

# 定期海洋観測に使用するクロロフィル $a$ およびフェオ色素を計算する一般方程式の導出とその解の数値計算法について

田中伊織\*

元北海道立総合研究機構中央水産試験場

Derivation of a general equation and numerical solution method for calculating chlorophyll  $a$  and pheopigments in serial oceanographic observations

IORI TANAKA\*

Formerly: Central Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan

When we analyze a sample containing mixed solution of chlorophyll  $a$  and pheopigments by fluorometric methods, dilution is needed for the sample containing high pigment concentration in which nonlinear relationship between fluorescence intensity and pigment concentration appears. In this study, a general equation, which can calculate the pigment concentration in the nonlinear region, was derived in order to avoid this dilution procedure. General solution of the equation through a numerical calculation method is also shown for chlorophyll  $a$  and pheopigments. Results of the calculation by general solution were verified by comparing the results to that obtained by the dilution procedure for total pigment concentrations up to  $520 \mu\text{gL}^{-1}$  using the same sample from in situ sea water collected during a spring phytoplankton bloom on the coast of the Sea of Japan.

キーワード：一般解, 一般方程式, キャリブレーション, クロロフィル $a$ , 蛍光光度計, 春季大増殖, 定期海洋観測, フェオ色素

漁業生物を含め、海洋生物の生産は海洋の一次生産者である植物プランクトンの生産力に依存する。この植物プランクトンの生産力は、主要な光合成色素であるクロロフィル $a$ が担っている。そこで、古くからクロロフィル $a$ を定量することにより、海洋の生産力の一つの指標としている。

北海道立総合研究機構水産研究本部中央水産試験場(以下、道総研中央水試)では、海洋環境モニタリングの一項目として、1970年代からクロロフィル $a$ を定量している。クロロフィル $a$ の定量方法には比色法(Richards with Thompson, 1952; Parsons and Strickland, 1963; Lorenzen, 1967)と蛍光法(Yentsch and Menzel, 1963; Holm-Hansen et al., 1965)がある。道総研中央水試では、少ない試水量で分析できる蛍光法を採用している。試水量が少なくすむという特性は、サンプル操作の簡便性を高めるため、現在も、同法を継続して採用している理由である。

機器分析の教科書では、蛍光法は、「蛍光強度が、目的物質の濃度に対し直線関係にあると見なせるごく低濃度領域で定量可能である。」と説明される。北海道南部の噴火湾において、春季植物プランクトン大増殖期(以下、大増殖期)におけるクロロフィル $a$ の最大濃度は、 $10 \mu\text{gL}^{-1}$ 以上になる(中田, 1982)ことが知られている。クロロフィル $a$ が、このような高濃度を示す大増殖期では、分析作業時に、低濃度領域を超える範囲にある試料について、定量可能な濃度領域まで希釈する作業がしばしば必要となる。これが、測定作業の労力や時間を増やす原因となっている。大増殖期に、多数の試料の分析を行なう研究課題で、この希釈作業を減らすことができれば、作業効率の大幅な向上が期待できる。

道総研中央水試では、ターナーデザイン社の蛍光光度計Turner Design Model 10の購入を契機に、この蛍光光度計の機械校正(キャリブレーション)を1985年3月19日に行った。この時の目的は、キャリブレーションと同

時に、高濃度領域の試料の分析結果が、低濃度領域まで希釈する従来法の結果と一致する「一般方程式」の導出と、その解法を検討することであった。本稿では、その課題解決に至ったので以下に報告する。

## 材料及び方法

蛍光測定理論 強度 $I_0$ の入射光が溶液を透過して強度 $I_t$ の透過光になるとき、 $T$ を透過率とすると、この溶液による光の吸収の強さは、

$$T = I_t/I_0 \quad (1)$$

である。また、吸光度 $A$ は

$$A = -\log T \quad (2)$$

のように定義されている。したがって

$$10^{-A} = I_t/I_0 \quad (3)$$

から

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-A} \quad (4)$$

である。

$C$ を溶液の濃度、 $\varepsilon$ を吸光係数、 $l$ を測定セルの光路長とすると、ランベルト-ベールの法則により、

$$A = \varepsilon Cl \quad (5)$$

と表される。

蛍光物質が発する蛍光強度 $F$ は、吸収された光の強さ $I_a$ と、吸収された光子が蛍光へ変換する変換効率 $\Phi_f$  (量子収率) との積で以下のように表される。

$$F = I_a \Phi_f \quad (6)$$

また、

$$I_a = I_0 - I_t \quad (7)$$

$$= I_0(1 - 10^{-\varepsilon Cl}) \quad (8)$$

である。ここで、蛍光強度 $F(C)$ を溶液濃度 $C$ の関数とすると、式(6)および式(8)から

$$F(C) = I_0(1 - 10^{-\varepsilon Cl}) \Phi_f \quad (9)$$

と表現される。ここで指数関数の底を常用対数の10から自然対数の $e$ に変換すると

$$F(C) = I_0(1 - e^{-2.303\varepsilon Cl}) \Phi_f \quad (10)$$

という蛍光強度の理論式が求まる (Fig. 1)。

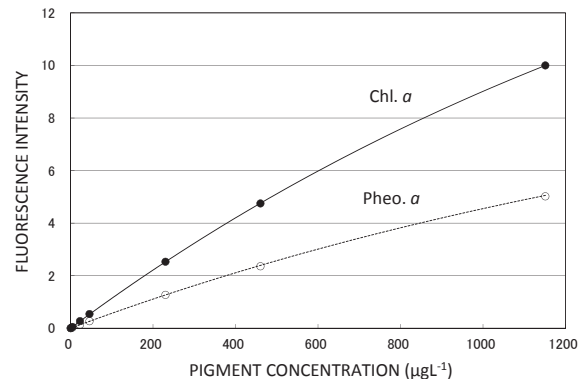


Fig. 1 Fluorescence intensity (arbitrary unit) for theoretical curve of chlorophyll  $a$  (solid line) and pheophytin  $a$  (dashed line) against pigment concentration. Calibration data is shown for chlorophyll  $a$  (solid circle) and pheophytin  $a$  (open circle).

