

ろ紙吸光法によるクロロフィル a 測定の有用性について

The Rapid and Easy Determination of Chlorophyll a by Filter Absorbance Method

菰田 顕彦*
 Akihiko SONODA *

 中村 圭吾*
 Keigo NAKAMURA *

 島谷 幸宏*
 Yukihiro SHIMATANI *

ABSTRACT : Chlorophyll *a* (Chl.*a*) concentrations are determined by acetone-extract-monochromatic method and Filter Absorbance Method (FAM) at artificial rivers in Aqua Restoration Research Center (ARRC). A correlation coefficient of Chl.*a* data gained by both methods is $r=0.95$ at Chl.*a* range 2-200mg/m³. This result prove that FAM is very useful for Chl.*a* determination. This method is very easy, cheap, quick to measure and rather precise. The primary error factors on FAM are SS (package effect) and pheophytin *a* which is Chl.*a* degradation products.

KEYWORDS : Chlorophyll *a*, Filter absorbance method, Algae Index, Aqua Restoration Research Center

1. はじめに

クロロフィル（葉緑素）は、水中の植物プランクトンの現存量や光合成による有機物生産力を推定する上で、重要な指標の一つである。クロロフィルには、図1に示すように、わずかに構造が異なる a, b, c, d が知られている。この内クロロフィル a（Chl.*a*）は全ての高等植物及び藻類に存在し、光合成の反応中心として働くことから、通常最も重視される。クロロフィルは生きた細胞中では比較的安定であるが、細胞が死滅したり、有機溶媒に抽出されたりすると分解しやすい物質である。特に重要な分解過程は酸の作用により Mg 原子が離脱し 2 原子の H と置換するフェオフィチン化であり、これにより吸収スペクトルが変化する（図2参照）。Chl.*a* がフェオフィチン a（Pheo.*a*）になる場合、90 %アセトン溶液中では、波長 665nm における吸収ピーク強度は約 40 %減少する¹⁾。この性質は Chl.*a* の分析にとって重要な意味を持つ。

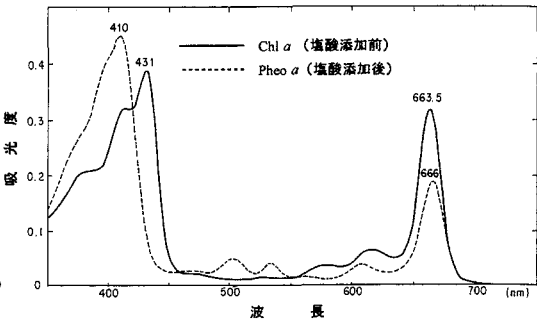
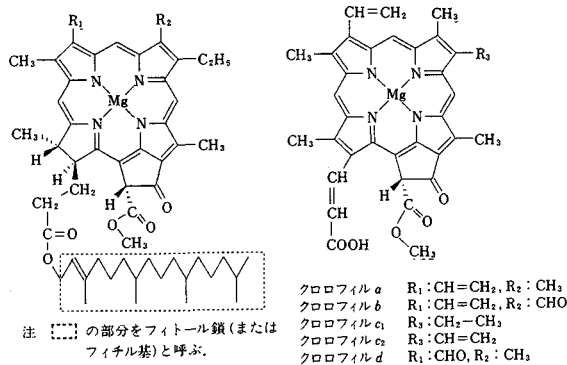


図2 フェオフィチン化による Chl.*a* の吸収スペクトル変化³⁾（溶媒：90%アセトン）

* 建設省土木研究所環境部河川環境研究室 River Environment Division, Public Works Research Institute

Chl.aの分析は通常手分析で行われるが、①煩雑で熟練を要し、②分析者の技量による個人差が出やすく、③分析過程において分解が進みやすく、④手作業が多く手間が掛かることから多数の検体を処理するのが困難であり、⑤そのため分析単価が高い、などの短所を有している。

これに対し、数年来当研究室で研究を進めている「ろ紙吸光法」は、測定が簡単・迅速、安価かつ総合的な情報が得られる（濁り、藻類、有機物など）利点を有する。このため、手分析では手間及び経費の制約から不可能なほどの、空間的・時間的に密度の高い調査が可能になる。本研究では、ろ紙吸光法から得られる藻類指標に着目して Chl.a の測定を試み、手分析との相関性と、ろ紙吸光法における誤差要因及び適切な測定条件について検討するものである。

