

第6回石橋雅義先生
記念講演会講演

光ルミネッセンス分析法の
基礎的研究とその応用

— ポルフィリン金属錯体及びクロロフィル類
の発光特性とその分析化学への応用 —



西川 泰治*

近畿大学工学部教授西川泰治先生は、1984年度日本分析化学会学会賞を標記の業績により授賞され、それを記念いたしまして昭和61年4月26日に開催されました第6回石橋雅義先生記念講演会にて御講演いただきました。ここにその内容をもとに、御寄稿いただきましたので、掲載いたします。

1. はじめに

ポルフィリンの金属錯体及びクロリン骨格を有するクロロフィル類は生物に関与して酸素の運搬、生体エネルギーの生産、物質代謝、光合成などに重要な役割りを演じている。例えば亜鉛プロトポルフィリンは酵母中に含まれ、金属酵素モデルと

してその生化学機作が検討されている。また金属ポルフィリン類は触媒やガン治療に有効とされ、さらにある種の金属ポルフィリンはコラーゲンを選択的に染色するのでラベリング試薬として役立つ、化学の各分野で注目されている。また水圏におけるクロロフィル(chl.)類は主として植物プランクトンに依存するので、光合成に関与して水

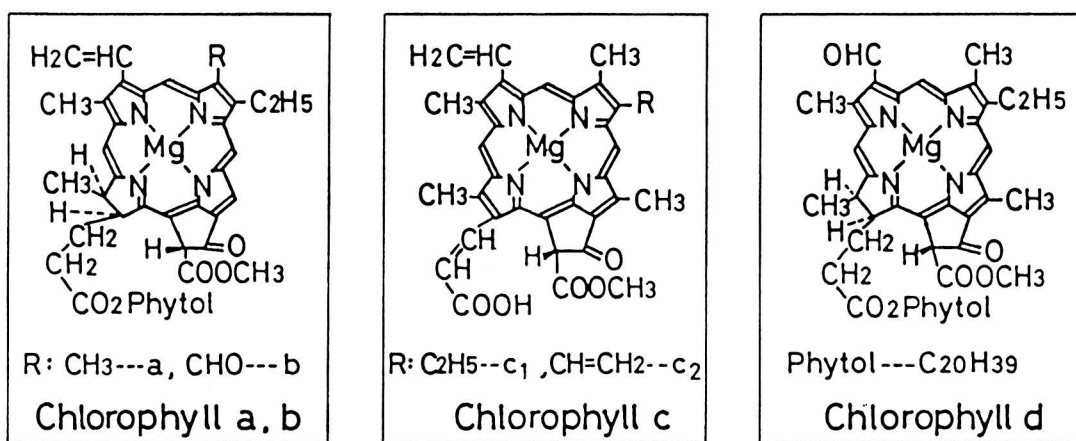


Fig. 1 Structure of chlorophylls

* 近畿大学工学部教授

中の有機物生産を支配する最も重要な物質である。一般に chl. 類は生物活性の失活過程において、中心金属Mgを容易に脱離してフェオフィチン (pheo.) となる。さらに側鎖の分解により多種多様な分解物へと変化する。従って chl. ならびに pheo. をはじめ初期分解物の分離定量は水圏における生物活性の消長を示唆する指標として地球化学的、生物化学的に重要である。現在、これらポルフィリン金属錯体及びクロロフィル類の定量には吸光度法（ソーレ帯あるいはQ帯）が汎用されている。しかし、一般にこれらの化合物のある種の中には蛍光・りん光を発生し、またポルフィリン金属錯体の中には熱活性化遅延蛍光を発生するものがあるので吸光度法よりは特異的、高感度な分析が可能である。そこでポルフィリン金属錯体及び chl. 類の発光特性とその分析化学への応用について概説する。