この理論式は非線形なので、線形化のため、指数関数部分を濃度ゼロ近傍でテイラー展開すると

$$F(C) = I_0(1 - (1 - 2.303\varepsilon Cl + (1/2!)(-2.303\varepsilon Cl)^2 + (1/3!)(-2.303\varepsilon Cl)^3 + \dots)) \Phi_f \quad (11)$$

$$= I_0(2.303\varepsilon Cl - (1/2!)(-2.303\varepsilon Cl)^2 - (1/3!)(-2.303\varepsilon Cl)^3 - \dots) \Phi_f \quad (12)$$

となる。ここで $2.303\varepsilon Cl$ が十分小さい低濃度領域では、2乗以上の項を無視できるため

$$F(C) = 2.303I_0\Phi_f\varepsilon Cl \quad (13)$$

と、直線近似が可能となる。この直線近似式は、機器分析の教科書では蛍光分析の基本式として記載され、蛍光強度と濃度の関係を評価するために広く一般に用いられている。これは完成された常法である。これを「線型モデル」とする。

ここでは、式(13)は非線形の理論式の直線近似であって、理論式に直線区間があるわけではないことに注意しなければならない。

本節では、教科書 (井村・樋上, 2016) の表記方法を参照した。

「線形独立蛍光モデル」によるクロロフィル $a$ とフェオフィチン $a$ の濃度計算式 蛍光物質が希薄な溶液中で、すなわち低濃度領域では、それぞれの蛍光物質は独立に蛍光を発すると仮定する。ここではこの仮定に基づく理論を「独立蛍光モデル」と呼ぶ。ここで、試料の酸化前の蛍光値は、クロロフィル $a$ の蛍光とフェオフィチン $a$ の蛍光が加わったものになり、酸化後の蛍光値は、酸化前のフェオフィチン $a$ の蛍光に、クロロフィル $a$ が酸化されてフェオフィチン $a$ になった蛍光が加わったものになる。そこで、

クロロフィルaとフェオフィチンaが発する蛍光強度について、「線形モデル」と「独立蛍光モデル」を組み合わせて、次の関係が成り立つ。

$$F_o = F_{ch} \cdot C_h + F_{ph} \cdot P_h \quad (14)$$

$$F_a = F_{ph} \cdot C_h + F_{ph} \cdot P_h \quad (15)$$

ここで、 $F_o$ は酸添加前の試料の蛍光値、 $F_a$ は酸添加後の試料の蛍光値、 $C_h$ はクロロフィルa濃度、 $P_h$ はフェオフィチンa濃度、 $F_{ch}$ は単位クロロフィルa濃度当たりの蛍光強度で定数、そして $F_{ph}$ は単位フェオフィチンa濃度当たりの蛍光強度で定数とする。

ここでは、式(14)と式(15)を「線形方程式」と呼ぶ。この $C_h$ と $P_h$ の連立方程式は以下のように解ける。式(14)から式(15)を差し引くと

$$F_o - F_a = C_h \cdot (F_{ch} - F_{ph}) \quad (16)$$

となり、これから

$$C_h = (F_o - F_a) / (F_{ch} - F_{ph}) \quad (17)$$

というクロロフィルa濃度を求める解が得られる。また、式(15)に $F_{ch}$ を乗じたものから、式(14)に $F_{ph}$ を乗じたものを差し引くと

$$F_a \cdot F_{ch} - F_o \cdot F_{ph} = F_{ph} \cdot (F_{ch} - F_{ph}) \cdot P_h \quad (18)$$

となるので

$$P_h = (F_a \cdot F_{ch} - F_o \cdot F_{ph}) / (F_{ph} \cdot (F_{ch} - F_{ph})) \quad (19)$$

というフェオフィチンa濃度を求める解が得られる。

ここで、式(18)、式(19)に酸係数(R)

$$R = F_{ch} / F_{ph} \quad (20)$$

を用いて変形すると、

$$C_h = (F_o - F_a) / (F_{ph} \cdot (R - 1)) \quad (21)$$

$$P_h = (R \cdot F_a - F_o) / (F_{ph} \cdot (R - 1)) \quad (22)$$

となる。これに濃縮倍率を乗じて濃度とする。気象庁海

洋観測指針(1970)では、この表記の解である。ここでは、式(21)と式(22)を「線形解」と呼ぶ。式(21)と式(22)に式(14)と式(15)も含めて、本稿では「線形独立蛍光モデル」と呼ぶ。

キャリブレーション クロロフィルaの測定に用いる試水を250mLの褐色ポリビンに採水し、測定は90%アセトン10mLの抽出液で行うため、濃縮倍率は25倍である。大増殖期のクロロフィルaの最大濃度を $40\mu\text{gL}^{-1}$ と仮定すると、濃縮倍率から換算して、最大 $1,000\mu\text{gL}^{-1}$ までの濃度範囲でキャリブレーションを行った。

