

高速液体クロマトグラフィーを用いたクロロフィル類の分析

島根県環境保健公社 ○石原 正彦

岡本 仁志

1. はじめに

クロロフィル類の分析法として、上水試験法では濾紙上に捕集し、細胞壁を破壊しクロロフィルを抽出しやすくするため、濾紙をすりつぶした後 90%アセトンにより抽出し、吸光光度法で定量を行う。また、河川試験法ではより簡便な方法として DMF 法がある。この方法は、抽出溶媒として DMF (ジメチルホルムアミド) を用いることで細胞壁を事前に破壊することなく、クロロフィルを抽出できるため、抽出操作が容易である。また、DMF 中のクロロフィル-a(以下 Chl-a と略す)の分光特性は 90%アセトンとほとんど同じであることから、そのまま吸光光度法で測定ができる。この他に、蛍光光度法や高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法) があり、蛍光光度法は現場での簡易測定的分類である。HPLC 法は各クロロフィルやその分解物を分離定量ができるため最も正確な方法であるが、標準物質を必要とし分析時間も他の方法より長時間を要する。このような背景からクロロフィルの分析では主に吸光光度法が用いられてきた。この吸光光度法における定量方法としては三波長法 (Strickland&parsons 法等) や単波長法 (Lorenzen 法) があり、三波長法では Chl-a、クロロフィル-b (Chl-b) 及び-c を定量できる。しかし、Chl-a から Mg が脱離することで生じるフェオフィチン-a(Phe-a)を区別できないため、Phe-a が共存すると正の誤差を受ける。一方、単波長法では Chl-a と Phe-a を分離測定ができるため、Phe-a の影響による誤差は除去できるが、その他のクロロフィル分解物(クロロフィライド等)の妨害物質の影響までは除去できない。そこで今回我々は、上記に示した短所はあるもののこれら妨害物質が共存するサンプルにおいて、より正確な定量を行う場合、高速液体クロマトグラフ法は最も適していると考え、高速液体クロマトグラフ法の有用性を見出したので報告する。

2. 測定方法

試料は河川試験法に基づいた前処理法 (DMF 法) を用い調整し、逆相 HPLC によって分離後、蛍光検出器によって定量した。

試薬

クロロフィル標準液 : Chl-a 及び Chl-b については市販の標準品 10mg をアセトン 50mL に溶かして調整した。

その濃度は妨害がないものとし吸光光度法を用いて測定した。

$$\text{Chl-a(mg/L)} = \text{吸光光度法(mg/L)} \times 0.7072$$

$$\text{Chl-b(mg/L)} = \text{吸光光度法(mg/L)} \times 0.8012$$

フェオフィチン標準液 : 上記の各クロロフィル標準液 10mL に対し 1mol/L 塩酸 0.1mL の割合で添加し、5 分間放置後、同量の 1mol/L ア

ンモニア水溶液を添加し、調整した。添加後、生じた塩化アンモニウムを耐溶媒性のフィルター(0.45 μm)で濾過した。

濃度の算出はMg 脱離による質量変化と HCl 及びアンモニア水溶液添加による希釈を下記の式で補正した。

$$\text{Phe-a (mg/L)} = \text{Chl-a} \times 0.9750 \div 1.02$$

$$\text{Phe-b (mg/L)} = \text{Chl-b} \times 0.9754 \div 1.02$$

移動相	: メタノール : アセトン = 80 : 20 の割合で混合
測定条件	
機種	: CLASS-LC10 (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-2 4.6×150mm (5 μm, GL サイエンス)
カラム温度	: 35 °C
注入量	: 10 μL
流速	: 0.8 mL / min

3. 条件の検討

DMF 法を採用するにあたり、従来の上水試験法との相関関係を明確にしておく必要がある。

そこで、同一試料を両法で前処理を行い、比較検討した。結果を図に示す。n = 48 での相関係数(γ)は 0.9857 となり、非常に強い相関が認められた。(図 1 参照)

測定条件の最適化

移動相としてメタノール : アセトン = 80 : 20 を用いることで分析時間を 20 分程度とし、流速を 0.8mL/min とすることで各成分の分離を図った。

各成分の検出は蛍光検出器で行い、励起及び測定波長はそれぞれ Chl-a 430nm, 670nm Chl-b 410nm, 670nm Phe-a 410nm, 655nm

Phe-b 410, 660nm とした。また、前処理で得られた DMF 溶液を直接 HPLC に導入することとし、定量下限値は吸光度法と同様の 0.5 μg/L とした(注入量を 50 μL とすることで 0.1 μg/L まで定量可能であった)。(図 2 参照)

