

日本周辺海域における低次生態系モニタリングにおける蛍光法によるクロロフィル *a* 分析マニュアル Ver. 1c 12-02-2003

Ver. 1b 06-11-2002

Ver.1 01-04-2002

東北区水産研究所混合域海洋環境部 齊藤宏明

Tel: 022-365-9576 Fax: 022-367-1250 e-mail: hsaito@affrc.go.jp

このマニュアルは当初、東北海区の水試に対する、クロロフィル分析の参考として作成したもの (Ver.1 01-04-2002) を改訂している。元はアセトン法、Holm-Hansen 法との比較や注意点を中心に書いたものであるため、その部分の記述が多いが、参考になる事もあると考えそのままにしている。モニタリングプロジェクトでは、DMF 抽出、Welschmeyer 法による分析が望ましいと考えるが、手法の統一については意見の交換が必要であろう。またこのマニュアルは随時改訂するのでコメント等いただきたい。

1. はじめに
2. 採水、濾過、抽出の手順
3. 蛍光光度計の補正と蛍光測定
4. Welschmeyer 法
5. 濾過、分析等に便利な物品
6. 参考文献

1. はじめに

クロロフィル *a* は植物プランクトンの光合成色素であり、海洋植物プランクトンの生物量および生産量の指標として広く使われている。クロロフィルの分析法としては古くから分光法が使われてきたが、Holm-Hansen et al. (1965)の蛍光法は(以下 Holm-Hansen 法とする)、その感度の高さおよびクロロフィル分解産物であるフェオ色素の分析も可能であることなどから、標準法として使われ、今日に至っている。クロロフィル *a* は青色の光の照射によって励起し、赤色の蛍光をだすため、蛍光法はこの蛍光強度を測定することによってクロロフィル *a* を定量する。Holm-Hansen 法では、さらに酸を添加することによって、クロロフィル *a* 分子から、Mg を外してフェオフィチンに分解する。Mg が外れると、蛍光は弱くなるため、クロロフィル *a* の酸化係数(酸を加える事により低下する蛍光強度の係数, acid factor、付表のエクセルシート参照)をあらかじめ測定し、酸添加前と添加後の蛍光を測定することによって、クロロフィル *a* とフェオフィチンとしてのフェオ色素をそれぞれ測定する。

蛍光法では、試水を濾紙で濾過し、溶媒中でクロロフィル色素を抽出してから、蛍光を

測定する。クロロフィルの抽出溶媒としては様々な有機溶媒や界面活性剤が使われているが、Suzuki and Ishimaru (1990)は *n,n*-ジメチルホルムアミド(DMF)が溶媒として優れていることを示した。それらは、

- 1) 抽出力が強く、暗所常温では1時間、冷蔵では半日程度の静置によってクロロフィル色素を完全に抽出することが可能。アセトンでは完全に抽出できない場合があるので、破碎、超音波処理等が必要。
- 2) クロロフィルは 90%アセトン中では水や、水の中の酸素によって不安定であるため速やかな分析を必要とするが、DMF 中では、暗所冷凍保存によってある程度の長期間保存可能。
- 3) アセトンと異なりほとんど揮発しないため、揮発したガスによる健康への影響が極めて少ない

といった点をあげることができる。特に1)に示した、アセトン抽出で必要とされる破碎、超音波処理は、この作業による溶媒の漏れや破碎に伴う熱によるクロロフィルの分解の危険を避けることができるため、精度向上に貢献できる。また、この手順を省略できるため、分析にかかる時間をかなり短縮できる。一方、問題点としては、ほとんど揮発しないため、皮膚につくと吸収され肝臓等への健康被害を及ぼすので、注意が必要である。また、ヴィニール等を溶かしてしまうため、液漏れ等には特に注意が必要である。溶媒としてのDMFの利点および他の溶媒の特性については Wright et al. (1997)を参照されたい。