クロロフィルaの結晶(和光純薬社製50mg入り)を、ほぼ全量90%アセトン溶液で2Lまでメスアップし、標準原液とした。これを順次希釈してキャリブレーション用の標準液とした。標準原液の濃度は吸光法(Lorenzen, 1967)により決定した。標準原液を10倍、20倍および50倍に希釈した標準液を、ダブルビーム分光光度計(Shimadzu UV-2000)で5cmセルを用いて、酸添加前後に665nm、750nmで吸光度を読み取った。酸化には1Nの塩酸を10滴滴下し、5分間静置した。

標準液の測定から得られたクロロフィルaおよびフェオフィチンaの計算式(Lorenzen, 1967)は以下の通りである。

$$C_h = 26.7 \cdot (665o - 665a) \cdot v / (V_f \cdot l) \quad (23)$$

$$P_h = 26.7 \cdot (1.7 \cdot 665a - 665o) \cdot v / (V_f \cdot l) \quad (24)$$

ここで、665oは酸化前の665nmの吸光値、665aは酸化後の665nmの吸光値で、 $l$ はセルの長さ、 $v$ は抽出液の容量、 $V_f$ は試水の濾水量である。標準液の場合、 $v/V_f=1$ である。665nmの吸光値は、750nmの吸光値で補正した。

吸光光度計の分析結果をTable 1に示した。665o/665aの値は1.69で、Lorenzen (1967)による、クロマトグラフィーにより分離されて得られた、クロロフィルaの結晶を用いた値1.7と一致した。式(23)から、標準原液の濃度は、 $23.02\text{mgL}^{-1}$ であった。

キャリブレーションを行うTurner Design Model 10は、感度を8段階変更でき、その中から読み取りに最適な感

Table 1 Absorbance and undiluted chlorophyll a concentration

chlorophyll a standard	before acidification			after acidification			undiluted		
	wave length	corrected		wave length	corrected		acid ratio	cell length	chlorophyll a*1
dilution rate	665o	750	665o	665a	750	665a	665o/665a	cm	mgL <sup>-1</sup>
10	1.055	-0.006	1.061	0.627	-0.006	0.633	1.676	5	22.88
20	0.524	-0.005	0.529	0.307	-0.005	0.312	1.696	5	23.20
50	0.209	0.000	0.209	0.123	0.000	0.123	1.699	5	22.99
average							1.690		23.02

\*1: Undiluted chlorophyll a concentration is calculated from Lorenzen (1967).

度を選び、酸添加前後に小数点以下2桁まで数値を読み取った。キューベットに入れた標準液の酸化には1Nの塩酸を4滴滴下し、5分間静置した。

1,151 $\mu\text{gL}^{-1}$ の濃度の標準液を、蛍光光度計の最低感度(1 $\times$ MS)で10.00に合わせた。90%アセトン溶液で原点合わせを行ったが、最高感度(100 $\times$ 31.6)では読み取り指針の動きが大きく原点あわせができなかったため、次の感度(100 $\times$ 10)において0.00と原点合わせを行った。

蛍光光度計のキャリブレーション結果をTable 2に示す。

### 結果及び考察

**理論式の係数決定** 本研究で用いた理論式の係数決定方法を説明する。理論式をテイラー展開した式(12)でCをxに置き換え、右辺第2項まで近似する。

$$F(x) = I_0(2.303\epsilon l x - (1/2!)(-2.303\epsilon l x)^2) \Phi_f \quad (25)$$

この式から単位濃度当たりの蛍光強度を

$$F(x)/x = I_0\Phi_f \cdot 2.303\epsilon l - I_0\Phi_f (1/2)(2.303\epsilon l)^2 \cdot x \quad (26)$$

と表し、最小二乗法によりキャリブレーションデータへ回帰直線を当てはめた (Fig.2)。そうするとy切片から

$$I_0\Phi_f \cdot 2.303\epsilon l$$

という近似値が得られる。傾きの近似値は

$$-I_0\Phi_f (1/2)(2.303\epsilon l)^2$$

となることから、傾きを2倍してy切片の値で除することにより、

$$2 \cdot (-I_0\Phi_f (1/2)(2.303\epsilon l)^2) / I_0\Phi_f \cdot 2.303\epsilon l = -2.303\epsilon l \quad (27)$$

として、指数関数の指数部の係数 $-2.303\epsilon l$ の近似値が得られる。

この近似値から、さらに非線形最小二乗法により正確

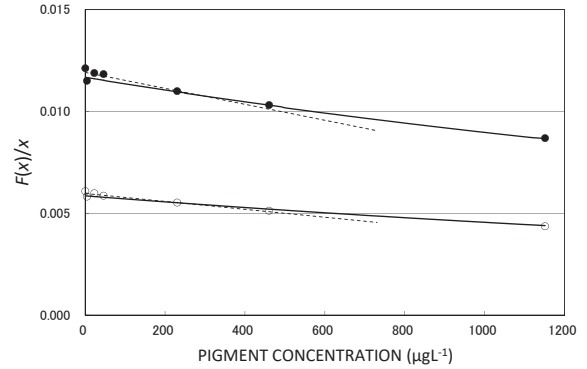


Fig.2 Fluorescence intensity per unit concentration. They are shown as solid curved lines for chlorophyll *a* and pheophytin *a* against pigment concentration. Calibration data is shown for chlorophyll *a* (solid circle) and pheophytin *a* (open circle). Dashed lines are linear regression lines drawn from calibration data using concentrations of 230.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  and lower.

