

淡水域のChlorophyll-a測定におけるエタノール抽出条件の検討

Examination of Extraction Condition of Chlorophyll-a
by Ethanol in Fresh Water根本富美子¹⁾・小野 美幸²⁾・福原 晴夫³⁾Fumiko NEMOTO¹⁾, Miyuki ONO²⁾ and Haruo FUKUHARA³⁾

Abstract

The determination of chlorophyll-a is important for estimating the primary production by phytoplankton, which is fundamental for determining the material metabolism in a lake. Although extraction of chlorophyll was performed with the 90% acetone solution in the original report, we used ethanol solution because its extraction rate was higher than that of acetone. The extraction condition by ethanol was examined using the SCOR-UNESCO method. The concentration of chl-a extracted under light condition was far lower than that under dark condition, and there was a significant difference in chl-a concentration between light and dark extraction condition after only one hour. The chl-a concentration was not different between room temperature (about 20°C) and low temperature (about 5°C) during one week under dark extracting condition. These results indicate that appropriate and convenient conditions for determination of chl-a in ethanol extraction are: 1) extracting chl-a at room temperature, and 2) determining at least within one week. In particularly, one should keep in mind that light illumination should be minimum during the entire measurement process to avoid the decomposition of chl-a.

Key words: クロロフィル a, エタノール抽出, 3点法, chlorophyll-a, ethanol extraction, SCOR-UNESCO method

1. はじめに

植物プランクトンによる一次生産は、湖沼における有機物生産の多くを占めるため、湖沼での物質循環を考える上で重要な要素である。また、クロロフィル a はほとんどすべての植物に含まれるため、光合成生物現存量の指標となる。したがって、クロロフィル a 量を測定することにより一次生産者の現存量と

生産の概要を知ることができる。

水域における光合成色素、特にクロロフィルの分析には、UNESCOの「光合成色素の分析に関する専門家ワーキンググループ」(SCOR (Scientific Committee on Oceanic Research) Working Group No. 17) によるSCOR-UNESCO法(いわゆる3点法)(SCOR-UNESCO Working Group 17, 1966)が一般的に用いられている。本法は、そ

2008.12. 1 受理

¹⁾ 新潟大学大学院教育学研究科: Graduate School of Education, Niigata University

²⁾ 新潟大学大学院教育学研究科: Graduate School of Education, Niigata University
現在; 横浜こども科学館: Yokohama Science Center

³⁾ 新潟大学教育学部: Faculty of Education, Niigata University

れまでのクロロフィル分析法の比較検討と、独自の検討の元に決定されたもので、そのオリジナルは、1) 約1 μg のクロロフィル a を含む体積の海水を MgCO_3 をうすく敷いた (約10 mg/cm^2) ろ紙 (セルロースメンブレン) でろ過する, 2) 貯蔵の必要な場合は、シリカゲル乾燥下、暗条件、1 $^{\circ}\text{C}$ かそれ以下で2ヶ月間可能であるが、湿らしたままで直ちに抽出に入る, 3) 5-15 mlのガラス管ビンに2-3 mlの90%アセトン液をいれて、1分間ホモジナイズする。10分間暗条件で抽出し、10分間・5000 gで遠心分離する, 4) バンド幅3 $\text{m}\mu$ またはそれ以下の分光光度計で4-10 cmのセルを用いて、波長750, 663, 645, 630 $\text{m}\mu$ で吸光度を測定する, 4) 計算は750 $\text{m}\mu$ の吸光度を差し引いた, e663, e645, e630について

$$\text{Chl-a} = 11.64 \text{ e663} - 2.16 \text{ e645} + 0.10 \text{ e630}$$

(Chl-b, Chl-cは略)

の値と抽出液量, ろ過量から $\mu\text{g}/\text{L}$ (mg/m^3) を単位として求める, となっている。

この方法は海洋におけるクロロフィルの分析に開発されたものであるが、陸水においても変法が広く用いられている (有賀, 1969; 高橋, 1984)。陸水においては一般に MgCO_3 は用いられていない。その後、ろ紙の開発や抽出液・抽出法の検討が数多く行われ (Nusch, 1980; Marker et al., 1980; Marker and Junks, 1982), 水域やプランクトン種によっていくつかの変法も使用されている。

原報においては90%アセトン溶液を用いてクロロフィルの抽出を行っているが、アセトンに代わり、エタノールでの抽出が用いられる場合がある (西條・三田村, 2002)。ここでは、簡便なクロロフィル a の定量のため、抽出過程で90%アセトンのかわりに実験処理の簡単なエタノールを用いる方法の検討を行う。

