

非イオン性界面活性剤水溶液中におけるクロロフィル *a*, *b* とフェオフィチン *a*, *b* の吸収及び蛍光特性

河合 範夫, 森重 清利^{®*}

(1994 年 5 月 16 日受理)

クロロフィル *a*, *b* 及びフェオフィチン *a*, *b* の非イオン性界面活性剤水溶液中での吸収並びに蛍光特性を検討し, クロロフィル分子と非イオン性界面活性剤分子間の相互作用について考察した. 界面活性剤は Triton X-100 など 6 種のポリオキシエチレン モノ-*p*-アルキルフェニルエーテルを用いた. その結果, クロロフィル類のモル吸光係数及び蛍光の量子収率はいずれの溶液中においても, 有機溶媒中のそれに比べ小さくなった. 又, クロロフィルの中心金属であるマグネシウムと親水基であるエチレンオキシド (EO) 鎖の酸素原子との相互作用が示唆された.

1 緒 言

植物の光合成初期過程において反応中心色素として重要な役割を果たしているクロロフィル (以下 Chl と略記) 類 (Fig. 1) は, 海水などの環境試料中において重要な指標物質となる. これらの物質の分離分析には, HPLC¹⁾²⁾ がはん用されているが, これらは酷似した性質を示すため, 短時間に多数のクロロフィル類緑化合物を分離定量するのは非常に困難である. 近年, 分離分析における新しい媒体として界面活性剤が注目されており, Chl などのポルフィリン化合物の新しい分離分析方法として非イオン性界面活性剤を用いた方法³⁾⁴⁾ が報告されている. しかし, 界面活性剤溶液中での Chl 類の分光特性並びに界面活性剤とクロロフィルとの相互作用などについては明らかにされていない. そこで本研究では, 非イオン性界面活性剤を用いた Chl 類の新規な分離法を確立するため, 界面活性剤溶液中における Chl *a*, *b* 及びフェオフィチン *a*, *b* (Phe *a*, *b*) の吸収及び蛍光特性について検討した. 更に, 藤田の有機性値, 無機性値⁵⁾並びに分子屈折値などのパラメーターから Chl 類と界面活性剤分子との相互作用について検討したので報告する.

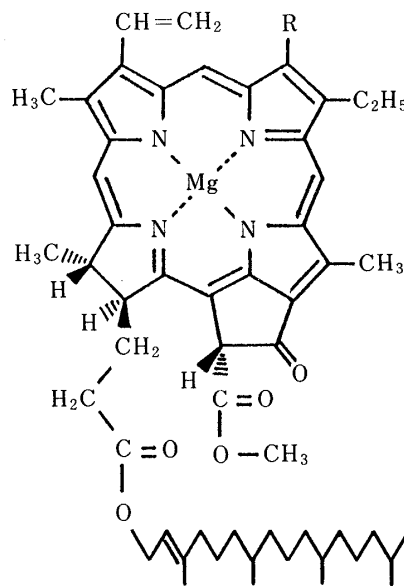


Fig. 1 Structures of chlorophylls

Chl *a*: R=CH₃-; Chl *b*: R=CHO-; Phe *a*: Chl *a*-Mg+2H; Phe *b*: Chl *b*-Mg+2H

2 実 験

2・1 装 置

吸収スペクトルの測定には日立製自記分光光度計 200-10 型を使用した.

蛍光スペクトルの測定には日立製分光蛍光光度計 850

* 近畿大学理工学部化学科: 577 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

型 (R-928F 光電子増倍管, 150 W キセノンランプ) に補正用タングステン標準ランプをセットして使用した。

2・2 試 薬

クロロフィル類の分離精製に用いたカラムクロマトグラフィ用担体は Advantec 製セルロース粉末 No. A (100~200 メッシュ) 及び No. B (200~300 メッシュ) を等量混合し, 温風乾燥器中で 2 時間乾燥後, デシケーター中で十分に放冷させて湿式法によりカラムに充てんして使用した。

