2O_2 を直接検出することによって超音波の化学作用が定量されている[11]．電気化学発光（electrochemiluminescence ; ECL）は，電気化学反応に伴う発光現象であり，種々の化学種の高感度検出手法として注目されている[12)~14)]．ルミノールを用いて ECL を行う場合，その発光を電気化学的に制御できることに加えて，ルミノールの通常の化学発光反応とは異なり中性又は弱アルカリ性の緩衝溶液中でも観察できるなどの利点がある[15]．本研究では，ルミノールの ECL を用いて超音波反応場の化学作用の定量とキャラクタリゼーションを行った．

2 実　　験

2･1 試　薬

ルミノールは和光純薬製の特級試薬を用いた．0.1 M（M = mol dm^{-3}）リン酸緩衝溶液はリン酸水素二ナトリウム・12 水和物とリン酸二水素カリウムを一定の割合で混合して調製した．過酸化水素標準溶液は，過マンガン酸カリウムを用いる酸化還元滴定により標定した後，蒸留水で所定の濃度に希釈した．

2･2 電気化学及び ECL 計測システム

電気化学測定には PAR 263A ポテンショスタットにより行った．直径 1.0 mm の白金ディスク作用電極，白金線（ϕ 0.4 mm）対電極と銀・塩化銀（Ag/AgCl）参照電極からなる三電極系電解セルを用いた．バッチ法の ECL 測定は，作用電極の前面に光ファイバ（ϕ 1.0 mm）の端面を設置し，電極表面からの微弱発光を H6780 光電子増倍管（浜松ホトニクス製）に導き検出した．

2･3 超音波照射装置と *in situ* ECL 計測システムの構成

周波数 28 kHz，45 kHz，100 kHz 及び 490 KHz の 4 種類の超音波振動子を用いて実験を行った．振動子の発振にはモデル W-115 超音波発生装置（本多電子製）又は後述のファンクションジェネレータと高速バイポーラー電圧増幅器を使用した．振動子を水槽の底に上向きに固定し，その上方 1 cm の所に平底の密閉した反応容器を設置した．反応容器に 0.1 M リン酸緩衝溶液（pH = 8.0）200 mL を入れ，超音波を一定の時間間隔で照射した後，溶液 3.0 mL を採取し，ルミノールの濃度が 50 μM になるよう添加し，生成した微量の H_2O_2 の濃度を ECL によって定量した．Weissler 法を用いる場合，初期濃度 0.1 M の KI 水溶液 200 mL を反応容器に入れ，生成した I_3^- の濃度を吸光光度法（I_3^- のモル吸光係数 : 350 nm で $2.6\times10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$）により決定した．

実験に用いた *in-situ* ECL 計測のシステムを Fig. 1 に示す．円筒型超音波反応器は厚さ 5 mm，内径 60 mm の透明アクリルパイプを用いて作製し，その底面にステンレス振動板付きの PZT 振動子（本多電子製）を取り付けた．モデル WF1943A ファンクションジェネレータ（NF 回路設計ブロック製）から出力された振幅 2 V の連続正弦波をモデル HAS4012 高速バイポーラー電圧増幅器（NF 回路設計ブロック製）によって増幅して振動子を駆動した．*In situ* 計測に用いられる ECL プローブの構造を Fig. 1（B）に示す．光ファイバーの先端部に直径 0.3 mm の白金線をらせん状に巻き，それを作用電極として用いた．作用電極は白金対極（ϕ 0.3 mm）と銀擬参照電極（Ag quasi reference electrode ; AgQRE）を径 3 mm のテフロンロッドに封入して ECL プローブとした．電位変調 ECL を行う場合は，ファンクションジェネレータから出力された交流電圧（E_{ac}）により電極に印加する電位を変調し，それに同調した発光シグナルをモデル NF LI-574 ロックインアンプ（NF 回路設計ブロック製）により検出した．ECL 計測は遮光ボックス内で行った．

3 結果及び考察

3･1 ECL による過酸化水素の高感度定量

Fig. 2 には 50 μM ルミノールを含む pH 8.0 のリン酸緩衝溶液中に 100 μM H_2O_2 を添加したときに得られたサイクリックボルタモグラム（A）と，それに対応した ECL 応答