Holm - Hansen 法の利点の一つはフェオ色素が測定できるという点である。しかし、海水中のクロロフィル分解色素を HPLC 等によって測定すると、フェオフィチンはほとんど存在せず、フェオフォルバイト濃度も Holm - Hansen 法で“検出”されるよりもはるかに低いことが明らかになってきた。これは主にクロロフィル *b* の存在が原因である。クロロフィル *b* の蛍光はクロロフィル *a* やフェオフィチンのそれと波長特性が似ているため、Holm - Hansen 法ではクロロフィル *b* の存在によってクロロフィル *a* の定量ができず、また、フェオ色素濃度が過大評価されてしまう。クロロフィル *b* は、淡水中に多い緑藻類だけではなく、原核緑色藻類やユーグレナ藻類が持っている色素である。当初、原核緑色藻類の存在は知られていなかったため、特に外洋水中ではクロロフィル *b* はほとんど存在しないと信じられていた。しかし、研究が進むにつれ、原核緑色藻類は海洋に広く分布し、特に貧栄養の暖水域では優占することが明らかになっている。従って、淡水の影響の強い沿岸域および黒潮系水の影響の強い海域で、Holm - Hansen 法によるクロロフィル *a* 濃度測定はクロロフィル *b* による影響が大きいと考えられる。

2. 採水、濾過、抽出の手順

採水からクロロフィル分析に至る一連の流れおよび注意点

バケツ採水または採水器で採水する。バケツ採水の場合はバケツの共洗いを2 - 3回行う。採水器による採水の場合、海水を採水器に入れたまま放置すると珪藻等大型の植物が採

水器の下のほうにたまることがあるため、採水後できるだけ早く容器に移す事が望ましい。共洗いをして容器に移す。

冷蔵庫に保存しても植物プランクトンは動物プランクトンによる捕食によって減少するので、できるだけ早く濾過する。2時間の放置は 10%程度の減少の原因となり得る。また、直射日光には曝さないように注意する。

定量して濾過する。定量はメスシリンダーまたは5で示す方法等を用いて正確に行う。フィルターは一般にはガラス繊維濾紙 Whatman GF/F を用いる。直径25mm、47mmの濾紙が用いられる場合が多いが、47mmは濾紙に多くの水分を含み、クロロフィル分解と溶媒容量の増加に繋がるため、25mmを用いる事が望ましい。濾過にはかならずゲージのついた引圧ポンプを用い、0.2 気圧以下(120mmHg 以下)となるように調節する(*注1)。それ以上の引圧をかけると平均捕捉粒子直径が0.7 μmといわれているGF/Fフィルターであっても、それ以上の大きさの植物プランクトンが通過してしまう。暖水域では0.7μmより小さな植物プランクトンが多い場合もあるため、必要に応じて0.2 μm 孔径のヌクレポアフィルターを用いる。

濾過後は直ちに溶媒中でクロロフィルを抽出する。アセトン抽出の場合は、クロロフィルは安定ではないので、冷凍保存などすることなく、定められた時間の抽出後に直ちに測定する。DMF 抽出の場合は冷凍庫内暗条件で比較的長期間保存可能である。抽出はフィルターが完全に溶媒中に隠れることによって空気に触れないようにし、溶媒を入れたヴァイアル瓶等は立てておく。フィルターを溶媒に入れる際は、ピンセットの先端が溶媒につかないように注意する。誤ってつけてしまった場合は、丁寧に洗い流すかふき取る。特に DMF の場合は一度ついた溶媒は揮発しないため、次のフィルターに触れると、フィルターが溶媒を吸収して補足した色素の流出・分解を引き起こす。

- 80 以下の deep-freezer または液体窒素が用意できる場合は、溶媒にフィルターを移す前にクライオヴァイアル等容器に入れて長期保存が可能である。その際はフィルターを半分におり、外側から ADVANTEC 定性濾紙等安価な濾紙で覆って水分を吸ってから保存することが望ましい。

