

ペーパクロマト展開物質の吸収, 蛍光スペクトル

Absorption and Fluorescence Spectra of Paper Chromatogram

保 田 和 雄*
Kazuo Yasuda

嶺 岸 久 子*
Hisako Minegishi

小 川 努*
Tsutomu Ogawa

内 容 梗 概

ペーパクロマト展開物質の反射スペクトルから吸収スペクトルを求めうる条件を, 理論的, 実験的に調べ, またこれを測定できる装置についても研究した。

展開物質が微結晶でなく, 単分子で吸着され, かつ低濃度の状態ならば, Kubelka-Munk⁽¹⁾の式を用いて散乱光を補正すれば, 反射スペクトルから吸収スペクトルが求められる。またペーパクロマト展開物質の蛍光スペクトルは, o-o' 遷移に相当する蛍光が著しい再吸収を受けることがわかった。

ペーパクロマト展開物質は紫外吸収スペクトルを持つものが多いので, 装置としては紫外域で分光感度の高い分光光度計を用い, さらに吸収強度のスケール拡大ができる回路を付属させれば吸収スペクトルを測定できることが明らかになった。

1. 緒 言

吸収スペクトルの測定は, ほとんどが溶液の透過法によって行なわれている。しかし近年, 特に微量分析がさかんになってきたので, クロマトグラムなどの展開物質を溶出して, それから吸収スペクトルを求めることが困難な場合が多い。したがってクロマトグラムから展開物質を溶出しなくても, そのままの状態では吸収スペクトルが測定できることが望ましい。F. Korte 氏⁽²⁾はペーパクロマトグラムの反射スペクトルから生化学代謝物質の定性を行なった。著者らはペーパクロマトグラムで, 反射スペクトルから吸収スペクトルを求める条件を, 理論的, 実験的に調べ, さらにこれが測定できる装置についても研究した。また蛍光スペクトルの再吸収の影響についても調べた。

2. 原 理

2.1 吸収スペクトル

ろ紙に展開された試料は, 単分子の状態, これらが集合した状態, あるいは微結晶の状態で存在している。そしてこれらは, ランダムな方向に存在し, かつ, ろ紙の厚さの方向に対して一様に存在している。したがってこのようなクロマトグラムの反射スペクトルには, 偏光などの特異な現象はほとんどないと考えられている。このようなクロマトグラムから試料の吸収スペクトルを測定するには分子または微結晶による光散乱および, これら分子の層あるいは微結晶などによって吸収された光の波長分布の補正を行なえば, 反射スペクトルから吸収スペクトルを求めることができる。

反射, 吸収, 散乱の間には(1)式で示される Kubelka-Munk⁽¹⁾の関係があることが知られている。この式をクロマトグラムに適応することによって, 散乱を補正して吸収スペクトルを求めることができる。

$$\frac{K}{S} = \frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty} \quad (1)$$

K : 吸 収 係 数

S : 散 乱 係 数

$$R_\infty = a - (a^2 - 1)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

$$a = \frac{1}{2} \left[R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right] \quad (3)$$

R_g : バックグラウンドの反射率

R_0 : バックグラウンドの反射率が零であるときのクロマ

トグラムの反射率

R : バックグラウンドの反射率が R_g であるときのクロマトグラムの反射率

また散乱係数は(4)式で与えられる。

$$S = \frac{1}{b} \left(Ar \operatorname{ctgh} \frac{1 - aR_0}{bR_0} \right) \quad (4)$$

$$b = (a^2 - 1)^{\frac{1}{2}}$$

吸収係数(K)は, 測定された R , R_0 , R_g の値を(2)式に代入し, (4)式より各波長における散乱係数を求め, これらの値を(1)式に代入して求められる。

入射光を試料に照射したとき, 反射光は, 試料の中の各所から出てくるので, 種々の吸収を受けた光が混合されたものである。すなわち同じ吸収強度の試料でも分子層の厚さ, 微結晶の大きさが異なると反射光は種々の吸収強度をもつようになる。しかも測定される反射率は, これらの光の積分値であるので試料の吸収強度が大きくなったとしても, 積分値である光量は, この吸収強度に比例して少なくなる。

透過法による溶液の吸収スペクトルの測定では, スリット幅を十分に小さくすると透過光は一つの吸収強度をもったものしか出てこない。このため透過光の積分値は吸収強度に比例する。

2.2 蛍光スペクトル

ろ紙に展開した分子に紫外線を照射して, 出てくる蛍光スペクトルは, 励起光の背面, 側面, 前面などから出る蛍光の積分されるものである。

クロマトグラムから出る蛍光に散乱がないと仮定した場合における背面, 側面, 前面から出る蛍光強度は(6), (7), (8)式によって与えられる。

$$dB'(\lambda') = \frac{\rho}{4\pi n^2} \cdot E_{\lambda,0} \cdot F_{\lambda}(\lambda') \frac{k_{\lambda}}{(k_{\lambda} + k_{\lambda}')} \cdot (1 - e^{-(k_{\lambda} + k_{\lambda}')l}) d\lambda' \quad (6)$$

$$dB'(\lambda') = \frac{\rho}{4\pi n^2} \cdot E_{\lambda,0} \cdot F_{\lambda}(\lambda') \frac{k_{\lambda}}{k_{\lambda}'} \cdot (1 - e^{-k_{\lambda}'l}) e^{-k_{\lambda}x} d\lambda' \quad (7)$$

$$dB'(\lambda') = \frac{\rho}{4\pi n^2} \cdot E_{\lambda,0} \cdot F_{\lambda}(\lambda') \frac{k_{\lambda}}{(k_{\lambda} - k_{\lambda}')} \cdot (e^{-k_{\lambda}'d} - e^{-k_{\lambda}d}) d\lambda' \quad (8)$$