2. 分析方法

1) アセトン抽出とエタノール抽出の検討

アセトン抽出

適度な植物プランクトンを含む試水150 ml (新潟市佐潟で2006年5月15日に採水したものを2倍に薄めた) を $\phi 47\text{mm}$ のワットマンGF/Cで濾過した。濾紙をピンセットでつまみ、小型の乳鉢中に細かく切り刻みながら入れた。その後、少量ずつ90%アセトンを加えながら、ペースト状になるまで乳鉢で良く

磨り潰した。これを容量10 mlの遠沈管に移した。使用したピンセット、はさみ、乳鉢、乳棒を少量の90%アセトンで洗い、その液も遠沈管に加えた。遠沈管をアルミ箔で包み、1.5時間室温で抽出した。その後、遠心分離し (3000 rpm, 15分間)、上澄み液を採取し、抽出液量を測定した。分光光度計 (Hitachi 200-10) を用い、1 cmセルで、波長750, 663, 645, 630 $\text{m}\mu$ を測定し、SCOR-UNESCO法でクロロフィル-a (以下Chl-a) 濃度を計算した。実験は5連で行った。

エタノール抽出

上記で使用した同じ試水を $\phi 47\text{mm}$ のワットマンGF/Cで濾過した。濾過済みの濾紙を一枚ずつ濾過部分が内側になるように小さく丸め、100%エタノールを5.0 ml入れた容量10 mlの遠沈管の中に入れた。アルミ箔で包み24時間冷蔵 (5 $^{\circ}\text{C}$) で抽出した。その後、遠心分離し (3000 rpm, 15分間)、上澄み液をアセトン抽出と同じ方法で定量した。エタノール抽出の場合、遠心分離から分光光度計による測定まで、出来るだけ光を照射しないように注意した。実験は5連で行った。

2) エタノール抽出における温度条件 (冷蔵と冷凍)

適度な植物プランクトンを含む試水150 ml (新潟市佐潟で2006年5月15日に採水したものを2倍に薄めた) を $\phi 47\text{mm}$ のGF/Cで濾過した。抽出は上記のエタノール抽出と同様に行い、抽出温度を冷蔵 (5 $^{\circ}\text{C}$)、冷凍 (-20 $^{\circ}\text{C}$) とした。実験は5連で行った。

3) エタノール抽出における温度条件 (冷蔵と室温) と光条件

適度な植物プランクトンを含む試水150 ml (新潟市佐潟で2006年5月30日に採水したものを2倍に薄めた) を $\phi 47\text{mm}$ のGF/Cで濾過した。抽出は1) のエタノール抽出と同様に行ったが、遠沈管は、明所抽出 (明条件: 室内光条件) のものはそのまま、暗所抽出 (暗条件) のものは1本ずつアルミ箔で包んだ。また、抽出温度を室温 (約20 $^{\circ}\text{C}$) と冷蔵 (5 $^{\circ}\text{C}$) とした。実験は5連で行った。

4) エタノール抽出時間の検討

適度な植物プランクトンを含む試水150 ml (新潟市佐潟で2006年5月30日に採水したものを2倍に薄めた) を $\phi 47\text{mm}$ のGF/Cで濾過した。抽出は1) のエタノール抽出と同様に行い、明所抽出のものはそのまま、暗所抽出のものは1本ずつアルミ箔で包ん

だ。抽出温度は、明・室温、暗・室温、暗・冷蔵（5℃）とし、抽出時間は1時間、12時間、24時間、48時間、72時間、168時間で行った。すべてのろ紙をろ過（暗・室温保存）後に抽出を開始した。実験は3連で行った。

3. 結果

1) アセトン抽出とエタノール抽出

エタノールによる抽出時間は24時間であるが、後述4)の結果より1時間以上には差がないためアセトンによる1.5時間と比較が可能である。同じ試水のアセトン抽出によるChl-a濃度は36.5~47.9 $\mu\text{g/L}$ 、平均40.6 (± 5.0 , $n = 5$) $\mu\text{g/L}$ であり、エタノール抽出によるChl-a濃度は65.2~71.0 $\mu\text{g/L}$ 、平均67.6 (± 2.5 , $n = 5$) $\mu\text{g/L}$ であった。両者には有意な差がみられ (t -test, $p < 0.01$)、エタノール抽出での値が高くなった。

2) エタノール抽出における温度条件（冷凍（-20℃）と冷蔵（5℃））

図1に暗条件抽出におけるChl-a濃度を示す。暗

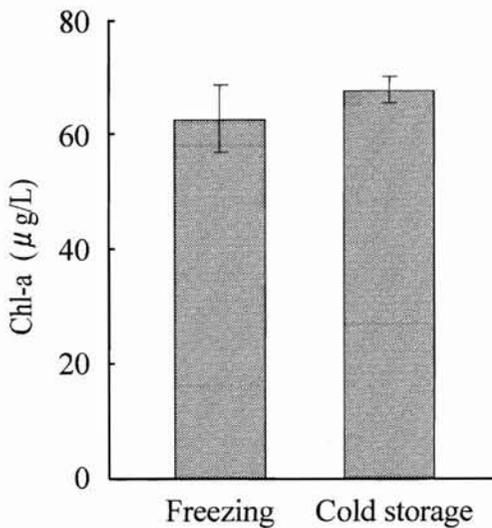


Fig. 1. Comparison of chlorophyll-a concentrations extracted in freezing and cold storage conditions during 24 hours under dark condition.