2. ポルフィリン及びクロロフィル類の熱活性化遅延蛍光特性とその分析化学への応用

プロトクロロフィル a, プロトポルフィリンジメチルエステルの金属錯体 (Mg-, Zn-, Cd-, Sn-PPDE) や chl.c など多くのポルフィリン化合物 (Fig. 3 参照) は Fig. 2 に示したように三重項状態 T_1 にある分子が熱的に励起され (ΔE), 系間交差 (k'_{isc}) により励起一重状態におしあげられ、これより蛍光放射する所謂、熱活性化遅延蛍光 (Thermally activation delayed fluorescence; TADF) を発する¹²⁾²³⁾。これら化合物の発光特性を Table 1 に示す。一般に TADF 強度はりん光強度と同様に三重項の励起子濃度 $[T_1]$ に比例し、一重項 (S) と三重項 (T) 間の混ざり合いの程度が $[T_1]$ を支配すると考えることができる。その混ざり合いの程度 (λ) は次式で示される。

$$\lambda = V_{so} / |E_t - E_s| \quad \text{この式はSとTの混ざり合い} (\lambda) \text{が大きい、かつSとTのエネルギー差}(E_t$$

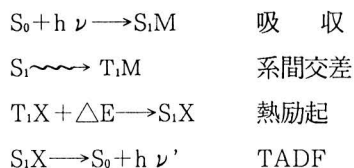
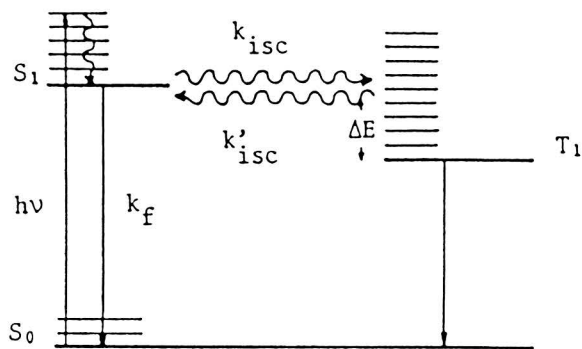


Fig. 2 TADF

$-E_s$) すなわち $\Delta E_s - t$ に逆比例することを示している。Table 1 よりわかるように、ポルフィリン類では ΔE の大きさは chl.a > Mg-PPDE, chl.b > Zn-TPPS3 > chl.c > プロトクロロフィル a > Cd-PPDE > Zn-PPDE \approx Sn-PPDE > Zn-pheo.c の順であり、最も大きい ΔE 値をしめす chl.a は TADF を示さない。すなわち、 $\Delta E < 46 \text{ kJ/mol}$ のポルフィリン類、特に $\Delta E = 34 \sim 42 \text{ kJ/mol}$ の化合物では TADF 及び常温りん光 (RTP) 双方の発光が濾紙に固定した状態で簡単に測定できる。従ってこれらの化合物はペーパークロマトグラフィーにより分離後、TADF により定量できる点で優れており、各種の分析化学的応用面を展開してくれる。

プランクトンの中の chl. c 及び pheo. c の TADF 法²⁾

濾紙上に固定した chl.c は Fig. 4 に示したように特異的な TADF (励起: 430nm / TADF: 604nm) を発するが、chl. a, b は TADF を示さない。pheo. c は TADF を示すが、その強度は chl.c の大よ 1 / 120 で極めて低値を示し、chl.c の TADF 測定には殆ど影響しない。しかし、濾紙に保持した pheo.c に亜鉛を貫入させ Zn-pheo.c とすれば、Zn-pheo.c

のTADF強度は pheo.c の約200倍, chl.c の約 2 倍に増加する。この特性を利用して水中プランクトンの chl.c 及び pheo.c を精度よく定量できる。天然水中の chl.c 及び pheo.c を本法により測定した結果の一例を Table 2 に示す。本TADF法の検出限界は0.1ng (C.V.; 6%) であり, 吸光度法では検出できなかった pheo.c 及び chl.c を精度よく定量できる。また本法によりプランクトンの生産及