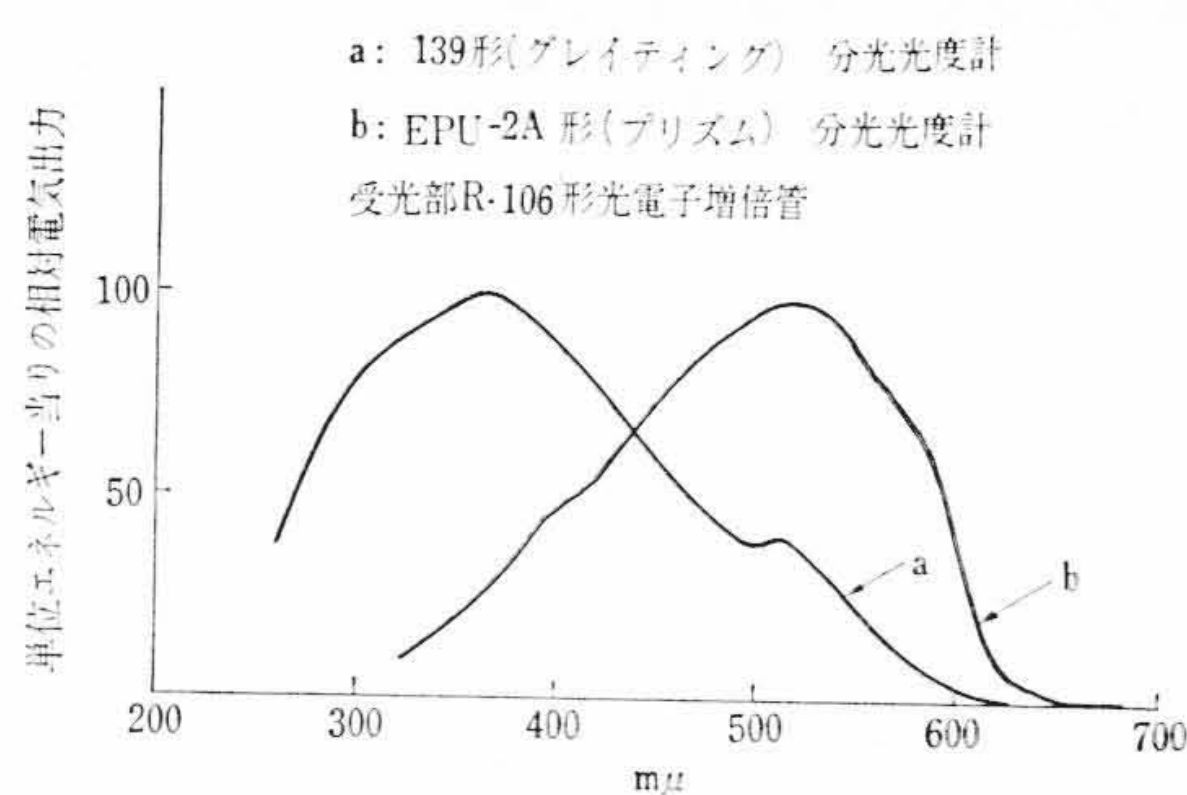
$dB'(\lambda')$: 蛍 光 の 密 度

ρ : 励起光の反射による損失補正係数

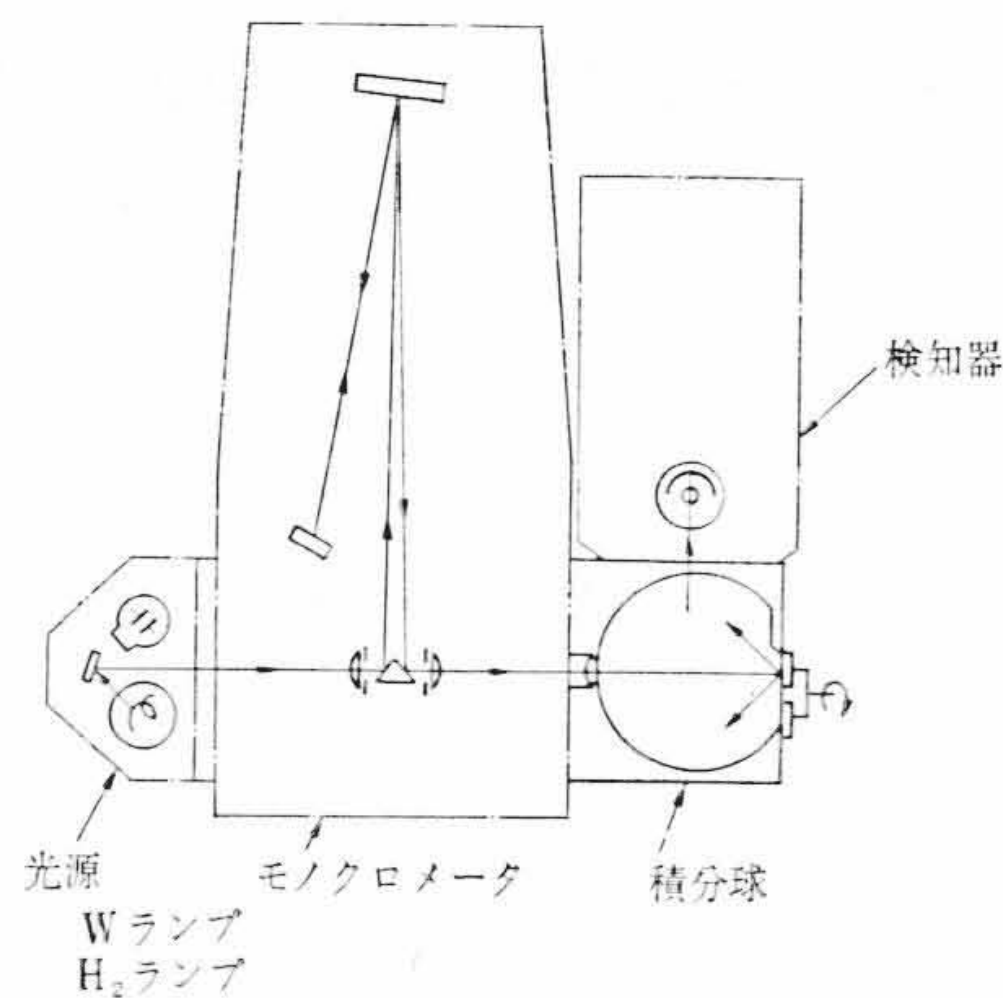
n : 屈 折 率

$E_{\lambda,0}$: 単位表面当たりの励起光の強度

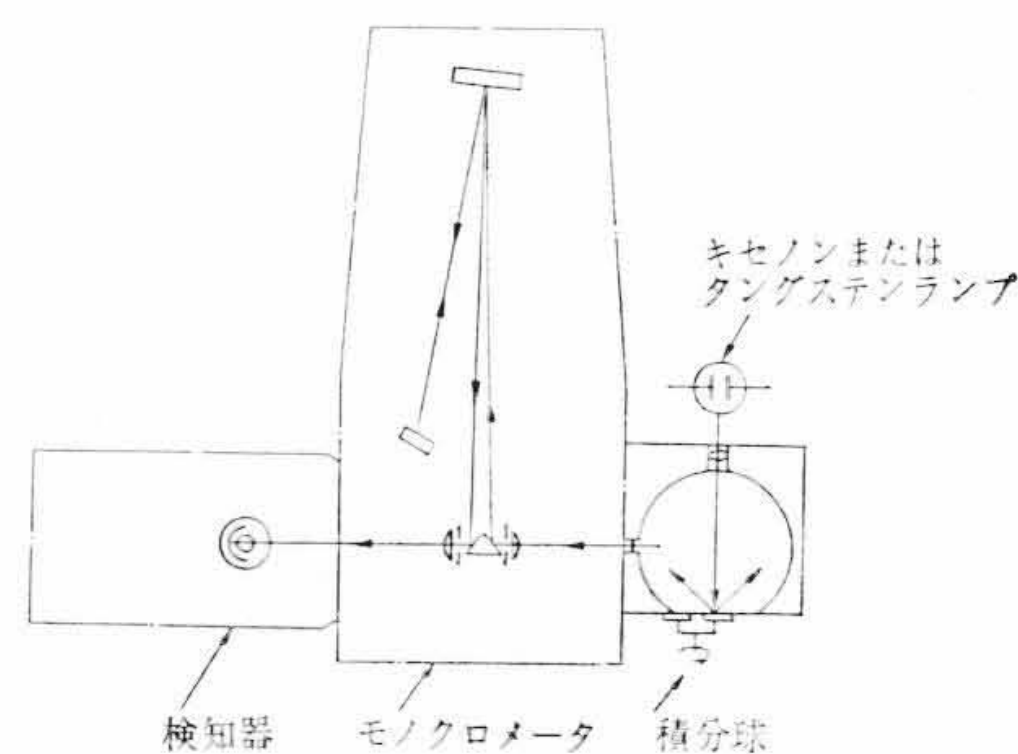
* 日立製作所那珂工場



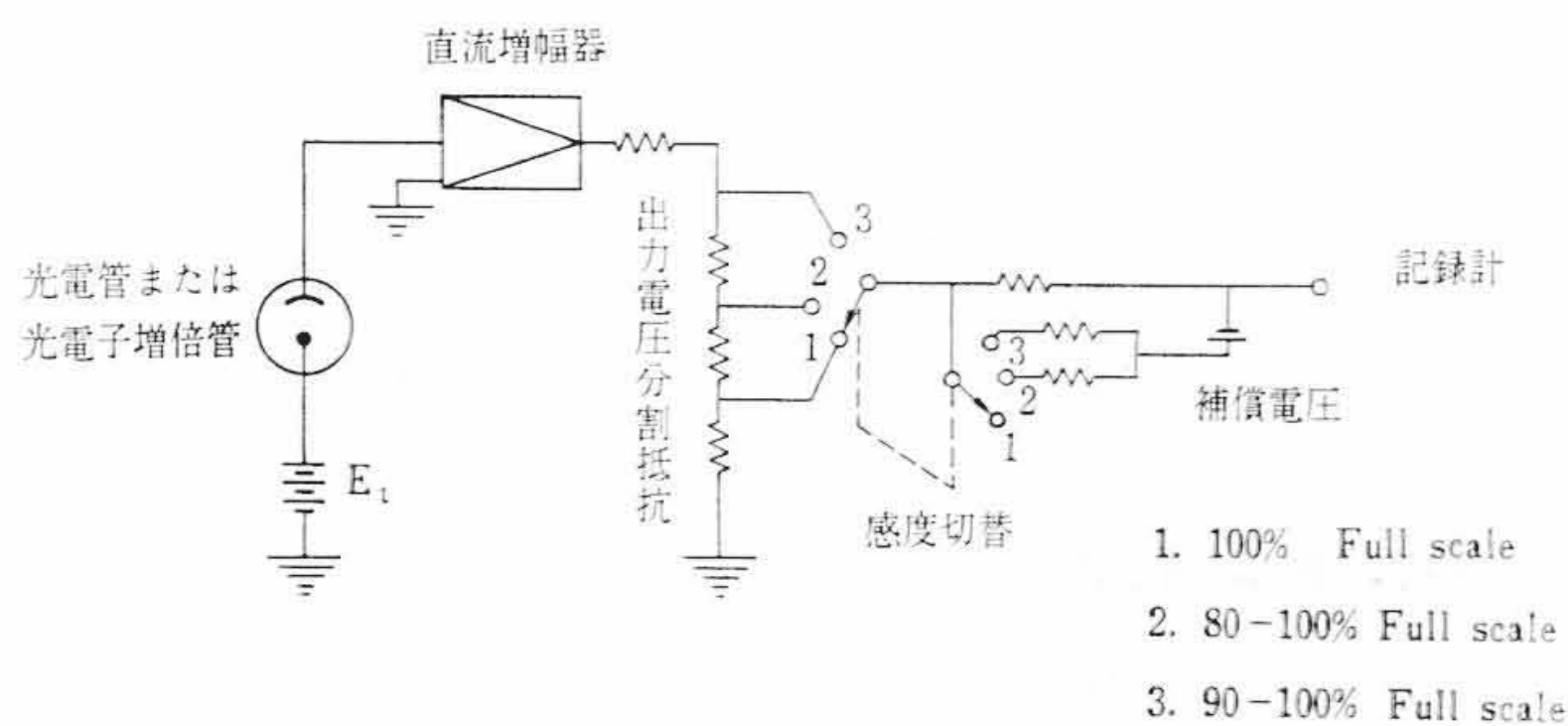
第1図 分光光度計の分光特性
※ NBS 標準ランプで補正



第2図 反射スペクトル測定的光学系



第4図 蛍光反射測定的光学系



第3図 Scale Expansion 回路系統図

$F(\lambda')$: 単位波長当たりの蛍光強度

k_λ : 励起光の波長における吸収係数

$k_{\lambda'}$: 蛍光の再吸収のある波長における吸収強度

l : スポットの大きさ

d : 層 厚

x : 表面からの距離

蛍光スペクトルは入射光の波長によって変わらないので、蛍光の再吸収が小さければ、いかなる方向から出る蛍光スペクトルにも変化がない。しかしながらろ紙に展開されたスポット中の試料濃度は高いので蛍光スペクトルは再吸収を受けたものが観測される。すなわち溶液蛍光で測定できる $o-o'$ 遷移をこのクロマトグラムのうえから求める場合には、再吸収の補正をせねばならない。

ろ紙に吸着された分子から出る蛍光の一部は散乱されたのみで、まったく再吸収のない正しい蛍光スペクトルを示す。すなわち(6), (7), (8)式において $k_{\lambda'}=0$ の場合に相当するものである。しかしながら、この蛍光の一部には再吸収を受けるものもある。媒質の屈折率と分子の屈折率とが同じであると仮定すると、再吸収の程度は(1)式より求めた k の値によって定まる。このため再吸収された蛍光と再吸収のない蛍光強度の比は、(1)式でもって表わされる。しかもこの再吸収が(6), (7), (8)式のうち主としてどれによるかは測定手段によって異なるものである。

蛍光スペクトルの強度は、試料の濃度、量子吸収率のほかに入射光の強度とこの光を吸収する吸収係数 $K\lambda$ によって定まる。すなわち、試料濃度が低い場合には、(1)式に示される吸収係数の値によって定まるものである。

3. 装 置

ろ紙に吸着した有機物はランダムな方向に存在しているので、吸収や蛍光を測定する場合に、一定方向のみで測定を行なうよりも積分球を用いて反射光または蛍光の積分値を求めるほうがより正しい測定値を与える。このために著者らは積分球を用いて、吸収、蛍光