窒素及び酸素は市販高純度ガスを用いた。

Triton X-100 (EO 基平均付加モル数 $n=9.5$) はキシダ化学製のものをそのまま使用した。ポリオキシエチレンモノ-*p*-オクチルフェニルエーテル ($n=10$) [POOPE-10] 及びオレイルエーテル ($n=10$) [POOE-10] 並びに 3 種のモノ-*p*-ノニルフェニルエーテル ($n=10, 15, 20$) [PONPE-10, -15, -20] は東京化成製のものを精製することなく使用した。

その他の試薬は市販特級品をそのまま用いた。

2・3 方 法

2・3・1 Chl *a*, *b* の単離精製 Chl *a*, *b* はコンフリー (*Symphytum officinale* L., ムラサキ科) の葉枝よりアセトン抽出後, ジオキサン法⁶⁾により濃緑色素類の沈殿を得た。得られた沈殿物からセルロースカラムクロマトグラフィ {石油エーテル: 1-プロパノール=99.9: 0.1~99.0: 1.0(v/v)} により Chl *a* 及び *b* を分取した。又 Phe *a*, *b* は, それぞれ Chl *a* あるいは *b* のジエチルエーテル溶液を 1 mol dm^{-3} 塩酸と共に約 2 分間振り混ぜて得た。

2・3・2 試料溶液の調製 濃度既知の Chl のアセトン溶液を一定量採り, 濃縮乾固後 0.1 mol dm^{-3} 界面活性剤水溶液に溶解し, 水を加えて臨界ミセル濃度 (CMC) よりも十分に大きい 0.01 mol dm^{-3} 界面活性剤溶液 (CMC の約 10~100 倍) とした。

2・3・3 蛍光測定 すべての蛍光測定は Chl の $0.1 \sim 0.8 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 溶液を用いて行った。窒素通気による除酸素あるいは酸素通気 (ガス流量: $1.5 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$, 20°C) 後の蛍光強度変化を検討したが, 変化は認められなかった。従って, 溶存酸素による蛍光の消光は受けないと考え, 以後溶液調製後そのまま測定に供した。

2・3・4 粘度測定 オストワルド粘度計を用いて測定し, 20°C における水に対する相対粘度として表した。

3 理論及び計算

3・1 界面活性剤の HLB 値

一般に非イオン性界面活性剤の可溶化, 分散あるいは乳化能を示すパラメーターとして HLB (hydrophile-lypophile balance) 値がはん用されている。

小田⁷⁾は藤田の考案した分子の極性を表す経験的パラメーターである無機性値 (I) と有機性値 (O) の比 (I/O) を 10 倍したものが非イオン性界面活性剤の HLB 値とよく一致することを見いだした。

藤田の無機性値及び有機性値は, それぞれ分子の双極子モーメント並びに分子間の分散力すなわち分極率に相当するパラメーターである。又, これらは分子の沸点並びに石油エーテル-水間の分配率から得られた経験的数値から求められる。すなわち無機性値 (I) は水酸基を 100 として各官能基について経験的に求められた数値により, 有機性値 (O) は炭素原子 1 個につき 20 とし, 各々加減計算により求められる (Table 1 参照)。

3・2 HLB 値と可溶化能

一般に界面活性剤が水中に分散しているときは疎水基の疎水性により水分子が氷類似構造 (iceberg) を形成し, 濃度が CMC を超えると疎水基を内側に向けてミセル化する。これにより水分子の iceberg 構造が破壊されて系のエントロピーは増加し, ミセル形成の推進力になる。しかし溶液の温度を上昇させると親水性と疎水性が釣り合い, 界面活性剤相が分離する。このときの温度を転相温度 T_{HLB} (HLB 温度)⁸⁾といい, HLB 値 N_{HLB}

Table 1 Organicities and inorganicities of functional groups and atomic groups

	Inorganicity
Light metal (salt)	over 500
Heavy metal (salt)	over 400
-COOH	150
-OH	100
Amines (-NH ₂ , -NHR, -NR ₂)	70
CO	65
-O-	75
Benzene nucleus	15
(aromatic mononucleus)	
Ring	10
(non-aromatic mononucleus)	
Triple bond	3
Double bond	2