注1: 真空機工(株)のポータブルアスピレーター(MDA-015 等)を用いる場合は、ひかない状態でのゲージの目盛りが大気圧の760mmHgとなっていて、引圧をかけると値が小さくなる(大気圧との相対圧力ではなく、内部の圧力を示すようになっている)。このようなゲージの場合は640mmHgより高い圧力でひくようにする。

すべての分析法にあてはまるが、必要十分な測定精度を得るためにはサンプリングから測定に至る過程で生じる様々な誤差要因を理解し、それに対処する事が重要である。分析精度を下げる 1 つの要因は、サンプリングから濾過、抽出に至る過程で、“偏らない標本を正確に定量する”ことが行なわれないことに起因する。上記の で述べた、細胞の沈降による採水器

内の濃度不均一はその一例である。また、揺れる船上では濾過量や抽出溶媒量の正確な定量が容易ではないことがあるため、以下の5では、容易で失敗の少ない定量法や準備のしかたを例として示した。また、クロロフィルは分解しやすい物質であるため、その化学的特性を理解して、採水、濾過、保存、分析の過程における分解を防ぐ事が大切である。クロロフィルの分解要因とそれを防ぐ方法を以下にまとめた。

表1. クロロフィル分解要因と対処方法

分解原因	対処方法
酸素	酸素に触れないようフィルターを溶媒中に完全に入れる。抽出・保存は瓶を立てて行う。
光	採水後は直射日光に曝さないよう注意し、直ちに濾過する。暗瓶に採水すれば光に曝される危険性は少なくなる。濾過は弱光下で行い、濾過後は暗所で保存する(溶媒中では特に光の影響を受けやすい)。
酵素	アセトン抽出の場合はできるだけ早く分析する。すぐに分析できない場合、DMF 抽出であれば - 20 以下の冷凍庫内で保存すれば分解は少ない。また、酵素活性の失われる - 80 以下で保存するのであれば、フィルターのまま保存する事も可能。
水	フィルターに残す水をできるだけ少なくする(必要に応じて、半分に折ったフィルターの水分を他の濾紙で吸収する)。
酸	抽出容器を繰り返し使う場合は酸洗浄しない。
熱	特に採水後濾過までの時間に温まってしまふことに注意する。

3. 蛍光光度計の補正

クロロフィル *a* 試薬を DMF または 90% アセトンに溶かして第 1 標準液を作り、吸光度を測定する。DMF の場合、750 nm と 664 (663.8) nm における吸光度を読み取る。750nm ではクロロフィルによる吸光はないため、664 nm と 750 nm の吸光度の差がクロロフィルによる吸光度 (A_{chl}) となる。すなわち、

$$\text{第 1 標準液のクロロフィル濃度}(\mu\text{g ml}^{-1}) = A_{chl}/0.08874$$

ここで、0.00874 は DMF 中でのクロロフィル *a* 分子吸光係数である ($88.74 \text{ liter}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Porra et al., 1989)。90% アセトンを溶媒とする場合、分子吸光計数は $87.67 \text{ liter}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ となる (Jeffery and Humphrey, 1975)。

この後、第 1 標準液を適宜希釈して標準液系列を作り、係数を求める。一例として、Welschmyer 法および Holm-Hansen 法を用いた場合のキャリブレーションのために東北水

研で使用しているエスセルシートを用意した(このファイルはデジタル化された新型ターナーおよびアナログの旧型ターナーそれぞれについて、アセトンおよび DMF 抽出用について作成してある。必要な場合は齊藤までメールで請求されたい)。印刷したのはデジタル化された Turner Designs AU10-005 蛍光光度計で DMF 抽出用である。デジタル化される以前のターナー蛍光光度計(分析の際、濃度によって door を変えて感度を変えるタイプ)を使用する場合は、それぞれの door 毎に 3 点程度の濃度の標準液を作り、door 毎にファクターを求める。具体的な補正方法等については蛍光光度計マニュアルを参考にされたい。

