

二波長測光を用いた自記分光光度計

(356形日立二波長自記分光光度計)

Double Beam Spectrophotometer with
Two-wavelength Measurement

本 川 忠*
Tadashi Honkawa

黒 石 忠 文*
Tadafumi Kuroishi

木 村 忠*
Tadashi Kimura

要 旨

従来の分光光度計では、同一波長の光を標準となる物質と試料となる物質にあてて、その透過光の比から試料の透過率を測定する。しかも試料が透明である前提に立っていた。近年、混濁試料の微小変化を測定する要求が高まり、一つの試料に二つの異なった波長の光を照射し、その透過光の比あるいは差から試料の透過率を測定する二波長測光法が生まれた。日立 356 形二波長自記分光光度計は、二波長測光法と従来の自記分光測光法を兼ね備えた分光光度計を実用化したものである。

1. 緒 言

従来の分光光度計は Beer の法則が成立する試料、すなわち、透明試料を測定するものであって、混濁試料を測定するには不適であった。これは試料による光散乱光を検知するのが困難なためであった。この光散乱の影響を取り除くために、オパールグラス法や積分球法が考え出されたがじゅうぶんではなかった。そこで B. Chance 氏⁽¹⁾は、チトクロームの生体色素の反応を研究するために、二波長測光方式の分光器を開発し多くのユニークな研究業績を残した。しかしこの二波長測光方式は、概念が従来の分光器と非常に異なっているために、一般には理解されにくく、生化学分野の一部の人々に知られていたにすぎなかった。日立二波長自記分光光度計(図 1)が発売されると、この装置は二波長測光と自記分光測光だけでなく、微分測光などができるため生化学分野だけにとどまらず柴田氏⁽²⁾のように、無機比色分析や公害物質の測定などの一般分野にまで浸透してきた。

2. 二波長測光の原理

二波長測光は、混濁試料の吸光度の微小変化量を測定する目的で生まれたものである。従来の自記分光測光は図 2-1 に示されるように、一つの分光器より出た単色光を回転ミラーあるいは振動ミラーで二つの光路に分け、これらを試料光・対照光としおのおのの光路におかれた試料に対して両試料の吸収の比を測定する。

二波長測光法とは、図 2-2 に示されたように、一つの光源より出た光を二つの分光器により異なった二つの単色光にし、一つの試料に照射し、両波長位置での吸収の比を測定する。測光セルは一つで検知器に密着させているため試料誤差、セル誤差がなくなり混濁試料の微小変化が測定される。

3. 装 置

本装置の光学系を図 3-1 に示す。ヨウ素タングステンランプ (850 nm—300 nm) あるいは重水素放電管 (350 nm—185 nm) から出た光は、光源切換ミラーにより入射スリット上に集光される。マスクの像がスリットレンズとコリメータミラーにより、二つの回折格子上に結像される。二つの回折格子の像は、カメラミラーとスリットレンズにより二つの分離ミラー上に結像し、ここで二つの回折格子からの単色光は、上下両光路に分けられる。上下に分けられた単色光は、チョップにより 75 Hz (電源周波数 50 Hz の場合) あるいは 90 Hz (電源周波数 60 Hz の場合) に時間分割され、二つのミラー

* 日立製作所那珂工場

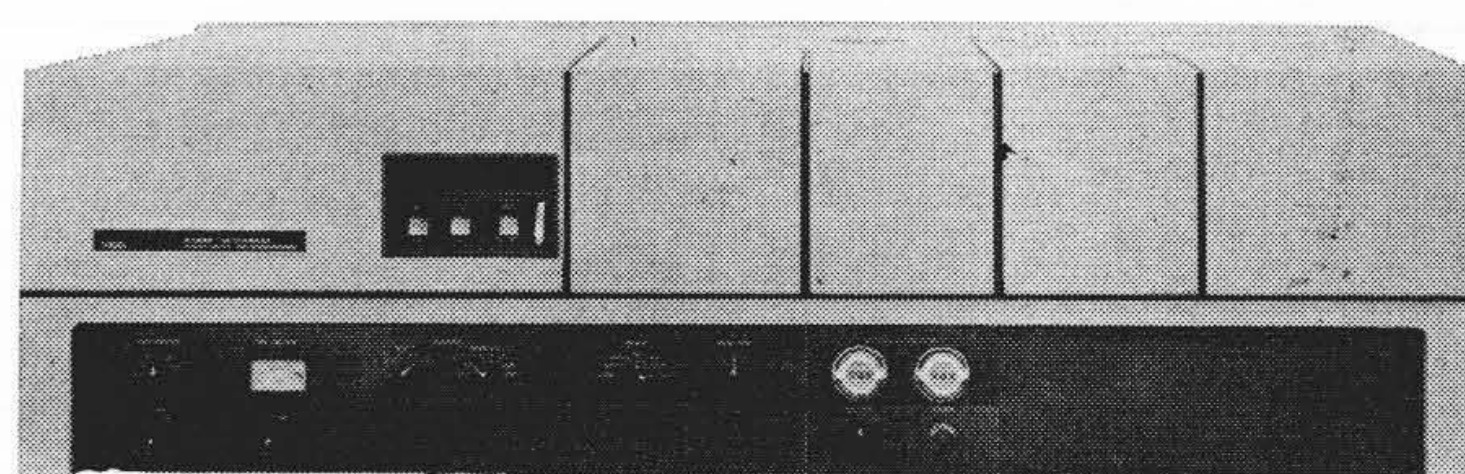
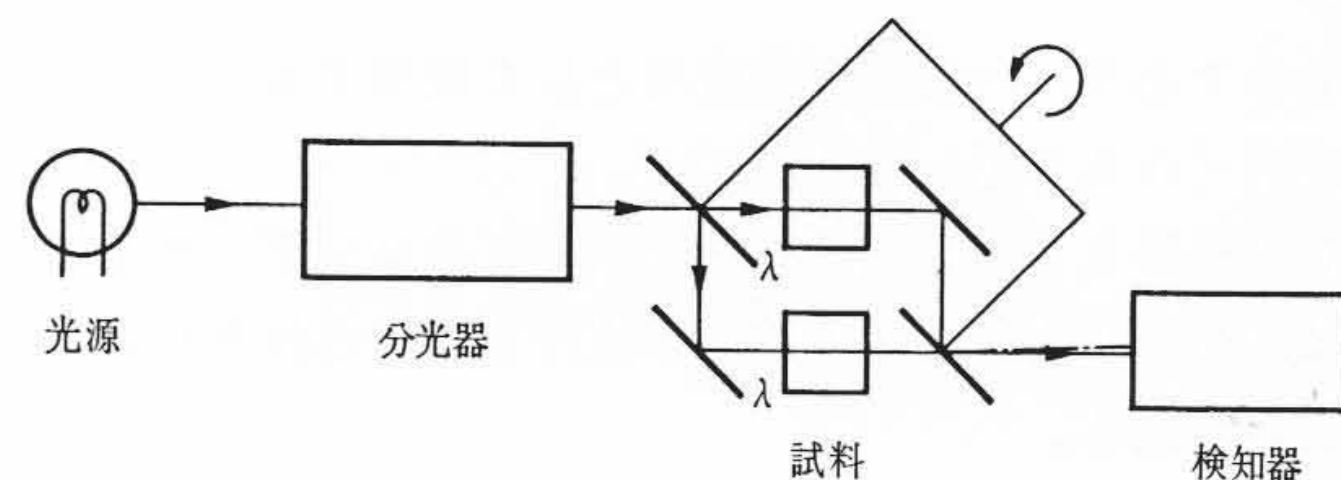