（B）を示す．ルミノールは＋0.6 V *vs.* Ag/AgCl で酸化され，その電位付近において電極からの発光が観測された．Scheme 1 に示されるように，ルミノールの電解酸化中間体であるジアザセミキノンラジカルと過酸化水素の酸化で生成したスーパーオキシドラジカルとの化学反応によって，励起状態の 3-アミノフタル酸が生成し，基底状態へと戻る際に光が放出される[15]．本計測システムを用いると，ECL の発光強度は H_2O_2 濃度範囲，0 から 100 μM までの間で直線関係（相関係数 $r = 0.9985$）を示し，検出下限は約 20 nM（$S/N > 3$）であった．

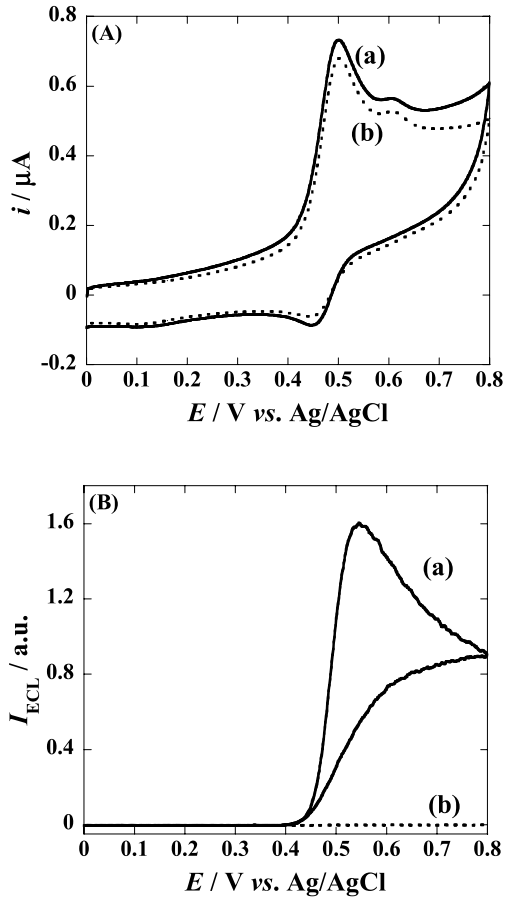


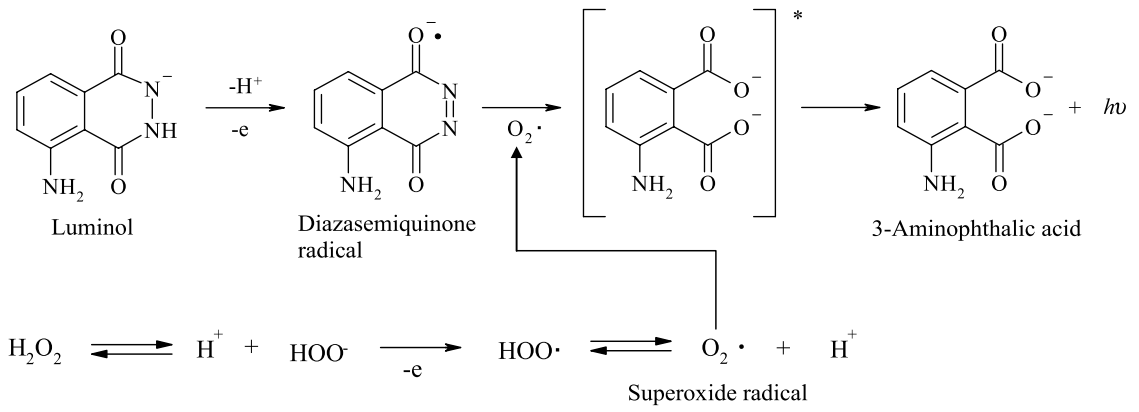
Fig. 2　(A) Cyclic voltammograms of 50 μM luminol at a glassy carbon electrode in 0.1 M PBS (pH 8.0) in the presence of 100 μM H_2O_2 ; (B) The corresponding ECL-potential curves

The dotted lines are the responses in the absence of H_2O_2.　Scan rate : 50 mV s^{-1}.　Voltage to PMT : 800 V

