

# 微分蛍光法によるクロロフィル a, b 及び フェオフィチン a, b の超微量定量

## ——励起微分スペクトルの有効性——

芳竹 良彰, 合田 四郎, 山崎 秀夫,  
森重 清利, 西川 泰治<sup>®\*</sup>, 重松 恒信<sup>\*\*</sup>

(1984 年 7 月 5 日受理)

クロロフィル (chl.) 及びフェオフィチン (pheo.) は、水圏における生物活性の重要な指標である。しかし、これらの構造は、テトラピロール環状構造に基づく非常に類似したものであり、いまだ適切な定量法が確立されていない。本研究では、chl. a, b 及び pheo. a, b のわずかに異なる励起・蛍光スペクトルを利用した励起・蛍光微分スペクトル法について検討した。又、chl. 高次分解物の影響を除去するために、ペーパークロマトグラフィーを併用した励起・蛍光微分スペクトル法を確立した。なお、本法により、環境試料中の chl. a, b 及び pheo. a, b は、他の 3 成分がそれぞれ単独で 20 倍量共存する場合についても、相対標準偏差 4% 以下 (9 回繰り返し測定) で、定量限界 0.1 ppm の超微量定量が可能である。

## 1 緒 言

クロロフィル (chl.) 及びその初期分解物であるフェオフィチン (pheo.) は、水圏における生物活性の重要な指標である。現在 chl. 及び pheo. の定量法は、吸光光度法を始め種々の分析法が報告されている<sup>1)2)</sup>。しかし、これらのポルフィリン類は、テトラピロール環状構造に基づく非常によく類似した分光化学的特性を有するため、いまだ満足すべき分析法は確立されていない。chl. c 及び pheo. c については、著者らが先に熱活性化遅延蛍光法 (TADF) を開発し、その特異的分析を可能にした<sup>3)</sup>。更に、chl. a, b 及び pheo. a, b については、ペーパークロマトグラフィーを併用する簡便な蛍光分析法を報告した<sup>4)</sup>。本研究は、より高感度、高精度な chl. a, b 及び pheo. a, b の分析法の確立を目的とし、それぞれのわずかに異なる励起・蛍光スペクトルを利用した二次微分蛍光分析法について検討した。又、chl. 高次分解物の影響を除去するために、ペーパークロマトグ

ラフィーを併用した微分蛍光法を開発し、chl. a, b 及び pheo. a, b の選択的・高感度分析法を確立した。

又、励起波長を固定し蛍光微分スペクトルを測定する通常の微分蛍光法と、新たに、蛍光波長を固定し励起光を微分する、いわゆる励起微分スペクトル法を開拓した。なお、両法を比較検討した結果、各種 chl. 類が混在する試料中の超微量 chl. a の選択的定量には、クロマトグラフィーを併用した励起微分スペクトル法が有効であることを明らかにした。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

chl. a, b は、ハウレン草の葉よりアセトン抽出後、ジオキサン法<sup>5)</sup>により沈殿とし、セルロースカラムクロマトグラフィー {石油ベンジン:アセトン:1-プロパノール=100:5:0.4(v/v)} により単離、精製した。pheo. a, b は、上記の方法により得た chl. a 及び chl. b のアセトン溶液に 1 mol dm<sup>-3</sup> 塩酸を滴下後、室温で 5 分間振り混ぜ、中心金属 (マグネシウム) を脱離させた。なお、chl. a, b の濃度はモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) より分光光度法的に決定した。この場合、chl. a 及び chl. b のモル吸光係数をそれぞれ  $\epsilon_{663}=8.2 \times 10^4$  dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon_{645}=4.8 \times 10^4$  dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> として濃度を算出した<sup>6)</sup>。

\* 近畿大学理工学部: 577 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

\*\* 近畿大学教養部: 577 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

その他の試薬は、すべて市販特級品を使用した。

## 2.2 クロマトグラフィー用担体

ペーパークロマトグラフィーには、Whatman No. 1 クロマトグラフィー用濾紙を使用した。

## 2.3 装置

吸収スペクトル及び吸光度の測定には、日立自動分光光度計 333 型を使用した。

蛍光スペクトル及び励起・蛍光微分スペクトルの測定には、日立分光蛍光光度計 850 型 (R-928F 光電子増倍管, 150 W キセノンランプ) 及び同内蔵コンピューター微分回路 (Savitzky-Golay 方式) を使用した。