図 1 356 形二波長自記分光光度計

1. 自記分光測光



2. 二波長測光

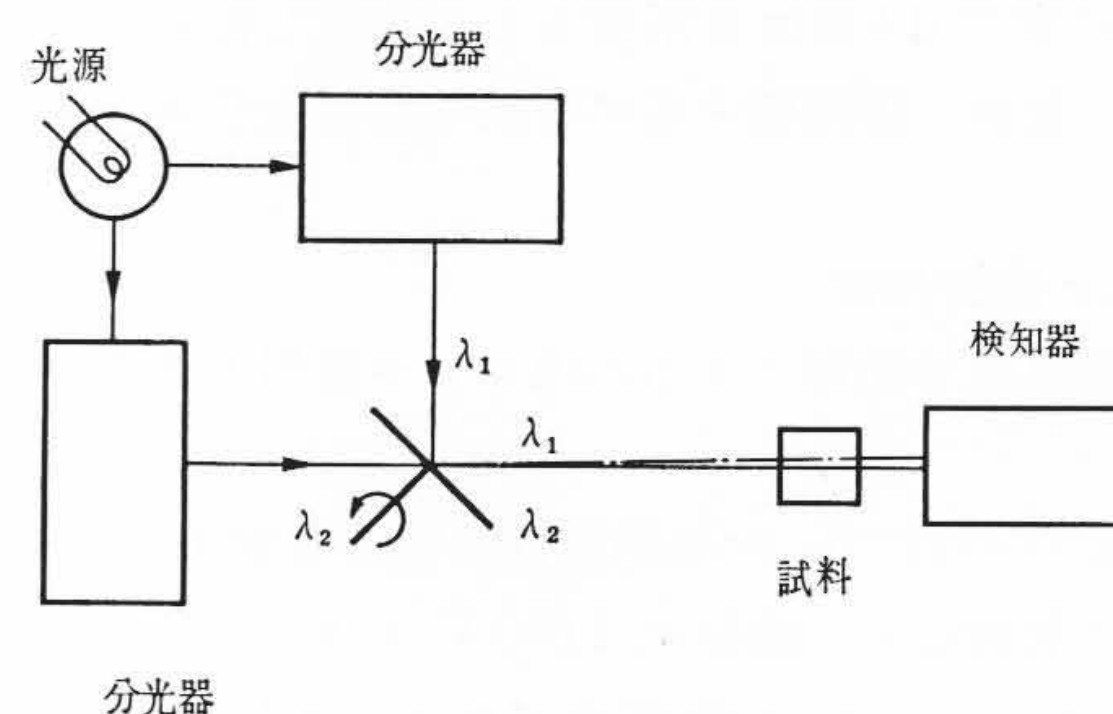


図 2 自記分光測光と二波長測光

M_{7-1} , M_{7-2} の角度の組合せによりセル 1 個 (二波長測光) の場合とセル 2 個 (自記測光) の場合に分けられ試料を照射し検知器に至る。本装置の電気系は図 3-2 に示すとおりである。検知器 (ヘッドオン形ホトマルチプライヤ) により光信号は電気信号に変えられ、前置増幅器を経てゲート回路に導かれる。チョップと同期した参照信号でゲート回路を動作させ、 λ_1 信号、零信号、 λ_2 信号、零信号……と交互に送られてくる信号を λ_1 信号、 λ_2 信号、零信号用のおのおののホールド回路に送られる。ホールド回路ではこのように送り込まれた断続信号を直流信号に変換する。 λ_1 信号は標準信号として、一定の基準電圧と比較してその差が常に 0 になるようにホトマルチプライヤ