に係数を求める。ここで、

$$I_0\Phi_f = D \quad (28)$$

$$2.303\epsilon l = E \quad (29)$$

とにおいて、蛍光強度の理論式を

$$F(x) = D (1 - e^{-Ex}) \quad (30)$$

と表記し直す。 $F_i$ をキャリブレーションで得られた蛍光値、 $S(x)$ を残差平方和とすると、

$$S(x) = \sum_{i=1}^n (F_i - F(x))^2 \quad (31)$$

が最小となるときのDおよびEの数値の組み合わせを求め、正確な値とする (Fig.3)。

ここで採用した計算方法は、近似値として求めた上記D、Eを初期値として、最初にDを固定してEにAEずつ加算しながら計算し、最小値を探した。次にDにADを加えて同様の計算を継続して最小値をさがす手順をとった。

Table 2 Calibration result for Turner Design Model 10

chlorophyll <i>a</i> standard dilution rate	chlorophyll <i>a</i> ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	before acidification			after acidification			corrected reading	
		range 1	range 2	$F_o$	range 1	range 2	$F_a$	$F_o$	$F_a$
20	1,151	1	MS	10.00	1	MS	5.02	10.00	5.02
50	460.5	1	MS	4.75	1	MS	2.36	4.75	2.36
100	230.2	1	3.16	8.00	1	3.16	4.02	2.53	1.27
500	46.05	1	10	5.45	1	10	2.70	0.545	0.270
1,000	23.02	1	31.6	8.65	1	31.6	4.35	0.274	0.138
5,000	4.605	100	MS	5.30	100	MS	2.68	0.0530	0.0280
50,000	0.4605	100	10	5.60	100	10	2.80	0.00560	0.00280

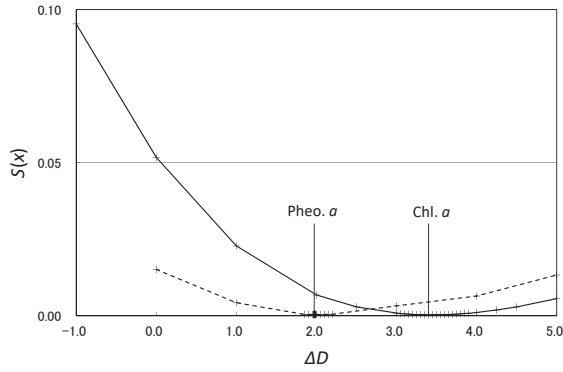


Fig. 3 Distribution of  $S(x)$  for chlorophyll  $a$  (solid line) and pheophytin  $a$  (dashed line) against  $\Delta D$ . Initial value of  $D$  is set to zero. Places of  $S(x)$  minimums are shown by the vertical lines. Calculated points are shown by crosses.

$\Delta D$ や $\Delta E$ は、 $S(x)$ が最小値近くで分解能を上げて極値を探した。最後に、全体の最小値となる $S(x)$ を求め、それに対応する $D$ と $E$ の値を真の値として採用し、理論式を確定した。

ここでは、クロロフィル $a$ の蛍光強度の理論式を $F_c(x)$ 、フェオフィチン $a$ の蛍光強度の理論式を $F_p(x)$ と表記する。

キャリブレーション結果 (Table 2) から、非線形最小二乗法により以下の理論式を得た。

$$F_c(x) = 21.51(1 - e^{-5.4277 \cdot 10^{-4} \cdot x}) \quad (32)$$

$$F_p(x) = 11.13(1 - e^{-5.2580 \cdot 10^{-4} \cdot x}) \quad (33)$$

キャリブレーションデータおよび式(32)、式(33)の理論式をFig. 1に示した。

非線形領域における「一般方程式」の導出 蛍光分析は線形近似が可能である低濃度領域の分析に優れているために、主に低濃度領域の特性に対する解説が主である。ここでは、非線形性が顕著となる、高濃度領域における分析結果を用いて、クロロフィル $a$ とフェオフィチン $a$ の濃度の計算式を導出する。

この高濃度領域における蛍光強度も、低濃度領域における線形の場合と同様に考えるが、係数は定数ではなく、濃度に依存する蛍光強度の理論式の関数として仮定する。ここで、単位クロロフィル $a$ 濃度当たりの蛍光強度を $F_{ch}(x)$  ( $=F_c(x)/x$ )、単位フェオフィチン $a$ 濃度当たりの蛍光強度を $F_{ph}(x)$  ( $=F_p(x)/x$ )、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、および $\gamma$ は濃度とする。すると、蛍光強度の方程式は

$$F_o = F_{ch}(\alpha) \cdot C_h + F_{ph}(\beta) \cdot P_h \quad (34)$$

$$F_a = F_{ph}(\gamma) \cdot C_h + F_{ph}(\beta) \cdot P_h \quad (35)$$

となる。

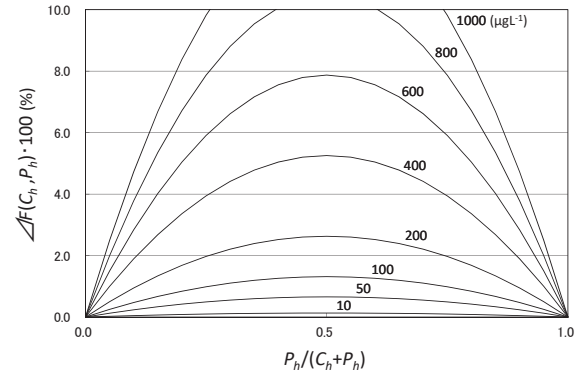


Fig. 4  $\Delta F(C_h, P_h) \cdot 100(\%)$  for various total pigment concentrations plotted against  $P_h/(C_h+P_h)$ . Total pigment concentration is drawn above each curve.