Organicity: C=20, iso=-10, tert=-20

との間には

$$T_{\text{HLB}} = k(N_{\text{HLB}} - N_{\text{oil}}) \quad (1)$$

の関係がある⁹⁾。ここで、 k は 17°C/HLB unit の定数である。又、 N_{oil} は共存する油性物質に依存する定数であり N_{HLB} と同様の単位を持つ。従って N_{oil} も N_{HLB} と同様に親水性と疎水性のバランスを示すと考えられる。

又、界面活性剤がミセルを形成するときの自由エネルギー変化 ΔG は界面活性剤の疎水基 (ΔG_i) と親水基に起因する成分 (ΔG_h) に分けられる。温度 T_{HLB} のとき ΔG_i と ΔG_h は釣り合っているので

$$\begin{aligned} \Delta G_i - \Delta G_h &= (\Delta H_i - T_{\text{HLB}}\Delta S_i) - (\Delta H_h - T_{\text{HLB}}\Delta S_h) \\ &= (\Delta H_i - \Delta H_h) - T_{\text{HLB}}(\Delta S_i - \Delta S_h) \\ &= 0 \end{aligned}$$

従って式(1)より

$$\begin{aligned} (\Delta H_i - \Delta H_h) / (\Delta S_i - \Delta S_h) &= T_{\text{HLB}} \\ &= k' \{ (I/O)_s - (I/O)_{\text{oil}} \} \\ &\quad (k' \text{ は定数}) \quad (2) \end{aligned}$$

となる。ここで $(I/O)_s$ 及び $(I/O)_{\text{oil}}$ はそれぞれ界面活性剤及び油性物質の無機性値と有機性値の比を示す。従って、界面活性剤の I/O との差の小さい I/O を持つ物質ほどエントロピー項に支配され、安定にミセル化されることが予想される。

3・3 界面活性剤の分子屈折

分子間の相互作用は古典力学的には Lorentz-Lorenz 式 $MR = \{(n^2 - 1)/(n^2 + 2)\} \times (M/d) = (4\pi/3) N\alpha$ で示される分子屈折値 MR で見積もることが可能である。従って、結合屈折¹⁰⁾¹¹⁾の値から MR 値を近似計算し、界面活性剤の臨界ミセル濃度 (25°C)¹²⁾及び I 値と O 値の比 I/O との関係、並びに Chl の界面活性剤溶液中における分光特性との関係を考察した。

4 結果及び考察

4・1 界面活性剤水溶液中における Chl 類の吸収特性

各種非イオン性界面活性剤水溶液中における Chl 類の吸収スペクトルは、いずれもクロリン環の π 電子系に起因するソーレー (Soret) バンド及び 4 本の Q バンドを示した。又、ソーレーバンドにおける各種界面活性剤水溶液中における検量線を作成した。その結果、Chl a, b では Triton X-100, POOPE-10, 及び PONPE-10 水溶液中で $6 \sim 9 \mu\text{mol dm}^{-3}$ の濃度まで吸光度に対し直線性が得られたが、その他の界面活性剤水溶液においては直線性からずれを生じた。すなわち、Chl a, b では POOE-10, PONPE-15, -20 で $4 \sim 6 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 以上、Phe a, b で $1 \sim 3 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 以上は溶解しなかった。

又、Table 2 に各界面活性剤水溶液中におけるソーレーバンド及び Q バンド第一バンドの吸収極大波長並びにその波長におけるモル吸光係数 ϵ_{max} を示す。但

Table 2 Absorption properties of chlorophyll a and b and pheophytin a and b in micellar solutions