得られた係数はランプの劣化、フィルターの劣化等によって経時的変化するため、定期的にキャリブレーションを行う必要がある。ランプは徐々に出力が低下するが、最後は急激に劣化する。その際はブランク値がばらつく等の変化がでるが、必ずしも大きな変化がおこるわけではない。ターナー蛍光光度計を使用する場合には、1 つの目安としてターナーが発売している solid standard を用いる手がある。この solid standard の蛍光(棒状の standard を入れる向きによって high と low がある)をキャリブレーション時および毎回の分析時に測定することにより、蛍光光度計の経時変化やランプの急激な劣化を知ることができる。ただし、この solid standard は係数変化の補助的な指標とするべきであって、この蛍光値から係数を計算してはいけない。ロットまたは使用した個々の製品の問題や、不慮の(測定者が気付かない)事故等により、ファクターが急変することを考慮し、あまり長くない間隔でファクターを点検することが重要である。

4. Welschmeyer 法

クロロフィル *b* が当初の予想よりも海洋に多く分布することが明らかになるにつれて、それまでクロロフィル *a* の世界標準定量法として用いられてきた Holm - Hansen 法の欠点が広く認識されるようになった。今日、正確なクロロフィル *a* の定量法としては逆層 HPLC が推薦されているが、蛍光法は、感度の高さ、測定に必要な時間等簡便さから現在でも“便利”な手法である。これらの問題点や、蛍光、吸光、HPLC 法による比較については Mantoura et al. (1997) を参照されたい。

Welschmeyer 法は、Holm - Hansen 法とは波長特性の異なるランプ、および励起、蛍光フィルターを用い、酸添加を行わずに蛍光を測定することによってクロロフィル *b* やクロロフィル分解産物の影響をできるだけ少なくして、クロロフィル *a* の蛍光を測定する(図 1, 2)。蛍光フィルターの透過特性は従来のフィルターに比べて立ち上がり長波長側にシフトし、また狭いため感度が落ちるが、通常の分析には十分な感度を持っている。この手法は Turner 社が用意するクロロフィル *a* オプティカルキット(10-040R)をターナー蛍光光度計に取り付けることによって取り入れることができる。詳しくは Welschmeyer (1994) を参照されたい。

この手法の導入によって、クロロフィル *a* は Holm - Hansen 法よりも正確に測定できるが、従来の手法とのデータの継続性には問題が出てくるであろう。

5. 濾過,分析等に用いる物品および注意事項

クロロフィル標準試薬

世界中でシグマのクロロフィル *a* が用いられているが、和光純薬の製品でも良い。しかしシグマの製品にはやや難溶性の不純物が入っていることが知られている(通常の蛍光法クロロフィル分析には問題がない、和光の製品については不明)。東北水研では JUNTEC の製品を用いている。これは不純物が少なく、HPLC分析には特に適しているうえ、シグマ製品よりは安価である (http://www.juntec.co.jp/chloro/chlo_prd_inf.htm)。

いずれの製品も窒素ガス等で空気を置換した容器内で冷凍、暗所保存する必要がある。スタンダードを開封した後は使い切ることが望ましいが、保存する場合はガラスアンプル等に入れ、窒素ガスで空気を置換した後暗所冷凍保存する。90%アセトン内ではクロロフィルは不安定なので保存できないが、DMF 中では比較的長期保存が可能で、東北水研では JUNTEC の全量を200mlの DMF に溶かして第1標準液とし、-40℃の冷凍庫で遮光して保存している。ただし、いずれの場合でも使用前に吸光度による濃度の確認が必要なのはいうまでもない。また、400 - 750nm の間で吸光度をスキャンして、吸収特性に変化がないことを(分解産物ができていないことを)確認することが望ましい。

