二波長測光の比色分析への応用

156形日立ディジタル二波長分光光度計

Application of Two-Wavelength Measurement to Colorimetry — Model 156 Hitachi Digital Double Wavelength Spectrophotometer —

In recent years spectrophotometers have been finding application in almost every industry as an ideal means of analysis. However, for measurement by this spectrophotometer, specimens are required to be processed previously so that Beer's Laws can hold. This preliminary treatment is extremely time consuming in most cases and some specimens defy such treatment. The treatment consists in the dilution or removal of effects from turbidities contained or from coexistent materials. The two-wavelength measurement method has been devised to eliminate such troublesome process. Hitachi has already developed a new type of spectrophotometer incorporating this measurement idea and placed it on the market under the trade name of Hitachi 356 Two Wavelength Double Beam Spectrophotometer as a high performance laboratory instrument, and recently developed another type, Type 156 Digital Double Wavelength Spectrophotometer, which complies with rising demands for types suitable for routine works. In this article are described their construction, measuring method, application data and some of the accessories used.

本川 忠* Tadashi Honkawa

佐藤 隆* Takashi Satô

村越武雄* Takeo Murakoshi

北川正敏* Masatoshi Kitagawa
黒石忠文* Tadabumi Kuroishi

□ 緒 言

従来の吸光光度法におけるBeerの法則は透明試料において成立するものであるが、この法則を混濁試料においても成立させるために B. Chance (1) は二波長測光法を考案した。しかしこの方法は、かれら生化学分野の一部で使用されたにすぎず一般化されなかった。昭和42年著者(2) らは356形日立二波長自記分光光度計を完成し、単に生化学分野にとどまらず一般分析分野へと発展させた。その結果、しだいに比色分析分野、

図 | 156形日立ディジタル二波長分光光度計 各種付属装置が取り付けられるように試料室は本体前面に飛び出している。測定値はディジタルで表示される。

Fig. I Model 156 Digital Double Wavelength Spectrophotometer

すなわちルーチンワークにおいて、二波長測光法の有利さが 認められこの分野での要求が高まってきた。しかし既販の356形 は大形万能器であるためルーチンワークには高価で高級すぎ た。そこで今回、一般比色分析分野に適した156形日立ディジ タル二波長分光光度計(図1)を完成させた。

2 二波長測光の原理(図2参照)

従来のシングルビーム測光やダブルビーム測光は対照液が必要で、対照液の吸光度が基準になり、それに対する吸光度O.D.を求めるが、二波長測光は、一つの試料に二つの異なる波長の光を照射し、その二つの波長 λ_1 、 λ_2 での吸光度差 Δ O.D.を測定する。

一つの波長 λ₁の吸光度が基準になるのでλ₁を変えることにより基準を任意に変えることができる。このことから次の測定が可能になる。

(1) 混濁試料によるバックグラウンドの消去 (図3(a))

従来の測定法では対照試料が基準になるので混濁試料では試料と全く同一の濁りの対照液を用意することは不可能に近く、対照液と測定試料の間に濁りの差を生じバックグラウンドと称するみかけの吸収Bが現われ、測定値O.D.は試料の吸収 $\Delta O.D.$ とみかけの吸収の加わったものになる。二波長測光は一つの波長 λ_2 を吸収波長に他の波長 λ_1 を吸収のない波長にセットする。 λ_2 で試料の吸収 $(\Delta O.D.)$ とみかけの吸収Bを λ_1 ではみかけの吸収Bを検知し、その差を測定するから $(\Delta O.D.+B)-B=\Delta O.D.$ となりBが相殺される。すなわち λ_1 によりバックグラウンドが消去されたことになる。