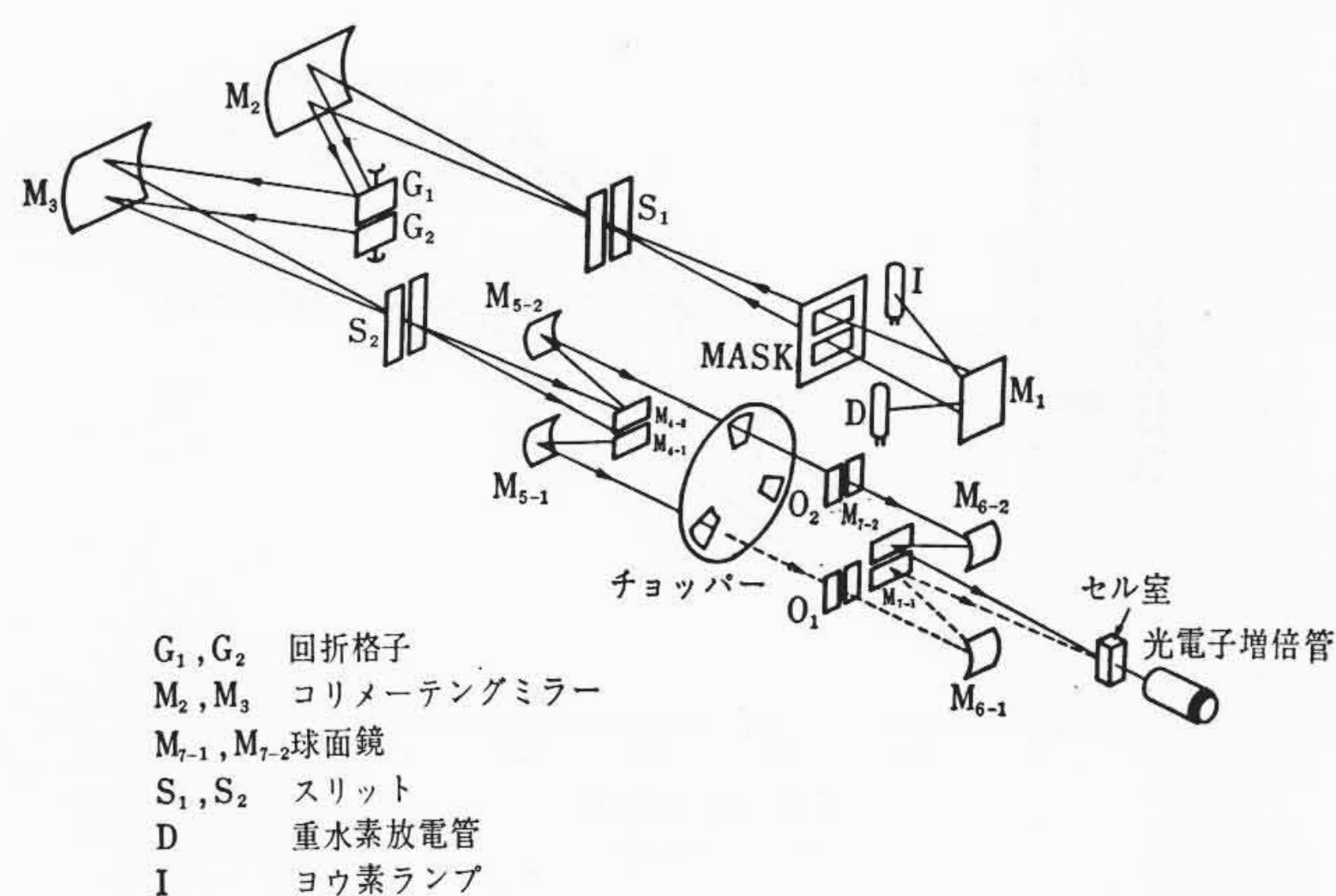


図 3-1 356 形二波長自記分光光度計光学系統図

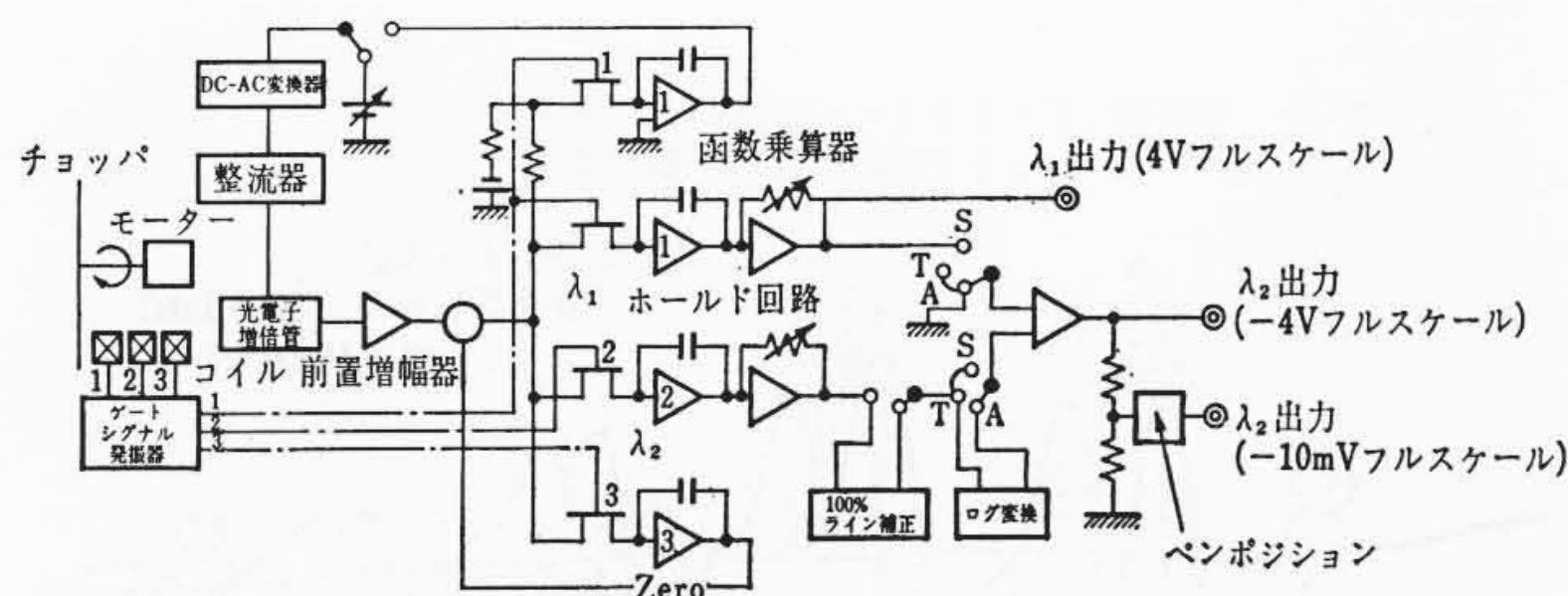


図 3-2 356 形二波長自記分光光度計の電気系統図

の印加電圧を自動制御し、光源の変動などの影響を除いている。零信号ホールド回路はこの出力をフィードバックし、光信号のはいっていないときの前置増幅器の出力が0になる補正回路を構成する。これはホトマルチプライヤの暗電流や外部からの光による信号の浮き上がりを除いている。 λ_2 信号は試料信号となり、透過率リニアで記録計に記録したり、または対数変換器を通して吸光度リニアで記録する。

4. 測 光 方 式

4.1 二波長測光法

(i) 吸光度の微小変化の測定

図 4-1 の左図は反応後のスペクトルである。混濁試料の微小変化量 ($AB \ll AC$) を測定する場合、二波長測光では二つの波長 λ_1, λ_2 をセットする。すなわち、 λ_1 は反応の前後で吸光度が変化しない波長に λ_2 は測定する吸収波長にセットされる。両波長の光量を光学的減衰器で調整し、吸収を同レベルにし測定物質を反応させると、A点からB点への変化量(吸光度変化量)がACの深さにかかわらず測定できる。この過程を記録したのが図 4-1 の右図である。反応点Dで試薬を加えるか、試料の側面から励起光で照射すると反応が始まりE点で反応が終わり安定状態になる。したがってDEによりその変化量 ΔOD が示される。図 4-2 はその実測例を示したものである。試料は光合成細菌で、波長 $\lambda_1 = 422 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 440 \text{ nm}$ にセットし試料側面に励起光を照射し、その変化状態を測定した。励起光をONにすると試料は酸化され、OFFにすると還元に戻る状態がこのデータよりつかむことができる。

(ii) 混合成分のマスキング

二成分からなる合金あるいは異性体の分別定量をする際、各吸収スペクトルの形がほとんど類似していても、一方の成分に適切な対照波長 λ_1 を選ぶことによって装置的にマスクすることが可能である。従来方法では、複数の波長で吸光度を測定して煩雑な計算を必要とした。二波長測光では、適当な二波長 λ_1, λ_2 をあらかじめ決めておけば、正確に直接定量ができる。図 4-3 に示