図1. 暗所、冷凍と冷蔵条件において24時間抽出を行ったクロロフィルa濃度の比較。

条件では冷凍 ($62.6 \pm 6.6 \mu\text{g/L}$, $n = 5$) と冷蔵 ($67.6 \pm 2.5 \mu\text{g/L}$, $n = 5$) に有意な差はなかった (t -test, $p > 0.05$)。

3) エタノール抽出における温度条件（冷蔵（5℃）と室温（約20℃））と光条件

図2に暗条件の冷蔵と室温、明条件の室温におけるChl-a濃度を示す。暗条件の冷蔵 ($52.2 \pm 1.0 \mu\text{g/L}$, $n = 3$) と室温 ($54.2 \pm 1.2 \mu\text{g/L}$, $n = 3$) に有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。室温における明条件ではChl-a濃度が暗条件の約10分の1となり、極めて低かった (Tukey-Kramer test, $p < 0.01$)。

4) エタノール抽出時間の検討

明所・室温におけるChl-a濃度は、抽出時間1時間の32.3 (± 6.3 , $n = 3$) $\mu\text{g/L}$ から12時間の6.4 (± 0.4 , $n = 3$) $\mu\text{g/L}$ にかけて急激に低下し、168時間（1週間）では3.2 (± 0.2 , $n = 3$) $\mu\text{g/L}$

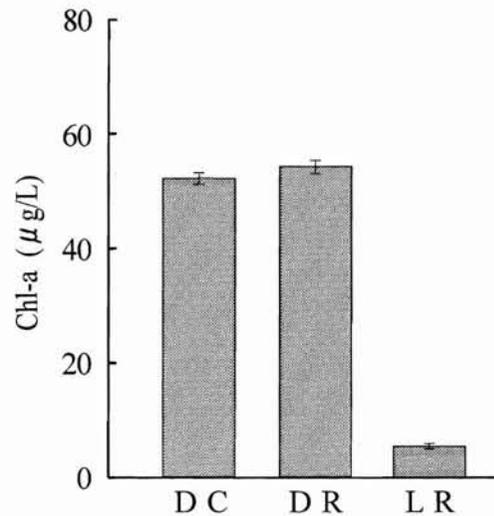


Fig. 2. Comparison of chlorophyll-a concentrations extracted under different temperature and light conditions during 24 hours: dark and cold storage (DC), dark and room temperature (DR), light and room temperature (LR).

図2. 異なった光と温度条件下において24時間抽出を行ったクロロフィルa濃度の比較: 暗所冷蔵 (DC), 暗所室温 (DR), 明所室温 (LR)。

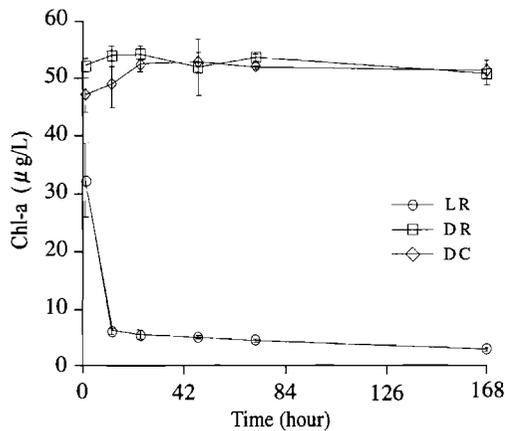


Fig. 3. Chlorophyll-a concentrations and extraction time in different light and temperature conditions: light and room temperature (LR), dark and room temperature (DR), dark and cold storage (DC).

図3. 異なった光と温度条件下における抽出時間によるChl-a濃度の変化: 明所室温 (LR), 暗所室温 (DR), 暗所冷蔵 (DC).

で12時間以降の変化は小さかった (図3). 暗所・室温, 暗所・冷蔵ともに, 同温度条件下では1~168時間の間でChl-a濃度に有意な差はみられなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$). 抽出時間1時間で, 明所・室温と暗所・室温, 明所・室温と暗所・冷蔵の間に有意な差が認められた (Tukey-Kramer test, 明所・室温と暗所・室温: $p < 0.01$, 明所・室温と暗所・冷蔵: $p < 0.01$). しかし, 暗所・室温と暗所・冷蔵の間では, 72時間を除いては有意な差は無かった.