^{*}日立製作所那珂工場

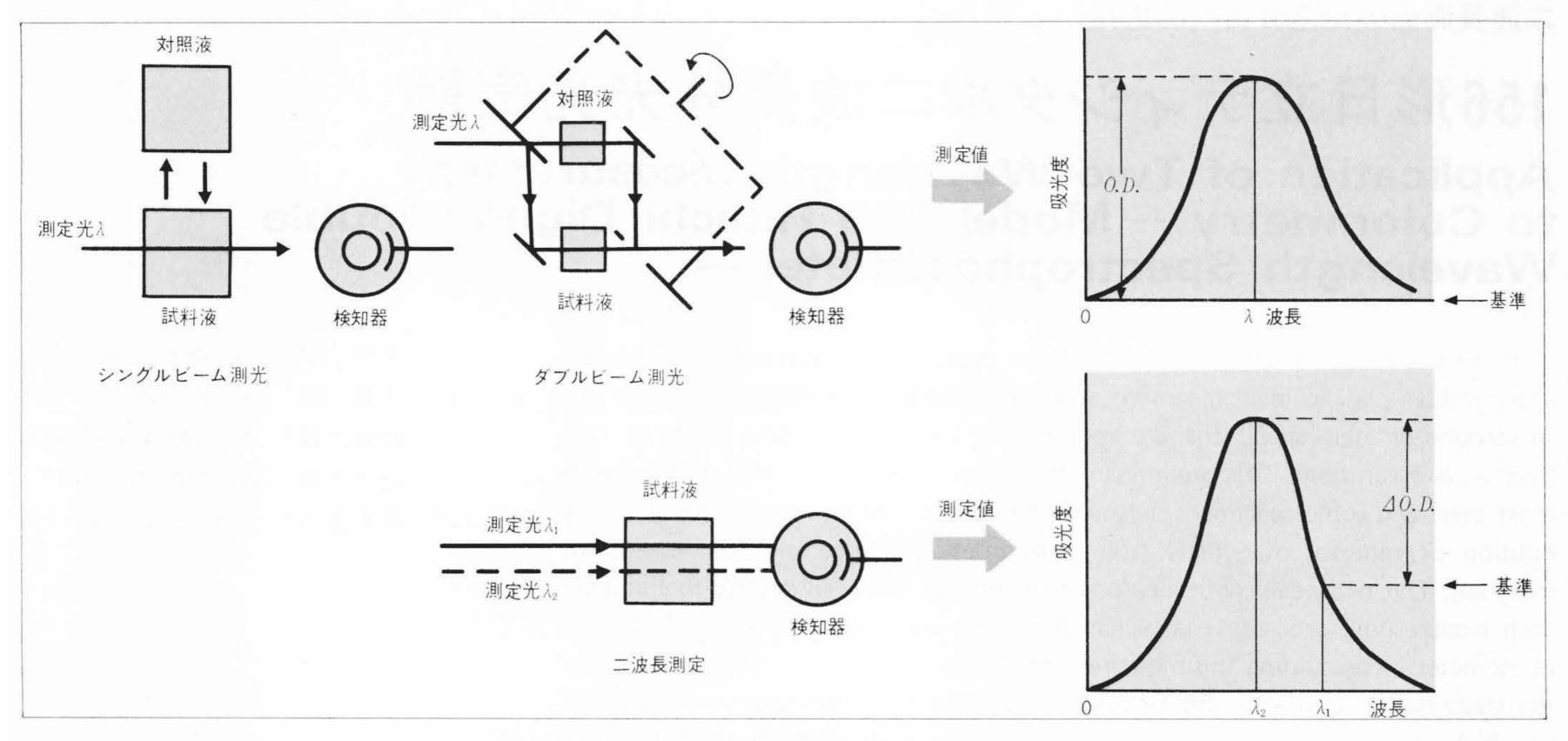


図2 従来の測光法と二波長測光法の比較 従来の測光法では必ず対照となる試料が必要であるが、二波長測光法では対照液は不要である。

Fig. 2 Conventional Measurement and Two-Wavelength Measurement