3･2　ECL による超音波化学作用の定量

Fig. 3（A）には，100 kHz の超音波を用いたときに得られた超音波照射時間と ECL 強度の関係を示す．超音波照射時間が長くなるのにつれて ECL の強度が増大し，反応器中の H_2O_2 の生成量が増加していることを確認できた．超音波反応場で生成した･OH は，反応式（6）に示すように速やかに再結合し，最終的にはより安定な過酸化水素（H_2O_2）として水溶液中に生成していると考えられる．したがって，超音波反応場に生成した･OH と H_2O_2 のような活性酸素種をバッチ法の ECL により直接定量できることが確認され，過酸化水素の生成速度（$[H_2O_2]/dt$）は 22.4 nmol s^{-1} と求められた．反応式（6）により，H_2O_2 は･OH の二量体であると考えられるので，･OH の生成速度 $v(= d[\cdot OH]/dt)$ は 44.8 nmol s^{-1} と見積もられた．次に，同じ超音波照射の条件下において，Weissler 法により得られた結果を Fig. 3（B）に示す．350 nm 付近に現われる I_3^- の吸収バンドは照射時間とともに増大し，I_3^- の生成速度は 19.8 nmol s^{-1} となった．反応式（2）～（5）に示すように，2 モルの･OH から 1 モルの I_3^- ($2[\cdot OH] = 1[I_3^-]$) が生成することから，･OH の生成速度は 39.6 nmol s^{-1} と求められ，ECL 法の結果よりやや低めの値であるものの，ほぼ一致した．Weissler 反応の場合，I_3^- が反応式（6）で生じた H_2O_2 と更に分解反応（$H_2O_2 + I_3^- \rightarrow 3I^- + O_2 + 2H^+$）が起こす可能性があるので，これにより低い値が得られるとの指摘がある[16]．ECL 法では，生成した H_2O_2 を直接定量しているので，超音波化学作用をより正確に評価できる新しい分析ツールとしての可能性を有している．

超音波化学作用を定量的に示す尺度として，香田らは超



Scheme 1　ECL in lumino/H_2O_2 system

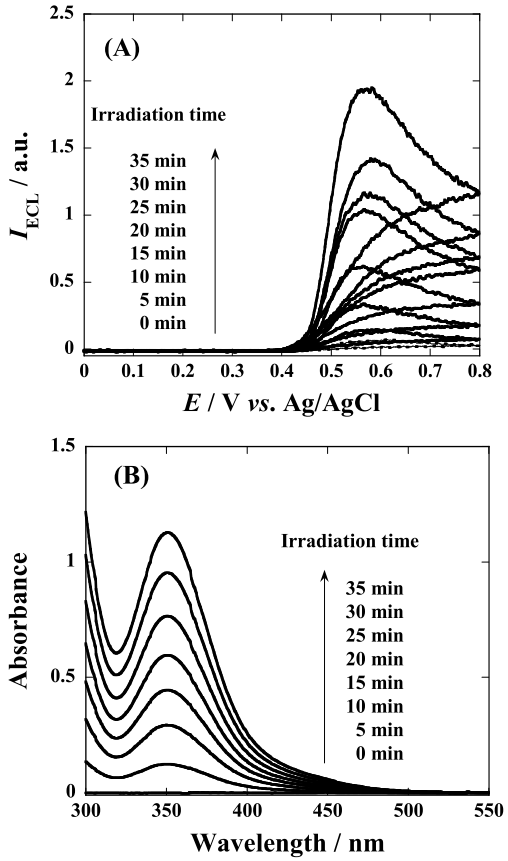


Fig. 3 (A) Dependence of ultrasound irradiation (100 kHz) time on ECL intensity in pH 8 PBS. The ECL signals were recorded by potential sweep mode from 0 to +0.8 V *vs*. Ag/AgCl with a scan rate of 50 mV s^{-1}; (B) The results by Weissler method. The initial concentration of KI was 0.1 M

The ultrasonic output power for (A) and (B) was 80 W.