Surfactants		Chl a		Chl b		Phe a		Phe b	
		Soret ^{a)}	Q(I) ^{b)}	Soret	Q(I)	Soret	Q(I)	Soret	Q(I)
Triton X-100	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}^{\text{c)}$	435	668	463	649	413	670	438	656
	$\epsilon_{\text{max}}/\times 10^4^{\text{d)}$	6.43	5.98	10.8	3.88	9.74	4.83	8.99	2.23
POOPE-10	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	435	669	463	649	413	670	438	656
	$\epsilon_{\text{max}}/\times 10^4$	7.62	6.98	10.9	4.01	8.38	4.32	11.8	2.66
POOE-10	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	434	669	462	649	413	697	437	678
	$\epsilon_{\text{max}}/\times 10^4$	4.74	4.40	9.41	3.62	4.50	3.55	2.82	2.11
PONPE-10	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	435	669	463	649	413	670	438	656
	$\epsilon_{\text{max}}/\times 10^4$	6.06	5.58	9.29	3.33	8.47	3.99	11.2	2.59
PONPE-15	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	435	669	463	650	415	700	417	678
	$\epsilon_{\text{max}}/\times 10^4$	1.85	1.59	5.57	2.49	—	—	—	—
PONPE-20	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	436	670	465	651	414	701	417	680
	$\epsilon_{\text{max}}/\times 10^4$	1.65	1.46	3.40	1.94	—	—	—	—
Acetone solution	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	432	662	457	647	413	665	436	654
	$\epsilon_{\text{max}}/\times 10^4$	9.58	7.71	13.8	5.06	11.1	4.26	18.1	3.63

0.01M surfactant solution, a) Soret-band, b) first band of Q -band, c) maximum wavelength, d) molecular extinction coefficient at maximum wavelength

し、すべて Chl 類の溶解度範囲内で測定した。Triton X-100 又は POOPE-10 を用いた場合 $\epsilon_{\max}$ は最大となり、親水基である EO 基の平均付加モル数の増加あるいはアルキル基の炭素数の増加により $\epsilon_{\max}$ は減少した。しかし、これらはいずれもアセトン溶液の場合に比し小さくなった。

4.2 有機概念図

藤田の方法により求めた無機性値(I)並びに有機性値(O)をそれぞれ縦軸、横軸にとったものを有機概念図⁵⁾といい、これにより分子の極性並びに分子間の相互作用を説明することができる。Fig. 2 に各非イオン性界面活性剤と Phe *a*, *b* の有機概念図を示す。各物質の点と原点とを結ぶ直線を同比率線と称する。これらの同一直線上にある物質ほど似通った極性を持つ物質であり、分子間の相互作用も強くなる。

軽金属の I 値は 500 以上とされ、Chl の中心金属であるマグネシウムの I 値は明らかでない。しかし、Phe の O 値の同系列線と Chl を最もよく溶解した Triton X-100 及び POOE-10 の同比率線との交点を Chl の点とすると、Chl と Phe の I 値の差は約 600 となりマグネシウムの I 値とほぼ一致した。すなわち、Chl の界面活性剤水溶液への可溶化には中心金属のマグネシウムが大きく関与していることが示唆された。

4.3 非イオン性界面活性剤の極性と臨界ミセル濃度

一般に同系列の界面活性剤では炭素鎖長が減少すれば CMC は増加し、ミセルの会合数は減少する。又、EO 基の平均付加モル数が減少すれば CMC は減少し、会合数は増加する傾向にある¹³⁾。Fig. 3 に示すように、親水基である EO 基の平均付加モル数 *n* による極性の変化よりも、アルキル基の疎水性による CMC の変化率のほうが大きい。すなわち、CMC あるいは会合数には EO 基の平均付加モル数よりも疎水基の鎖長が大きく影響すると解される。

しかし、Chl 類を最も溶解し、その溶液中で Chl 類の $\epsilon_{\max}$ が最大値を示した POOPE-10、あるいは Triton X-100 は、他の界面活性剤よりも高い CMC を示し、会合数は他の界面活性剤よりも小さいと考えられる。従って、会合数の増加による Chl 類の可溶化能の増大は認められなかった。