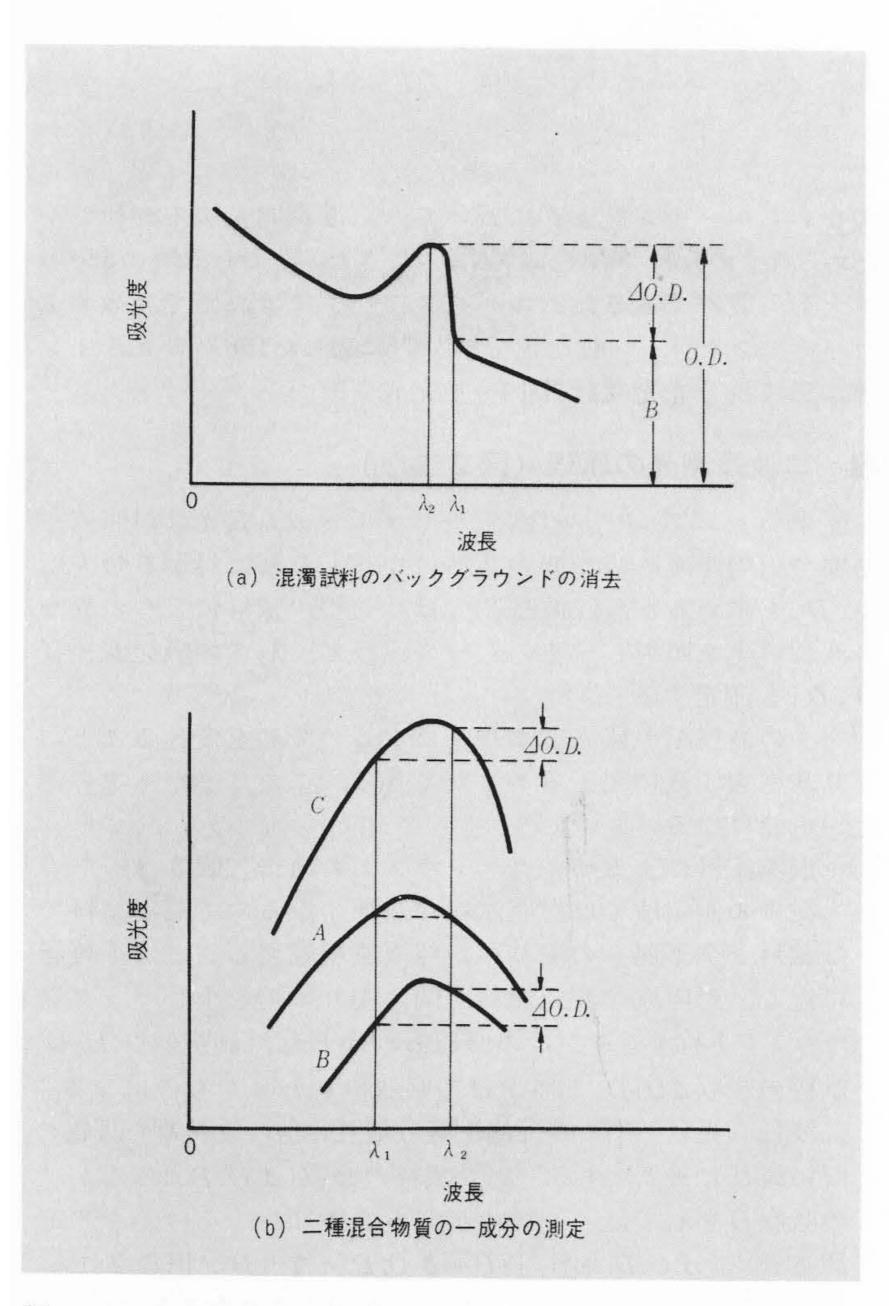


図3 二波長測光の波長選択 (a)は混濁試料のバックグラウンドを消去し、(b)は混合物質中の一成分を定量するときの波長位置(λ_1 、 λ_2)を示している。

Fig. 3 Wavelength Selection of Two-Wavelength Measurement

(2) 二種混合物質の一成分の測定 (図3(b))