スペクトルを測定した。

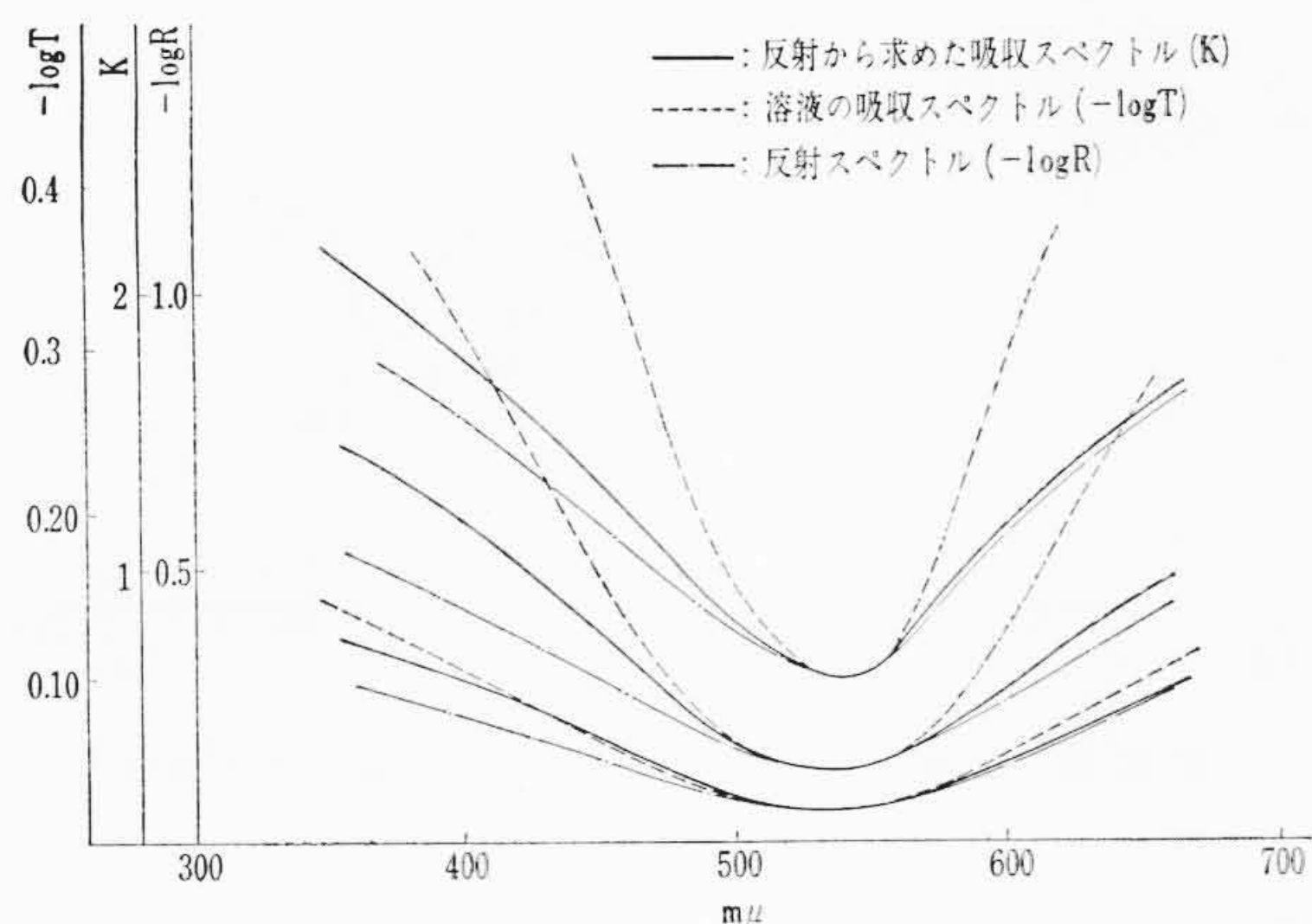
(1) 反射スペクトルの測定

紫外反射スペクトルの測定においては、検知される光量が少ないので光源の強度を大きくする、紫外に分光感度の高いモノクロメータを用いる、増幅を大きくするなどのことをしなければ反射スペクトルを測定することはできない。このため F. Korte 氏⁽²⁾は紫外強度の大きい重水素放電管を用いて反射スペクトルを測定した。

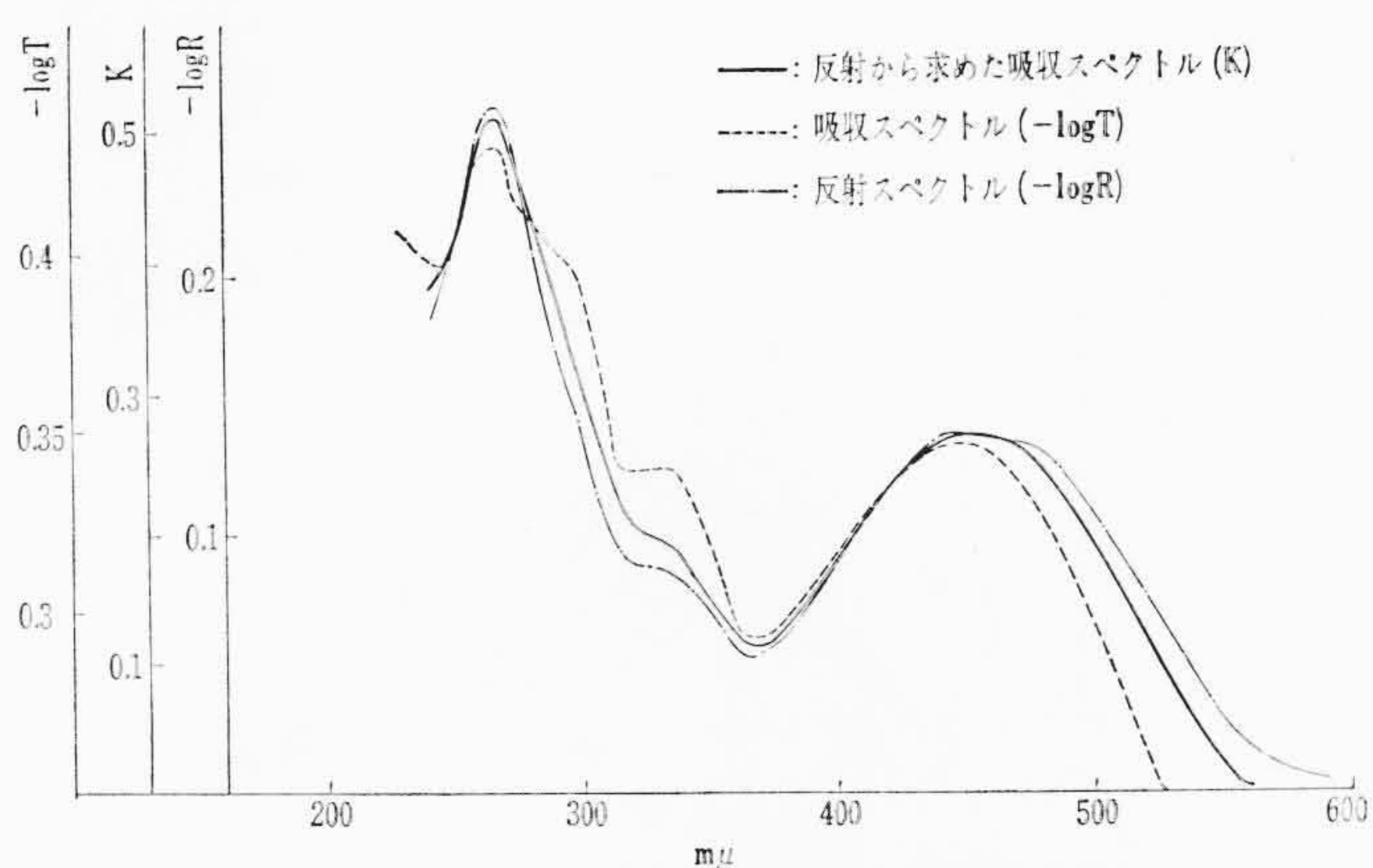
著者らは、紫外域で分光感度の高い日立 139 形分光光度計を用いることによって測定した。この装置の分光特性は第1図に示すように、プリズム分散形のモノクロメータに比べて紫外域の分光感度が高い。第2図は測定装置の光学系を示す。この方法では試料に直接照射される紫外線強度を少なくすることができるので、光化学反応などをおさえることができる。しかしながら試料が蛍光性のものであると、蛍光のために吸収強度が小さくなって測定される。このような場合には第4図に示す方法でもって蛍光の妨害を除いた。しかしながらこの場合には、光源の強度が小さいと測定不可能なので Xe 灯あるいは輝度の高い W ランプを用いた。このため紫外線ですぐ光化学反応を起こすようなものでは測定することがむずかしいと考えられる。なお、この反射スペクトルの測定においてはろ紙の反射が試料反射スペクトルに重なってくるのを防ぐために、標準側には試料の吸着していないろ紙を用いた。ろ紙のスポット上では試料濃度が高くても、繊維などによって直接入射光が照射されない場合が多いので、この展開物質の吸収係数は溶液の場合に比べて低い値として測定される。また低濃度で測定をするほうが正しい吸収スペクトルを与えるので、著者らは、第3図に示す回路を用いて最大 10 倍のスケール拡大を行なった。