また、 $F_a$ はすべてがフェオフィチン $a$ であるから

$$F_a = F_{ph}(C_h+P_h) \cdot (C_h+P_h) \quad (36)$$

である。この式(36)は、 $F_a$ から合計色素濃度を求めるために使用する基本式である。

ここで、初めに線形方程式で仮定したように、式(35)の右辺の、クロロフィル $a$ 由来のフェオフィチン $a$ (第1項)と、元々あったもの(第2項)が、それぞれ独立に蛍光を発する「独立蛍光モデル」( $\gamma=C_h$ ,  $\beta=P_h$ )を考える。

式(35)の右辺の蛍光強度と、式(36)の右辺の蛍光強度の差を式(36)の右辺で正規化した、以下の $\Delta F(C_h, P_h)$ という関数を導入する。

$$\Delta F(C_h, P_h) = ((F_{ph}(C_h) \cdot C_h + F_{ph}(P_h) \cdot P_h) - (F_{ph}(C_h+P_h) \cdot (C_h+P_h))) / (F_{ph}(C_h+P_h) \cdot (C_h+P_h)) \quad (37)$$

ここで、 $\Delta F(C_h, P_h)$ を任意の合計色素濃度について計算し、 $P_h/(C_h+P_h)$ をパラメーターとしてFig. 4に示した。ただし、図中では $\Delta F(C_h, P_h)$ を100倍して%表示にしてある。

$\Delta F(C_h, P_h)$ は、合計色素濃度が $50 \mu\text{g L}^{-1}$ では最大0.6%程度だが、 $600 \mu\text{g L}^{-1}$ では8%近くまでになる。「独立蛍光モデル」の仮定は、 $50 \mu\text{g L}^{-1}$ 程度では許容されるが、より高濃度では成り立たない。それぞれが独立に蛍光を発するとした場合、式(35)の右辺の値が式(36)の右辺の値より大きくなり、唯一等号が成り立つ場合は、クロロフィル $a$ とフェオフィチン $a$ のどちらかの濃度がゼロの場合だけである。すなわち、「独立蛍光モデル」では、非線形領域において両色素が共存する場合、蛍光強度の収支が合わないために、式(35)は等号が成立しない。

以上から、蛍光強度の収支が合っ等号が成り立つことを説明するためには、式(35)における単位濃度当たり

の蛍光強度が、そこに存在する濃度に対応する値よりも小さくならなければならない。これは、濃度が高いほど単位濃度当たりの蛍光強度が低くなる (Fig. 2) ことから、「単位濃度当たりの蛍光強度が、実際に蛍光を発する濃度よりも、見かけ上高い濃度で存在している場合の値を示す。」と考えられる。すなわち、どちらか一方の色素側から放射される光子が、自己吸収だけではなく、共存する他方の色素にも吸収されて消光するという「非線形効果」によるものと考えられる。

ここで、式(35)の右辺が式(36)の右辺と等号が成り立つ場合を考えてみる。式(36)の右辺を変形すると

$$F_a = F_{ph}(C_h + P_h) \cdot C_h + F_{ph}(C_h + P_h) \cdot P_h \quad (38)$$

となる。そこで、式(35)の右辺は、式(38)の右辺との比較から、 $\beta = \gamma = C_h + P_h$ の場合に等号が成り立つことが分かる。また、式(34)の右辺第1項の $F_{ch}(\alpha)$ は、クロロフィル $a$ が酸化されると、式(35)の右辺第1項の $F_{ph}(\gamma)$ になることから、 $\alpha = \gamma = C_h + P_h$ でなければならない。そして、見かけ上の濃度は $C_h + P_h$ で、合計色素濃度に対応していることを示している。

以上から、非線形領域における蛍光強度の方程式が以下のように導かれる。

$$F_o = F_{ch}(C_h + P_h) \cdot C_h + F_{ph}(C_h + P_h) \cdot P_h \quad (39)$$

$$F_a = F_{ph}(C_h + P_h) \cdot C_h + F_{ph}(C_h + P_h) \cdot P_h \quad (40)$$

ここでは、式(39)と式(40)を蛍光強度の「一般方程式」とする。これは線形方程式と類似しているが、係数がすべて非線形の関数に置き換わっている点異なる。

「一般方程式」の解と数値計算法 次に「一般方程式」の解を求める。ここで

$$C_h + P_h = T_p \quad (41)$$

と置いて、 $C_h$ および $P_h$ について、「線形解」を求めた時と同様の演算により連立方程式を解くと、

$$C_h = (F_o - F_a) / (F_{ch}(T_p) - F_{ph}(T_p)) \quad (42)$$

$$P_h = (F_{ch}(T_p) \cdot F_a - F_{ph}(T_p) \cdot F_o) / (F_{ph}(T_p)(F_{ch}(T_p) - F_{ph}(T_p))) \quad (43)$$