## 2.4 一般操作

クロマトグラフィー用濾紙の下端より 4 cm の部分に、試料からのアセトン抽出溶液をマイクロシリンジ (テルモ MS-N10) で一定量スポットする。この際、スポットの直径が 2 mm になるよう注意する。展開溶媒として石油ベンジン:アセトン=20:3 (v/v) を用い、上昇法により展開する。各成分の  $R_f$  値に従い、濾紙を chl. a, b 部分と pheo. a, b 部分に切り分け、アセトン 3 cm<sup>3</sup> により振り混ぜ抽出する。各抽出溶液について微分蛍光法により chl. a, b 及び pheo. a, b を定量する。

## 3 結果及び考察

### 3.1 微分蛍光法

微分蛍光法は原理的には微分吸光光度法<sup>7)8)</sup>と同様であり、 $d^2F/d\lambda^2$  の波長に対する曲線を直接測定し、微分スペクトルを描かせる ( $F$ : 蛍光強度,  $\lambda$ : 波長,  $n$ : 微分次数)。すなわち、波長差  $\Delta\lambda$  当たりの蛍光強度が微分値  $\Delta F$  として記録される。Fig. 1 に通常の蛍光スペクトル (原スペクトル) と微分スペクトルの関係を示した。1 回の微分ごとに位相が  $\pi/2$  進み、2 次微分スペクトルでは、原スペクトルのピークが反対に谷となることが理解できる。なお、本研究で使用した日立分光蛍光光度計 850 型は、コンピューター回路による Savitzky-Golay 方式<sup>9)</sup>を採用している。又、本装置のコンピューター回路では、波長走査スタートとチャートスタートのタイミングをずらすことにより、位相のずれは自動的に補正される。従って、原スペクトルの波長と微分スペクトルの波長は、完全に一致する。

Table 1 に chl. 及びその分解物の励起・蛍光波長を示した。ここで、これら chl. 類は、その励起・蛍光極大波長が共に近接しているため、従来の蛍光法での原ス

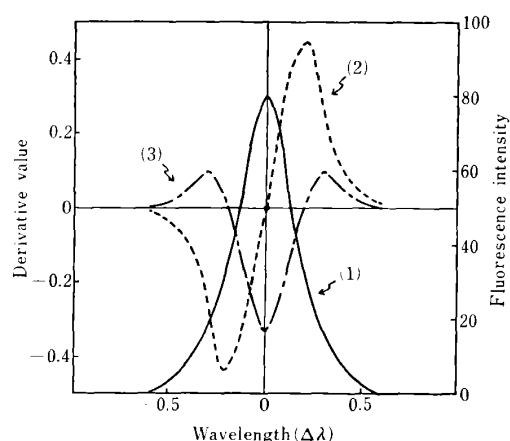


Fig. 1 Relationship between original spectrum and derivative spectra (principle diagram)

(1) Original spectrum, (2) 1st derivative spectrum, (3) 2nd derivative spectrum

Table 1 Excitation and emission maxima of chlorophylls

|                | Ex./nm | $\lambda - \lambda_{chl. a}$ | Em./nm | $\lambda - \lambda_{chl. a}$ |
|----------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|
| chlorophyll a  | 430    | —                            | 666    | —                            |
| chlorophyll b  | 460    | 30                           | 655    | -11                          |
| chlorophyll c  | 452    | 22                           | 634    | -32                          |
| pheophytin a   | 410    | -20                          | 670    | 4                            |
| pheophytin b   | 440    | 10                           | 655    | -11                          |
| pheophytin c   | 435    | 5                            | 657    | -9                           |
| pheophorbide a | 410    | -20                          | 670    | 4                            |
| pheophorbide b | 435    | 5                            | 659    | -7                           |

ペクトルによる分離定量は困難である。微分蛍光法によれば、chl. 類のような励起・蛍光波長の近接した物質の分離確認が容易である。又、蛍光性物質に対して微分蛍光法は、微分吸光光度法に比べ高感度分析が可能であるとともに、励起・蛍光波長の設定により、選択性の向上が期待できる。