音波反応効率（Sonochemical Efficiency, *SE* value）という概念を提唱した[8]. *SE* 値（mol J^{-1}）は，反応容器に投入された超音波エネルギー *E*(J) と超音波照射による ·OH の生成量 *m*(mol) の比，もしくは超音波パワー *P*(W) に対する ·OH の生成速度 *v*[mol s^{-1}] として次式から求める．

$$SE\ \text{value} = \frac{m}{E} = \frac{v}{P} \qquad (7)$$

反応器に投入した超音波パワー *P* は，カロリメトリーにより見積もられた[7)8)]. Table 1 には *SE* 値の周波数依存を示す．周波数 100 kHz 以下の超音波では比較的小さい *SE* 値が得られるが，490 kHz では *SE* 値が 10 倍も増大し，化学作用が最も大きいことが分かった．ECL で得られた *SE* 値は香田ら報告した結果とほぼ一致しており[8]，また，Table 1 に示すように Wiessler 法の結果とも良好な相関関係があった．

Table 1 Evaluation of sonochemical efficiency (*SE* value) in different ultrasonic reactors by ECL and Weissler methods, respectively

Ultrasound frequency/kHz	*SE* value/mol J^{-1}	
	(ECL method)	(Weissler method)
490	30.6×10^{-10}	29.8×10^{-10}
100	8.92×10^{-10}	7.86×10^{-10}
45	2.02×10^{-10}	1.81×10^{-10}
28	1.89×10^{-10}	1.57×10^{-10}

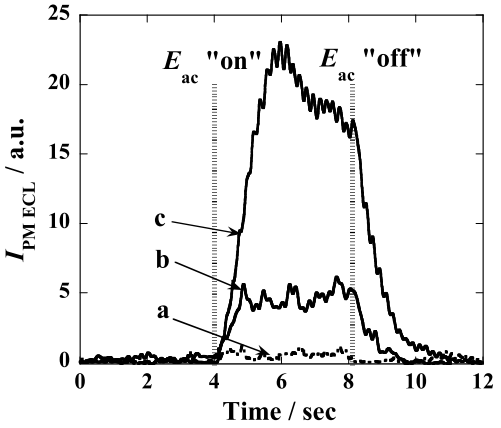


Fig. 4 Potential modulated (PM) ECL for *in situ* detection of H_2O_2 produced in a 490 kHz ultrasonic reactor which contained 50 μM luminol and 0.1 M PBS (pH 8)

The electrode potential was modulated from 0 to +0.8 V *vs*. AgQRE with a frequency of 5 Hz. The light emissions were monitored synchronously using a lock-in amplifier. The ECL response of (a) was measured under stationary condition, while the ECL curves of (c) and (d) were observed under ultrasonic irradiation with electric output powers of 30 W and 60 W, respectively.

3·3 電位変調 ECL による超音波反応場の *in situ* 計測

液体に強い超音波を照射すると，ソノルミネッセンス[17)18)]と呼ばれる発光現象が起こるため，*in situ* で ECL 計測を行う際には妨害となる．本研究では電位変調電気化学発光法（potential modulated electrochemiluminescence, PMECL）を用いてソノルミネッセンスによるバックグラウンド発光を除去し，超音波反応場の *in situ* 計測を行った．PMECL は電極に印加する電位を周期的に変化させながら，交流電圧（E_{ac}）と同調した発光シグナルをロックインアンプにより検出する方法であり，出力された信号は変調 PMECL 強度（I_{PMECL}）と定義される．I_{PMECL} は電極反応のみに依存しているためソノルミネッセンスの影響を効果的に取り除くことができる．Fig. 1（B）に示したプローブを用いて，490 kHz の超音波反応器の中で観察した *in situ* PMECL の応答を Fig. 4 に示す．点線 a は静止のときに記

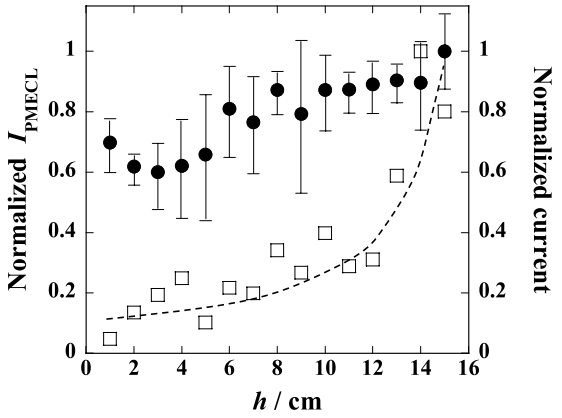


Fig. 5　Normalized PMECL intensity (I_{PMECL}) (□) and reduction current (●) for 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$ as a function of the distance from the transducer (h) in a 490 kHz sonochemical reactor with the electric output power of 60 W

The normalized I_{PMECL} and current are defined as the ratio of the PMECL intensity or current to the maximum PMECL intensity or the current near the liquid surface, respectively.