2. ろ紙吸光法の概要

通常の吸光度法が溶液の吸光度を測定するのに対して、ろ紙吸光法は試料水をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ紙に残った懸濁物質の波長毎の反射光を測定し、それを吸光度曲線で表現する方法である

（図3、図4）。吸光度分布から、例えば次の3指標を得ることができる^{4) 5)}。

①総吸光度（TA:total absorbance）：濁りを表す指標。

波長400～800nm（可視光部）の吸光度の積分値。

②藻類指標（AI:algae index）：藻類の存在量を表す

指標。クロロフィルaによる吸収ピークである670nmの吸光度から、濁りによる吸光度のベースラインである750nmの吸光度を差し引き、100倍したもの。100倍するのは単に数値を取り扱い易くするためである。

③紫外吸光指数（UVAI:ultra-violet absorbance index）：

有機物の指標。有機物の一部は波長240～300nmの紫外線を吸収する性質がある。240nmと300nmにおける吸光度を結ぶ直線と、その間の吸光度曲線で囲まれる面積を用いる。

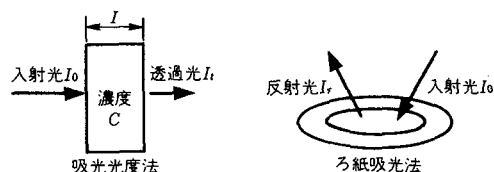


図3 吸光度法とろ紙吸光法⁵⁾

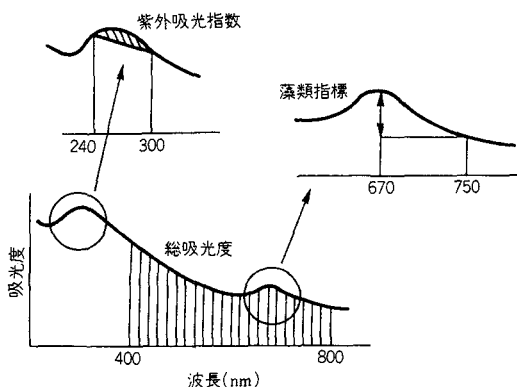


図4 総吸光度、藻類指標、紫外吸光係数⁵⁾

3. 実験方法

3.1 サンプルング方法

建設省が岐阜県羽島郡川島町の木曽川河川敷内に設置した、「自然共生研究センター」の全長800mの3本の実験河川をフィールドとして、平成10年11月から平成11年3月にかけて、2回の人工洪水時及び13回の平常時において、各河川の最上流地点及び最下流地点の計6地点で採水した。各地点ともに、平常時においては1日1回午前中に採水し、人工洪水時には増水時から減水時にかけて3～5回（内1～3回が増水時、ピーク時1回、減水時1回）採水した。

採水時には、天候・気温・水温・透視度・水位を観測・測定した。ろ紙吸光法用試料は1Lポリビンに満水として、冷暗状態で土木研究所に送って分析し、手分析用試料は別のポリビンに採り、速やかに名古屋市内の分析所に搬入して分析に供した。

Chl.aの全分析検体数は、ろ紙吸光法及び手分析でそれぞれ平常時78検体、洪水時50検体の合計128検体である。なお同一試料による繰り返し分析は行わなかった。

3.2 分析方法

(1) クロロフィル手分析方法

建設省河川局監修「河川水質試験方法(案)[1997年版]」、アセトン抽出－単波長吸光光度法により Chl.a と Pheo.a を同時分析した。分析操作の概略フローを図5に示す。

(2) ろ紙吸光法（藻類指標）

試料を100ml、200ml、300ml、400mlの4段階に分取し、ガラス繊維ろ紙（Whatman GF/B、孔径1μm、直径47mm）で各々吸引ろ過し、それらのろ紙を約105℃で2時間乾燥させた。測定は、自記分光光度計（島津製作所 UV-2400PC）に積分球（ISR-2200）をつけて行った。ろ紙ホルダーに試料ろ紙をはさみ、蒸留水100mlをろ過して乾燥させたろ紙を対照として、波長670nm及び750nmの吸光度を測定した。