という解が得られる。ここでさらに

$$R(T_p) = F_{ch}(T_p) / F_{ph}(T_p) \quad (44)$$

という、酸係数 $R(T_p)$ を導入して表記すると

$$C_h = (F_o - F_a) / (F_{ph}(T_p)(R(T_p) - 1)) \quad (45)$$

$$P_h = (R(T_p) \cdot F_a - F_o) / (F_{ph}(T_p)(R(T_p) - 1)) \quad (46)$$

という解が得られる。ここでは、式(45)および式(46)を、本稿では「一般解」と呼ぶ。また、「一般方程式」と「一般解」を併せて「非線形色素共存モデル」とする。

しかし、この「一般解」には未知数 $T_p$ が含まれている。したがって、この「一般解」を計算するためには、 $T_p$ を別途求める必要がある。

合計色素濃度 $T_p$ は $F_a$ からニュートン法を用いて計算する。 $T_p = x$ と置いて、

$$F_{ph}(x) \cdot x = F_p(x) \quad (47)$$

の関係及び式(36)から、

$$G(x) = F_p(x) - F_a = 0 \quad (48)$$

という関数 $G(x)$ を導入する。ニュートン法の公式に、式(33)を代入すると以下になる。

$$x_2 = x_1 - G(x_1) / (dG(x_1)/dx) \quad (49)$$

$$= x_1 - ((D(1 - e^{-E x_1}) - F_a) / (DE \cdot e^{-E x_1})) \quad (50)$$

この式(50)に、最初は適当な初期値 $x_1$  (本稿では10)を代入してから $x_2$ を計算する。次に、得られた $x_2$ を $x_1$ に代入し、 $x_2$ を求めるという計算を繰り返した。収束条件を

$$|(x_2 - x_1)| < 1 \cdot 10^{-5} \quad (51)$$

とし、これを満たした時に計算を打ち切り、 $x_2$ の値を $T_p$ の解とした。繰り返し計算の回数は、4~5回であった。

現場海水を用いた「一般解」の有効性に関する検証 計算式の適用が妥当か検討するために、色素共存状態にある試水として、現場海水を使用した。3月下旬は北海道西岸では大増殖期にあたるので、試水量が多ければきわめて高濃度の試料が容易に得られる。1985年3月20日、道総研中央水試前浜において、大型バケツに表面海水を採取した。

実験室内で、大型バケツ内の海水をよく攪拌しながら分取し、容量100mL、200mL、500mL、1,000mLの試水を、容量順に濾過(47mm, ワットマンGF/C)し、試料を2セット作成した。遠沈管に試料を入れ、90%アセトン10.0mLを加えて室温、暗所で1時間色素抽出した。その後、震蕩、遠心分離し、上澄液についてキャリブレーションと同様の分析操作を行った。分析結果を「一般解」で計算しTable 3に示した。

測定された蛍光値を、試水量の関数としてFig. 5に示した。図中の直線は、試水量100mLと200mLのデータを使った、原点を通る回帰直線である。試水量500mLと1,000mLの試料の蛍光値は、回帰直線から下方にずれて、非線形領域にある。

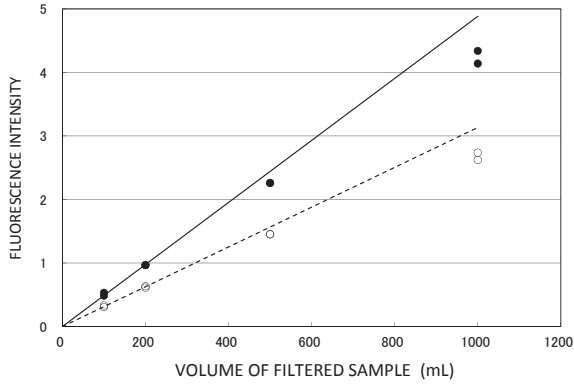


Fig.5 Fluorescence intensity (arbitrary unit) of in situ samples before (solid circle) and after (open circle) acidification shown against the volume of filtered sample. Linear regression lines from origin are drawn using data for 100 mL and 200 mL of sample before (solid line) and after (dashed line) acidification.

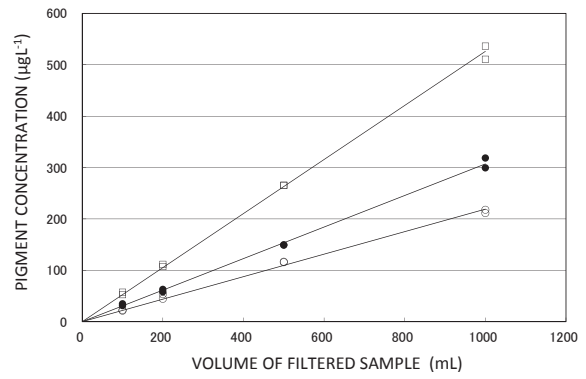


Fig.6 Pigment concentration of in situ samples calculated by general solution, shown for total pigment (open square), chlorophyll a (solid circle), and pheopigments (open circle) against the volume of filtered sample. Linear regression lines from origin are drawn.

次に、「一般解」で計算した色素濃度を、試水量の関数としてFig.6に示した。図中に、クロロフィルa、フェオ色素、および合計色素濃度について、それぞれ原点を通る回帰直線を記入した。

なお、Lorenzen and Jeffrey (1980)によると、クロロフィルaの分解色素では、フェオフォービドaが海水中では最も多く存在するという。そこで、本報告では海水中におけるクロロフィルaの酸化分解色素の呼称を、存在量の少ないフェオフィチンaではなく、フェオ色素とした。

「一般解」の計算値は、それぞれ試水量に正比例し、決定係数(R<sup>2</sup>)がすべて0.99以上あり、直線性が良い。

Fig.6のデータについて、回帰直線からの偏差をFig.7に%表示した。試水量が少ない100mLと200mLのデータには、高い値が含まれている。100mLでは、試料の1つで合計色素濃度が高かった。これは、攪拌がまだ十分でない状態のバケツから海水を分取したために生じたものと考えられる。200mLでは、試料の1つでフェオ色素が特に高い値である。合計色素濃度が高いわけではなく、

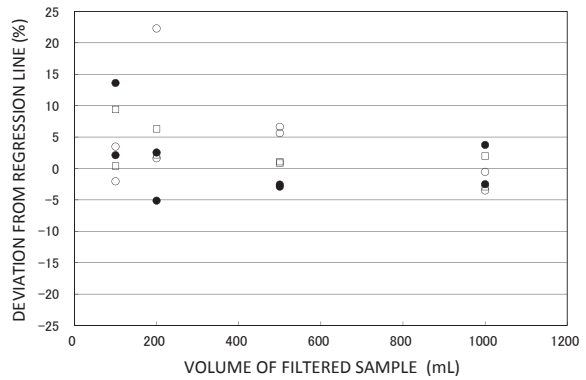


Fig.7 Deviation (%) of pigment concentration of in situ samples calculated from regression lines by general solution. They are plotted for total pigment (open square), chlorophyll a (solid circle), and pheopigments (open circle) against the volume of filtered sample.