び死滅による pheo.c への変換を追跡することもできる (Fig. 5 参照)。

プロトクロロフィルのTADF法⁴⁾

chl. 類はその前駆体であるプロトクロロフィル (protochl.) の光作用により生産される (Fig. 6)。protochl.a は Table 1 に示したようにTADF発光するので, TADF法でそのchl. 類への光合成過程を定量的に追跡することができる。

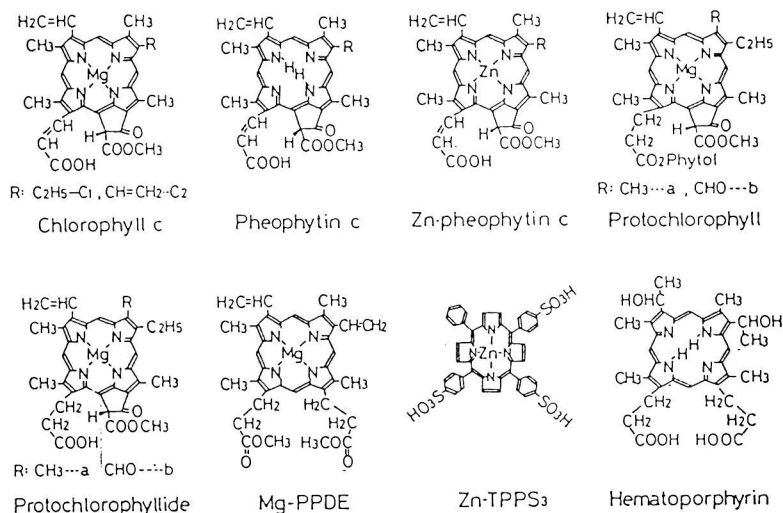


Fig. 3 Structure of porphyrins

Table 1. Luminescence properties of porphyrins

Compounds	Fluorescence		TADF				ΔE_{S-T} (kJ·mol ⁻¹)
	λ_{em}/nm	τ_f/ns	Ex/nm	Em/nm	τ/ms	R.I.	
PPDE	634	11	415	630	—	0.007	—
Mg-PPDE	597	8.1	422	595	45	0.065	4.31
Zn-PPDE	588	5.2	417	587	29	0.14	3.72
Cd-PPDE	597	—	—	600	—	v.w.	3.74
Sn-PPDE	588	5.2	416	587	9.4	1.0	3.72
TPPS ₃	—	—	465	659	—	0.016	—
Zn-TPPS ₃	—	—	430	607	25	0.40	4.23
Chlorophyll a	666	—	non TADF			—	58.5
Chlorophyll b	650	—	460	635	—	v.w.	4.31
Chlorophyll c	635	—	430	604	36.8	0.5	4.02
Pheophytin c	657	—	418	638	—	0.013	—
Zn-pheophytin c	—	—	422	595	22.1	1.0	34.7
Protochlorophyll a	629	—	428	605	25	0.25	38.5

Table 2 Results of analysis using delayed fluorometry and absorption spectroscopy for phytoplankton in natural water

Location of Sampling	TADF method		Spectrophotometry		
	Chl.c (ug/l)	Pheo.c (ug/l)	Chl.c (ug/l)	Chl.a (ug/l)	Chl.b (ug/l)
Pond in Hiqashi Osaka City	1.5	0.9	none	53	21
Ise Bay	2.5	1.6	1.5	18	2.9
Osaka Bay	4.3	9.2	13.4	55	none
Yodo River	0.0091	0.43	4.6	32	2.2

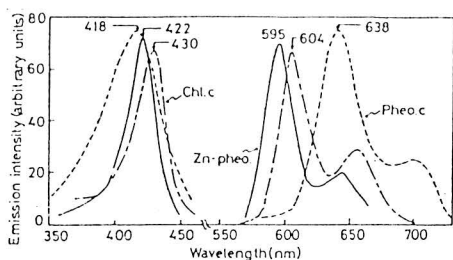


Fig. 4 Zn-pheophytin c (3.7ng/5 mm φ spot), 31°C, Chlorophyll c (10ng/spot), 32°C, Pheophytin c (9.6ng/spot), 67°C ; 1 M-NaOH 1 μ for Chl.c and Pheo.c, 1 M-NaOH 5μs for Nn•pheophytin c.