(3) その他の項目

透視度：100cm透視度計により現地測定した。

SS・濁度：「河川水質試験方法(案)[1997年版]」により分析した。

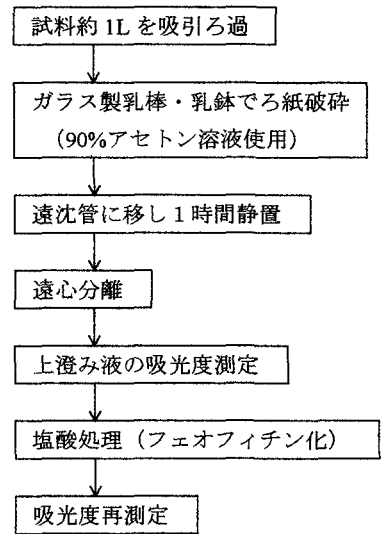


図5 クロロフィル手分析方法

4. 実験結果と考察

4.1 相関性と回帰式

(1) 平常時データ

平常時水質データの概要を表1に示す。ここで、フェオフィチン率 = $100 \times \text{Pheo.a} / (\text{Chl.a} + \text{Pheo.a})$ であり、A₁₁₀₀～A₁₄₀₀は試料のろ過水量100ml～400mlの藻類指標を示す。

SSは2検体を除いて10mg/l以下であり、SSによる妨害が生じる恐れはほとんどない。

一方、フェオチン率は4%から77%の広範囲に渡っているが、藻類指標にはChl.aとPheo.aの両者が異なる強度で応答する（670nm付近の吸光係数が異なる）ため、フェオフィチン率の大幅な変動は、ろ紙吸光法（藻類指標）によるChl.aの測定精度を低下させる可能性がある。

手分析値と藻類指標との相関係数を表2に示す。Chl.a及びChl.a+Pheo.aとの相関は良好であり、ろ過水量が増えるにしたがって増大するが、Pheo.aとの相関はほとんどない。図6に散布図の一例を示す。

表2 手分析値と藻類指標との相関係数

	Chl.a	Pheo.a	Chl.a+Pheo.a
A ₁₁₀₀	0.89	0.41	0.88
A ₁₂₀₀	0.93	0.43	0.92
A ₁₃₀₀	0.96	0.48	0.95
A ₁₄₀₀	0.97	0.45	0.95

表1 平常時水質データの概要 (n=78)

項目名	単位	最小値	最大値	平均値	標準偏差
透視度	cm	29	100	57	18
濁度	度	2.0	8.7	5.3	1.6
SS	mg/L	1.0	13.0	5.4	2.3
Chl.a	mg/m ³	0.5	42.7	8.7	9.8
Pheo.a	mg/m ³	0.4	9.9	3.5	2.1
フェオフィチン率	%	4	77	39	21
A ₁₁₀₀	abs	0.92	9.68	3.18	2.12
A ₁₂₀₀	abs	2.32	19.3	6.36	4.02
A ₁₃₀₀	abs	3.43	28.0	9.61	5.93
A ₁₄₀₀	abs	4.7	38.4	12.8	7.76

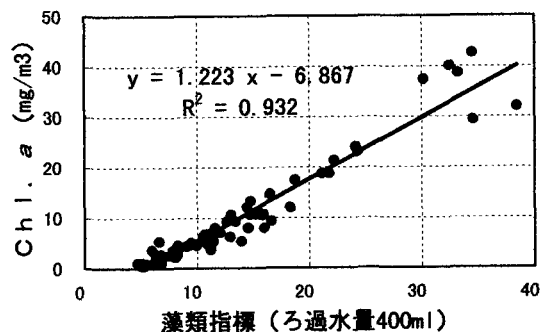


図6 Chl.aと藻類指標との散布図

(2) 全データ

洪水時を含む全水質データの概要を表3に示す。
SSは最大 1225mg/l にも達している。ろ紙吸光法ではろ紙表面の反射光を測定するため、SSが多いと package effect による妨害が生じやすい。これは、ろ紙上に粒子が積層することによって、下層の粒子が覆い隠されて、測定対象物質量と吸光度との間の直線性が失われる現象である。表3の藻類指標の最大値に着目すると、ろ過水量が増えてもAIが増加していないことから、ろ過水量200ml以上では明らかにSSによる極端な妨害を受けていると考えられる。したがって、全データの検討はAI₁₀₀(ろ過水量100mlの藻類指標)を使用して行うことにする。