クロロフィルaが逆に最も低い値 (Table 3)であることから、この試水を濾過するまでの間の動物プランクトンによる摂食か、あるいは、測定前の試料(抽出液)の酸汚染、いずれかの可能性が高いと考えられる。

Table 3 Results of calculation by general solution for in situ sea water samples

volume of filtered sample (mL)	corrected reading		in situ concentration			deviation from regression line					
	$F_o$	$F_a$ ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	$C_h$ ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	$P_h$ ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	$C_h+P_h$ ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	$C_h$ (%)	$P_h$ (%)	$C_h+P_h$ (%)			
100	0.532	0.332	34.9	22.7	57.6	3.49	2.27	5.76	13.6	3.5	9.4
100	0.485	0.305	31.3	21.5	52.8	3.13	2.15	5.28	2.1	-2.0	0.4
200	0.968	0.612	63.0	44.5	107.5	3.15	2.23	5.38	2.5	1.6	2.2
200	0.965	0.636	58.3	53.6	111.9	2.91	2.68	5.59	-5.1	22.3	6.3
500	2.26	1.450	149.6	115.7	265.3	3.00	2.31	5.31	-2.6	5.6	0.9
500	2.26	1.453	149.1	116.8	265.9	2.98	2.34	5.32	-2.9	6.6	1.1
1,000	4.14	2.623	299.4	211.4	510.8	3.00	2.11	5.11	-2.5	-3.5	-2.9
1,000	4.34	2.737	318.6	217.9	536.5	3.19	2.18	5.37	3.8	-0.5	2.0
r.m.s									5.7	8.7	4.3

ここで重要なのは、合計色素濃度の偏差であり、これが「一般解」の有効性を示す指標となる。合計色素濃度の平均二乗偏差は、全体で4.3% (Table 3) であり、100mLの特により高い値を除くと、2.9%である。濃縮倍率で標準化して現場濃度を計算すると、試水量100mLの試料から試水量1,000mLの試料まで、ほぼ同じ数値が得られる (Table 3)。

「線形解」による計算値との比較 「一般解」で得られた試水量100mLの試料の合計色素濃度 ( $T_p$ ) は  $55\mu\text{gL}^{-1}$  (平均値) であり、「線形独立蛍光モデル」が適用できる濃度領域にある。

そこで、 $46\mu\text{gL}^{-1}$ 以下の濃度のキャリブレーションデータから、回帰直線を作成し、「線形解」から得られた数値と、「一般解」から得られた数値を比較すると、その差は最大で4%程度である (Table 4)。

回帰直線を計算したキャリブレーションデータは  $46\mu\text{gL}^{-1}$ までなので、「一般解」で得られた  $55\mu\text{gL}^{-1}$ は、それを上回る濃度であり、比較の正確性が少し欠けるため、回帰直線による別の評価方法を採用した。

本来、回帰直線で近似する対象は、理論式そのものである。測定誤差がなければ、キャリブレーションデータは理論式の上に乗る。ここでは理論式が得られているので、この理論式の任意の濃度まで回帰直線が作成できる。そこで、理論式を用いて  $55\mu\text{gL}^{-1}$ までダミーデータを作成し、ダミーデータから回帰直線を計算して正確な回帰直線を得た。その結果、「一般解」から得られた数値と、回帰直線から得られた数値は0.6%以内の差で一致した (Table 4)。

以上から、「線形独立蛍光モデル」が適用可能な濃度領域では、「線形解」と「一般解」は一致することが示された。これは同時に、「一般解」で計算された濃度は、従来法では本来10倍希釈しなければならない、非線形領域にある試料についても、正しいことを示している。

現場海水による「一般解」の検証では、理論式の線形化可能領域から非線形領域の合計色素濃度で  $500\mu\text{gL}^{-1}$ 程度までの範囲で検証ができた。キャリブレーションデータから理論式は  $1,000\mu\text{gL}^{-1}$ 超まで適用できているので、「一般解」の計算もこの濃度まで適用できる。したがって、「一般解」により、北海道周辺の大増殖期のクロロフィ

ルaの最大濃度まで、正しい濃度が計算できることが明らかになった。

おわりに 現場海水による「一般解」の検証で得られたフェオ色素の濃度は、クロロフィルa濃度の70%以上もある。春季植物プランクトン大増殖期であるにもかかわらず、フェオ色素の濃度が高すぎるように思われる。

Lorenzen (1967)によると、植食性甲殻類の糞粒中には、フェオフィチンaよりもフェオフォービドaが含まれていたという。沿岸域では、波浪の影響で海底からこのようなクロロフィルa分解色素の再懸濁があり、フェオ色素が多くなったと考えられる。また、蛍光法では、クロロフィルbは酸化前に比べ、酸化後の蛍光強度が強くなるという光学特性を持つ (Lorenzen, 1967) ために、クロロフィルaはやや過小に、フェオ色素は極めて過大に計算結果が出るということが知られている (Gibbs, 1979; Jeffrey, 1997)。これらの理由が、フェオ色素の濃度が高すぎるように思われることを説明すると考えられる。