一般に蛍光物質の励起スペクトルと蛍光スペクトルとの間には、ほぼ鏡像関係が成立する。従って、微分蛍光法では、励起波長を固定し蛍光スペクトルを微分する、蛍光微分スペクトル法 (Emission derivative spectrum method) と、蛍光波長を固定し励起スペクトルを微分する、いわゆる励起微分スペクトル法 (Excitation derivative spectrum method) が可能である。

### 3.2 蛍光微分スペクトル

Fig. 2 に chl. a, b を等量混在させたアセトン溶液についての、原スペクトルと 2 次蛍光微分スペクトルを示した。励起波長をそれぞれ chl. a の極大波長 (430 nm, [A]), chl. b の極大波長 (457 nm, [B]) に固定し、

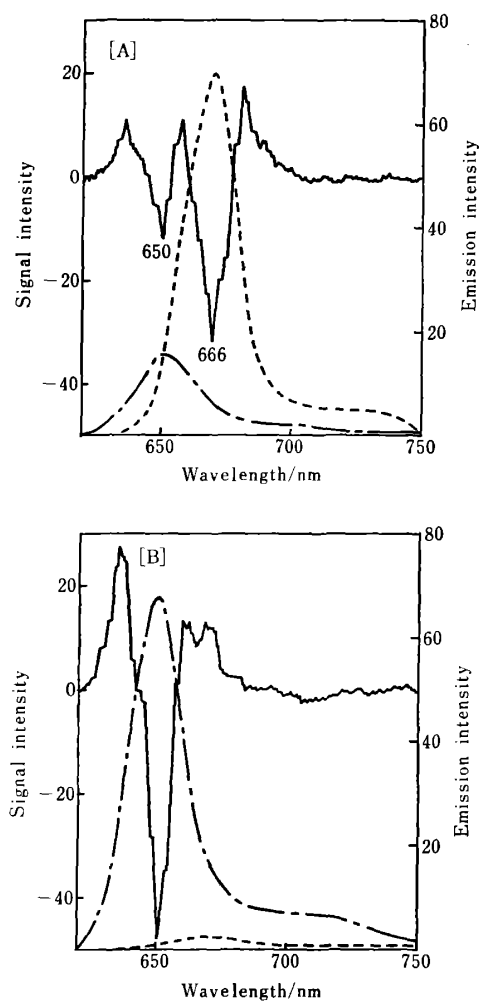


Fig. 2 Fluorescence and fluorescence derivative spectra of chlorophylls a and b

-- : Emission spectrum of chlorophyll a ( $1.0 \mu\text{g cm}^{-3}$ ),  
 - · - : Emission spectrum of chlorophyll b ( $1.1 \mu\text{g cm}^{-3}$ ),  
 — : 2nd fluorescence derivative spectrum of a mixture of chlorophylls a and b; [A]: Excitation wavelength 430 nm, [B]: Excitation wavelength 457 nm

2次蛍光微分スペクトルを測定したところ, 650 nm に chl. b, 666 nm に chl. a が分離確認できた。それぞれのシグナル強度(微分スペクトルの山と谷のピーク高さ)と成分濃度の間には直線性が成立し, 更に, 微分回路に増幅機能が備わっているため, 後に Fig. 5 に示すように chl. 類の ng オーダーの微量定量が可能である。

### 3.3 励起微分スペクトル

微分蛍光法は  $d^2F/d\lambda^2$  の波長に対する曲線を直接測定し, 微分スペクトルを描かせることから, 鏡像関係にある励起・蛍光両スペクトルに対して, 同様の原理に

基づく微分スペクトルの測定が可能である。Fig. 3 に chl. a 及び pheo. a 共存下における2次励起微分スペクトルを示した。chl. a, pheo. a は共に 670 nm に蛍光極大波長を有する(正確には Table 1 に示したように, chl. a 666 nm, pheo. a 670 nm に蛍光極大波長を有し, 分解能の優れた分光蛍光光度計でのみこれらを分離確認できる)。従って2次蛍光微分スペクトル法による場合は, 各成分の影響が分析値を大きく支配する。しかし, 蛍光波長を 670 nm に固定した2次励起微分スペクトルによれば, 410 nm に pheo. a, 又, 430 nm に chl. a が容易に分離確認できる。更に, 蛍光微分スペクトル法と同様に, シグナル強度と成分濃度の間には直線性が成立するため, Fig. 5 に示すように各成分の特異的・選択的な定量が可能である。

