U.D.C. 535.399 : 547.979.7

山口一孝, 福島清吾, 伊藤みよ子: 分光反射率測定の分析的応用に関する研究 (第 6 報*)

クロロフィル量と沝紙クロマトグラム斑点の分光反射率との関係

Kazutaka Yamaguchi, Seigo Fukushima, and Miyoko Ito: Analytical
Application of Reflectancy Determination. VI. Relation between
Reflectancy and Amount of Spotted Chlorophyll on the Paper
Partition Chromatography.

(National Hygienic Laboratory, Tokyo**)

Paper chromatography of chlorophyllin was carried out to examine the relationship between the reflectancy of the spot and amount of chlorophyllin. An approximate linear relationship was found to exist between the square root of the amount of chlorophyllin and the value of $2-\log R$, where R is the reflectancy, as was reported previously*.

(Received November 15, 1955)

著者等は前報で染色沝紙の分光反射率と色素量及び色素点滴沝紙の分光反射率と色素量の間に定量的関係のある事を報告したが, 今回は沝紙クロマトグラフィを行つた際の有色斑点につき, これらの関係を検討する目的で, 水溶性銅クロロフィル・ナトリウム塩 (以下クロロフィルと呼ぶ) について実験を行つた. その結果一定限界内でクロロフィル量の平方根と $2-\log R$ (R : 分光反射率), 即ち D の間に前報と同様な近似的直線関係を見出した.

最近 McCready 等¹⁾は糖類の沝紙クロマトグラフィの斑点で, 糖量の対数と分光反射率との直線関係につき報告しているが, 本法と同様実験的な結果を裏付ける理論的な根拠は明らかとされていない. 両者何れが適当であるかは将来検討を要する. なおクロロフィルの沝紙クロマトグラフィは tailing の除去, 展開中の分解防止等の問題につき更に検討を要し, 本実験例をもつてクロロフィル定量に関する決定的な成績とは認め難い.

実 験 の 部

供試検体 水溶性銅クロロフィル・ナトリウム (純度 101.4%) の 250 mg を蒸留水に溶かし全容 25 cc とした溶液 (0.01 cc 中 100 γ) を原液とし, これを希釈し 0.01 cc 中おのおの 80, 60, 40, 20, 10, 5 γ を含む溶液を作り検液とした.

沝紙クロマトグラフィ 東洋沝紙 No. 50, 2×45 cm の下端から 6 cm の位置に各濃度の検液 0.01 cc (± 0.0005 cc) を各 4 板づつに点滴し, 溶媒としてブタノール・エタノール・ N 塩酸 (3:1:1) を用い, 上昇法により室温で 16 時間展開後風乾, 4 時間後に反射率を測定した. 平均 R_f は 0.80 であつた.

分光反射率測定 Diffuse reflectance accessory を装備した Beckman spectrophotometer B 型を用い

Fig. 1.

Fig. 2.

* 第 5 報: 本誌 75, 556(1955).

** Tamagawa-yoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo.

1) McCready, McComb: Anal. Chem. 26, 1645(1954).

反射率を測定した。この際装置の反射窓 (直径 15 mm) に更に絞りを付け直径 7.5 mm の円型窓とし、斑点中肉眼的に最も色調の濃い部分を窓の中心部に一致させ、供用濾紙を対照として測定を行つた。濾紙クロマトグラフィにより得た緑色斑点の反射率曲線は 100 γ /0.01 cc の場合 Fig. 1 の如く、405 m μ 及び 635 m μ に最小反射部位を有し、これ等は吸光度曲線の場合の最大吸収部位と良く一致している。

その結果から 405 m μ 及び 635 m μ 部位の反射率 R を測定した成績は Table I の通りで、同時に 2-log R 値及び同一濃度検体に於ける平均値を示す。

Table I.

No.	Spotted chlorophyll (γ)	at 635 m μ			at 405 m μ			Notes
		R	2-log R	average	R	2-log R	average	
1	100	45.6	0.3400	0.345	17.8	0.7496	0.731	
2	"	46.6	0.3316		19.4	0.7122		
3	"	43.6	0.3605		19.6	0.7077		
4	"	43.0	0.3665		17.6	0.7545		
5	80	54.2	0.2660	0.296	24.4	0.6126	0.674	
6	"	48.0	0.3188		20.4	0.6904		
7	"	52.6	0.2790		22.0	0.6576		
8	"	48.0	0.3188		19.8	0.7033		
9	60	58.2	0.2351	0.244	27.4	0.5622	0.582	
10	"	54.6	0.2628		24.2	0.6162		
11	"	58.6	0.2321		28.4	0.5467		
12	"	57.0	0.2441		25.0	0.6021		
13	40	68.6	0.1637	0.180	34.6	0.4601	0.488	
14	"	67.8	0.1688		33.4	0.4763		
15	"	58.8	0.2306		27.8	0.5560		
16	"	69.6	0.1574		34.6	0.4608		
17	20	80.6	0.0937	0.096	33.6	0.2708	0.310	
18	"	79.8	0.0980		48.0	0.3188		
19	"	"	"		46.4	0.3335		
20	"	80.6	0.0397		48.0	0.3188		
21	10	88.4	0.0535	0.040	66.0	0.1805	0.166	
22	"	93.4	0.0297		66.4	0.1778		
23	"	89.4	0.0487		74.0	0.1308		
24	"	93.6	0.0287		67.0	0.1739		
25	5	96.4	0.0159	0.022	79.8	0.0980	0.107	
26	"	96.6	0.0150		79.2	0.1013		
27	"	92.2	0.0353		72.6	0.1391		
28	"	95.0	0.0223		81.6	0.0883		

Table I の 2-log R 値を縦軸にとり、検体量 (γ) の平方根を横軸にとつてその関係をグラフに画くと 405 m μ の場合は 5~60 γ , 635 m μ の場合は 10~100 γ の範囲内で近似的に直線関係を認める (Fig. 2).

本実験例の範囲の検出誤差を吟味する目的で、各測定波長で得た 2-log R の平均値を基とし回帰方程式を求めると、

405 m μ , c: 5~60 γ $x=11.00y+1.14$ (1) $y=2-\log R$ の平均値

635 m μ , c: 10~100 γ $x=22.40y+2.22$ (2) $x=\sqrt{c}$

これらの式より各 y 値に相当する検出量を算出し、供用した検体量との差及び検出誤差 (%) を求めた (Table II).

Table II.

Chlorophyll used (γ)	at 635 m μ				at 405 m μ			
	2-log R	detected (γ)	difference (γ)	error (%)	2-log R	detected (γ)	difference (γ)	error (%)
100	0.345	102.27	2.27	+2.3	0.582	56.85	3.15	-5.3
80	0.296	78.28	1.73	-2.3				
60	0.244	60.55	0.55	+0.9				
40	0.180	39.06	0.94	-2.3				
20	0.096	18.22	1.78	-8.9				
10	0.040	9.69	0.31	-3.1	0.166	8.78	1.22	-12.2
5					0.107	5.35	0.35	+7.0