

濁度を用いた新しい二酸化炭素濃度測定法

大阪府立高津高等学校化学部

藤田 雅輝

指導教員：藤村直哉

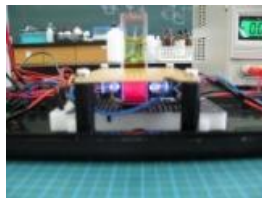
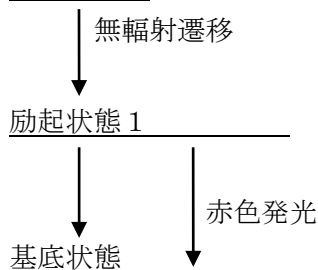
1. はじめに

地球温暖化によるプランクトンの異常発生が頻繁に報道されている。その原因となっている植物プランクトン量の測定は、ふつう顕微鏡を用いた個体数の計数により行われているが、操作が煩雑なこともあり、簡易な方法としてクロロフィル量を蛍光光度計で測定する方法が実用化されている。しかし、装置は高価なため、利用は大学や研究機関などに限られている。簡易な方法として紫外線 LED と光センサーを利用する方法が提案されている¹⁾。しかし、微弱な光を測定するなど技術的に難しい点も多い。学校の理科クラブなどで、この安価で簡単な簡易蛍光光度計の利用を進めるため、その基礎な研究を行った。

2. 装置の製作

植物は過剰な光の受光による障害を防ぐため、クロロフィルの吸収したエネルギーの一部を、赤色の蛍光（ピーク波長 670~680nm）で放出している。この蛍光の強さから、溶液中のクロロフィル濃度を測定することができる。

励起状態 2



クロロフィルの蛍光

2-1 クロロフィルの抽出

実験に用いたクロロフィルは、ホウレンソウの葉から抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを利用して精製した。色素成分の分離にはシ

リカゲル（ワコーゲル C-300）と石油エーテル：2-プロパノール=25：1 よりなる展開溶媒を用いた²⁾。



図1 ホウレンソウ



図2 カラムでの分離

このカラムで分取したクロロフィル a、b それぞれの溶液を以下の実験に利用した。

2-2 光源の構造

励起光源として市販されていた実験用青色レーザー（波長 405nm）を利用した装置（図 3）を製作したが、光線の幅が細く、生じた蛍光が周囲のクロロフィル溶液に再び吸収されてしまうため、紫外線 LED（波長 395nm, SANDER 社 SDL-5N3CUV-A）の光を四面透過の角型セル（光路長 1cm）の両側から当てる装置に変更した。（図 4）



図3 レーザー式（黒い部分がセルケース、センサーおよびフィルターはケース内）

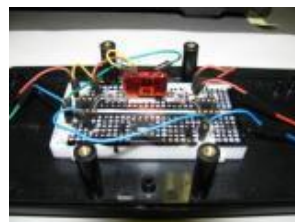
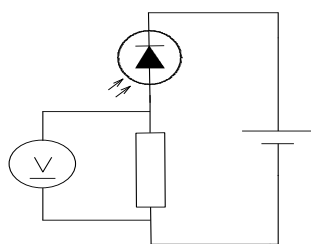


図4 発光ダイオード式（右はセルガイドを付けた状態、測定時には全体を黒いケースで覆う）

また、検出は可視光検出用高感度 PIN フォトダイオード（浜松ホトニクス S6775）を用い、蛍光以外の光が検出されることを防ぐため、ロングパスフィルター（シグマ光機 SCF-50S-580, 透過波長>580nm）をセンサー前面に取り付けた。

2-3 検出方法

フォトダイオードをセンサーとして用いる場合、光量とのセンサーの出力との比例関係が最も良いのはダイオードの両端に直接電流計や電圧計を接続する「短絡電流」や「開放電圧」の測定であると言われている³⁾。これには高感度の電流計、電圧計が必要である。今回は、市販の安価なテスターでも十分に大きな電圧変化として検出できるよう、フォトダイオードに抵抗を直列に接続し、ダイオードに逆方向の電圧を加える「バイアス型回路」を用いた。(図5)



バイアス電圧型回路

図5

「バイアス型回路」での光量と出力電圧の直線性を確保するため、非線形抵抗であるフォトダイオードに直列接続する抵抗値を、様々な値に変えて出力電圧を検討した。実験はクロロフィルa溶液を1/2に希釈する操作を繰り返しながら、装置の出力電圧を測定することで行った。フォトダイオードに直列接続した抵抗値が500kΩのとき、広いクロロフィル濃度範囲（広い蛍光光量範囲において）で、大きな電圧変化が測定できることが確認できた(図6)。