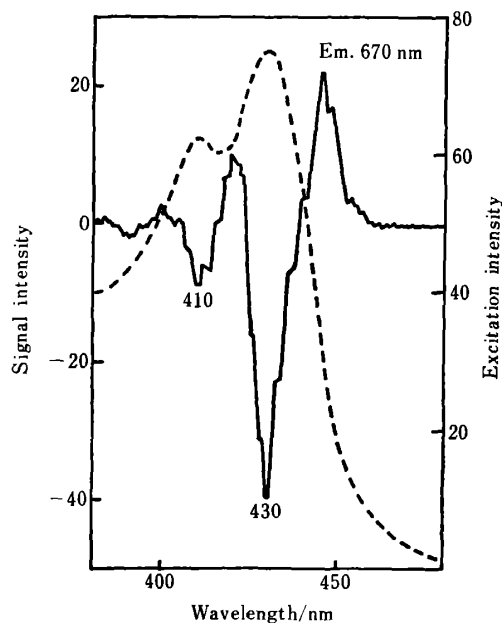


Fig. 3 Excitation and 2nd excitation derivative spectra of chlorophyll a and pheophytin a

-- : Original spectrum of a mixture of chlorophyll a and pheophytin a, [chl. a]=[pheo. a]= $0.42 \mu\text{g cm}^{-3}$ ;  
 — : 2nd excitation derivative spectrum

### 3.4 ペーパークロマトグラフィー

天然水中には chl. 及びその初期分解物である pheo., 更にはフェオホルバイド(pheobide.)などの多種多様な chl. 分解物が存在する。これら分光特性の酷似したポルフィリンの共存下においては, 2次励起・蛍光微分スペクトル法によっても, 各成分の正確な同定・分離定量は容易でない。これらの化合物の高次微分スペクトル法についても検討したが, 原スペクトルに含まれるノイズ

が目的成分の信号に比べて、はるかに高い周波数を有することから、高次微分法を適用するに従い、目的成分の信号にノイズが加算され、シグナルの利用効率を低下させる。

そこで、より精度の高い分析値を得るために、ペーパークロマトグラフィーによる試料抽出液の前処理法について検討した。Fig. 4 に chl. a, b 及び pheo. a, b のペーパークロマトグラムの一例を示した。石油ベンジン：アセトン=20：3(v/v) 溶媒系における上昇法によれば、再現性ある良好な分離が可能である。なお、本条件下において、pheobide. をはじめとする高次分解物の大部分は原点に残留する。更に、クロマトグラム上の目的成分は、アセトンにより定量的に逆抽出できることから<sup>4)</sup>、テILINGなどによる影響が比較的少ない pheo. b と chl. a の間でクロマトグラムを切断、分離し、pheo. 部 (A) と chl. 部 (B) の両アセトン抽出溶液について、励起・蛍光微分スペクトル法を適用した。

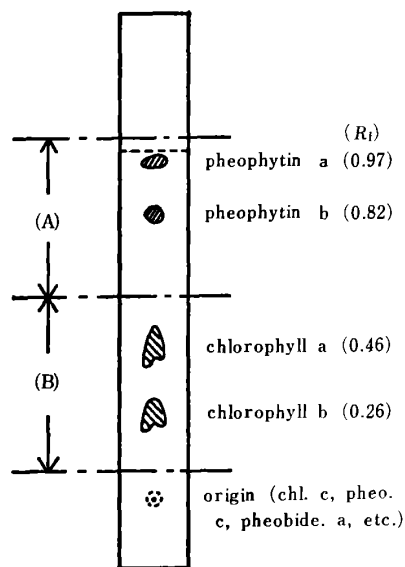


Fig. 4 Paper chromatogram of chlorophylls and their degradation products

Solvent system—Light petrolcum : Acetone=20 : 3 (v/v)