表3 全水質データの概要 (n=128)

項目名	単位	最小値	最大値	平均値	標準偏差
透視度	cm	3	100	45	24
濁度	度	2.0	255	18.3	39.2
SS	mg/L	1.0	1225	68.8	184
Chl.a	mg/m ³	0.5	454	24.3	59.3
Pheo.a	mg/m ³	0.4	276	17.0	42.8
フコフィチン率	%	4	85	42	20
AI ₁₀₀	abs	0.92	34.6	5.42	5.61
AI ₂₀₀	abs	2.32	29.1	8.78	6.32
AI ₃₀₀	abs	3.43	29.6	11.5	6.90
AI ₄₀₀	abs	4.7	38.4	13.9	7.83

図7にChl.aと藻類指標との散布図を示す。Chl.aが200mg/m³以下のデータは一本の曲線付近にあるが、Chl.aが300mg/m³以上の3データのみが、大きく外れている。これらのデータはいずれもSSが極めて高い(それぞれ715, 1100, 1225mg/l)ため、おそらくSSの妨害を強く受けて藻類指標が過小となっているものと考えられる。そこで、この3データを除いて回帰式を作成した。

図8と図9にその結果を示す。平常時と比べ package effect が大きいいため、直線ではなく2次曲線式となった。Chl.aでは $r = 0.95$ 、Chl.a+Pheo.aでは $r = 0.98$ と、相関性は極めて良好である。

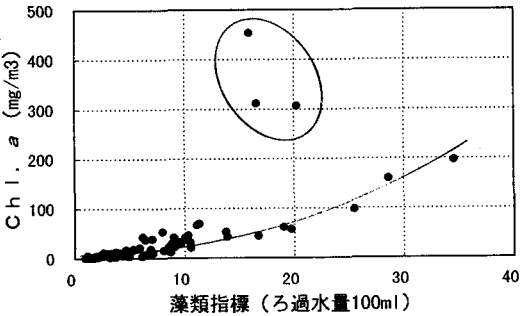


図7 Chl.aと藻類指標との散布図(全データ)

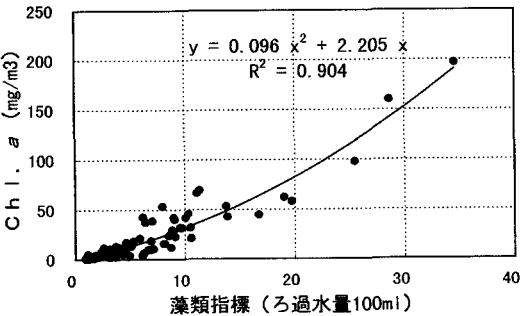


図8 Chl.aと藻類指標との散布図(棄却後)

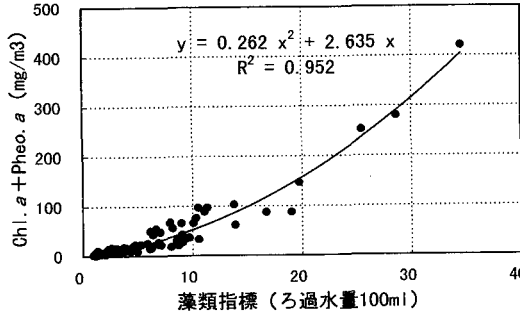


図9 Chl.a+Pheo.a 藻類指標との散布図(棄却後)

4.2 回帰式による計算値と実測値の比較

前項で得た回帰式

$$Chl.a = 0.096AI_{100}^2 + 2.2AI_{100} \text{ ----- ①}$$

$$Chl.a+Pheo.a = 0.26AI_{100}^2 + 2.6AI_{100} \text{ ----- ②}$$

を用いて、藻類指標から算出した計算値と手分析値の比較を表4に示す。

最小値が過大評価されているが、手分析値の定量下限値が 2mg/m³ 程度²⁾ であるから、このような低濃度領域での不一致はやむを得ない。全体として、計算値は実測値とよく一致していると言えるであろう。