(2) 蛍光スペクトルの測定

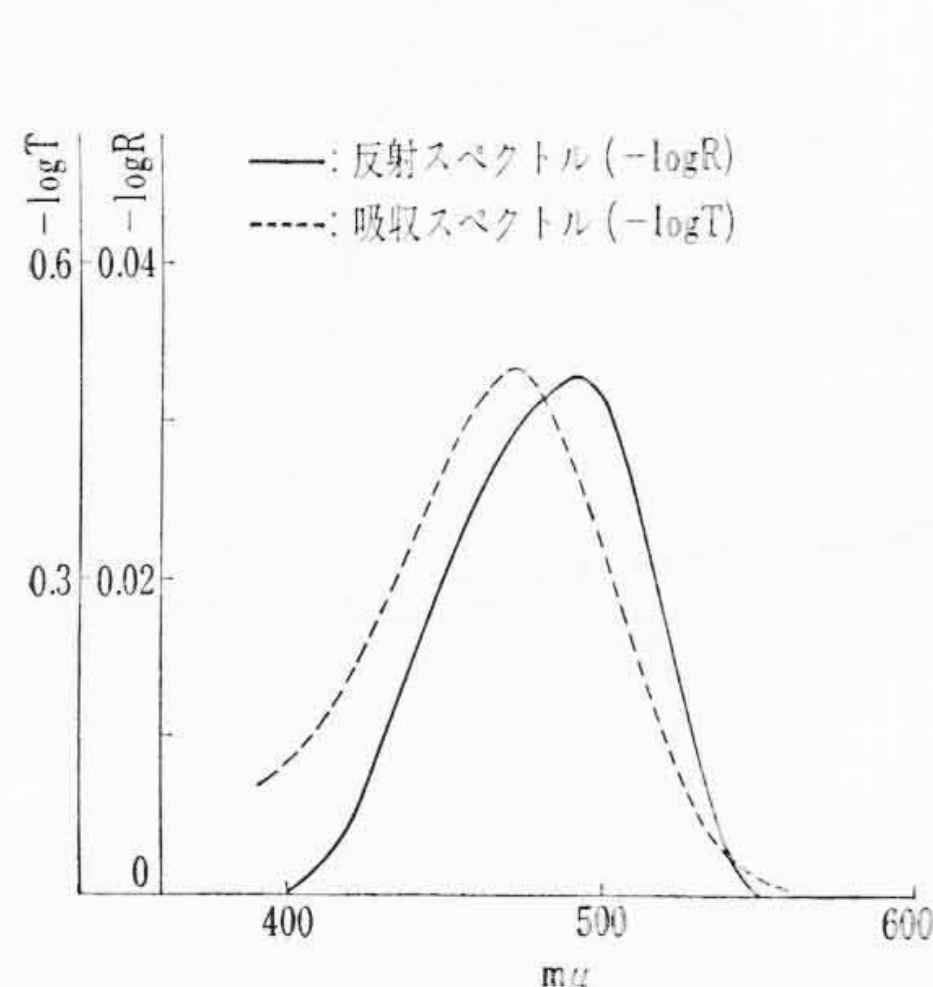
第4図に示す装置の光源に水銀灯を用い、フィルタでもって輝線のみを分光し、これで試料を励起した。この試料から出る蛍光をモノクロメータで分光して検知した。なお蛍光スペクトルの $1 \text{ m}\mu$ あたりの相対エネルギーが必要なときには第1図の分光特性でもって補正した。フィルタで励起光のみを完全に分離することができないと、蛍光スペクトルの上にこの励起光の反射スペクトルが重なってくる。このような場合には励起光源を連続光である Xe 灯などにかえて蛍光スペクトルを測定した。そして蛍光スペクトルに重なってくる光源の光を除くために標準側にろ紙をおいて、反射スペクトルを測定する場合と同じようにして測定した。したがってこの結果は、反射スペクトルの上に蛍光スペクトルが重なってくる。しかも、このときの蛍光スペクトルの強度は光源のスペクトルの強度の比として表わされるようになる。



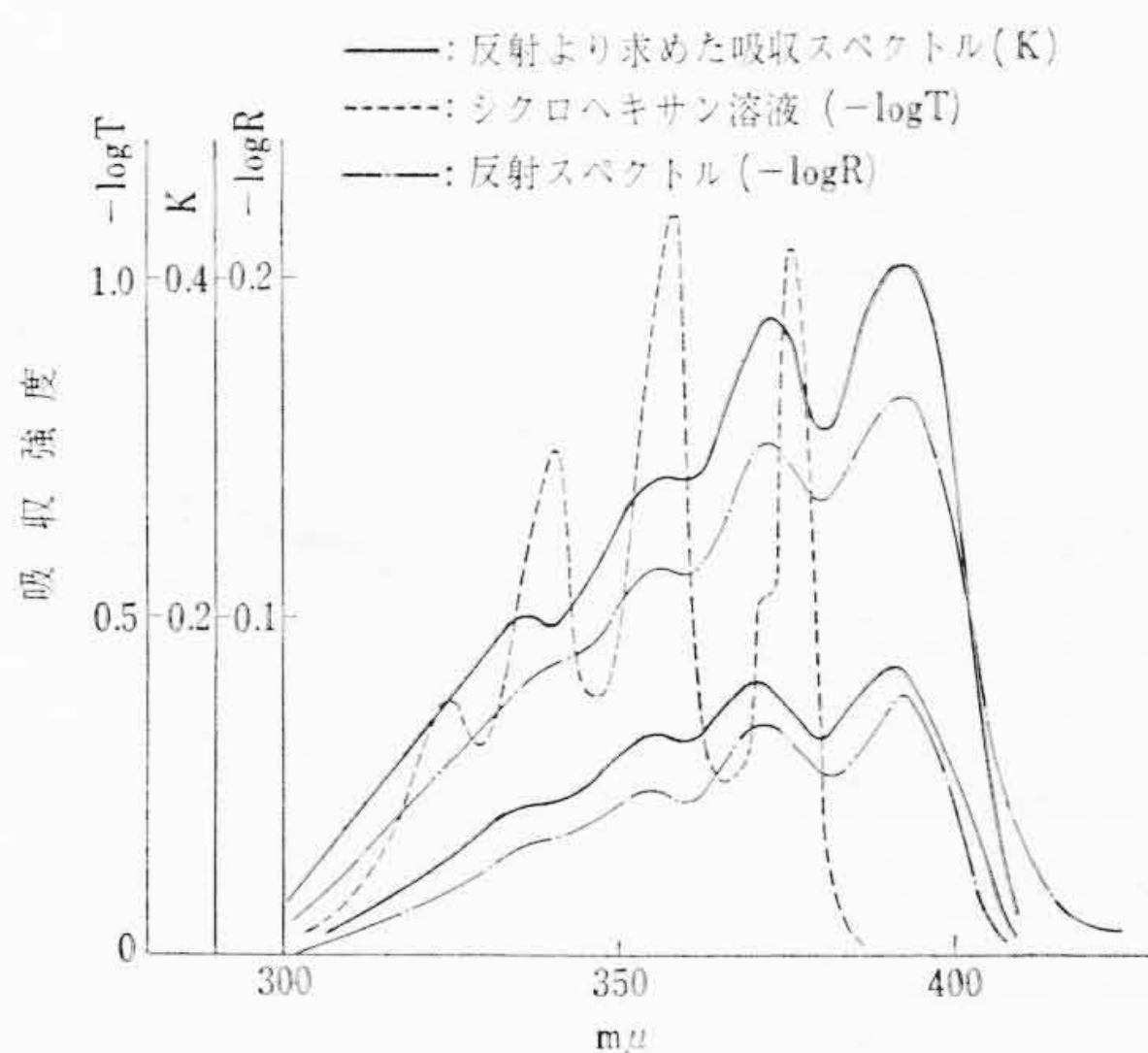
第5図 ナフトールグリーンの吸収スペクトル



第8図 2-アミノ-1:4-ナフトキノンの吸収スペクトル



第6図 イソドロソプテリンの吸収スペクトル



第7図 アントラセンの吸収スペクトル

4. 測定結果

4.1 吸収スペクトル

反射スペクトルから散乱光の補正を行なって求めたナフトールグリーン、イソドロソプテリン、アントラセンおよびボルフィリンの吸収スペクトル、および溶液の吸収スペクトルを、それぞれ第5, 6, 7, 8図に示す。