### 3.5 分析精度

ペーパークロマトグラフィーを併用した励起・蛍光微分スペクトル法の一例として、chl. a 及び pheo. a の2次微分スペクトルと検量線を Fig. 5 に示した。微分スペクトルの山-谷間のピーク高さをシグナル強度とすると、シグナル強度と成分濃度の間には良好な直線性が認められた。又、各成分ともに他の3成分がそれぞれ単独で20倍存在した場合においても、相対標準偏差4%

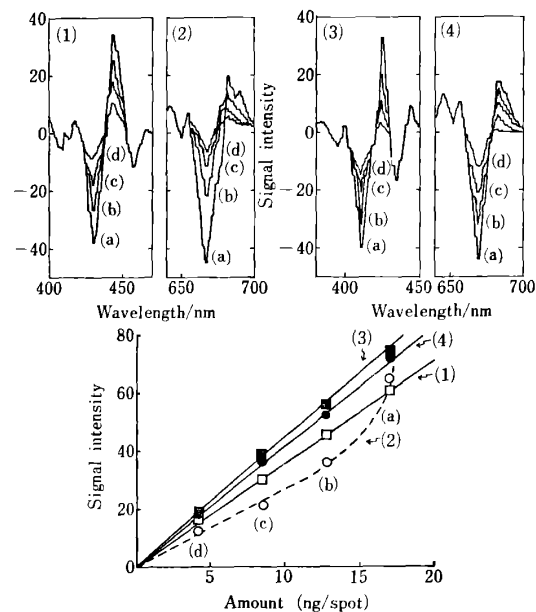


Fig. 5 Analytical curves for chlorophyll a and pheophytin a on derivative fluorometry

Chlorophyll a—(1) Excitation derivative spectrum method, Em. 666 nm, (2) Emission derivative spectrum method Ex. 430 nm; Pheophytin a—(3) Excitation derivative spectrum method, Em. 670 nm, (4) Emission derivative spectrum method, Ex. 410 nm; (a) 17.0 ng, (b) 12.7 ng, (c) 8.5 ng, (d) 4.2 ng

以下(9回繰り返し測定)で、定量限界0.1 ppmの chl. a, b 及び pheo. a, b の分離定量が可能となった。

ただし、天然試料中の chl. a の定量に際しては、原点から chl. a, b 付近に展開される赤色蛍光物質の蛍光極大波長(670 nm 付近)と chl. a のそれが近接するため、蛍光波長を666 nmに固定した励起微分スペクトル法が有利であるとの知見を得た。

### 3.6 実試料への応用

本法を環境標準試料(国立公害研究所, NIES No. 2 Pond Sediment)をはじめ、chl. 分解物の影響が大きい積物及び水試料中の chl. a, b 及び pheo. a, b の定量に適用した。

**3.6.1 環境標準試料中の chl. a, b 及び pheo. a, b の定量** Pond Sediment 1.0 g をひょう量し、冷アセトン 20 cm<sup>3</sup> で5分間振り混ぜて抽出する。4回の抽出操作により得た全抽出溶液を分液漏斗に移し、石油エーテル 10 cm<sup>3</sup> 更に飽和食塩水 50 cm<sup>3</sup> を加え、chl. 類を石油エーテル相へ抽出する。石油エーテル相を蒸留水で3回洗浄し、減圧下で濃縮乾固後、一定量とする。一定量にしたアセトン抽出液について、本法により chl. a, b 及

Table 2 Results of analysis using derivative fluorometry and spectrophotometry

| Sample                                            | Derivative fluorometry |        |         |         | Spectrophotometry |        |        |
|---------------------------------------------------|------------------------|--------|---------|---------|-------------------|--------|--------|
|                                                   | chl. a                 | chl. b | pheo. a | pheo. b | chl. a            | chl. b | chl. c |
| Pond Sediment NIES No. 2, ppm                     | N. D.                  | N. D.  | 4.3     | 2.1     | 26.6              | 7.2    | 2.3    |
| Pond sediment in Takarazuka, ppm                  | 8.4                    | 1.2    | 13.6    | 7.7     | 114.6             | 177.4  | 294.2  |
| Pond water in Higashiosaka/ $\mu\text{g dm}^{-3}$ | 15.3                   | 3.5    | 1.5     | 1.0     | 17.0              | 3.8    | N. D.  |

chlorophyll a: Excitation derivative spectrum method; chlorophyll b and pheophytins a, b: Emission derivative spectrum method