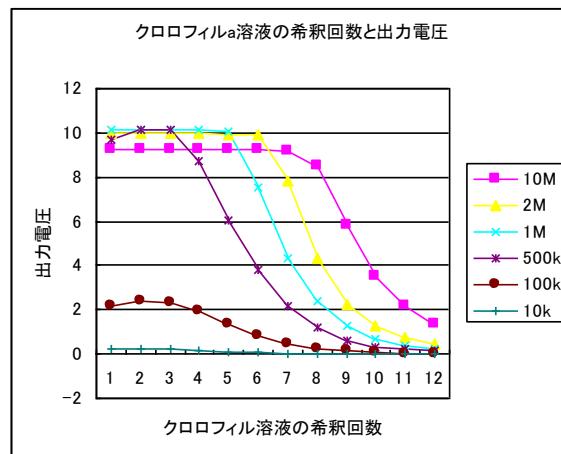


図6 抵抗値と出力電圧

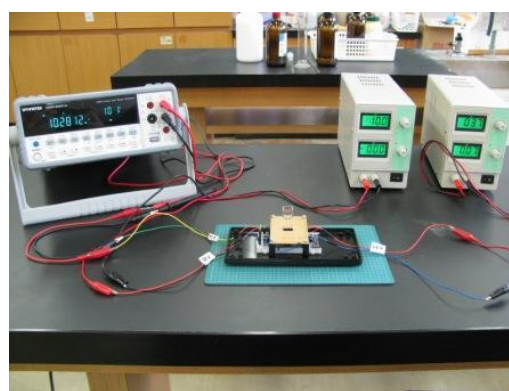


図7 測定装置の全体像

3. 測定方法

3-1 検量線の作成

完成した装置がどの程度のクロロフィル濃度範囲で利用できるのかを調べるため、分取したクロロフィルa溶液を溶媒で1/2に希釈する操作を続けながら、蛍光強度を調べた。溶液のクロロフィル濃度は、市販の分光光度計を用い、吸光度を測定するArnonの方法⁴⁾を用いて調べた。

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/mL}) = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/mL}) = 22.9A_{645} - 4.68A_{663}$$

(A_{663} 、 A_{645} は、それぞれ663nm、645nmにおける溶液の吸光度)

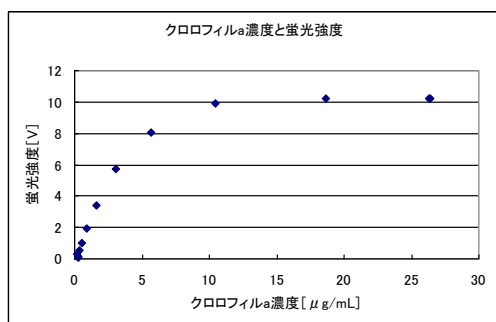


図8 クロロフィル a 濃度と蛍光強度

吸光度の測定から、分取したクロロフィル a 溶液中にクロロフィル b は含まれず、またクロロフィル b 溶液中には、1/5 程度のクロロフィル a が含まれることがわかったので、クロロフィル a と蛍光強度の関係を用いて、クロロフィル a の値を差し引いて、クロロフィル b と蛍光の関係を計算した。(図 10) また、蛍光強度との係数を比較することにより、クロロフィル a (係数 2.062) はクロロフィル b (係数 0.269) の 7.6 倍の蛍光強度を持つことが確認できた。

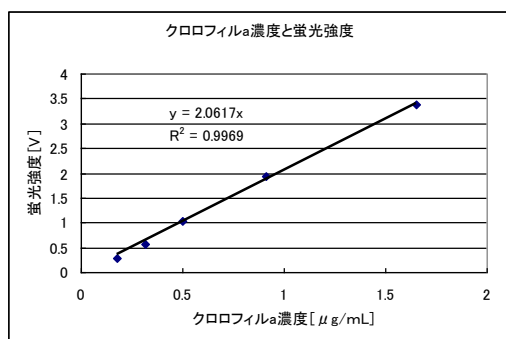


図9 クロロフィル a 濃度と蛍光強度

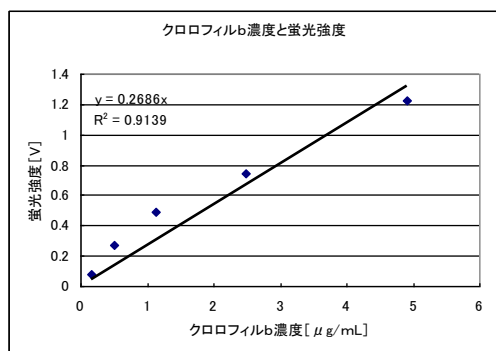


図10 クロロフィル b 濃度と蛍光強度

3-2 抽出方法

植物プランクトンに含まれるクロロフィルの抽出は、通常試験水をろ過したガラスろ紙（ワットマン GF/C、GF/F など）を抽出溶媒を加えてすりつぶす方法で行われる。その後、遠心分離を行い、その上澄み液を吸光度測定に用いる⁵⁾。この操作には 90%アセトンが用いられ、また蛍光測定には、DMF（ジメチルホルムアミド）が用いられることが多い。しかし、DMF は人体への有害性も指摘されているので、今回、学校で利用しやすい各種の溶媒を用い、そのクロロフィル抽出能力を蛍光強度を測定しながら、比較し検討してみた。実験は、1mL のクロレラ培養液をガラスフィルター GF/C でろ過した後、抽出をすりつぶし法、浸漬法（3h）の異なる方法で行い（図 11）比較してみた。

