

螢光法によるクロロフィル a 測定に必要な 定数算出のための色素の単離法

伊藤 栄樹・飯塚 昭二

On the Method of Isolation of Chlorophyll-a and Phaeophytin-a for Determination of two Constant Numerals in Fluorometric Chlorophyll-a Measurement

Hideki ITOH and Shoji IZUKA

The fluorometric method of measuring chlorophyll-a involves some difficulties at practical measurement by field scientists unfamiliar with chemical analysis, although this method has some advantages. One of the problems is the difficulty in isolating pure chlorophyll-a and/or phaeophytin-a. This paper describes a simplified method of isolation of chlorophyll-a and phaeophytin-a for determination of two constants (f_{ph} and acid factor) without any special equipment or aid of skilled technique. Three features of this simplified method are mentioned in this paper. The first is to use fresh "wakame" (*Undaria pinnatifida*, brown alga) containing chlorophyll-a and no chlorophyll-b which is otherwise difficult to separate from chlorophyll-a; the second is to determine the amount of phaeophytin-a by light absorption method in order to simplify chromatography treatment; and the third is to isolate chlorophyll-a by paper chromatography.

螢光法によるクロロフィル a の測定 (Yentsch and Menzel, 1963; Holm-Hansen *et al.*, 1965; 西条・西沢, 1968; 西条, 1975) は“生きた”クロロフィルと“死んだ”クロロフィル (フェオフィチンなど) を分離定量できることや、吸光法 (Richards with Thompson, 1952; SCOR/UNESCO, 1966; Lorenzen, 1967) に比較して必要試水量が 1/10 以下で済むことなどから、近年ひんぱんに利用されている。これらの利点にもかかわらず、測定にあたって直面する問題の 1 つとして、測器に特有の定数を算出するための純粋なクロロフィル a およびフェオフィチン a を単離することの困難さがあげられる。フロレッセンナトリウム塩溶液を標準試薬として利用するにせよ (この際測器は日立 203 型分光蛍光光度計などを使用する)、またはダミーキューベットを使用するにせよ (この際測器は Turner 蛍光光度計を使用する)、標準溶液と測器に、または測器に固有の定数を算出しなければならず、これは分析に不慣れた研究者にとっては困惑する問題である。本報告はフェオフィチン a の固有蛍光値 (f_{ph})

ならびに acid factor (クロロフィル a とフェオフィチン a の固有蛍光比) を比較的簡単に求める方法について述べたものである。

本研究に当っては西海区水産研究所安楽正照博士ならびに同所小笹悦二技官には機器の使用について便宜を取りはからって頂いた。また本学部入江春彦教授には研究の御指導を頂いた。厚く感謝の意を表する。

1. 方法の概要と特徴

新鮮なワカメ *Undaria pinnatifida* から色素を抽出し、カラムクロマトグラフィーでフェオフィチン a を単離し、吸光度を測定し定量を行なう。その後フェオフィチン a の固有蛍光値を算出する。クロロフィル a はペーパークロマトグラフィーで単離し、acid factor を算出する。

本法の特徴は次のとおりである。

- 1) クロロフィル a と分離しにくいクロロフィル b を含まないワカメを使用したこと。したがって酸処理後にフェオフィチン b が含まれないことか

ら、カラムクロマトグラフィーが比較的容易である。

- 2) フェオフィチン a を吸光度で測定することによって色素抽出液の処理が重量測定 (Koyama *et al.*, 1968) に比較して簡単である。口径が 1 cm 程度のカラムクロマトグラフィーはより大口徑のそれに比較して容易である。また抽出液の濃縮操作も特別な機器を使用することなく簡単にできる。
- 3) クロロフィル a をペーパークロマトグラフィーで単離することにより、処理を冷暗所で行うことができる。

本方法は Koyama *et al.* (1968) の方法を改変し簡略化したものである。なお、クロマトグラフィーの手法については佐竹 (1961) を参考にした。