第5図からナフトールグリーンが低濃度の場合には、反射から求めた吸収スペクトルは、溶液の吸収スペクトルにほぼ一致するが、濃度が高くなると一致しなくなる。また低濃度であっても吸収係数が大きくなった場合同じように一致しなくなる。これはすでに述べたように、観測された反射光は少ししか吸収を受けないものや、大きい吸収を受けたものの積分値であるので、濃度が高いほど大きい吸収を受けた光が測定に寄与しないためである。したがって反射から真の吸収スペクトルを得るためには、低濃度の場合のみしか適応できないと考えられる。

ろ紙を透過する光の強度が零になると、散乱光の補正を行なうことができなくなる。このため反射率 ($-\log R$) を第5図にプロットしてみた。これは吸収スペクトル ($-\log T$) とあまりよく一致していない。しかし低濃度の場合には、ある程度一致することが期待される。

第6図にイソドロソプテリンの低濃度の反射スペクトル ($-\log R$) と10倍に拡大して測定した結果、および酸性溶液の吸収スペクトルを示す。この結果をみると、吸着状態と酸性溶液の状態との相異のために吸収の主波長は異なるが、この点を除けばスペクトルの形状そのものは非常に一致を示している。

第7図はスケール拡大を行なわないで測定したアントラセンの吸収スペクトルである。反射から求めた吸収スペクトルは溶液の吸収

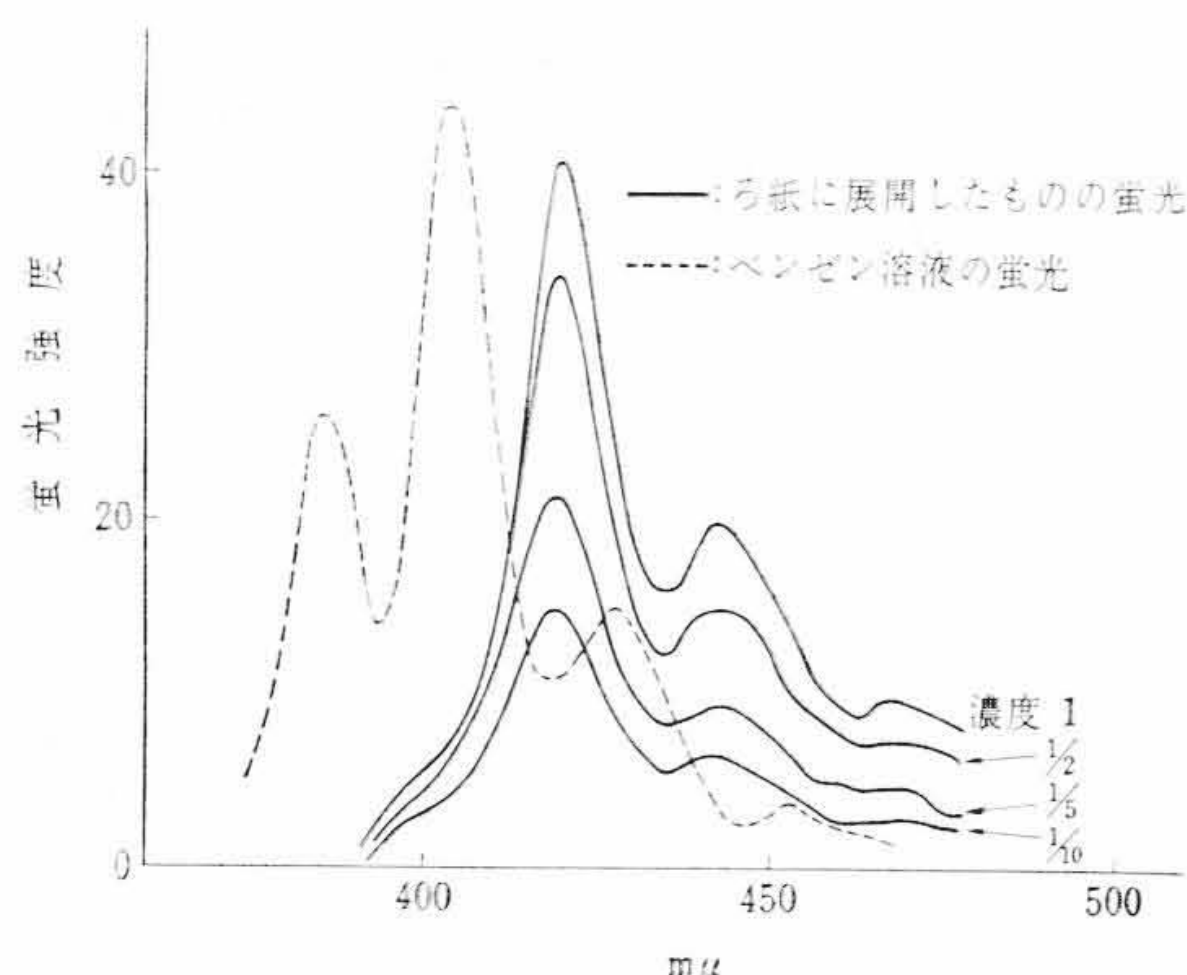
スペクトルに比較して振動スペクトルが明瞭に出ていない。これは、アントラセンはろ紙に単分子で吸着されるというよりは、微結晶が析出しているので、表面反射が大きいと考えられる。このため、ナフトールグリーンでは表面反射の影響が小さいと考えられるような低い反射率のところでも、アントラセンの場合には大きな影響を受ける。散乱光を補正しない場合は、吸収された反射光の、測定値に対する寄与が小さくなるので、補正した場合にくらべ、振動スペクトルがさらに明瞭に現われなくなってくる。なお結晶状態と溶液の状態とでは電子状態が異なるので、吸収の主波長は一致しない。なお一般には吸着、結晶状態では吸収の主波長は

長波長にシフトするものが多い。

第8図にスケール拡大を行なわないで測定したナフトキノンの吸収スペクトルを示す。反射から求めた吸収スペクトルと溶液の吸収スペクトルは、一方が固体であり他方が溶液の状態であることを考えればよく一致している。これは分子が結晶状態でなく単分子の形で吸着されているので、特に強い吸収や、特に弱い吸収がなく、ほぼ等しい吸収を受けた光が反射されてくるからであろうと考えられる。

4.2 蛍光スペクトル

水銀灯の 365 mμ 輝線で励起したアントラセンの蛍光スペクトル、およびベンゼン溶液における蛍光スペクトルを第9図に示す。ここで両スペクトルにおける最も著しい相異は、溶液蛍光において測定された 386 mμ に相当する蛍光バンドが、ろ紙に展開した場合には、わずかにショルダーとしてしか測定されないことである。これはスポット上の微結晶による再吸収のために吸収スペクトルと重なった蛍光スペクトルは、濃度の高い溶液蛍光と同じように⁽³⁾、強度が減少するためである。この点を除けば、結晶の蛍光スペクトルと溶液蛍光スペクトルとは、吸収スペクトルの場合に比較してよく一致した振動構造を持っている。このことは、蛍光スペクトルは、吸収スペクトルのように測定値が標準に対する対数で表わされるのではなく、ある波長における種々の蛍光強度の算術和で表わされるためである。アントラセンの濃度を変えた場合の蛍光強度は濃度に比例しない。これはスポット上の濃度が高いために、入射光と微結晶を透過した光との比があまりにも大きいことに基づくものと考えられる。なお溶液蛍光スペクトルと結晶の蛍光スペクトルとの波長のずれは、電子状態のちがいによるものであると考えられる。