び pheo. a, b を定量した。結果を Table 2 に示した。本法と吸光光度法での分析値を比較、検討した結果、吸光光度法では、他成分の影響を受け著しく高値を示すが、本法によれば、chl. 分解物の影響を受けることなく chl. a, b 及び pheo. a, b の微量定量が可能であることを明らかにした。

### 3.6.2 天然水中の chl. a, b 及び pheo. a, b の定量

試料水をグラスファイバーフィルター (Toyo, GA 200, pore size:  $0.8\mu\text{m}$ ,  $\phi$ : 4.5 cm) で濾過する。濾過量はフィルター上の残留物の色で判断した ( $0.5\sim 3\text{ dm}^3$ )。残留物をフィルターとともに 90% アセトンで粉碎、抽出する。遠心分離 (4000 rpm, 10 min) により浮遊物を除去し、上澄み溶液を一定量とする。本法により定量した結果を Table 2 に示した。試料の採水点は、比較的水質良好であり、chl. 分解物の影響が少ないため、本法と吸光光度法の分析値は、分析誤差内でよく一致している。

以上のように、クロマトグラフィーを併用した励起・蛍光微分スペクトル法により、天然に多く存在する chl. 分解物の影響を受けることなく、chl. a, b 及び pheo. a, b の選択的・高感度分析が可能であることが明らかとなった。なお、chl. 高次分解物の少ない試料については、ペーパークロマトグラフィーによる前処理の必要はなく、通常の微分蛍光法により、十分選択性のある結果を得ることが可能である。

なお、本研究は文部省科学研究助成金 (58102012) 並びに近畿大学研究助成金によって行ったものであり、記して感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) L. P. Vernon: *Anal. Chem.*, **32**, 1144 (1960).
- 2) 柳 勝美, 福井 深, 岡部史郎: 日本海水学会誌, **36**, 339 (1983).
- 3) Y. Nishikawa, K. Hiraki, Y. Onoue, K. Nishikawa, Y. Yoshitake, T. Shigematsu: *Bunseki Kagaku*, **32**, E 115 (1983).
- 4) 芳竹良彰, 西川泰治, 平木敬三, 尾上義明, 重松恒信: 日本海水学会誌, **37**, 335 (1984).
- 5) K. Iriyama, N. Ogura, A. Takamiya: *J. Biochem.*, **76**, 901 (1974).

- 6) S. W. Jeffrey: *Biochem. Biophys.*, **162**, 277 (1968).
- 7) 古川正道, 柴田正三: ふんせき, **1980**, 608.
- 8) 柴田正三: 島津機器分析応用講座 “二波長・微分分光法による吸光分析講習会テキスト”。
- 9) A. Savitzky, M. J. E. Golay: *Anal. Chem.*, **36**, 1627 (1964).

☆

### Ultramicro determination of chlorophylls a, b and pheophytins a, b by derivative fluorometry; Availability of excitation derivative spectrum.

Yoshiaki YOSHITAKE, Shiro GOHDA, Hideo YAMAZAKI, Kiyotoshi MORISHIGE, Yasuharu NISHIKAWA\*, and Tsunenobu SHIGEMATSU\*\* (\*Faculty of Science and Technology, Kinki University; \*\*College of General Education, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka-shi, Osaka, 577)

Analysis of chlorophylls and pheophytins is indispensable for the estimation of physiological biomass and/or environmental pollution. However, there are no remarkable difference in spectral properties between chlorophylls and degradation products. Excitation and emission maximal wavelength of chlorophylls and pheophytins were as follows; chlorophyll a (430/666 nm), chlorophyll b (457/650 nm), pheophytin a (410/670 nm), pheophytin b (435/655 nm). It indicates that coexistence of a large amount of degradation products causes a large error on the determination of chlorophylls and pheophytins. Therefore, derivative fluorometric method was utilized for the analysis of chlorophylls and pheophytins, because this method is essentially profitable to analyze the spectra which are largely overlap. In particular, it was realized that excitation derivative spectrum method (Em.=666 nm; excitation wavelength was driven from 380 to 500 nm) was effective for the determination of chlorophylls in environmental samples that coexist many degradation products. Further, the selectivity of this technique can be increased by excitation and emission derivative spectrum methods combined with paper chromatography. The relative standard deviation of the measurements was less than 4.0% (9 determinations) for chlorophylls a, b and pheophytins a, b, even when amounts of the other three pigments were 20-fold than that of the desired pigment. By using this method, chlorophylls a, b and pheophytins a, b in environmental samples with ppb levels could be determined.