2. フェオフィチン a の単離と固有蛍光値の測定

2-1. 使用器具

- a) 分光光度計 筆者らは Specta-10 型および島津 Double40 型を使用した。
- b) 蛍光光度計 筆者らは日立 203 型および Turner 111 型を使用した。
- c) クロマトグラフィー用カラム 内径約 1 cm, 長さ約 40 cm, 下部にストップコックの付いたものが良い。ゴム, 合成樹脂などは使用していないこと。
- d) 分液漏斗 300 cc 容のものが良い。
- e) 減圧用具 アスピレータで充分である。
ガラス器具類は洗浄後, 充分乾燥したものを使用すること。水分が残っているとクロマトグラフィーがうまくいかないことがある。

2-2. 試薬

- a) アセトン (試薬特級)
- b) 石油エーテル (試薬特級)
- c) 混合溶媒 石油ベンゼン (試薬特級) : ベンゼン (試薬特級, チオフェンを含まず) = 14 : 1 v/v 使用直前に混合する。
- d) 1N 塩酸 (試薬特級, 濃塩酸は 12N)
- e) 無水硫酸ナトリウム (試薬特級)
- f) フロッシェンナトリウム塩 1 mg/l 溶液 あらかじめウラニン (試薬特級) を使って, その 100 mg/l 溶

液を作製し, 冷暗所に保存しておく。使用直前に 10 ml/l に正確に希釈して使用する。

- g) セルロースパウダー (クロマトグラフ用)

2-3 カラムの製作

a) セルロースパウダーをビーカーに適量入れた後, 混合溶媒を充分加え, ガラス棒などでかくはんし内部の気泡を追い出す。

b) カラムの 1/2 ~ 2/3 の高さまで混合溶媒を入れた後, 溶媒に浸した綿栓を気泡が入らないように注意しながらカラムの下端に入れる。下端にパッドの付いたカラムでは綿栓は不要である。

c) b) に a) を少しずつ流し込む。ストップコックを開いてもセルロースパウダーが沈下しなくなるまで時間をかけて少しずつ入れる。最終的にセルロースパウダーの高さが約 30 cm になるよう積み重ねる^{注1)}。

d) カラムの充てんが完了したら上部に内径よりやや小さめに切った円型の濾紙 (規格は特に問わない) を乗せる^{注2)}。

2-4. 操作手順

a) 新鮮なワカメ^{注3)}の藻体 (約 50 g) を適当に切り^{注4)}約 100 ml のアセトン中に投入し, 冷蔵庫中で時々振とうしながら色素を抽出する^{注5)}。

b) 抽出液を濾過する^{注6)}。

c) 濾液を分液漏斗中に入れ, 10 ml の 1N 塩酸を加え, クロロフィル a をフェオフィチン a にする。このとき溶液は赤味を帯びた色調に変化する。

d) 石油エーテル約 50 ml を器壁にそわせて添加し, その後蒸留水約 50 ml を同様にして加え, 色素を石油エーテル層に移行させる^{注7)}。

e) 下層のアセトン-水層を排出した後, 約 100 ml の蒸留水を器壁にそわせてゆるやかに加える。石油エーテル層に残留したアセトンを水層に溶かし込んでその水層を排出する。この水洗操作を数回くり返す。

f) 石油エーテル層をフラスコに移し, 無水硫酸ナトリウムを加え^{注8)}, 水分を完全に取り去る。

g) 石油エーテル抽出液を濾過する^{注9)}。

h) 抽出液をアスピレータで減圧し完全に蒸発させる。

i) 蒸発残渣に 2 ~ 3 ml の混合溶媒を加えた後, クロマトカラム上にピペットで溶液を乗せ, セルロースパウダーの上端になるべく幅を狭く吸収させた後, 混合