DMF・アセトン容器

DMF は揮発性がなく、一度皮膚に付くと洗い流さない限りゆっくりと吸収されるうえ、ビニール製品を溶かすため、漏れのない容器の使用が望ましい。ガラス製のヴァイアル瓶は蓋をあけるときの容器外側に漏れ出すことが多いため、健康面からも、容量の正確さからも適当ではない。ザルステット社の遠心チューブ(8ml, アシスト p54, No.60.542)は、蓋を開けた時に容器の外側にこぼれることがほとんどなく、またガラス容器にしばしば見られる蓋と容器の捻子口の不一致に伴う漏れがないため便利である。東北水研では、航海前に6mlのDMFをディスペンサーで入れ、船上ではフィルターを入れるだけの状態に準備している。

ディスペンサー

ディスペンサーの目盛りはあてにならないものがあるので、補正しておく必要がある。また、ディスペンサーの一部の製品は再現性が著しく低いものがある。特に、使用条件(押し下げるスピード等)による影響が大きかったり、使用しているうちに目盛りがずれやすい製品があるため、前もって繰り返し精度を測定しておく必要がある。東北水研ではザルステットの容器に、6mlのDMFを入れるため、10mg精度の秤で6.35gが入るように(DMFの密度は25℃で0.9445)ディスペンサー(モルトロニックを使用している)の目盛りをあわせて注入している。使用しているうちにディスペンサーの目盛り位置がずれることが(モルトロニックの場合ほとんどないが、可能性は)あるため、20本ごとに重さを計量して容量が正確な事を確認している。パッ

キン等消耗品劣化は精度を著しく低下させるため注意が必要である。

また、溶媒を入れるのにピペットを用いる際にも、上に述べた精度等に関する記述があてはまる。ピペットは有機溶媒用を用いる。特にアセトンの場合は内部の真空を損ね精度低下を招きやすいので注意する。

サンプル容器

濾過量は通常メスシリンダーで測定されるが、時化による揺れや船酔い、また不慣れな補助調査員等の要因は比較的大きな測定誤差を生みやすい。東北水研ではクロロフィルの分析容量を測定するためにメスシリンダーを用いず、100mlのアイボーイ(ポリプロピレン製、この場合容積は114ml)いっぱいに入れ、その全量を濾過している。このことによって高い精度での定量が極めて簡単に行える。アイボーイはロットによる容量の差が小さいが、一部のポリエチレン製品は容量の個体差が大きいため注意が必要である。ターナー蛍光光度計を用いる場合、感度設定にもよるが、一般には100 - 200mlの濾過量があれば十分な精度で測定可能であるうえ、ある程度高濃度になっても希釈なしで分析が可能である。

メスシリンダー

船上ではプラスチック製が便利であるが、ガラス製よりも目盛りはあてにならないため(ガラス製にも不正確なものがある)、目盛りを信用してはいけない。かならず使用前に検定し、必要であれば正確な目盛りをつけて使う。ポリエチレン製や PFA 製のやわらかいものは梱包時の強い圧力等で変形することがあるため、ポリプロピレン、TPX や PMP 製のほうが安心である。一定量を定量するために、必要とする容量の位置に穴をあけて使用方法もある。

ピンセット

ピンセットはかならず先端の丸くなったフィルター用の製品を用いる。先のとがったものは丁寧に扱ったつもりでもフィルターに傷を付け正確な濾過ができなくなる。ミリポアのフィルターピンセット(XX6200006)は、置いた時にピンセットの先端がつかず、また錆にくいため便利である。

引用文献

Holm-Hansen, O., Lorenzen, C. J., Holmes, R.W., J. D. H. Strickland 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Cons. Int. Explor. Mer* : 30, 3-15.

Jeffrey, S. W., Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 167: 191-194.

- Mantoura, R. F. C., Jeffrey, S. W., Llewellyn, C. A., Claustre, H., Morales, C. E. 1997. Comparison between spectrophotometric, fluorometric and HPLC methods for chlorophyll analysis. *In: Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Wright, S. W. eds. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern*, 261-282, UNESCO Publishing.
- Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. 1989. Determination of accurate coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta*, 975: 384-394.
- Suzuki, R., Ishimaru, T. 1990. An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using n,n-dimethylformamide. *J. Oceanogr.*, 46, 190-194.
- Welschmeyer, N. A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.*, 39, 1985-1992.
- Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. *In: Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Wright, S. W. eds. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern*, 261-282, UNESCO Publishing.