(Received July 5, 1984)

**Keyword phrases**

derivative fluorometry of chlorophylls a, b and pheophytins a, b; excitation derivative spectrum method;

emission derivative spectrum method; paper chromatography of chlorophylls.

## 共沈-還元気化法を用いた海水中の水銀の蛍光定量

長 沼 健\*

(1984 年 7 月 27 日受理)

水銀は塩化スズ(II) 溶液の存在下で空気によるバブリングによって気化される。吸収液として過マンガン酸カリウムの硫酸溶液を用いると水銀は完全に捕集される。この反応は特異的であり分離法として優れている。水銀の定量はローダミン B-臭化水素酸・硫酸混酸-トルエンの抽出系を用い、蛍光法で測定した。本法を *p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン共沈法と併用して海水に適用し、沿岸海水中の水銀の含有量として 0.15~0.19 ppb を得た。本法における妨害元素は金(III)、ヨウ化物イオン、臭化物イオン、硫化物イオンなど直接水銀と化合するものが負誤差を与えるが、海水試料では干渉を示さなかった。

### 1 緒 言

環境汚染物質の一つである水銀の定量については多数の報告がなされているが、最近では主に原子吸光法が使用されている。加熱気化法並びに還元気化法のいずれの原子吸光法でも大きなシグナルで安定な値を得るために気化の部分で、中間にトラップを付けるなどの工夫をしなければならない<sup>1)</sup>。しかし、この還元気化法を分離法として用い、気化された水銀を溶液で捕集すれば、絶対量を損失することなく、再現性良く測定できる。

一方、水銀(II) は酸性領域でハロゲン水銀錯陰イオンを生成しやすく、その錯イオンは陽イオン染料とイオン対を形成し有機溶媒に抽出され、吸光度あるいは蛍光定量に利用される<sup>2)~4)</sup>。この方法は良好な感度を有するものの実試料への適用例は全くない。その原因としては非常に低い酸濃度からの抽出のために再現性の低下と試料溶解などの操作上の問題が挙げられる。

本研究においては、陽イオン染料であるローダミン B による水銀の蛍光定量法を検討するとともに共沈濃縮と還元気化による水銀の分離操作を併用し、実試料への適

用を試みた。

### 2 装置及び試薬

#### 2.1 装 置

蛍光強度測定には日立製 204 形分光蛍光光度計 (150 W キセノンランプ) を用いた。pH 測定には日立-堀場製 M-7 形 pH メーターを用い、水銀の還元気化装置は自作した。

#### 2.2 試 薬

水銀(II) 標準溶液：塩化水銀(II) (片山化学製特級) 0.1353 g をひょう量して温水で溶解後全量を 100 ml とし、1 mg/ml 水銀(II) 溶液とする。

ローダミン B 溶液：ローダミン B ( $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ ; CI 45170, 東京化成工業製特級) 0.75 g を温水で溶解し水で 250 ml とし、0.3 % 水溶液として使用した。

*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン溶液：*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン (片山化学製特級, 以下 PDBR と略記) 0.05 g をアセトンで溶解、全量 100 ml とし 0.05 % 溶液を調製した。

塩化スズ(II) 溶液：塩化スズ(II) (片山化学製特級) 22.56 g に 9 M 硫酸 10 ml を加え加熱溶解後、水で 100 ml に希釈し 1 M 溶液を調製した。

有機溶媒、酸、その他の試薬は市販特級品を、又水はイオン交換水を蒸留したものを用いた。

\* 愛知教育大学化学教室：448 愛知県刈谷市井ヶ谷町広沢 1