注 1) いかなる場合も溶媒がセルロースカラムの上端よりも少なくともはいけない。もしそうであると, カラム内部に気泡が生じて後の展開がしくくなる。

注 2) カラムの上端部がくずれることを防ぐためである。

溶媒で展開する。この時フェオフィチン a の単体は灰色を呈する。

j) 展開終了後、カラムのコック部よりセルロースパウダー中の余分の溶媒をアスピレーターでゆるやかに吸引除去し^{注9)}、カラムを清浄なガラス板上に取り出す。

k) 清浄なナイフ等でフェオフィチン a の画分を切り取り、90%v/v アセトン溶液が着色する程度加える。その後溶液を滷過する^{注9)}。

l) 分光光度計を使用して滷液の吸光値 (測定波長は 665m μ および 750m μ である) を測定する。

m) 測定した溶液を d 倍希釈し、フロレッセンナトリウム塩溶液を対照に、またはダミーキューベットを対照にして、蛍光光度計で励起波長 436m μ 、測定波長 660m μ における蛍光を測定する。

n) フェオフィチン a の固有蛍光値は次式で求められる。

$$f_{ph} = \frac{F \times d \times l}{A \times 1000 \times (E_{665} - E_{750})}$$

ただし、

F: 蛍光の読み取り値

d: 希釈率 (すなわち d 倍希釈)

l: 分光光度計で使用したセルの長さ (cm)

A: フェオフィチン a の吸光係数 18.7 となる (この値は Lorenzen (1966) より筆者らが計算)

E₆₆₅: 665m μ における吸光値

E₇₅₀: 750m μ における吸光値

である。

3. クロロフィル a の単離と acid factor の測定

3-1. 使用器具

- a) 蛍光光度計 前項と同じ。
- b) 一次元ペーパークロマトグラフィー用試験管 上昇法用、長さ約 30cm、口径約 3cm。
- c) 分液漏斗 前項と同じ。
- d) 減圧用具 前項と同じ。
- e) 毛細管ピペット

3-2. 試薬

- a) アセトン 前項と同じ。
- b) 石油エーテル 前項と同じ。
- c) エチルエーテル (試薬特級)
- d) 混合溶媒 石油エーテル: n-プロピルアルコール (試薬特級) = 500: 6 v/v 使用直前に混合する。
- e) フロレッセンナトリウム塩溶液 前項と同じ。
- f) 1 N 塩酸 濃塩酸 (試薬特級) 4 ml を蒸留水で 100ml にうすめる。
- g) 一次元ペーパークロマトグラフィー用紙 (東洋濾紙 No51)

3-3. 操作手順

- a~g) 2-4 項 c) の手順を除く以外同項と同じ。抽出時間はより少なくてよい。
- h) 抽出液を減圧し、湿り気がまだ残っている程度まで蒸発させる。
- i) 残渣に 0.5ml のエチルエーテルを加え溶解させる。
- j) 一次元ペーパークロマトグラフィー用濾紙の下端から 4 cm のところに鉛筆で原線を引き、この上に i) の溶液を毛細管ピペットでスポットする。
- k) クロマトグラフ用試験管の底に 3 cm 位の深さに混合溶媒を入れ、スポットした濾紙をつり下げて展開させる^{注10)}。
- l) クロロフィル a の R_f 値 (原線からのクロロフィル a の移動距離/原線からの溶媒の移動距離) は 0.33 ± 0.003 (Koyama *et al.*, 1968) で色調は青緑色である。この部分を清浄なはさみで切り取り、90%v/v アセトン溶液 5~10ml 中に入れ、色素を溶解させる。
- m) 色素抽出液について、フロレッセンナトリウム塩溶液を、あるいは、ダミーキューベットを対照にして蛍光光度計で励起波長 436m μ 、測定波長 660m μ における蛍光を測定する。
- n) 色素抽出液に 1 N 塩酸を 1~2 滴加え、5~10 分経過後、同じ操作で蛍光を測定する。
- o) acid factor は次式で求められる。

注 3) ふつうホウレンソウを使用するが、フェオフィチン a と b を分離するのに熟練を要する。ここではクロロフィル b を含まない褐藻類のうちからワカメを使用した。