4.4 界面活性剤の MR 値と Chl 類の $\epsilon_{\max}$ の関係

Fig. 4 に示すように Chl 類のソーレーバンド及び Q バンド第一バンドの $\epsilon_{\max}$ は Triton X-100、又は

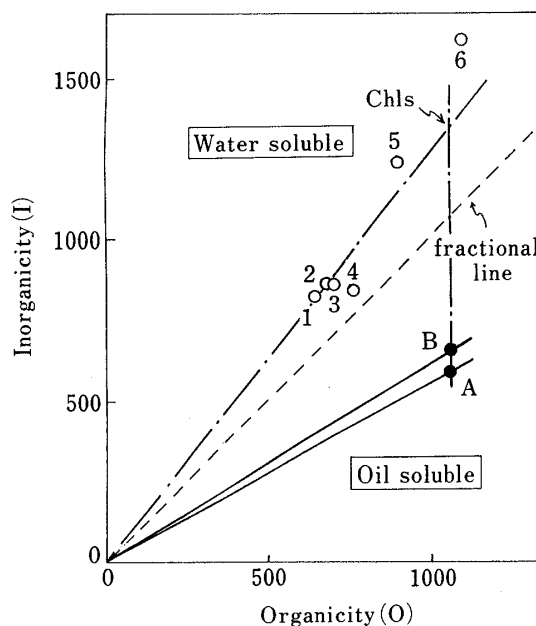


Fig. 2 Organic conceptual diagram of Phe *a* and *b* and surfactants

1: Triton X-100; 2: POOPE-10; 3: PONPE-10; 4: POOE-10; 5: PONPE-15; 6: PONPE-20. A: Phe *a*; B: Phe *b*

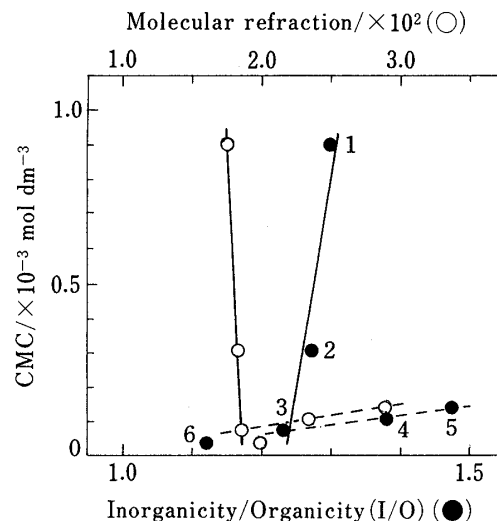


Fig. 3 Relationship between CMC and I/O ratio and/or molecular refraction of surfactants

1: Triton X-100; 2: POOPE-10; 3: PONPE-10; 4: PONPE-15; 5: PONPE-20; 6: POOE-10

POOPE-10 水溶液中で最大を示し、MR 値の増加により $\epsilon_{\max}$ は減少した。同系列化合物では分子の双極子モーメントが減少すると MR 値、すなわち分散力は増加する。従って、界面活性剤分子との π -polar あるいは

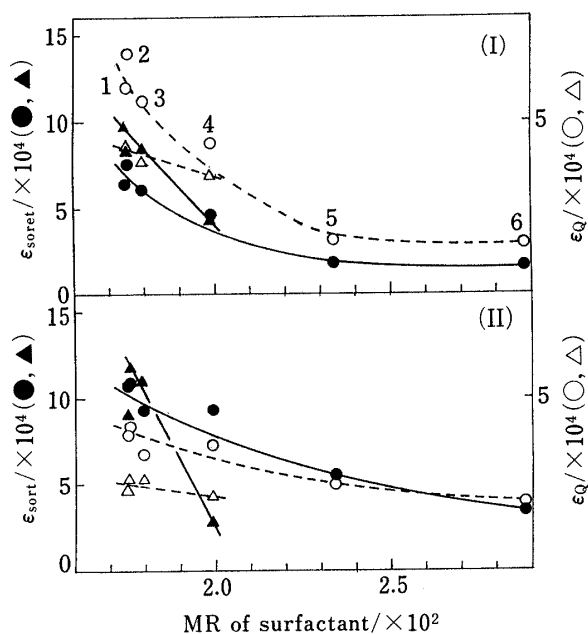


Fig. 4 Relationship between MR of surfactants and ϵ of Chl *a* and *b* and Phe *a* and *b* in micellar solutions

(I) ●, ○: Chl *a*, ▲, △: Phe *a*; (II) ●, ○: Chl *b*, ▲, △: Phe *b*; 1: Triton X-100; 2: POOPE-10; 3: PONPE-10; 4: POOE-10; 5: PONPE-15; 6: PONPE-20