第9図 アントラセンの蛍光スペクトル

5. 分 析 例

以上に述べたように反射スペクトルから吸収スペクトルを求める場合には、低濃度で微結晶がなく、分子膜で吸着しているものでないといふ一致を示さないことがわかった。

(1) ショウジョウバエの目の色素

ショウジョウバエには Normal, Sepia, Rosy の種類があり、これらは遺伝学上非常に興味あるものであるといわれている。これらのうち、Normal から抽出した目の色素をペーパクロマトグラフに展開したものの中で、イソドロソプテリン (isodrosopterin) の吸収スペクトルを測定した。クロマト展開は、ハエを乳鉢ですりつぶし、50%メタノールで抽出し、抽出液をろ過、濃縮し、ブタノール-酢酸アンモンを展開溶媒として行なった。結果を第6図に示す。

(2) リボフラビンの光分解生成物

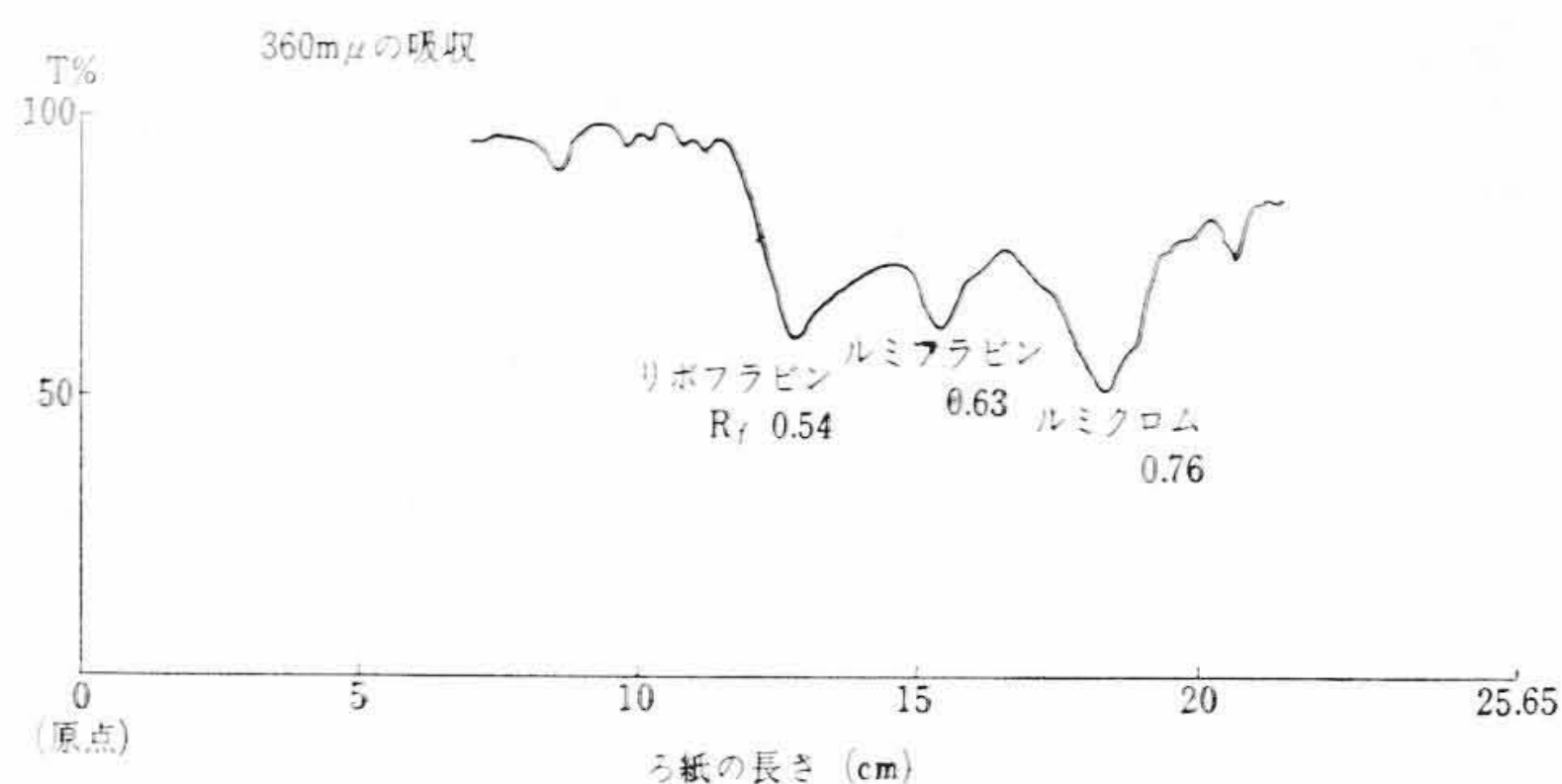
リボフラビンに光を照射すると、分解しルミフラビンとルミクロムが生成する。この生成物をブタノール-酢酸で展開した。それを360 mμの波長でデントメトリーした結果を第10図に示す。またペーパの各スポットの反射スペクトルから吸収スペクトルを求めた結果を第11図に示す。これらの結果から定性を試みた。リボフラビンでは吸収極大の波長が、溶液吸収スペクトルから求めたものとよい一致を示した。

(3) 鳥形結核菌の抽出物質

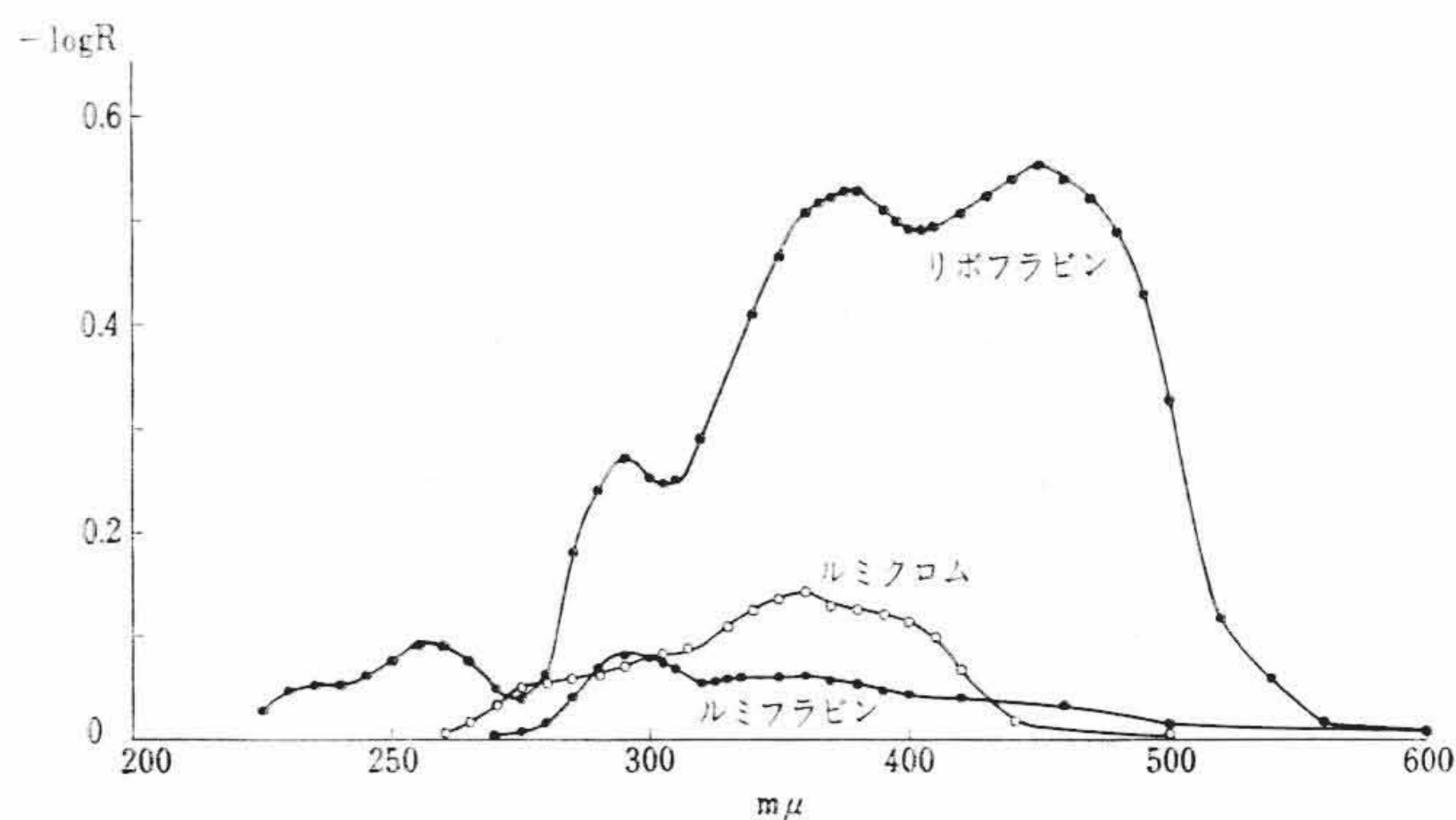
鳥形結核菌の中のコプロポルフィリンの測定は生化学上必要なものであるので、菌抽出物質をケロシン-クロロホルム-*n*-プロピルアルコールで展開し、ポルフィリンの定性を行なった。測定結果を第12図に示す。このスペクトルは散乱光の補正を行わず、 $-\log R$ の値を波長に対してプロットした。同じ図に示した溶液吸収スペクトルと吸収極大の波長はよく一致している。