(これらの文献が必要な場合は齊藤までメールで請求されたい)

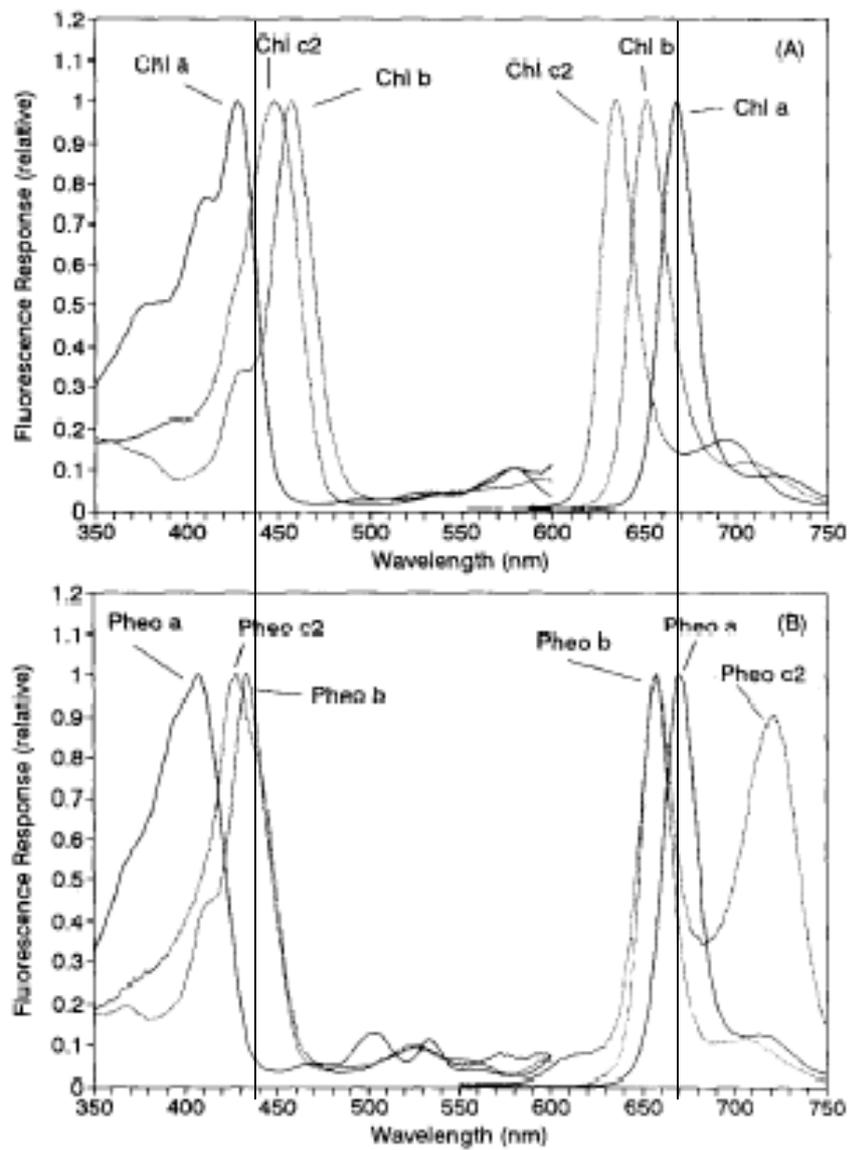


図1. クロロフィルとその酸化物の励起波長(600nm以下)および蛍光波長(550nm以上)。クロロフィル*a*の蛍光波長にクロロフィル*b*やフェオフィチン*a*の蛍光波長が重なることに注意。クロロフィル*a*の励起波長はクロロフィル*b*やフェオフィチンに比べて短いため、励起波長を430-440nm付近に限定すれば、クロロフィル*b*やフェオフィチン*a*をあまり励起させることなくクロロフィル*a*を励起させることが可能。図2を参照。Welschmeyer(1994)から一部改変。