しかし、個々のデータを詳細に比較すると、幾つかの誤差要因が明らかになってきた。次節で、それらについて検討する。

表 4 Chl.a と Pheo.a の計算値と実測値の比較 (n=125)

項 目 名		単位	最小値	最大値	平均値	標準偏差
Chl.a	実測値	mg/m ³	0.5	197	16.3	27.1
	計算値	mg/m ³	2.1	191	16.6	25.6
Chl.a+	実測値	mg/m ³	1.3	421	28.4	53.3
	計算値	mg/m ³	2.6	404	27.8	52.3
Pheo.a	実測値	mg/m ³	0.4	224	12.1	28.2
	計算値	mg/m ³	0.5	213	11.3	26.9

4.3 誤差要因

(1) SS (package effect) の影響

SS が 700mg/l 以上では、ろ過水量 100ml でも測定不能に陥ることは 4.1(2) で述べたが、ろ過水量が多い場合は、もっと低濃度の SS でも影響を受ける。図 10 に、藻類指標比 (A_{1400}/A_{1100}) と SS との関係を示す。package effect がなく、藻類指標がろ過水量に比例するのであれば、この比は 4 になるはずであるが、実際には SS の増大とともに減少し、SS が約 120mg/l 以上で約 1 になる。この状態では、 A_{1400} による Chl.a の測定は不可能である。同様の現象は A_{1300}/A_{1100} と A_{1200}/A_{1100} でも生じており、前者では SS が約 170mg/l 以上、後者では SS が約 250mg/l 以上で測定不能の状態になっている。この関係から類推すると、ろ過水量 100ml の場合、SS が約 500mg/l 以上で測定不能になると思われるが、4.1(2) で述べたように、実際には 670mg/l までは A_{1100} により測定可能であった。SS が 700mg/l 以上の試料にろ紙吸光法を適用するには、ろ過水量を 50ml 程度以下に減らす必要がある。しかし、あまり水量を減らすと感度が低下するため、Chl.a が低濃度の場合は測定できなくなる。

なお、上記の SS の数値は、測定不能になる限界濃度であり、実際にはもっと低い SS でもある程度の妨害は発生していると考えられる。図 10 では、SS 約 40mg/l 以上で A_{1400}/A_{1100} が 2 以下 (ろ過水量比 4 の半分以下) のデータがあり、かなり package effect による妨害を受けていると推察される。

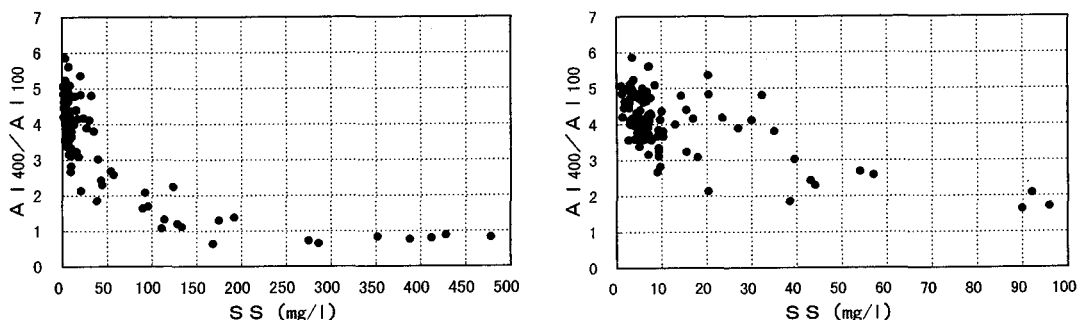


図 10 藻類指標比 (A_{1400}/A_{1100}) と SS との関係

(2) Pheo.a の影響

図 11 に SS が 30mg/l 未満のデータについて、フェオフィチン率と Chl.a 誤差率との関係を示す。ここで、 $[\text{Chl.a 誤差率}(\%) = 100 \times (\text{計算値} - \text{実測値}) / \text{実測値}]$ である。フェオフィチン率が大きくなるにしたがって、Chl.a 誤差率が極端に増加 (過大評価) する傾向が明確に認められる。特にフェオフィチン率が 60% を超えると計算値は実測値の 2 倍以上となる場合が多い。それでは、なぜフェオフィチン率が高いと藻類指標による計算値が過大となるのか。それは、本実験で得た回帰式が平均フェオフィチン率約 40% のデータに基づいて作成されているからである。仮にフェオフィチン率が 80% であれば Chl.a は 20% しか存