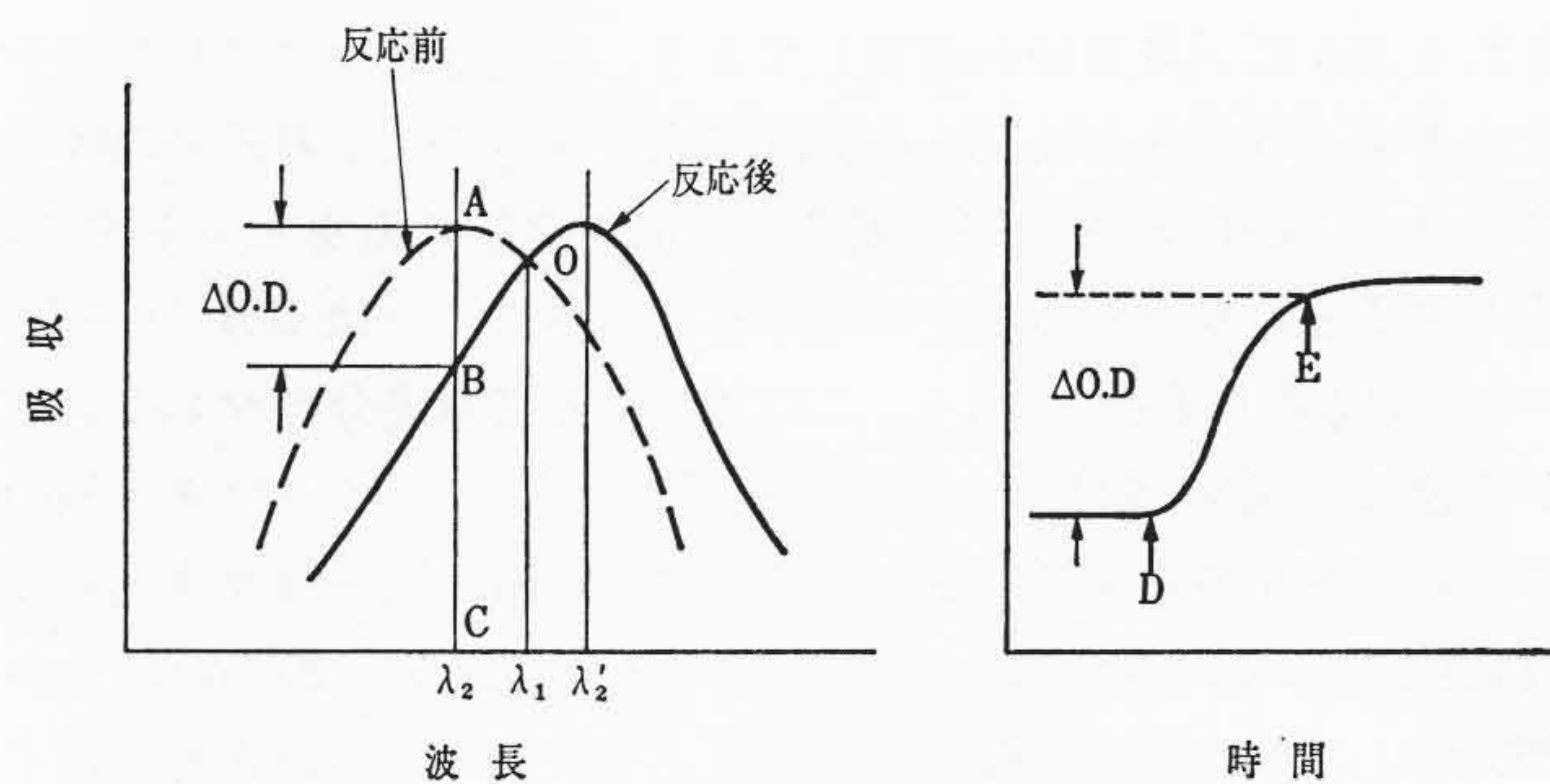


図 4-1 二波長測光法吸光度の微小変化の測定

試料：クロマチウムD

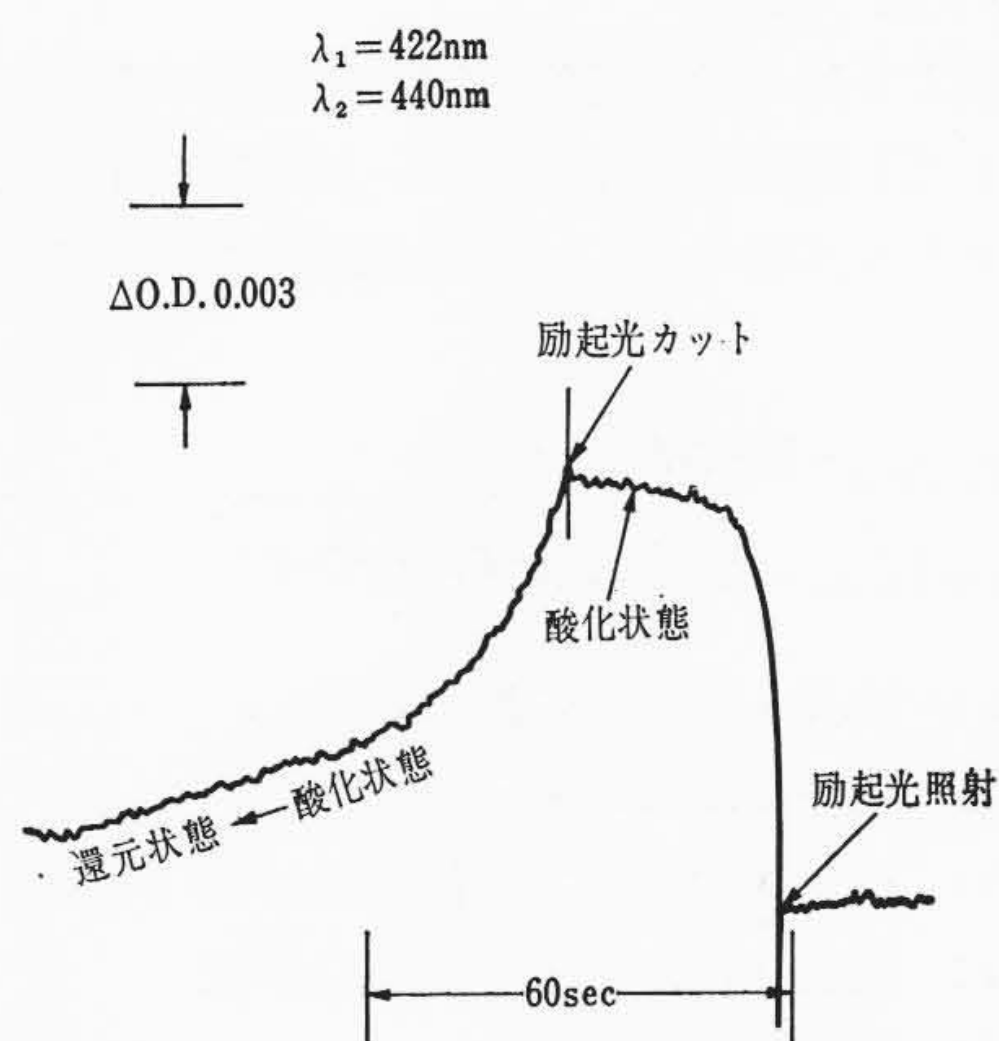


図 4-2 二波長測光による測定例

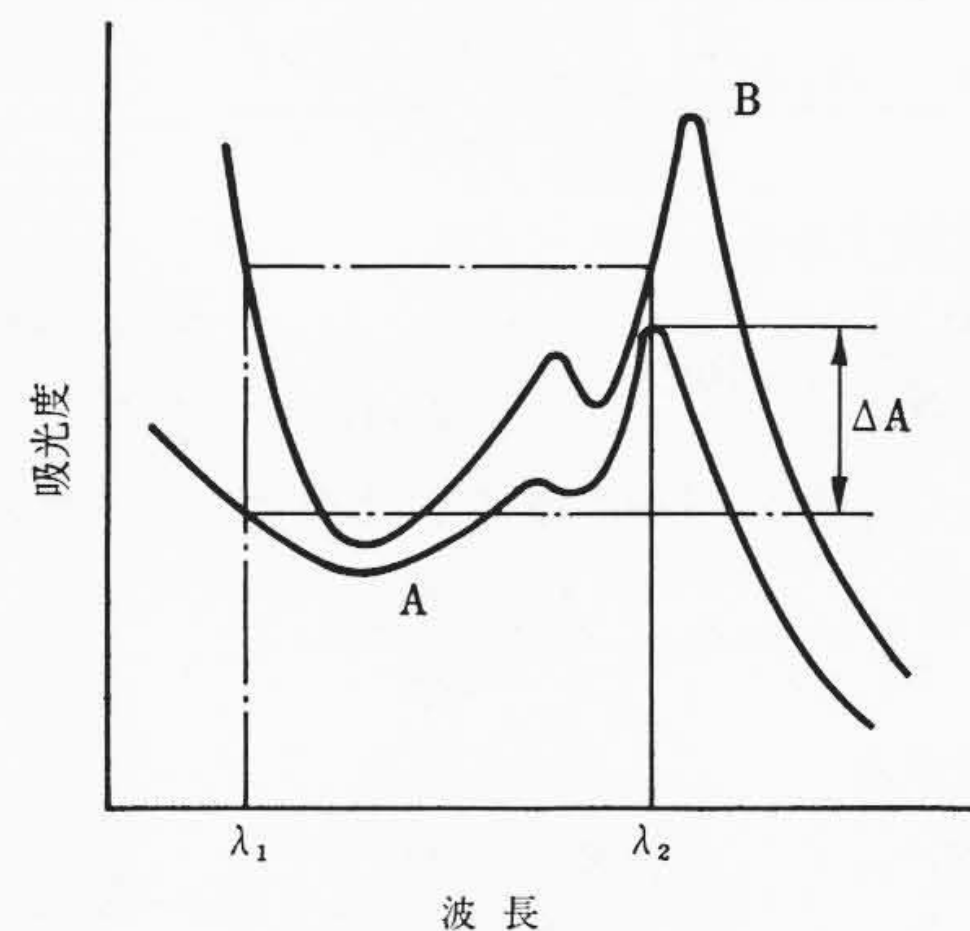


図 4-3 混合成分の定量

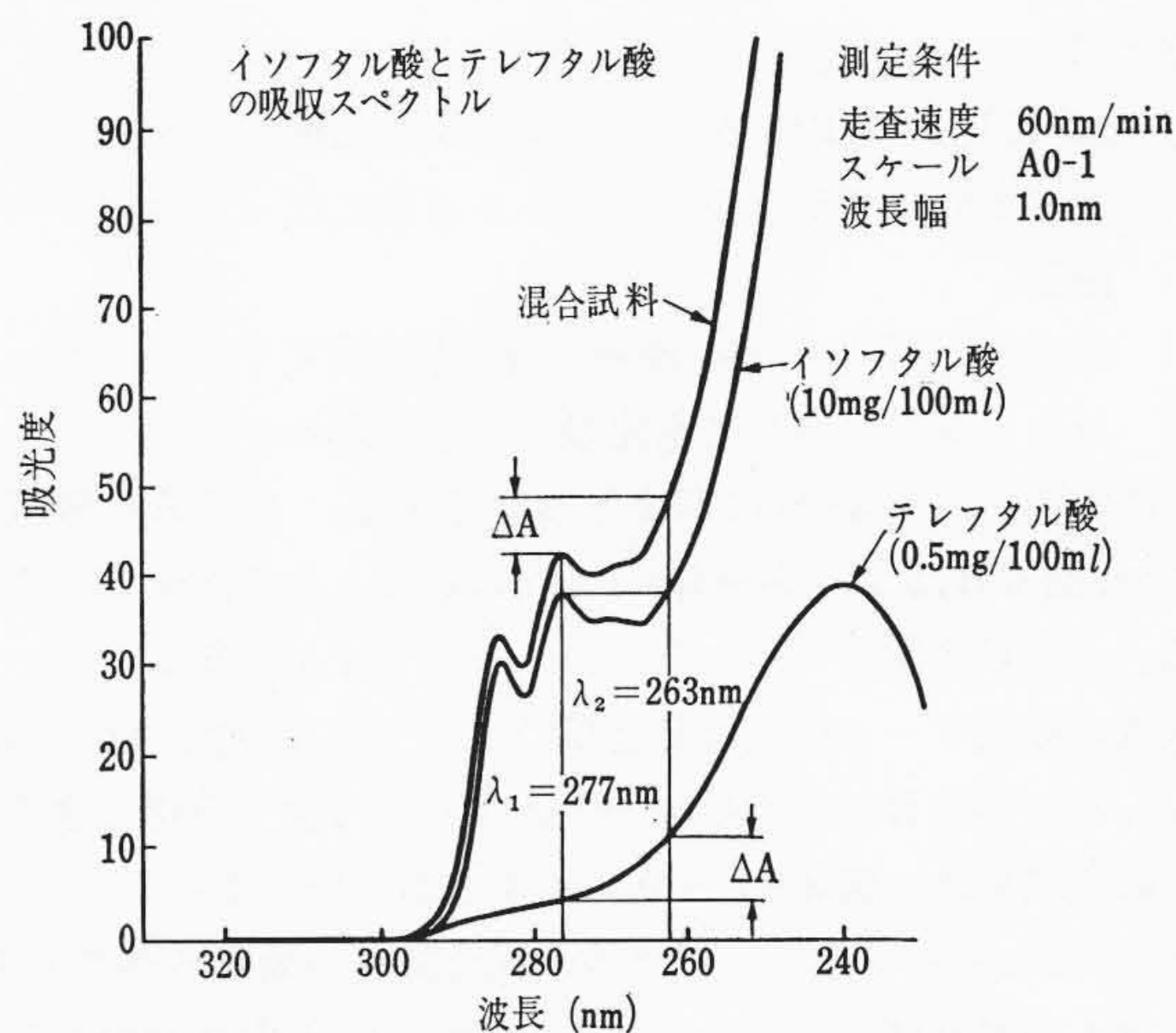


図 4-4 イソフタル酸、テレフタル酸の吸収スペクトル

されるように AB 成分が混在しており、 B 成分をマスクしたいときはまず、 A 成分の吸収波長位置に λ_2 をセットし、 B 成分の吸収スペクトルから λ_2 と同一の吸光度を示す波長に λ_1 をセットする。そうすると、 B 成分の濃度に対するベースラインは $\Delta A (\lambda_2 - \lambda_1) = 0$ の関係から変動がない。このようにして B 成分のマスキングができる。図 4-4 はその実測例を示したもので、イソフタル酸中のテレフタル酸の定量である。イソフタル酸の同一吸光度を示す波長位置に λ_1, λ_2 をセットする。すなわち、 $\lambda_1 = 277 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 263 \text{ nm}$, 二つの混合試料を測定するとイソフタル酸の影響はなくなり、テレフタル酸のみ定量することができる(図中の ΔA 値)。図 4-5 はその検量線を示したものである。またバックグラウンドであるイソフタル酸の濃度をかえても(図中の $\bigcirc \times \triangle$) 良い検量線が得られる。

4.2 微分測光

二つの分光器より出た単色光を一定波長間隔に保って(すなわち $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$ として) 波長を走査し、同一試料に照射すると波長に対する微分スペクトルが得られる。これは数式的には以下のようになる。

$$S_\lambda = I_\lambda \cdot D_\lambda e^{-E_\lambda \cdot C \cdot l} \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$S_{\lambda+\Delta\lambda} = I_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot D_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot e^{-E_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot C \cdot l} \quad \dots\dots\dots (2)$$

S_λ : 波長 λ における出力信号
 I_λ : 波長 λ におけるエネルギー
 D_λ : 波長 λ における装置関数
 E_λ : 波長 λ における分子吸光係数
 C : 試料濃度
 l : 試料層の厚さ

ここで波長 λ を基準にして $\lambda + \Delta\lambda$ の値を測定すると出力信号は