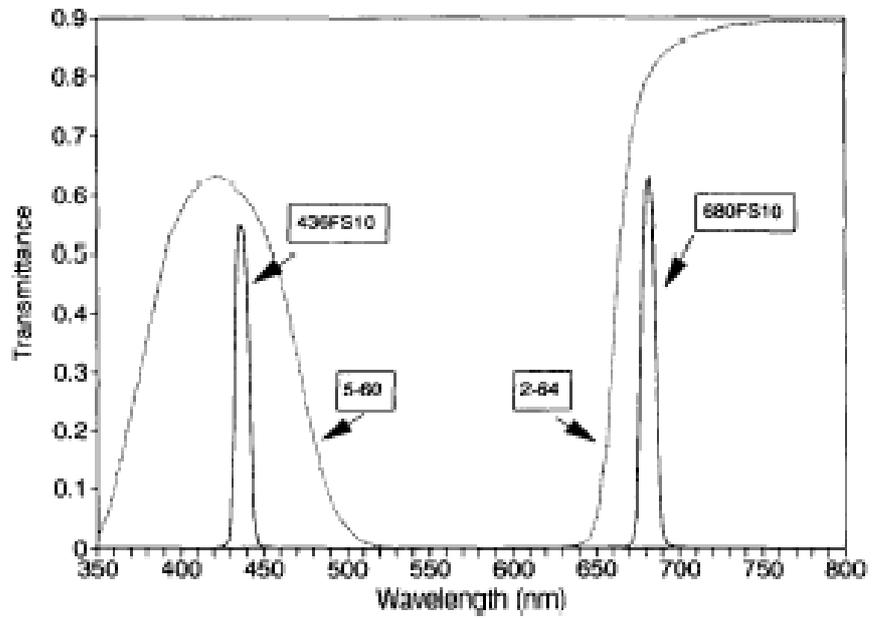


図2. Holm - Hansen法および Welschmeyer 法で用いられる励起フィルターおよび蛍光フィルターの透過波長 (Welschmeyer, 1994)。5 - 60と2 - 64が Holm - Hansen 法で用いられるフィルター。436FS10と680FS10が Welschmeyer 法で用いられるフィルター。

参考 キャリブレーション用エクセルシートのプリントアウト。水色の部分に数値を入れて用いる。

Date	2002/1/1					
Original solution: A part of Juntec Chla is soloved by 100 ml of DMF and acetone						
	DMF				水色のバックグラウンドのところに測定値等を入力する。	
		88.74	l/g/cm		Chl分子吸光係数	
OD at 664nm (cm ⁻¹ -1)		1.96			標準液のクロロフィル濃度	
OD at 750		0.051				
Concentration		21.512	mg/l			
blank		0.367			校正中最初、中間、最後の3回測定した平均	
		0.365			読み取り値からブランクを引いた値	
		0.355				
avg		0.362				
	Dilution	Conc. (mg/l)	Read	Read-blank	Factor	
		0.02	0.4302	969	969.000	0.0004440
		0.01	0.2151	501	500.638	0.0004297
標準液の希釈率		0.005	0.1076	250	249.638	0.0004309
		0.0025	0.0538	127	126.638	0.0004247
		0.001	0.0215	50.9	50.538	0.0004257
		0.0005	0.0108	25	24.638	0.0004366
		0.00025	0.0054	13.1	12.738	0.0004222
		0.0001	0.0022	5.4	5.038	0.0004270
				avg	0.0004301	この値を計算に用いる
				sd	0.00000475	
				cv	0.01104362	
				slope	0.00042996	
				median	0.00042703	
						solid stdの読み取り値
Solid std	H		88.9	88.5376667	38.079	
	L		18.8	18.4376667	7.930	