結果は、図 12 に見られるように、すりつぶし法では、ヘキサンを除き、水と親和性の高い溶媒はすべて高い抽出力を持ち、浸漬法では、アルコール、特にメタノールは抽出力が高く、すりつぶしを行わなくとも十分抽出できると予想できた。



図11 すりつぶし法（左）と浸漬法（右）

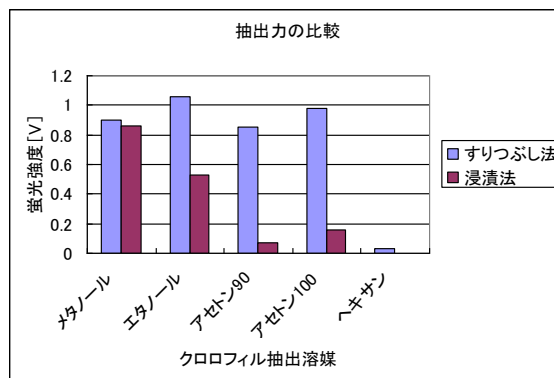


図12 クロロフィル抽出方法の比較

4 吸光測定法と蛍光測定法の比較

今回製作した簡易蛍光光度計が、実際に環境中のクロロフィル濃度測定に利用できるかを、さまざまな濃度のクロレラ培養液をつくり、吸光測定法と蛍光測定法の二つの方法で測定し、比較してみた。



図 12 さまざまな濃度のクロレラ培養液

実験は、0.1～5mL のクロレラ培養液を含む試験水をガラスろ紙 GF/C でろ過し、浸漬法) で抽出 (24h) してから、セルに入れた同じ溶液を分光光度計と今回製作した簡易蛍光光度計で測定し比較した。

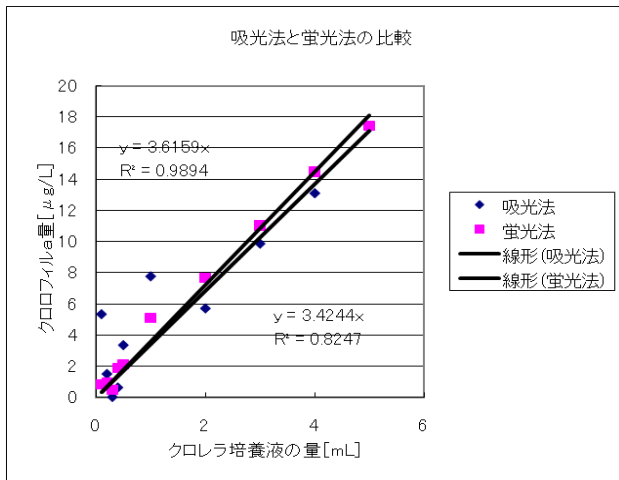


図 13 吸光法と蛍光法の測定値の比較

クロロフィル a 量の計算は、吸光法では環境水の測定でよく用いられるユネスコ法⁶⁾で、蛍光法では今回決定した、クロロフィル a - 出力電圧の係数 (図 9) を用いて行った。

2つの異なった方法で行ったクロロフィル a 濃度はほぼ一致しており、低濃度では、蛍光法の方がよい比例関係を示している。

5.まとめ

水中のクロロフィル a 濃度を調べるための簡易蛍光光度計を製作した。この装置を用いて測定した結果と市販の分光光度計を用いた測定結果はよく一致しており、また、蛍光法では低濃度でも比較的高い精度で測定できることが確認できた。さらに、クロロフィル抽出方法を検討し、ろ紙乳鉢ですりつぶさなくても、溶媒に一定時間浸漬する方法で十分に抽出できること、また、その抽出溶媒としてはメタノールが適していることなどがわかった。

蛍光強度に対するクロロフィル b やクロロフィルが分解して生じるフェオフィチンの影響については検討できていないため、今後実験を行い検討していきたい。

参考文献

1. 松村 隆・早坂知恵・安達菜央, 湖沼の富栄養状態の把握を目的としたクロロフィル定量—蛍光光度計の試作とその利用, 宮城教育大学環境教育研究紀要第 7 巻, 2004
2. 日本化学会編, 楽しい化学の実験室, 15 章 光合成色素を分け取る, 渡辺 正ほか, 1993
3. 谷腰欣司, ビギナーのためのセンサ回路集, 日刊工業新聞社, 2003
4. D. Arnon Plant Physiology 24: 1・15, 1949
5. 西條八束・三田村緒佐武, 新編湖沼調査法, 講談社, 2002
6. SCOR/UNESCO : Determination of photosynthetic pigments in sea water. IN, Monographs on oceanographic methodology, UNESCO publishing center, New York, 1966