Optical micrograph of Asterionella formosa HASSALL (x 500)

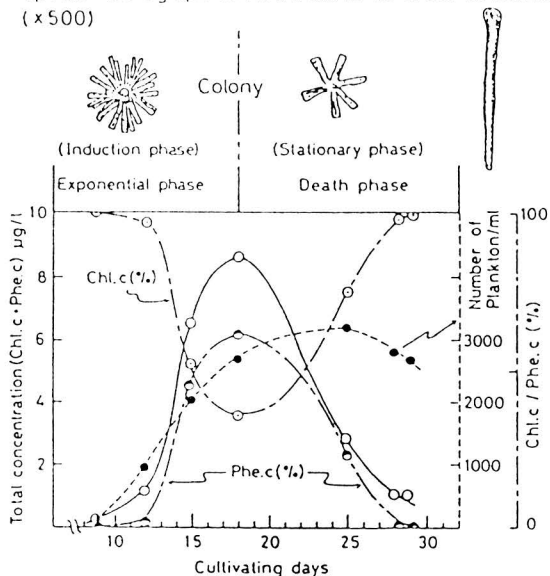


Fig. 5 Relationship between number of plankton per milliliter and cultivation days.

- : Total concentration of chl.c and phe.c (ug/l)
- : Number of Plankton per ml.
- : Chl.c % —○—: Phe.c %

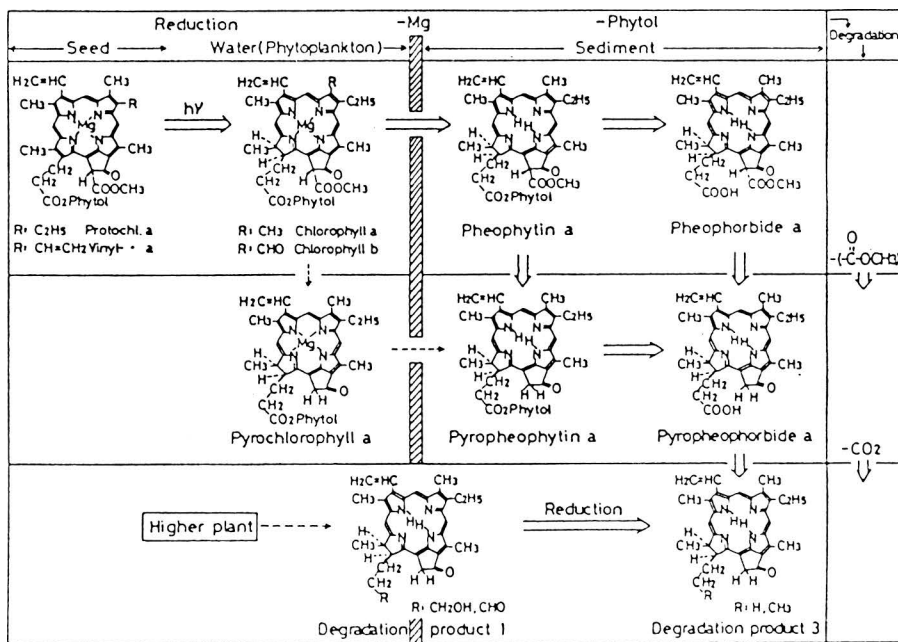


Fig. 6 Chlorophyll degradation process in sediment samples.