二種の成分A, Bより成る混合物質C中でBを測定する場合,従来の測光法ではAをマスキングするか,Bを抽出するという前処理が必要であったが,二波長測光では前処理の必要はなく直接Cを測定して,Bを定量することができる。すなわち,Aの吸収の等しい二つの波長位置 λ_1 , λ_2 を選択する。この波長位置 λ_1 , λ_2 ではAの濃度が変わってもAの吸光度差を生じないのでCを測定し,その吸光度差はそのままBの吸光度差になりBが定量できる。

 λ_1 でのCの吸収 $C\lambda_1$ は、Aの吸収 $A\lambda_1$ とBの吸収 $B\lambda_1$ の加わった値を λ_2 でのCの吸収 $C\lambda_2$ は、Aの吸収 $A\lambda_2$ とBの吸収 $B\lambda_2$ の加わった値を検知するので λ_1 、 λ_2 での吸光度差 Δ O.D.は、

$$\Delta O.D. = C\lambda_2 - C\lambda_1$$

= $(A\lambda_2 + B\lambda_2) - (A\lambda_1 + B\lambda_1)$

この場合は $A\lambda_2 = A\lambda_1$ だから、

$$\Delta O.D. = B\lambda_2 - B\lambda_1$$

となり、Aに関係がなくなりBそのものの値を示すことになる。

(3) 混濁試料の微少反応の測定(図4)

生体試料などでの酸化還元反応を測定するとき試料は一般に混濁しており、しかも吸光度変化が少ない($\Delta O.D.=0.001-0.005$) ため、従来の測光法では濁りによるバックグラウンドに吸光度変化がかくれ測定できなかった。二波長測光はこの測定が可能である。一つの波長 λ_1 を反応の前後で吸光度変化のない等吸収点に、他の波長 λ_2 を吸収波長位置にセットする。 λ_1 では濁りによるバックグラウンドを λ_2 では濁りによるバックグラウンドを反応による吸光度変化を検知し、その差を測定してバックグラウンドを消去し求める吸光度変化 $\Delta O.D.$ が測定される。

(4) 二現象測光

異なる二つの波長位置での試料の吸光度変化を同時に測定できる。一つの試料に二つの異なる波長の光 λ_1 , λ_2 を照射し、そのおのおのの出力信号を独立に取り出し記録する。