4. 考察

抽出溶液としてアセトンとエタノールの比較では同じ式を適用した場合, Chl-a濃度はアセトン抽出ではエタノール抽出の約60%であった. アセトン抽出では, 植物プランクトンを含むろ紙を出来るだけ磨り潰す, 磨り潰した液を遠沈管に移す, 遠沈管から液量測定のため再度メスシリンダー等に移す作業があり, これらを注意深く行っても, 器具への附着などで損失がおこり, すべてのクロロフィルを計

測できていないという可能性がある. エタノール抽出では液の移し替えによる損失はない.

アセトン, エタノール, メタノールではメタノールでの抽出効率が最も良いという結果 (Marker and Junks, 1982) や, メタノールとエタノールの抽出効率は同率であるがアセトンより良い (Nusch & Palme, 1975) という結果が知られている. アセトンよりもエタノールの抽出効率が高い結果は本実験結果と一致している. クロロフィルの抽出にメタノールを使用しない理由として, Nusch (1980) は毒性があること, より高価であること, 抽出中に化学反応 (dephytylizationやアロメリ化反応) を起こし易いことをあげている. 本実験ではメタノールとエタノールの抽出比較は行っていないが, Nusch (1980) の見解は妥当と解される.

エタノールを用いて行った抽出では, 明所での抽出量は暗所での抽出量に比べ極端に少ない結果となった. 抽出時間1時間で明所と暗所に有意な差がみられた. これはクロロフィルが光によって分解されたためと考えられる. 明所抽出は12時間抽出で, 1時間抽出の約5分の1の濃度となったことから, 光による分解は非常に早いことがわかる. 光の照射を出来るだけ避けることは, エタノールを用いて抽出するときの大きな注意点となる.

抽出を行う温度としては, 暗条件下では72時間以外は室温と冷蔵に有意な差が認められず, その差も極めて小さいため, 室温抽出と冷蔵抽出に差はないといえる. また, 暗条件下では, 冷凍と冷蔵抽出にも差はなかった. Nusch (1980) は沸騰エタノール (78°C) 抽出が最も効果的であるとしているが, 危険性の点で簡便な分析では問題と思われる. 室温での抽出はルーチンでの実験上極めて簡便である.

抽出時間の検討では, 室温, 冷蔵ともに本実験で用いた試料では1~168時間 (1週間) のChl-a濃度に有意な差がみられなかった. Nusch (1980) は沸騰エタノール (78°C) 後20-23°C抽出では24時間で最もよく, 1週間の間に多少の低下をみているが, 20°C抽出後1-4°C保存では24時間以降7日間は安定していることをみている. 暗条件下で貯蔵するなら, 少なくとも1週間程度は安定であるといえる.

クロロフィルの抽出に多くの場合90%アセトン溶液が用いられているのは, 酸性化することによりクロロフィルの分解産物 (フェオ色素) を定量化する場合, エタノール, メタノールに比べて, スペクトラムがpHに“よりセンスイティブでない”ことによる. クロロフィルの分解産物の定量を必要としない

場合は抽出効率のよいエタノールを使用するほうが良いと言える。

以上のことからクロロフィル a 量の測定は、抽出溶液としては100%エタノールを用い、暗所の室温または冷蔵で抽出を行い、抽出時間は少なくとも1週間以内であれば1時間以上で可能である(我々の研究室では水域による植物プランクトンの違いを考慮して24時間後に測定している)。また測定の全過程において、クロロフィルの分解を避けるため、光の照射を最低限とするよう十分注意する必要がある。

5. 謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究補助金 (Nos.17510193, 20510214) によって行われた。

6. 引用文献

有賀祐勝 (1969): クロロフィルの測定法. 陸水生物生産研究法, 陸水生物生産測定方法論研究会 (編): 17-20. 講談社, 東京.

Marker, A. F. H. and S. Junks (1982): The spectrophotometric analysis of chlorophyll a and phaeopigments in acetone, ethanol and methanol Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 16: 3-17.

Marker, A. F. H., C. A. Crowther and R. J. M. Gunn (1980): Methanol and acetone as solvents for estimation chlorophyll a and phaeopigments by spectrophotometry. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 14: 52-69.

Nusch, E. A. (1980): Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 14: 14-36.

Nusch, E. A. and G. Palme (1975)*: Biologische Methoden für die Praxis der Gewässeruntersuchung 1. Bestimmung des Chlorophyll a und Phaeopigmentgehaltres in Oberflächenwasser. GWF, 116 (12): 562-565.

西條八東・三田村緒佐武 (2002): 新編湖沼調査法. 講談社サイエンティク.

SCOR-UNESCO Working Group 17 (1966): Determination of photosynthetic pigments. In Determination of photosynthetic pigments in sea-water, UNESCO (ed): 11-36.

高橋正征 (1984): クロロフィル a. 湖沼環境調査指針, 日本水質汚濁研究協会 (編): 138-140.

*In Nusch (1980)