$$\frac{S_{\lambda+\Delta\lambda}}{S_\lambda} = \frac{I_{\lambda+\Delta\lambda} D_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot e^{-E_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot C \cdot l}}{I_\lambda \cdot D_\lambda e^{-E_\lambda \cdot C \cdot l}} \quad \dots\dots\dots (3)$$

(3) 式を $\log$ 変換すると

$$\log\left(\frac{S_{\lambda+\Delta\lambda}}{S_\lambda}\right) = \log\left(\frac{I_{\lambda+\Delta\lambda} D_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot e^{-E_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot C \cdot l}}{I_\lambda \cdot D_\lambda e^{-E_\lambda \cdot C \cdot l}}\right) \quad \dots\dots\dots (4)$$

試料を測定しないときのベースラインは次式で表わせる。

$$\log\left(\frac{S'_{\lambda+\Delta\lambda}}{S'_\lambda}\right) = \log\left(\frac{I_{\lambda+\Delta\lambda} D_{\lambda+\Delta\lambda}}{I_\lambda D_\lambda}\right) \quad \dots\dots\dots (5)$$

(4), (5) 式より

$$\log\left(\frac{S_{\lambda+\Delta\lambda}}{S_\lambda}\right) - \log\left(\frac{S'_{\lambda+\Delta\lambda}}{S'_\lambda}\right) = C \cdot l (E_\lambda - E_{\lambda+\Delta\lambda}) \quad \dots\dots\dots (6)$$

となり波長に対する微分スペクトルは濃度に比例し Beer の法則が成り立つ。

微分スペクトルには次の利点がある。

- (i) 二つ以上の吸収帯がオーバーラップした場合やバックグラウンド上のわずかな吸収でショルダ状になった吸収ピークの確認。
- (ii) 微分値と濃度の間に Beer の法則が成立するのでバックグラウンドが存在しても定量が可能になる。

(i) の実測例は図 4-6 に示すとおりである。曲線 A は吸収スペクトルで、曲線 B は $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1 = 1 \text{ nm}$ にしたときの微分スペクトルである。点線 C は微分スペクトルのベースラインである。

曲線 A の吸収ピーク位置は B と C の交点 (② ⑨ ⑬ ⑲ ⑳) になり A のショルダ部は B の谷 (④ ⑪ ⑱) となりはっきり確認できる。

(ii) の実測例は、図 4-7 ~ 9 に示すとおりである。

図 4-7 はセリウムとエルビウムの混合試料の吸収スペクトルで、エルビウムの濃度は一定でセリウムの濃度を变化させたものである。同一の試料を波長差 $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1 = 1 \text{ nm}$ で波長を走査した微分