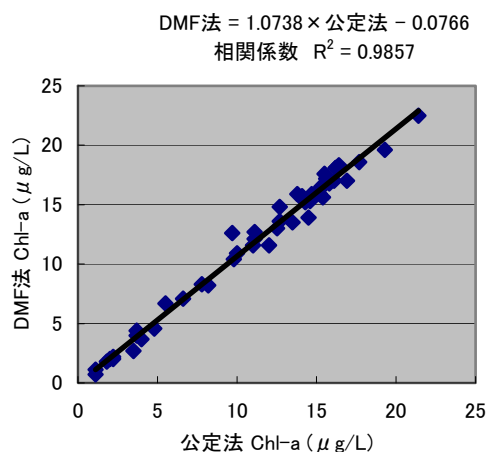


図1. 公定法とDMF法との相関

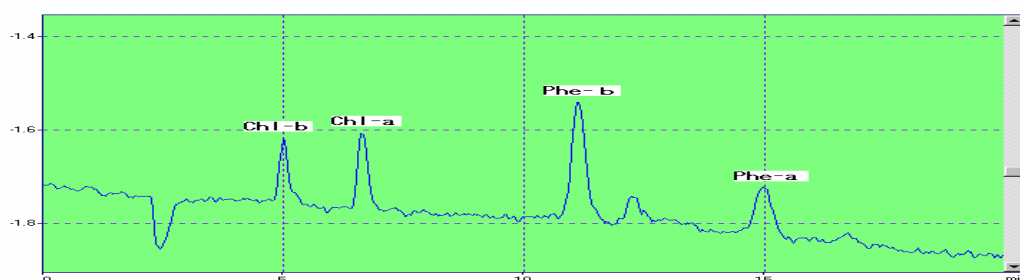


図2. クロロフィル類のクロマト (各成分0.5ng)

4. 吸光光度法との相関性

実サンプルを用いて Strickland&Parsons 法及び Lorenzen 法と HPLC 法との相関性をみた。妨害物質の少ない実サンプルが多かったためか、良好な相関が得られた。(図3及び図4参照)

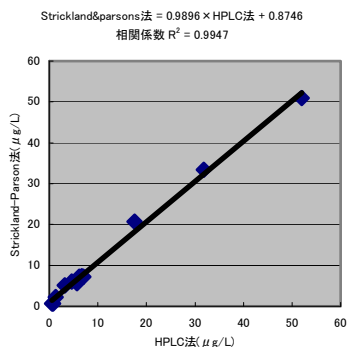


図3. HPLC法とStrickland&parsons法との相関

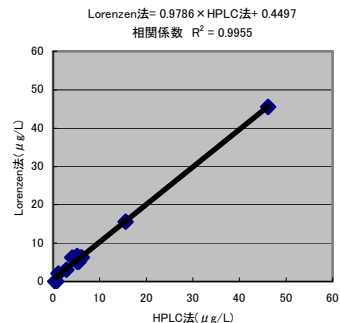


図4. HPLC法とLorenzen法との相関

このことより抽出溶媒を DMF とした場合でも、HPLC 法は吸光光度法との相関が高いことが明らかとなった。

5. 各成分間の妨害の有無

先も述べたが三波長法的一种である Strickland &Parsons 法では、Chl-a と Phe-a の区別ができないため、Phe-a が多く共存する試料では Chl-a の値は正の誤差を受ける。これに対し単波長法である Lorenzen 法では Chl-a と Phe-a を分離測定できるため Phe-a の妨害は除去できる。(図5参照)

しかし、図6及び図7に示すように一定濃度の Chl-a と Chl-b や Phe-b が共存する試料を Lorenzen 法で測定すると共存する Chl-b や Phe-b の濃度が増

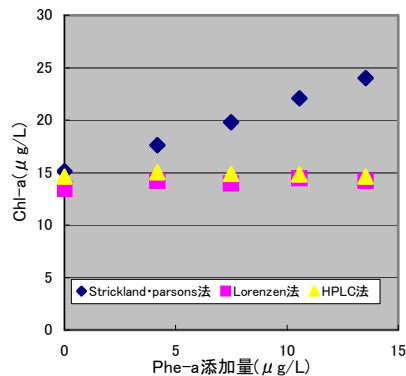


図5. Phe-aの共存による妨害

すにつれ、Phe-a の値が増加した。このことは Chl-b や Phe-b の妨害を受けている可能性を示しているが、単に Chl-a が分解し Phe-a が生じているとともれる。そこで、Chl-b のみの試料を Lorenzen 法で測定したところ、やはり Phe-a の値は Chl-b の増加に伴い増加する傾向にあることがわかった(図8参照)。これにより Lorenzen 法で測定する場合、Chl-b