は polar-polar の相互作用によるChl分子の安定化が示唆された。すなわち、Chl 類の非イオン性界面活性剤溶液に対する可溶化は、Chl のマグネシウムと EO 鎖の酸素原子との相互作用によると解された。

4・5 界面活性剤水溶液中における Chl 類の蛍光特性

Triton X-100, POOPE-10, PONPE-10 及び POOE-10 水溶液中におけるChl 類の蛍光強度に対する界面活性剤濃度の影響を検討した。界面活性剤濃度は $0.05 \sim 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, Chl は $0.05 \sim 0.1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ とし、完全に溶解していることを確認した。いずれの溶液も臨界ミセル濃度¹²⁾付近で一定となり、ミセル化により Chl 類が界面活性剤溶液中で安定に存在することが示唆された。更に、最適励起・蛍光波長並びに蛍光の相対量子収率 ϕ_f {フルオレセインナトリウム水溶液 (0.1 mol dm^{-3} NaOH) 対照, 励起波長 436 nm , $\phi_f = 0.90$ ¹⁴⁾} を Table 3 に示す。これらの相対量子収率 ϕ_f は、Chl 類の分光特性を求める場合には用されるアセトン溶液に比べ小さくなり、 ϵ_{max} の大小とは一致しなかった。又、蛍光性物質の溶液において溶液の粘性が増加すると、分子運動が抑制されるため蛍光の発光効率は増加する。従って、各界面活性剤水溶液の水に対する相対粘度を測定し、Chl 類の ϕ_f と比較した (Table 3 参照)。相対粘度と ϕ_f の大小はおおよそ類似した傾向にあった。又、Chl 分子と親水基である EO 基の相互作用により可溶化するため、親水基近辺の水分子の極性により π 電子系が局在化されて励起状態が不安定化されると考えられる。従って、Chl は溶液の粘性により分子運動は抑制されるが、励起状態の不安定化により ϕ_f は ϵ_{max} の大小とは一致せず、アセトン溶液に比べ小くなる知見を得た。

4・6 Chl 類の可溶化モデル

Chl のマグネシウムはクロリン環平面から突出し、水

Table 3 Fluorescence properties of chlorophyll *a* and *b* and pheophytin *a* and *b* in micellar solutions

	$\eta/\text{cP}^{\text{a)}$		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Phe <i>a</i>	Phl <i>b</i>
Triton X-100	1.0314	Ex./Em.(nm/nm)	433.6/677.0	463.0/657.6	414.2/676.2	440.8/661.4
		$\phi_f^{\text{b)}$	0.118	0.062	0.091	0.099
POOPE-10	1.0384	Ex./Em.(nm/nm)	416.2/676.9	463.7/657.1	415.6/675.9	441.2/662.0
		ϕ_f	0.089	0.059	0.076	0.073
PONPE-10	1.0423	Ex./Em.(nm/nm)	436.2/676.3	463.0/658.0	413.9/676.0	441.2/661.9
		ϕ_f	0.130	0.061	0.083	0.152
POOE-10	1.0760	Ex./Em.(nm/nm)	435.2/675.8	463.5/657.5	414.2/677.2	439.9/662.6
		ϕ_f	0.176	0.063	0.041	0.082
Acetone	0.2981	Ex./Em.(nm/nm)	432.1/669.1	457.1/652.5	411.2/672.4	436.0/659.8
		ϕ_f	0.386 ^{c)}	0.121 ^{c)}	0.156 ^{c)}	0.070 ^{c)}

a) relative viscosity of 0.01M aqueous solution at 22°C , b) fluorescence quantum yield (vs. sodium fluorescein, Ex.= 436 nm , $\phi_f=0.90$) at 22°C , c) after removal of oxygen gas