3. ポルフィリン及びクロロフィル類の蛍光特性とその分析化学への応用

1) クロロフィルa,b 及びフェオフィチンa,b の蛍光特性とその天然水への適用 :

chl.a,b 及びpheo.a,b の蛍光特性をFig. 7 に示す。

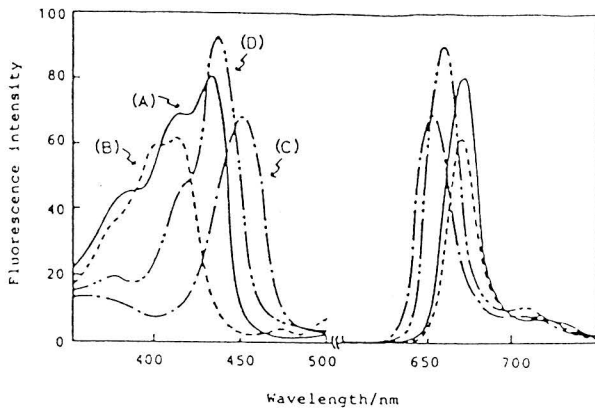


Fig. 7 Fluorescence spectra of chlorophylls a, b and pheophytius, a, b in acetone
 (A) : chlorophyll a (430/670nm)
 (B) : pheophytin a (410/670nm)
 (C) : chlorophyll b (460/650nm)
 (D) : pheophytin b (440/655nm)

互いに酷似した蛍光スペクトルを示すが、ペーパークロマトグラフィーで容易に分離可能であることを利用し、chl.a,b 及び pheo.a!b の迅速、簡便な定量法を組立ることができる。しかし、これら相互の含有比が著しく異なったり、超微量の定量には励起微分スペクトル法が有効であり、さらに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が有効である (Fig. 8 参照)。

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%以下で、定量限界0.1ppmの超微量定量が可能である。

2) プロポトルフィリンジメチルエステル (PPDE) 金属錯体の蛍光特性 :

PPDEの金属錯体は金属酵素モデルとして生化学の基礎的研究が盛んに行われている。また、分析化学的には金属ポルフィリン化合物の代表としてその分離・定量に対関する研究が行われている。代表的な金属PPDE錯体の蛍光特性をTable 3 に示した。いずれの錯体も蛍光の感度指数F.S.I.は 10^{-2} ~ 10^{-3} の値を有し、極めて強い蛍光性錯体であり、その蛍光シグナルは蛍光検知高速液体クロマトグラフィーに利用できる⁵⁾。

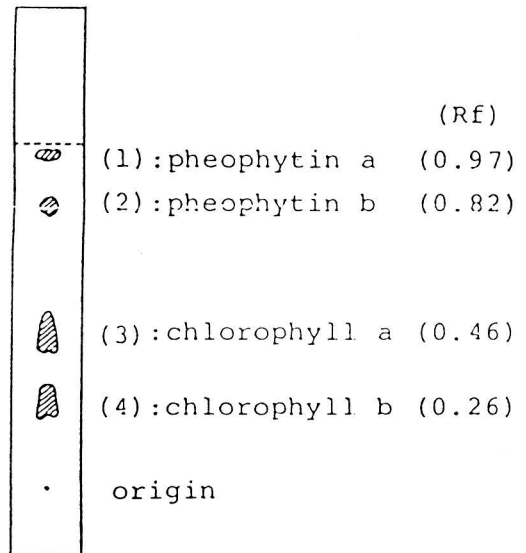


Fig. 8 paper chromatogram

3) 堆積物中のクロロフィル初期分解物の高速液体クロマトグラフィーによる解析 :

chl 類は前述のように光合成に関与する重要な色素であり、植物やプランクトンの枯死によりFig. 6 に示したように多種多様な chl. 分解物に変化すると共に堆積物中に取り込まれる。これらの初期分解物はそれぞれの蛍光検知HPLC法 (ZORBAX ODS 4.6mm×25cm, アセトニトリル:アセトン=45:55v/v) で迅速、簡便、高感度に分析できる⁶⁾。HPLCの定量化にはNarrow