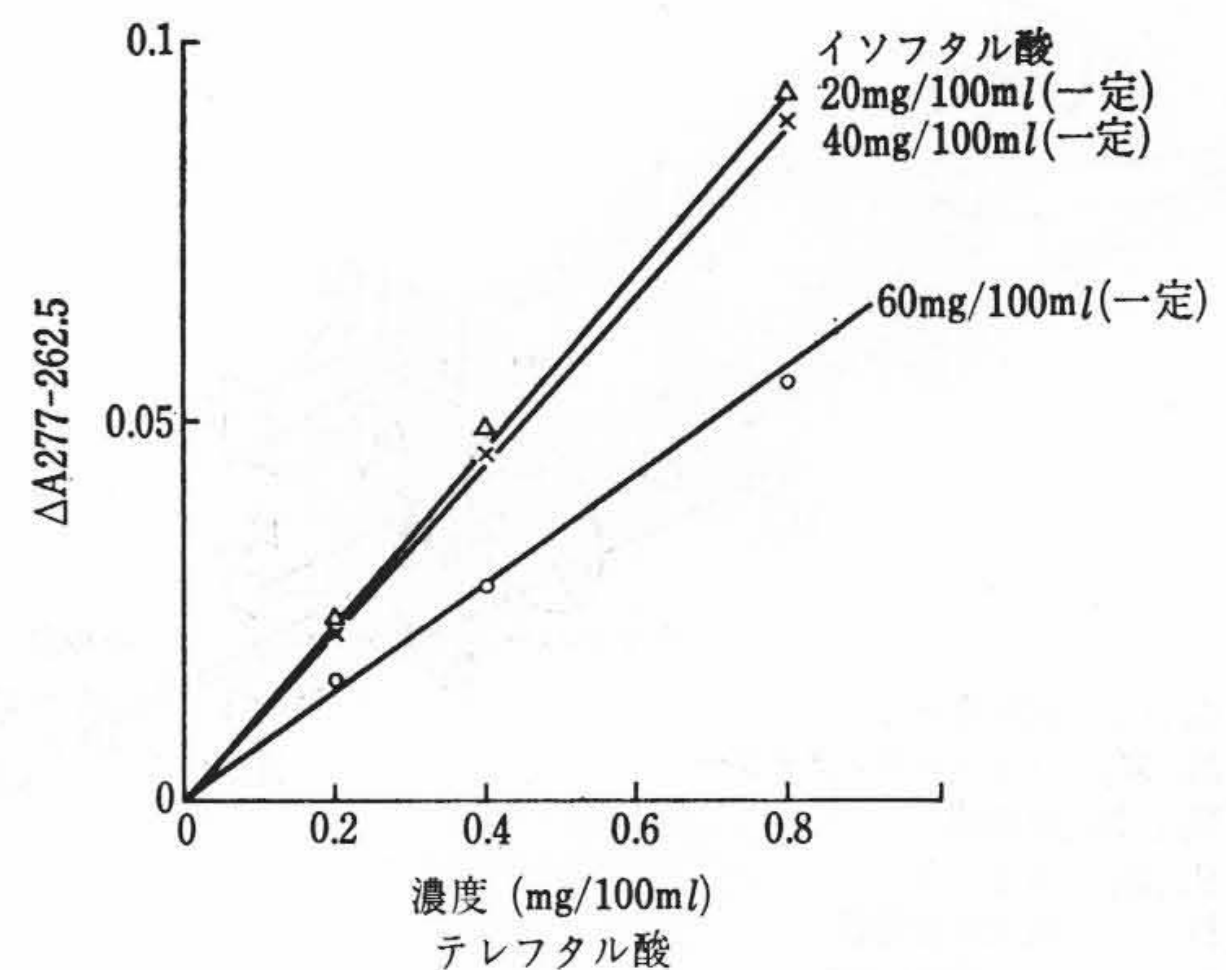


図 4-5 イソフタル酸中のテレフタル酸の検量線

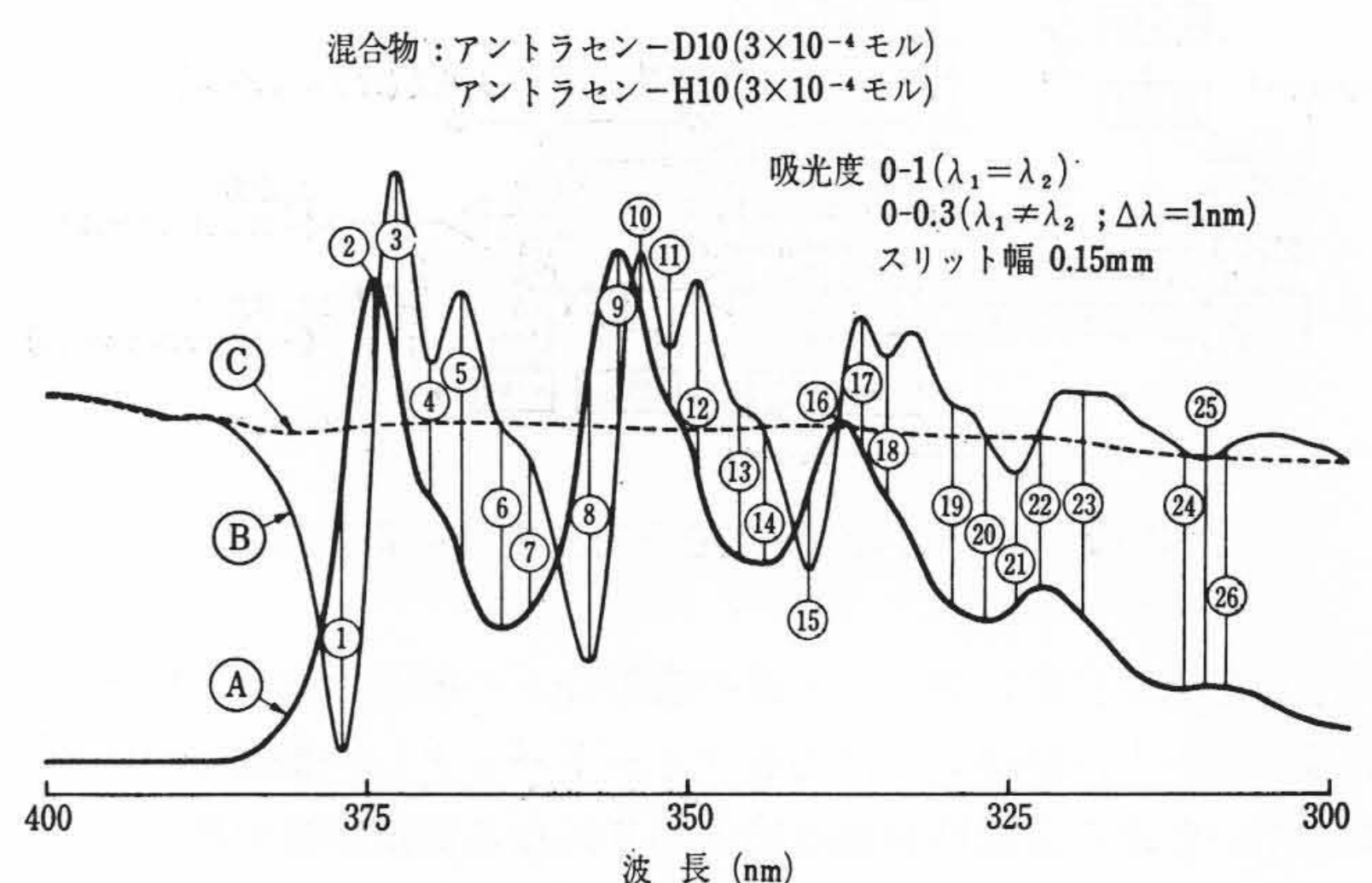


図 4-6 吸収スペクトルと微分スペクトルの比較

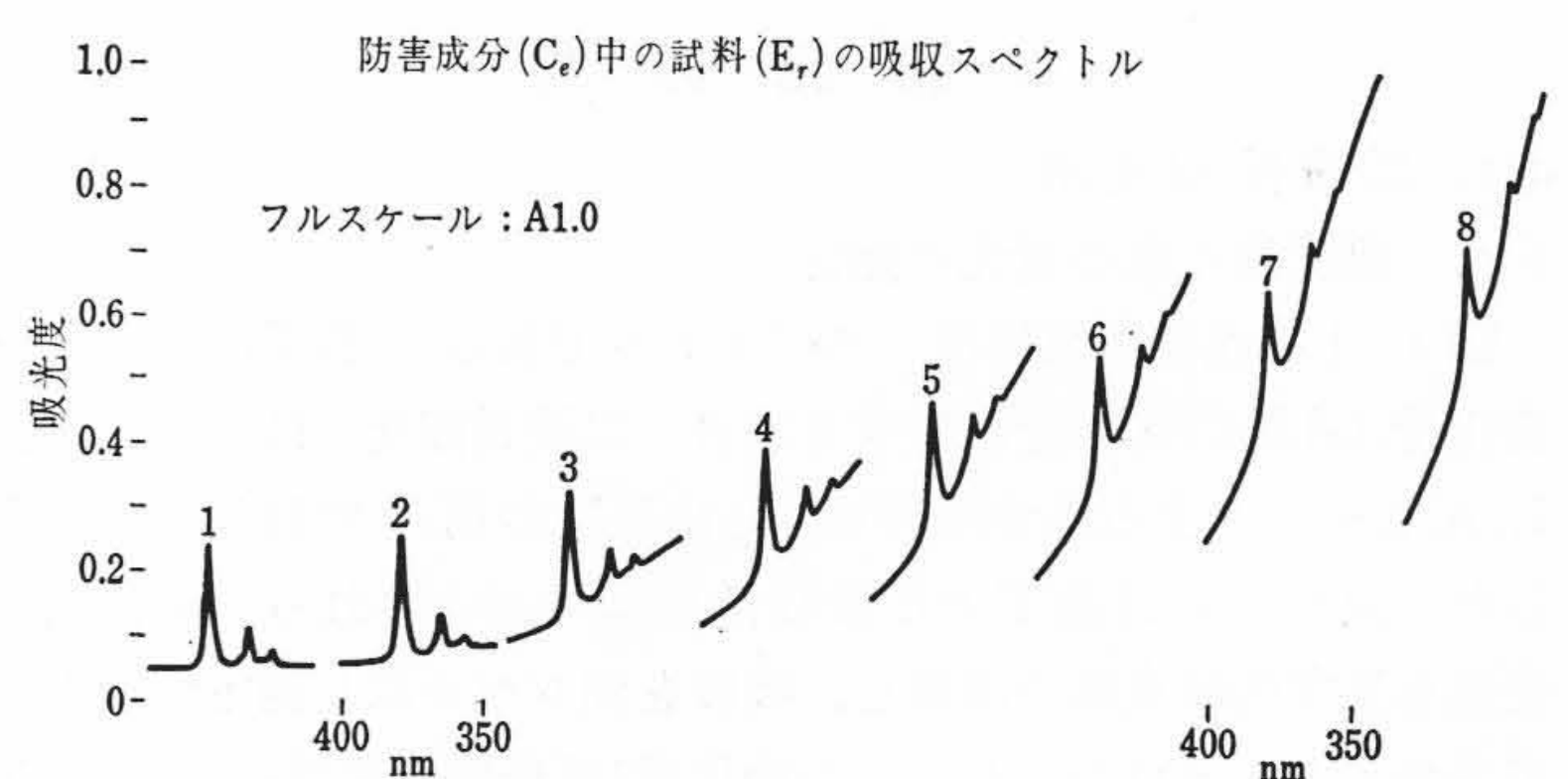


図 4-7 セリウム、エルビウム混合試料の吸収スペクトル

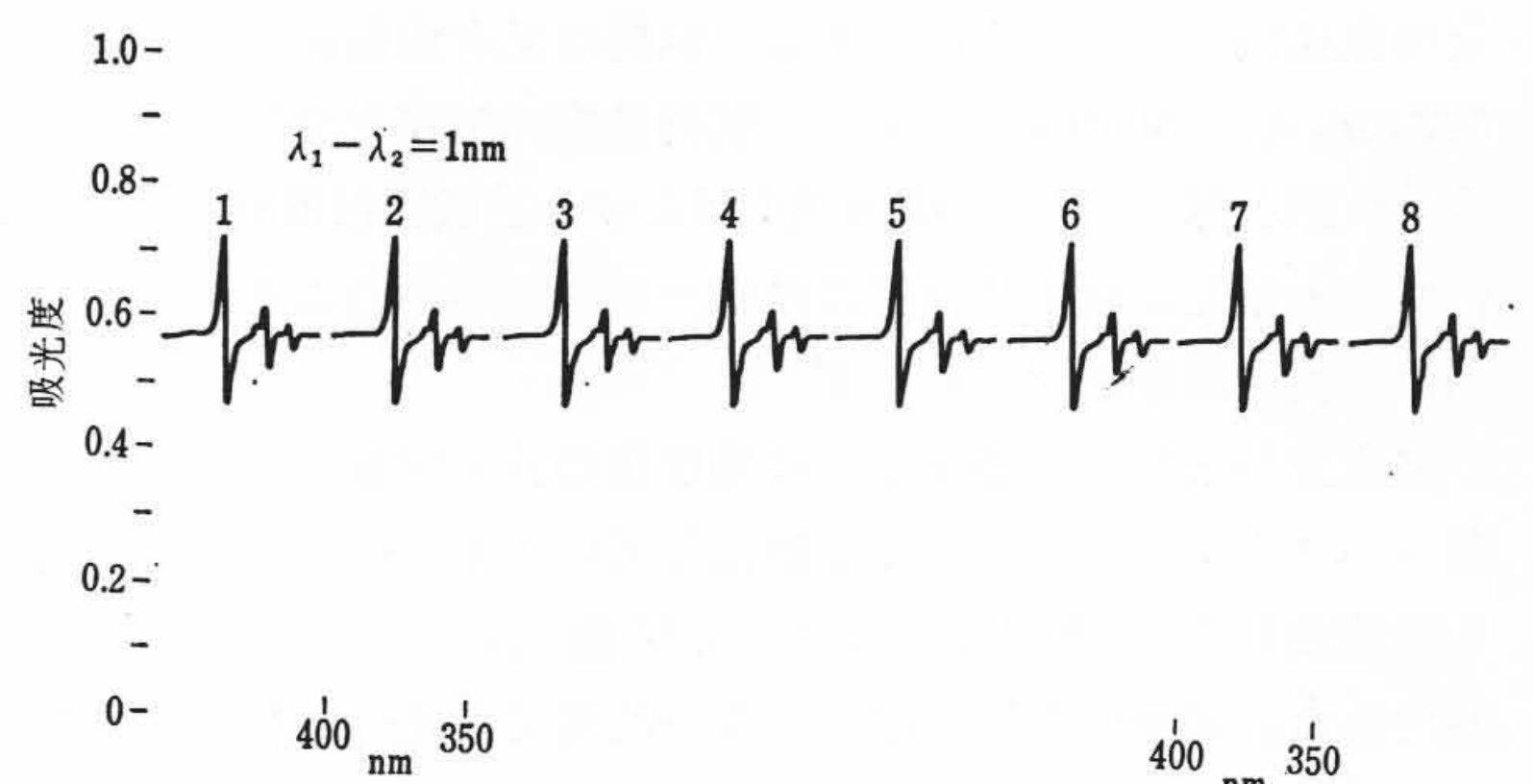


図 4-8 図 4-7 の微分スペクトル

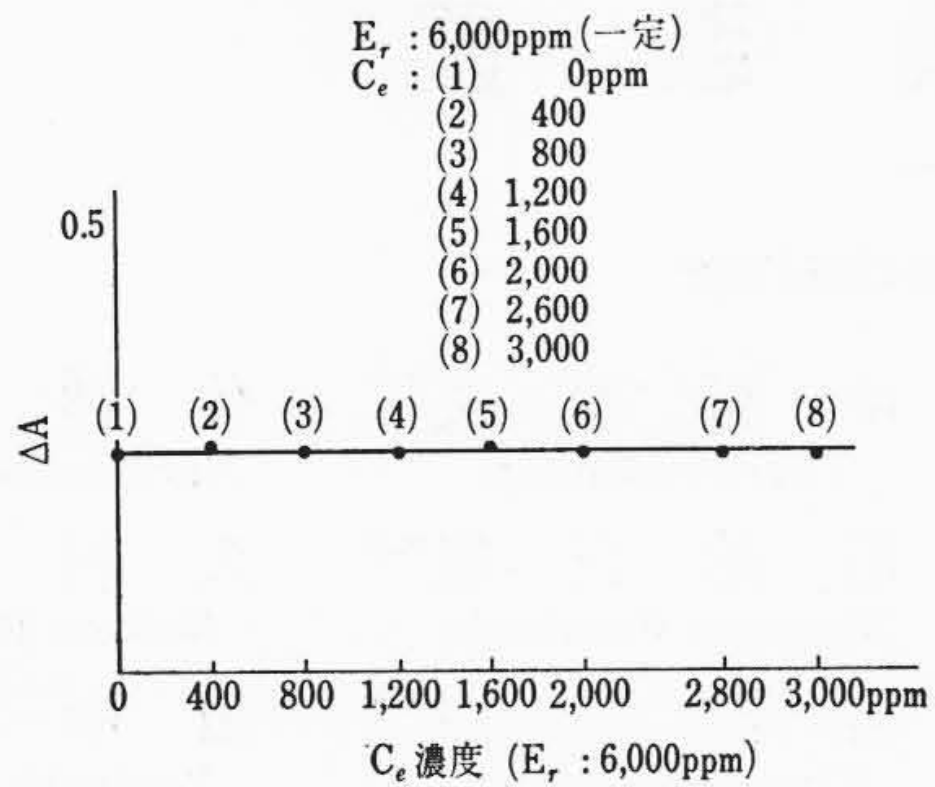
379nmでの吸収帯での微分スペクトルの極大極小の値(ΔA)

図4-9 微分スペクトルによるエルビウムの検量線

スペクトルが図4-8で、バックグラウンドであるセリウムの濃度が変わってもエルビウムの吸収度は一定値を示している。

4.3 自記測光

二つの分光器から出る単色光を同一波長に保ち走査すると対照光、試料光をもった自記分光光度計になる。本装置では検知器にセルが密着しているため混濁試料の測定も可能である。図4-10 a, bは混濁試料に光を照射した様子を示したものである。aのように通常の方法では検知器とセルの間がはなれているため散乱光を検知する量が少なくバックグラウンドが上昇する。

bのように検知器とセルを密着させ、さらに広受光面積の検知器を用いるとaに比べ多くの散乱光を検知し、吸収の情報が多く得られるのでバックグラウンドが下がり吸収が現われてくる。図4-11は実測例を示したものである。

試料はパンのイースト菌中のチトクロームで対照光側にろ紙を8枚重ねたものをそう入したときの吸収スペクトルである。非常に濁った状態での吸収スペクトルが得られた。

5. 結 言

二波長測光法・微分測光法はある場合には、今までの吸光光度法と変わらないこともあるが、一般には測定濃度範囲が広くなり従来の自記測光法では得られなかった情報が得られる。対照信号が今までとは全く別種のものになるので、分析法まで変わると考えられる。たとえば、試料が混濁していてもこれらの影響が少ないとか、普通は考えられていなかった高い吸収を示すものの中のおずかの吸収（本装置最大拡大は吸光度0.01フルスケール）を測定しこれで定量するなどの方法がとられるので、分析法そのものもこれによって変わってくる。

二波長測光法が生化学の一分野にとどまっていた理由は、装置の製作がむずかしく満足な成果が得られなかったためで、今回の日立二波長自記分光光度計の完成により、二波長自記測光が生化学のみ