注 4) すりつぶさないこと。すりつぶすとクロロフィル分解酵素が混入する恐れがある (ヒル・ウィッティンガム, 1957)。

注 5) 抽出時間は 1 時間以内でよい。以後の操作は強光にさらさないこと。

注 6) 本操作におけるすべての滷過は、漏斗に清浄な脱脂綿を付したものをを使用した。

注 7) 分液漏斗は振とうしないこと。溶液を器壁にそわせながらゆるやかに回転させる程度で良い。

注 8) 加えた無水硫酸ナトリウムがフラスコ中でさらさらと動くようになるまで加える。

注 9) この操作でセルロースカラムが収縮し、ガラス壁との間に薄い空間ができ、吸着層を乱すことなく容易に取り出すことができる。

注 10) 冷蔵庫中で行う。スポットした部分は混合溶媒にひたさないことが必要である。

$$\text{acid factor } R = \frac{F_0}{F_a}$$

ただし、

F_0 : 酸添加前の蛍光の読み取り値

F_a : 酸添加後の蛍光の読み取り値
である。

以上はクロロフィル a の測定に必要な 2 定数を算出するに当り、高度な技術を持たなくても求められる方法について記述した。現在定数を求めるためには単一種培養した対数増殖期の珪藻類の一種 *Skeletonema costatum* が利用されているが (西条・西沢, 1968; 西条, 1975), 本種は体内に多量のクロロフィル分解物を保有し (神谷ら, 1970), また他の色素類も存在することから問題があり, 色素を直接単離する本法のようなやり方がより信頼性のある値を得ることができる。本法では試料としてワカメを使用した, これはクロロフィル a と分離しにくいクロロフィル b を含まず, かつ, 入手しやすい藻類ということで本種を選んだ。しかし新鮮なワカメを周年入手することは不可能である。そこで季節に応じて他の適当な藻類を使い本法で単離することが可能である。

名古屋大学水圏科学研究所西条八東教授より分けて頂いた純粋のフェオフィチン a から求めた固有蛍光値は Turner111 型 (ブルーランプ使用, 絞り $\times 1$) では 0.53, 日立 203 型では 0.13 であり, 本法から求めたそれはそれぞれ 0.55 および 0.14 であった。一方 acid factor は Turner111 型では 2.0 であり, 日立 203 型では 15.3 である。

本法で求められた 2 つの定数は次の式で実際に使用できる。

$$\text{クロロフィル } a \text{ 量 } (\mu\text{g}/l) = \frac{F_0 - F_a}{f_{ph}(R+1)} \cdot \frac{v}{V}$$

ここで、

F_0 : 最初の蛍光の読み取り値

F_a : 酸添加後の蛍光の読み取り値

f_{ph} : フェオフィチン a の固有蛍光値

R : acid factor

v : 抽出した 90% アセトンの量 (ml)

V : 濾過した試水の量 (ml)

である。

文 献

- 1) ヒル・ウィットティングム (藤茂宏・伊沢清吉・宮地重遠, 訳) (1957): 光合成. 現代科学叢書, 40, みずさ書房 (東京), PP.125.
- 2) Holm-Hansen, O., Lorenzen, G.J., Holmes, R.W. and J. D. H. Strickland (1965): Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, **30**, 3-15.
- 3) 神谷知子・西条八東 (1970): 海洋におけるクロロフィライドの存在. 文部省特定研究, 海洋生物群集の総合的研究, 昭和44年度業績報告, 30-32 頁.
- 4) Koyama, T., Shmamura, O. and K. Yanagi (1968): Vertical distribution of pigment in a lake sediment as determined by paper chromatography. *Geochem. J.*, **2**, 87-103.
- 5) Lorenzen, C. J. (1967): Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 343-346.
- 6) Richards, F. A. with T. G. Thompson (1952): The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Marine Res.*, **11**, 156-172.
- 7) 西条八東・西沢敏 (1968): クロロフィル分析法の検討, 文部省特定研究, 海洋生物群集の総合的研究, 昭和42年度業績報告, 24-26 頁.
- 8) 西条八東 (1975): クロロフィルの測定法. 陸水学雑誌, **36** (3), 103-109.
- 9) 佐竹一夫 (1961): クロマトグラフィー (改訂版). 共立出版 (東京), pp. 244.
- 10) SCOR/UNESCO Working Group on Photosynthetic Pigments (1966): Monographs on oceanographic methodology. UNESCO, pp. 69.
- 11) Yentsch, C. S. and D. W. Menzel (1963): A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, **10**, 221-231.