過去からのデータの数値に関する継続性を無視して、単にクロロフィルaだけを蛍光法により正確に求めるならば、Welschmeyer (1994) の方法が優れている。

従来の「線形独立蛍光モデル」は、「線形解」の計算が容易な点にメリットがある。本研究で得られた「非線形色素共存モデル」では、蛍光測定値から濃度を求める「一般解」の計算過程に、繰り返し計算が必要な、ニュートン法を用いなければならない。この点は、分析作業の軽減というメリットに対するデメリットである。

回帰直線について。通常、クロロフィルaの標準原液を希釈して濃度別の標準液を作成し、線形化可能領域内でキャリブレーションを行い、回帰直線 (検量線) を得る。この際、高濃度領域の標準液も利用して、理論式を求めておくと、理論式から任意の濃度までの回帰直線が作成できる。この方法は、正確な検量線を作成する良い方法と考える。本研究から、当時使用していた、キャリブレーションデータから得られた検量線は、理論式から得られたものと若干ずれていて、単位濃度当たりの蛍光強度が、 $F_{ch}$ で2.5%、 $F_{ph}$ で1.6%大きかったことが分かった。この原因は、計算の該当区間に含まれるキャリブレーションデータの数少なく、小数標本から現れる、分析誤差の偏りを拾って回帰直線が計算されていることにある

Table 4 Comparison of results of calculation for chlorophyll a and pheopigments obtained using the general equation, normal regression line using calibration data ( $-46.05\mu\text{g L}^{-1}$ ), and exact regression line ( $-55.00\mu\text{g L}^{-1}$ )

corrected reading		general equation (ge)		calibration data (cd)		exact regression (er)		$100 \cdot (\text{ge} - \text{cd}) / \text{cd}$		$100 \cdot (\text{ge} - \text{er}) / \text{er}$	
		$C_h$	$P_h$	$C_h$	$P_h$	$C_h$	$P_h$	$C_h$	$P_h$	$C_h$	$P_h$
$F_o$	$F_a$	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	(%)	(%)	(%)	(%)
0.532	0.332	3.49	2.27	3.36	2.28	3.47	2.26	3.87	-0.44	0.58	0.44
0.485	0.305	3.13	2.15	3.02	2.16	3.12	2.14	3.64	-0.46	0.32	0.47



と考える。

「線形独立蛍光モデル」が適用されるような低濃度領域では、Fig.2に端的に見られるように、単位濃度当たりの蛍光強度が定数に見える。これは、理論式から減少関数であるはずのものが、測定誤差が大きいため、この領域では定数に見えてしまうためである。 $F_{ch}$ と $F_{ph}$ が定数ということは、検量線が直線であることを意味し、キャリブレーションデータを回帰直線に当てはめる、線形モデルしか適用できない。これが従来から行っている方法である。

今後、蛍光光度計による測定誤差が、桁違いに小さくなるような技術革新が進んだ場合、キャリブレーションの測定値は、低濃度領域でも、線形化された回帰直線上に乗るのではなく、究極的には、理論式の上に乗って行くようになるはずである。その時に、本研究結果が広く活用されることになるであろう。

## 謝 辞

本研究の始まりとなる蛍光光度計のキャリブレーションでは、標準原液の作成および標準液の調整は鹿又一良氏（故人、当時北海道立中央水産試験場漁業部海洋科）が行ったものである。本来であれば共著者とすべきところであるが、ここに記して感謝の意を表す。

## 引用文献

- Gibbs CF. Chlorophyll b interference in the fluorometric determination of chlorophyll a and "phaeo-pigments". *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 1979 ; 30 : 597-606.
- Holm-Hansen O, Lorenzen CJ, Holmes RW, Strickland JDH. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 1965 ; 30 : 3-15.
- 井村久則, 樋上照男. 「基礎から学ぶ機器分析化学」(株)化学同人, 京都市. 2016.
- Jeffrey SW. Application of pigment methods to oceanography. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds). *Application of pigment methods to oceanography: guidelines to modern methods.* UNESCO Publishing, France. 1997 ; 127-166.
- Lorenzen CJ. Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 1967 ; 12 ; 343-346.
- 気象庁. 植物色素の測定. 「海洋観測指針」気象庁編 日本海洋学会, 東京, 1970 ; 250-254.
- Lorenzen CJ, Jeffrey SW. Determination of chlorophyll in sea water: report of intercalibration tests. *UNESCO technical papers in marine science* 1980 ; 35 : 1-21pp.
- Mantoura RFC, Jeffrey SW, Llewellyn CA, Claustre H, Morales CE. Comparison between spectrophotometric, fluorometric and HPLC methods for chlorophyll analysis. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods* UNESCO Publishing, France. 1997 ; 361-382.
- 中田 薫. 北海道噴火湾の1981年春季増殖期における植物プランクトンの組成. 水産海洋研究会報 1982 ; 41 : 27-32.
- Parsons TR, Strickland JDH. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.* 1963 ; 21 : 155-163.
- Richards FA, Thompson TG. The estimation and characterization of plankton population by pigment analysis II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Marine Res.* 1952 ; 1 : 156-172.
- Welschmeyer NA. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.* 1994 ; 39 : 1985-1992.
- Yentsch CS, Menzel DW. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.* 1963 ; 10 : 221-231.