録したもので，I_{PMECL} はほとんど観察されなかった．しかし，出力が 30 W と 60 W の超音波がそれぞれ照射されるとbとcに示すように，I_{PMECL} が顕著に観測され，その値は超音波の出力に伴い増大していることが分かった．水溶液に超音波を照射すると，キャビテーションによる化学的な効果のほかに，物質輸送速度の促進などの物理的な効果が考えられる[19)20)]．本研究では，2000 rpm の白金回転ディスク電極上で I_{PMECL} 応答がほとんど認められなかったことから，Fig. 4b と Fig. 4c に示した ECL 応答は，超音波の機械的な撹拌（かくはん）効果によるものではなく，キャビテーションの化学作用によるものと推定できる．

超音波の出力が一定値以上に達するとキャビテーションが発生する．この値は超音波キャビテーションの閾値（しきい）と呼ばれ，超音波化学研究のうえで重要な指標である[21)]．この系では，超音波の出力が 16 W 以上になると I_{PMECL} が観察され始めたことから，キャビテーションの閾値は 16 W であることを意味している．キャビテーションの発生に伴った物質移動速度の促進効果を利用して，ボルタンメトリーによる閾値を決定するも可能であるが[22)]，その結果は *in situ* PMECL で得られた結果とほぼ一致しているため，ECL の分析感度はその値を実測するのに十分であることを示唆した．

3･4　超音波反応場中のキャビテーションの分布

現段階において，局所領域における H_2O_2 の絶対濃度を決定することが難しいが，PMECL の強度により反応場中のキャビテーション発生の相対頻度，すなわちキャビテーションの分布を評価することが可能だと考えている．ここで，ECL プローブを超音波の進行方向に沿って振動子からの距離 0.5 cm から 16 cm（液面付近）までの位置に移動させながら，I_{PMECL} のマッピングを行った．その結果を Fig. 5 (□) に示す．縦軸は発光強度の最大値を 1 として規格化した I_{PMECL} である．用いた超音波反応器は，振動子から離れるほど ECL 強度が大きく，液面近くに最も強い ECL 発光が観測された．$[Fe(CN)_6]^{3-}$ を電気化学プローブとして用いて，反応場中の物質輸送速度の分布を $[Fe(CN)_6]^{3-}$ の還元電流の計測によって評価した．その結果を Fig. 5 (●) に示す．電流値はある程度のばらつきを示したが，ほぼ一定の範囲内であったので，物質輸送速度の位置依存性はほとんどなく，液面付近では超音波による化学作用が大きいと考えられる．この原因として，強い定在波が液面付近に形成されキャビテーションバブルがトラップされやすいことと，音響放射圧の作用でキャビテーションバブルが反応器の上部に集まることが考えられる[23)]．このように ECL プローブを用いることにより，超音波反応場における局所的なキャビテーション活性を評価できることが示された．

4　結　　言

本研究で開発した ECL プローブを用いて，反応場に生成した活性酸素種を *in situ* 測定した結果，ECL 強度は超音波の出力に依存し，また ECL の分析感度は，キャビテーション発生の閾値を実測するのに十分であった．490 kHz 超音波反応場中で生成した活性酸素種の相対濃度を ECL プローブにより *in situ* 測定した結果，超音波発生源よりも液面付近で高い濃度となり，反応場中でキャビテーションの分布を評価できることを明らかにした．ECL を用いる場合，その電流値の大きさから超音波による物理的な撹拌効果，発光強度から超音波の化学的作用に関する情報を同時に得られるため，多次元で音響反応場を評価するツールとして今後の応用，展開が期待できる．