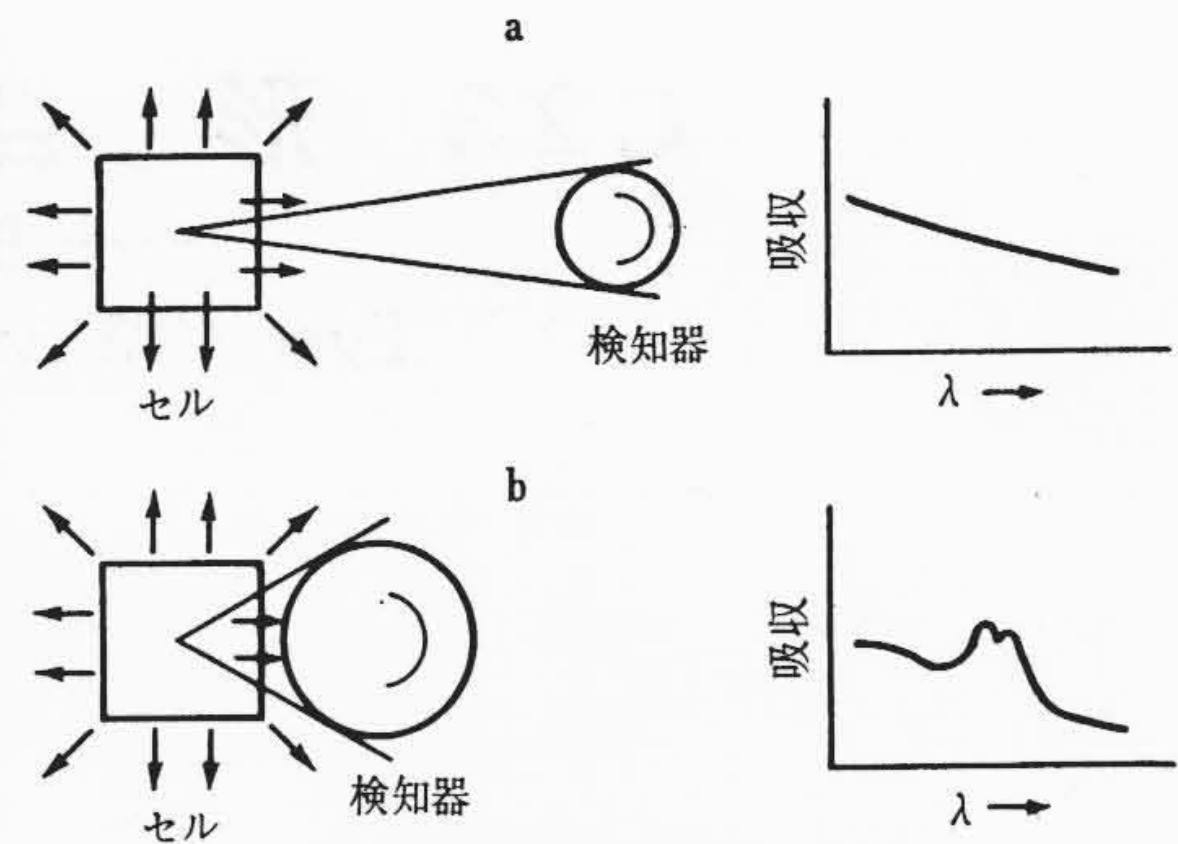


図4-10 試料と検知器間距離と散乱光の関係

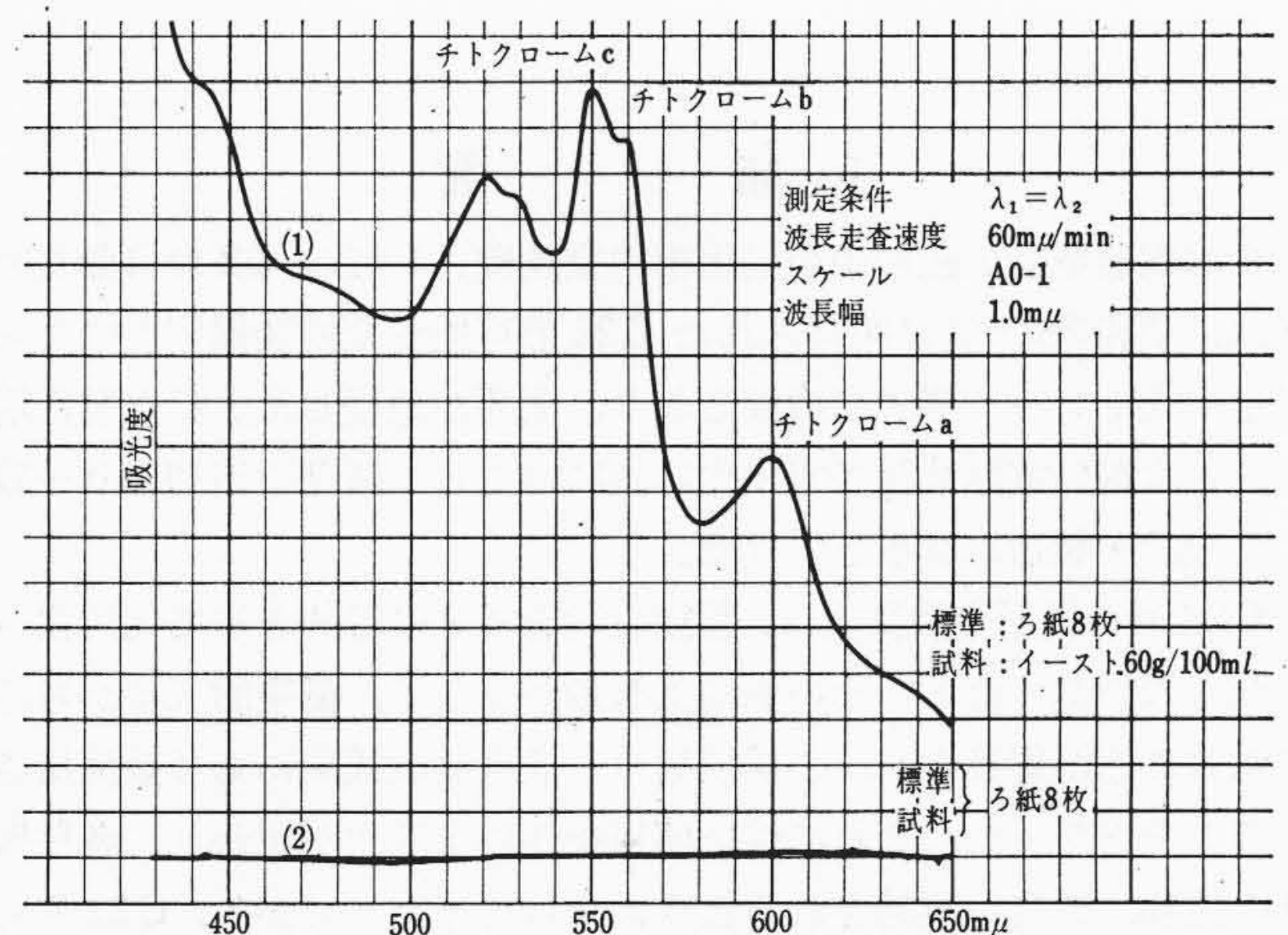
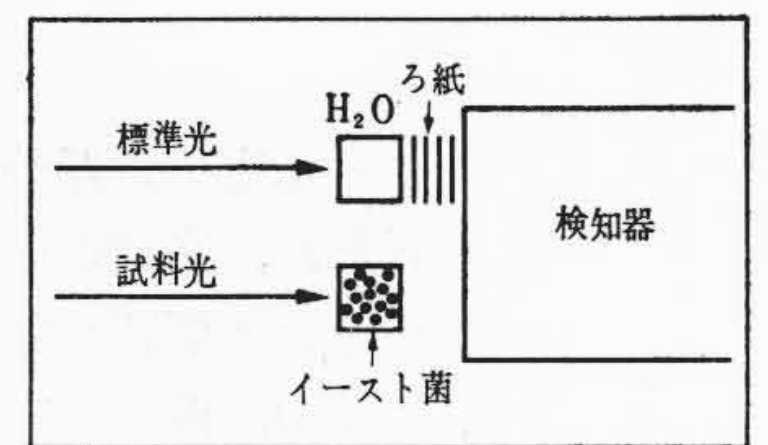


図4-11 イースト菌中のチトクロームの吸収スペクトル

ならず、一般化学分析にも広がりつつある。

参 考 文 献

- (1) B. Chance: Rev. Sci. Instr. 22, 634 (1959)
B. Chance: Science 120, 1967 (1954)
- (2) 柴田正三, 古川正道: Hitachi Sci. Instr. News, 12, 682 (1969)
S. Shibata, M. Furukawa, K. Gotô: Anal. Chim. Acta. 46, 271 (1969)