6. 結 言

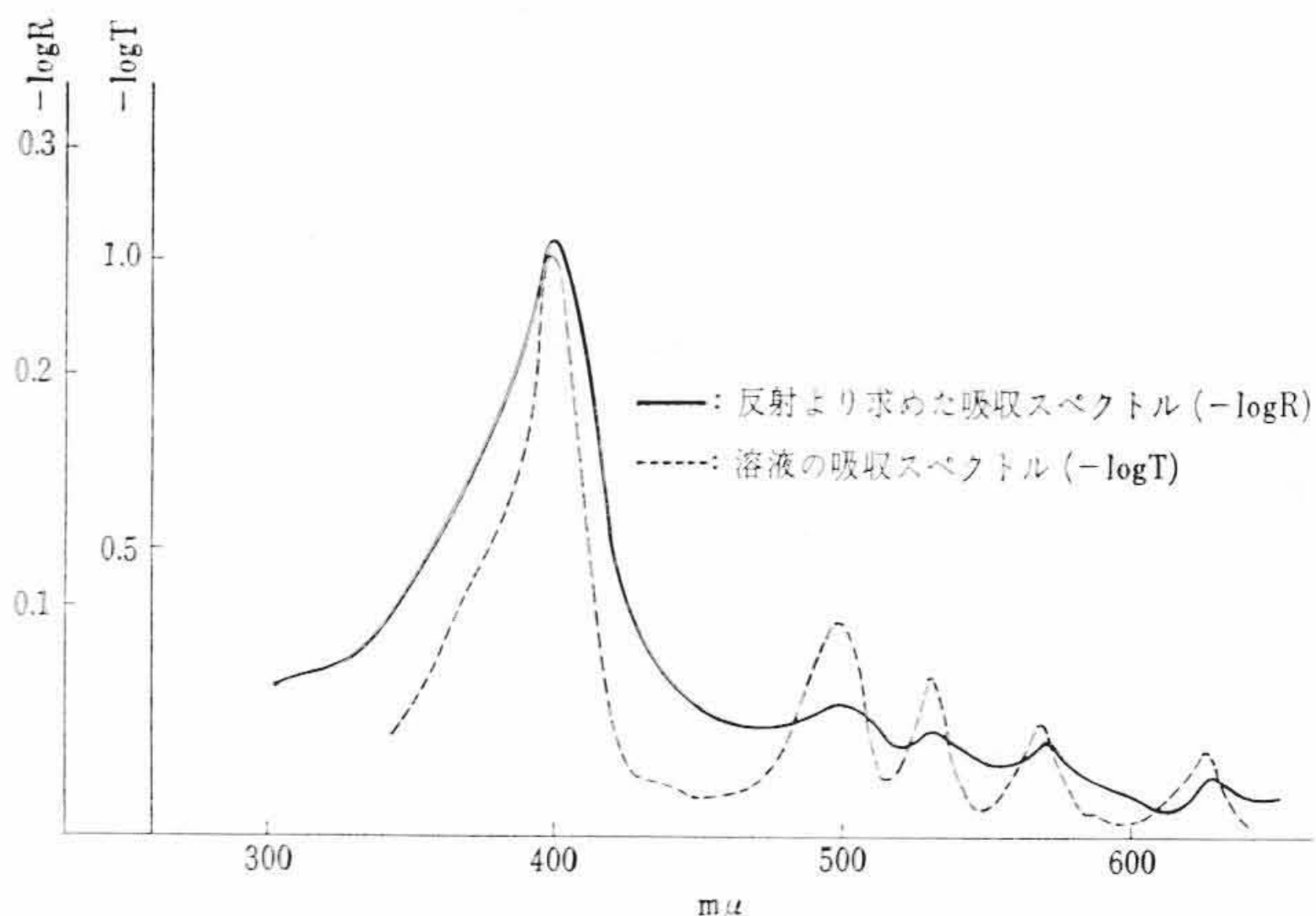
ペーパクロマトグラムの反射スペクトルから吸収スペクトルを求める場合には、散乱光を補正し、さらに吸収された反射光が近似的に一つの吸収強度を持つようにしなければ、正しい吸収スペクトルを求めることができない。すなわち、クロマト展開物質が微結晶の状態で存在すると、散乱光の強度が大きく、かつ反射光が種々の吸収強度を持っているので正しい吸収スペクトルは得られない。展開物質が分子膜の状態で存在している場合には、散乱光を Kubelka-Munk の式で補正すれば吸収スペクトルを求めることができる。しかしながら、濃度が高い場合には正しい値は得られず、低濃度の場合にのみ正しい値が得られることがわかった。しかもこの場合には、散乱光の補正をしなくても、反射率から得た $-\log R$ を吸収強



第10図 リボフラビンの光分解のデントメトリー



第11図 リボフラビン、ルミフラビン、ルミクロムの反射スペクトル



第12図 コプロポルフィリンIII-メチルエステルの吸収スペクトル

度としてもあまり大きい誤差がないことがわかった。

ペーパクロマト展開物の蛍光スペクトルは、溶液の場合とほとんど同じスペクトルを示すが、短波長側にある $o-o'$ 遷移のところの再吸収が大きくなり、ある場合にはこれに相当する蛍光バンドが消失することがわかった。

ペーパクロマト展開物質の多くが紫外域に吸収をもつために、装置としては紫外に分光感度の高い分光器を用い、吸収強度をスケール拡大して測定できる電気回路を使用すれば、反射スペクトルから吸収スペクトルが求められることがわかった。

本研究を行なうに当たり、種々ご指導、ご助力くださった学習院大学、後藤幹保助教授に厚く感謝する。

参 考 文 献

- (1) D. B. Judd: Color in Business, Science and Industry. (John Wiley & Sons, Inc. 1952)
- (2) F. Korte & H. Weitkamp: Augew Chem., 70, 434 (1958)
- (3) M. Nakamizo, Y. Kanda: Spectrochimica Acta., 19, 1235 (1963)