謝　　辞

本研究を行うにあたり，助言又は超音波反応器の作製に協力をいただいた名古屋大学大学院工学研究科物質制御工学専攻の香田忍教授及び㈱本多電子の朝倉義幸博士に謝意を表します．

文　　献

1) K. S. Suslick : *Science*, **247**, 1439 (1990).
2) 香田　忍 : 化学と工業，**57**, 811 (2004).
3) 興津健二，前田泰昭 : 表面科学，**26**, 593 (2005).
4) K. S. Suslick, M. M. Mdleleni, J. T. Ries : *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9303 (1997).
5) P. R. Gogate : *Adv. Environ. Res.*, **6**, 335 (2002).
6) 工藤信樹，山本克之 : 生体医工学，**43**, 231 (2005).
7) S. Koda, T. Kimura, T. Kondo, H. Mitome : *Ultrason.*

Sonochem, **10**, 149 (2003).
8) Y. Asakura, M. Maebayashi, S. Koda : *J. Chem. Eng. Japan*, **38**, 1008 (2005).
9) A. Weissler, H. W. Cooper, S. Snyder : *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1769 (1950).
10) R. Zhou, W. Luo, L. Zhu, F. Chen, H. Tang : *Anal. Chim. Acta*, **597**, 295 (2007).
11) Y. Hu, Z. Zhang, C. Yang : *Ultrason. Sonochem.*, **15**, 665 (2008).
12) F. Takahashi, J. Jin : *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1669 (2009).
13) F. Takahashi, J. Jin : *Electroanalysis*, **20**, 1581 (2008).
14) F. Takahashi, J. Jin : *Luminescence*, **23**, 121 (2008).
15) S. Sakura : *Anal. Chem. Acta*, **262**, 49 (1992).
16) K. R. Morison, C. A. Hutchinson : *Ultrason. Sonochem.*, **16**, 176 (2009).
17) D. J. Flannigan, K. S. Suslick : *Nature*, **434**, 53 (2005).
18) D. Lohse : *Nature*, **434**, 33 (2005).
19) 金 継業，鈴木保任：超音波テクノ，**19**, 59 (2007).
20) R. G. Compton, J. C. Eklund, S. D. Page, T. J. Mason, D. J. Walton : *J. App. Electrochem*, **26**, 775 (1996).
21) T. J. Mason, J. P. Lorimer : "*Applied Sonochemistry : Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*", p. 43 (2002), (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim).
22) M. Atobe, T. Nonaka : *Chem. Lett.*, **1997**, 323.
23) H. Mitome : *Electron. Comm. Jpn. Part 3*, **81**, 10 (1998).

Characterization of Sonochemical Reactors by an Electrochemiluminescent Probe

Jiye JIN[1], Hiroaki KUMETA[1], Fumiki TAKAHASHI[1] and Yasutada SUZUKI[2]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, Shinshu University, 3-1-1, Asahi, Matsumoto-shi, Nagano 390-8621
[2] Department of Applied Chemistry, Interdisciplinary School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 4-3-11, Takeda, Kofu-shi, Yamanashi 400-8511

(Received 27 August 2009, Accepted 30 October 2009)

The generation of cavitation through ultrasonic waves can lead to the formation of reactive species, such as ·OH and H_2O_2 in aqueous liquids. These short-lived species are capable of effecting secondary oxidation or reduction reactions, which are referred to as sonochemical reactions. This paper reports a new method of cavitation diagnostics with an electrochemiluminescence (ECL) optical sensor for studying any sonochemical activity induced by ultrasonic cavitation. This system has been successfully employed to determine the actual rate production of H_2O_2 and the sonochemical efficiency (*SE* value) in different sonochemical reactors with frequencies of 28, 45, 100 and 490 kHz, respectively. The *SE* values were in excellent agreement with results evaluated by potassium iodide (KI) dosimetry. Because of the high sensitivity of this method, the potential modulated ECL sensor was capable of measuring the hydroxyl radical production (in this case hydrogen peroxide) *in situ*, so as to obtain the spatial distribution of cavitation generated in the ultrasound field.

Keywords : ultrasonic cavitation ; luminol ; hydroxyl radical production ; electrochemiluminescent sensor.