baseline 法の導入によりさらに高精度の定量ができる。一例をFig. 9に示す。

Table. 3 Fluorescence properties of metals-PPDE complexes

Compound	Fluorescence							ϕ_{1q}^{**}		ϕ_{1q}^{**}		F. S. I. (**)		$\tau_{1 \text{ nsec}}$	FSI* (10^{-3})
	Ex. peak (nm)	1st Em. peak (nm)	2nd Em. peak (nm)	B-A (nm)	τ (ns)	530-800 (nm)	1st peak	530-800 (nm)	1st peak	Non degas	Degas	Degas.			
		Correct A	Correct B	Correct B	Uncorrect (nm)										
PPDE	403	633 (634)	633 (634)	702	701	69	12.5 (11)	0.03 ₀	0.01 ₇	0.04 ₆	0.02 ₆	16.7	25.8	19.2	4.1
Mg-PPDE	417	595	594 (597)	652	648	57	10 (8.1)	0.08 ₈	0.03 ₈	0.11 ₁	0.04 ₉	83.1	106.7	10.4	9.1
Zn-PPDE	418	590	589 (588)	645	644	55	5.8 (5.2)	0.02 ₇	0.01 ₁	0.02 ₈	0.01 ₂	9.0	9.7	6.3	1.1
Cd-PPDE	424	599	597	654	652	55	6.3	0.00 ₃	0.00 ₁	0.00 ₃	0.00 ₁	2.8	2.8	6.3	0.035
Sn-PPDE	413	586 (588)	586 (588)	641	640	55	5.6 (5.2)	0.01 ₅	0.00 ₇	0.01 ₆	0.00 ₇	3.5	3.8	5.6	1.4

() In Chloroform, FSI: Fluorescence sensitivity index = $(\phi_{1q} \cdot D \cdot \lambda) / I$, calculated from 1st peak
 *: Ex. = 366 nm, **: Ex. = 436 nm
 ϕ_{1q} : Non-degassed fluorescence quantum yield, ϕ_{1q} : Degassed fluorescence quantum yield

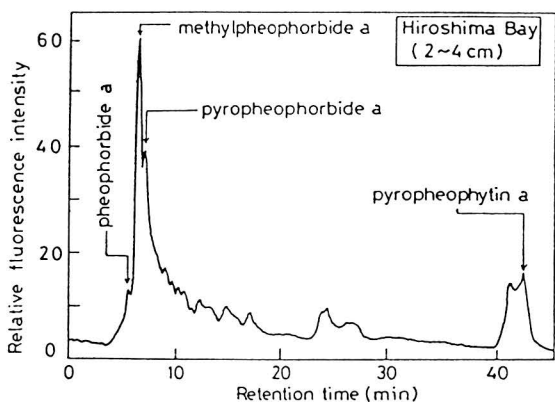


Fig. 9 Separation of chlorophyll derivatives in core sample.

引用文献

- 1) 尾上義明, 平木敬三, 西川泰治: 分析化学, 31, 169 (1982).
- 2) Y. Onoue, K. Morishige, K. Hiraki, Y. Nishikawa: BUNSEKI KAGAKU: 32, E115 (1983).
- 3) 尾上義明, 平木敬三, 西川泰治: 分析化学, 31, 169 (1982).
- 4) 尾上義明: 博士学位論文 (近畿大学) P38 (1982).
芳本良彰: 備士学位論文 (近畿大学) P118 (1985).
- 5) 田村隆之, 瀧澤伸幸, 森重清利, 西川泰治: 日化第52春季年会議演予稿集 I, P550 (1986)
- 6) 芳竹良彰, 垣内喜久子, 合田四郎, 森重清利, 重松恒信, 西川泰治: 日化, 1987, No. 4, P678.