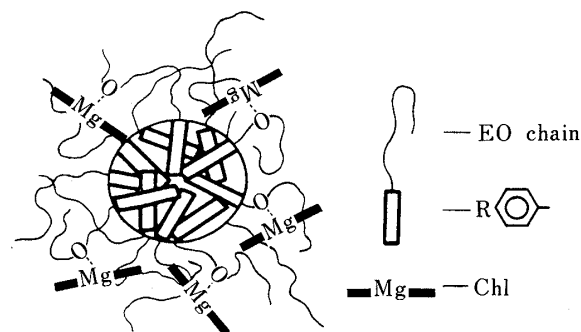


Fig. 5 Structural model of chlorophyll-nonionic surfactant system

分子などの極性分子が軸配位しやすいことが知られている¹⁵⁾。Chl を非イオン性界面活性剤水溶液に可溶化させた場合も EO 鎖の酸素原子とマグネシウムとの相互作用により、Fig. 5 に示すようなミセル構造を有すると解される。すなわち、可溶化された Chl 類はミセル中心の疎水域ではなくミセル表面の EO 鎖中に取り込まれた状態にあり、水分子から完全に隔離された状態ではないとの知見を得た。又、会合数の増加による可溶化能の増大は見られなかったことから、EO 鎖に水和した水分子の極性により可溶化能は減少する傾向にあると解された。以上の結果より、Chl 類の分離濃縮や HPLC などの分離分析法への応用が期待されるが、その詳細は改めて報告する。

(1993 年 10 月, 日本分析化学会)
(第 42 年会において一部発表)

文 献

- 1) J. K. Abaychi, J. P. Riley : *Anal. Chim. Acta*, **107**, 1 (1979).
- 2) P. G. Falkowski, J. Sucher : *J. Chromatogr.*, **213**, 349 (1981).
- 3) J. J. Santana, M. Gunshefski, J. D. Winefordner : *Talanta*, **39**, 195 (1992).
- 4) W. J. Horvath, C. W. Hute : *Talanta*, **39**, 487 (1992).
- 5) 藤田 穆 : “化学実験学・基本操作編”, p. 255 (1940), (河出書房).
- 6) K. Iriyama, N. Ogura, A. Takamiya : *J. Biochem.*, **76**, 901 (1974).
- 7) 小田良平 : 帝人タイムス, **22**, No. 9, 10 (1952).
- 8) 篠田耕三 : 日化, **89**, 435 (1968).
- 9) H. Kunieda, K. Shinoda : *J. Colloid Interface Sci.*, **107**, 107 (1985).
- 10) A. I. Vogel, W. C. Cresswell, G. H. Jeffery, J. Leicester : *J. Chem. Soc.*, **1952**, 514.
- 11) E. L. Warrick : *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2455 (1946).
- 12) 吉田時行, 進藤信一, 大垣忠義, 山中樹好共編 : “新版界面活性剤ハンドブック”, p. 126 (1991), (工学図書).
- 13) 田中 満 : 油化学, **34**, 206 (1985).
- 14) J. N. Demas, G. A. Crosby : *J. Phys. Chem.*, **75**, 991 (1971).
- 15) K. Ballschmiter, J. J. Katz : *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2661 (1969).



Absorption and Fluorescence Properties of Chlorophyll *a* and *b* and Pheophytin *a* and *b* in Aqueous Solutions of Nonionic Surfactants. Norio KAWAI and Kiyotoshi MORISHIGE, (Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka-shi, Osaka 577)

Absorption and fluorescence properties of chlorophyll *a* and *b* and pheophytin *a* and *b* in aqueous solutions of six species of nonionic surfactant were examined, respectively. The interaction between chlorophyll and surfactant was considered using two parameters; molecular refraction and inorganic/organicity ratio. Chlorophyll was most soluble in Triton X-100 [average addition molar number of ethylene oxide (EO) group: $n=9.5$] solution or polyoxyethylene mono-*p*-octylphenylether [$n=10$] (POOPE-10) solution. Chlorophyll *a* and *b* had larger solubilities in the surfactant solutions than did pheophytin *a* and *b*. However, the molar extinction coefficients and fluorescence quantum yields of the chlorophylls in the surfactant solutions were smaller than those in organic solvents, such as acetone. Consequently, the interaction between the magnesium of chlorophyll

and the oxygen atom on the EO chain and labilization of the excited states of chlorophyll by water molecules became apparent.

(Received May 16, 1994)

Keyword phrases

chlorophyll; nonionic surfactant; inorganicity/organicity ratio; ethylene oxide chain.