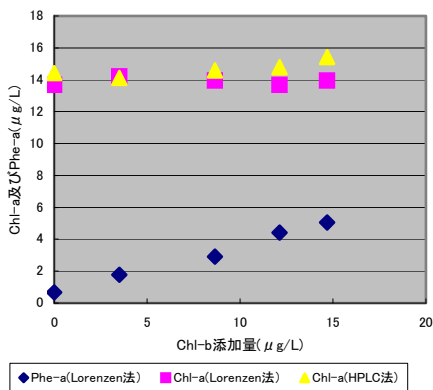


図6. Chl-b共存による妨害

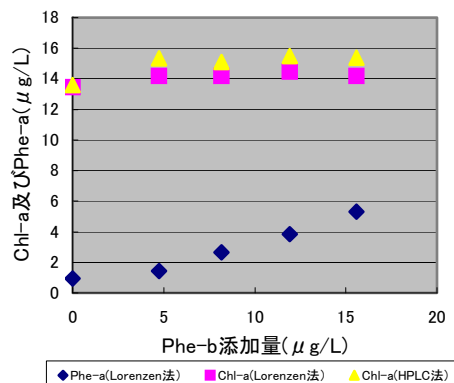


図7. Phe-b共存による妨害

が多く共存する試料では妨害を受けることが明らかとなった。

通常では Chl-b を含む藻類の種類が少ないため Chl-b の測定はあまり行われていない。そのため、Chl-b の妨害に気付かず Phe-a の濃度として認識してしまい、極端な場合では Chl-a よりも Phe-a の方が多くなるといった現象を引き起こす危険性ははらんでいる。一方、HPLC 法を適用した場合、各成分を分離し測定するため吸光光度法で生じた上述のような妨害を受けることなく正確な定量が可能であった(図9参照)。

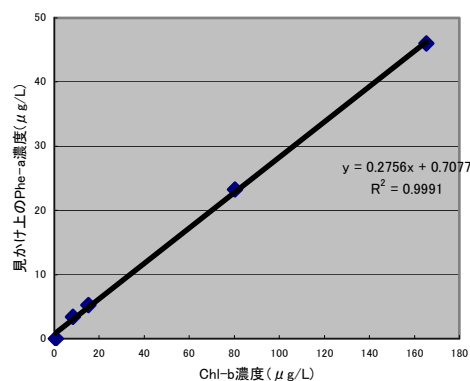


図8. Lorenzen法におけるChl-b濃度と見かけ上のPhe-a濃度

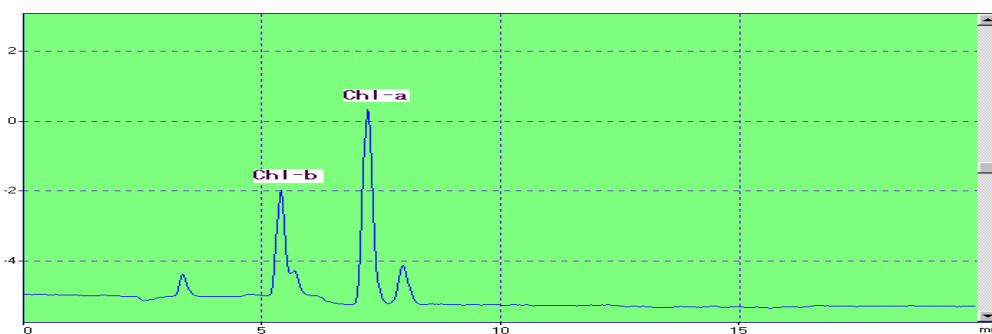


図9. Chl-b共存下のChl-aのクロマト

6. まとめ

HPLC 法は前処理として DMF 法を用いた場合でも、従来の吸光光度法との相関も高く十分に利用可能であることが明らかとなった。定量下限値についても、従来の吸光光度法に比べ 1/5 程度の低濃度まで定量が可能であった。さらに、前処理として DMF 法を用い、その試料を直接 HPLC で測定することにより、全体の分析に要する時間短縮が可能となった。

また、各成分間の妨害の有無を検討した結果、Chl-b 及び Phe-b が多く共存する試料を Lorenzen 法で測定した場合、Phe-a が妨害を受けることが明らかとなった。これに対し HPLC 法では、各成分を分離し定量することができるため、妨害を受けることなく Chl-a, Chl-b, Phe-a 及び Phe-b を正確に分離、定量することができた。

以上のことから、HPLC 法は確かに標準物質を必要とし、吸光光度法などに比べ分析時間がかかるといったデメリットもあるが、Chl-b や Phe-b などの妨害を受けることなく各成分を正確に分離、定量できるといったメリットも大きい。また、DMF 法に基づき前処理を行ったサンプルは吸光光度法、HPLC 法のどちらでも測定可能であるため、妨害を受けるサンプルの一部を分取し、HPLC 法で分析することも可能である。このように妨害を受けるサンプルにおいて正確な分析を行うには HPLC 法が有用な方法であると思われる。