在しないが、藻類指標は Chl.*a* と Pheo.*a* を区別できない。したがって回帰式によって得られる Chl.*a* 計算値は、Chl.*a* が 60 %あるものとして計算されるため、計算値は実測値を大幅に上回ることになる。

(3) その他の影響

通常の吸光光度法による Chl.*a* 分析では、吸光度が 0.1 ～ 1.0 の範囲⁶⁾で測定されるが、ろ紙吸光法の場合は溶液と比べてろ紙上の物質と吸光度との直線性が悪いいため、より低い吸光度範囲での測定が望ましい。本実験のデータから判断すると、藻類指標による Chl.*a* 測定では吸光度 0.05 ～ 0.3 の範囲が適当と考えられる。

また、一般論としてサンプリング時の影響（本実験では手分析用とろ紙吸光用の試料を別の容器に採取しており、厳密に言えば完全な同一試料ではない）や、試料に含まれる藻類の種による影響もあり得る。

さらに、1. の③で指摘したように、手分析は十分な注意を払わないと分解が進みやすく、必ずしも正確なデータが得られない場合もある。これらの要因については、今後の研究課題として取り組んでいきたい。

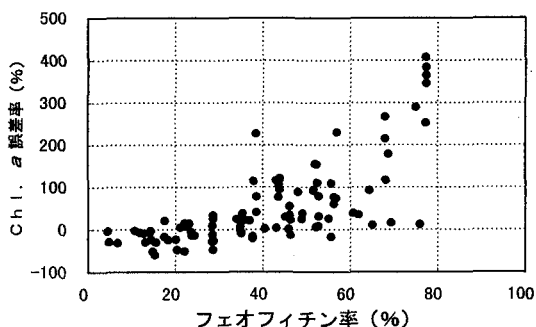


図 1 1 フェオフィチン率と Chl.*a* 誤差率との関係

5. まとめ

自然共生研究センターにおける研究の一環として、ろ紙吸光法と手分析（アセトン抽出・単波長吸光光度法）とによる Chl.*a* 及び Pheo.*a* の測定結果を比較検討した。両者の相関は、Chl.*a* が 200mg/m³ 以下の濃度範囲で $r = 0.95$ と良好であるが、SS と Pheo.*a* が主な誤差要因となる。

ろ紙吸光法は測定が簡単・迅速・安価であり、精度も上記の誤差要因に留意して使用すれば、十分使用に耐える、極めて有用な方法である。本法の採用に当たっては、あらかじめ手分析とのクロスチェックによる回帰式の作成が必要であるが、今後多くの水域においてデータが集積されれば、少なくとも変動傾向のチェック程度の用途であれば、クロスチェック抜きで採用することも可能になると考えられる。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、助言と協力をいただいた玉野総合コンサルタント株式会社の浦野久美子氏ほかの方々に謝意を表します。

参考文献

- 1) C.J.Lorenzen: Determination of chlorophyll and pheo-pigments :spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr. 12, 343-346 (1967).
- 2) 建設省河川局監修：河川水質試験方法（案）1997 年版、技報堂出版 (1997).
- 3) 菌田顕彦：ペーパークロマトグラフィーによるクロロフィルの簡易精製法、中部技報, 第 158 号 (1983).
- 4) K.Nakamura, Y.Shimatani: A Basic Study on Comprehensive Water Indices using Glass Fiber Filters and Spectrophotometer, Water Science & Tech. Vol.34, No.7-8, p163-168, 1996.
- 5) 中村圭吾、島谷幸宏：「ろ紙吸光法」による河川総合水質指標の試みについて、日本河川水質年鑑-1996 研究・参考編, p1003-1010, 1998.
- 6) APHA, AWWA, WEF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th Ed. (1995).