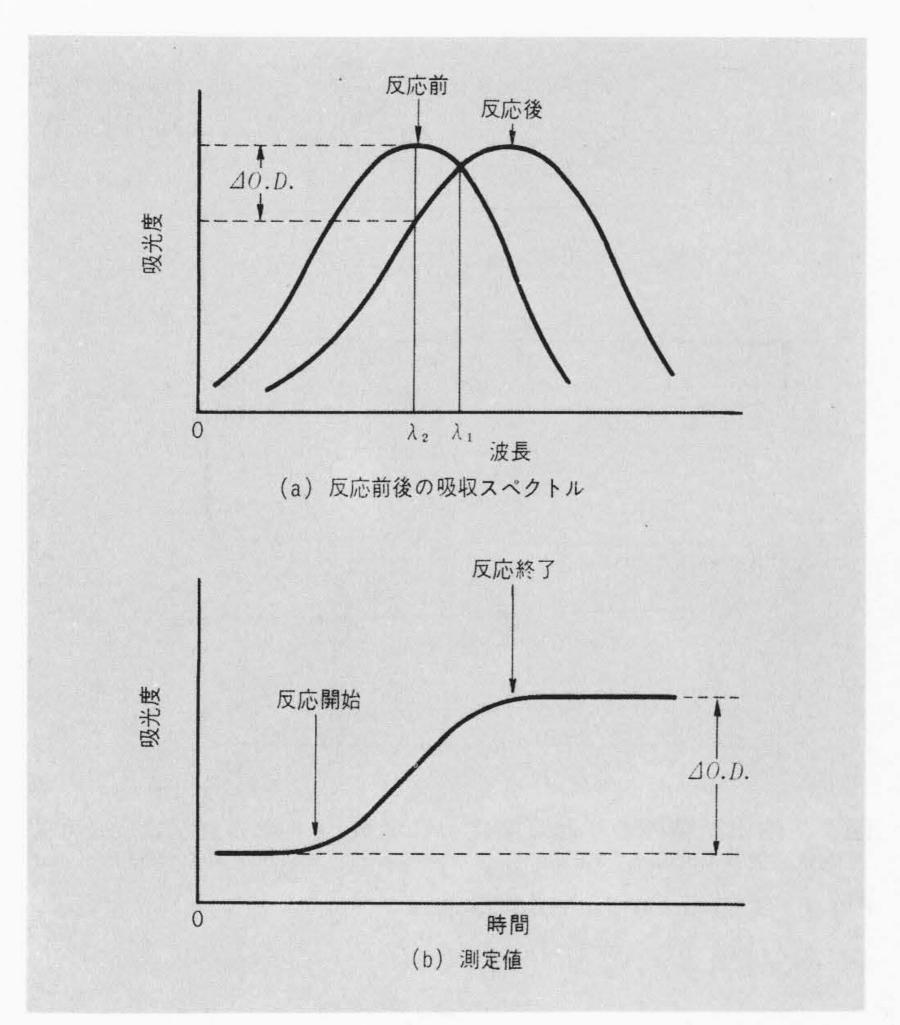


図4 混濁試料の微少反応の測定 (a)は二つの波長の選択位置, (b) は二波長測光による測定値を示している。

Fig. 4 Quantitative Analysis of Trace Components in Turbid Samples

たとえば,

このような反応系を考える。(a)の吸収は280nmで,(b)の

吸収は310nmである。反応前、すなわち反応開始時は(a)の吸収のみ存在し(b)の吸収は存在しない。反応が進むに従い(a)の吸収がしだいに減少し(b)の吸収が増加する。いま二つの波長 λ_1 、 λ_2 をそれぞれ280nmおよび310nmにセットする。二つの波長位置での信号を独立に取り出し記録すると反応物質と生成物質の変化がわかり反応速度論の解析ができる。

3 構 造

図5は本装置の系統図を示すものである。光源(ヨウ素ラ ンプまたは重水素放電管)から出た白色光は二つのツエルニ ーターナ形分光器により独立した二つの単色光λ₁,λ₂になる。 この λ_1 、 λ_2 はチョッパにより240Hz(電源周波数60Hz)で時 間分割されたのち第二試料室を経て同一光路にされ、主試料 室を通り検知器であるホトマルに到達する。二波長測光は 常に主試料室を使用して行なわれる。二つの波長を同一波長 にし第二試料室を使用すると、ダブルビーム測光ができる。 ホトマルに到達した光信号はここで電流に変換され、プリア ンプで電流増幅された後、長方形波状の電圧信号となりゲー トに向かう。チョッパと同期したゲート信号により、λ1の光 信号がホトマルに到達したときは、 λ_1 ゲートが働き λ_1 ホール ド回路で λ_1 信号は直流信号にされる。 λ_2 信号のときは λ_2 ゲー トが働き λ_2 ホールド回路で λ_2 信号は直流信号にされる。 λ_1 信 号電圧Eliは基準電圧Eoと比較され、差分が高圧回路に入り、 ホトマルの印加電圧を変化させ、 $E\lambda_1$ が一定になるよう動作す るので λ_2 信号 $E\lambda_2$ は自動的に $E\lambda_1$ に対する比として得られる。 Eλ₂はゲイン回路を経てスケール1の位置で透過率として得 られる。対数変換器を経て対数変換されたものはスケール2 で吸光度として得られる。スケール3では吸光度値に任意の 係数をかけ、試料濃度が直接得られる。これらの出力信号は 表示管に4けたで表示され、プリンタに接続し印字すること ができる。また、アナログ信号が必要なときは1 V あるいは 10mV端子により取り出すことができ、高速反応のときはメモ リスコープを、普通の測定のときは記録計を使用する。

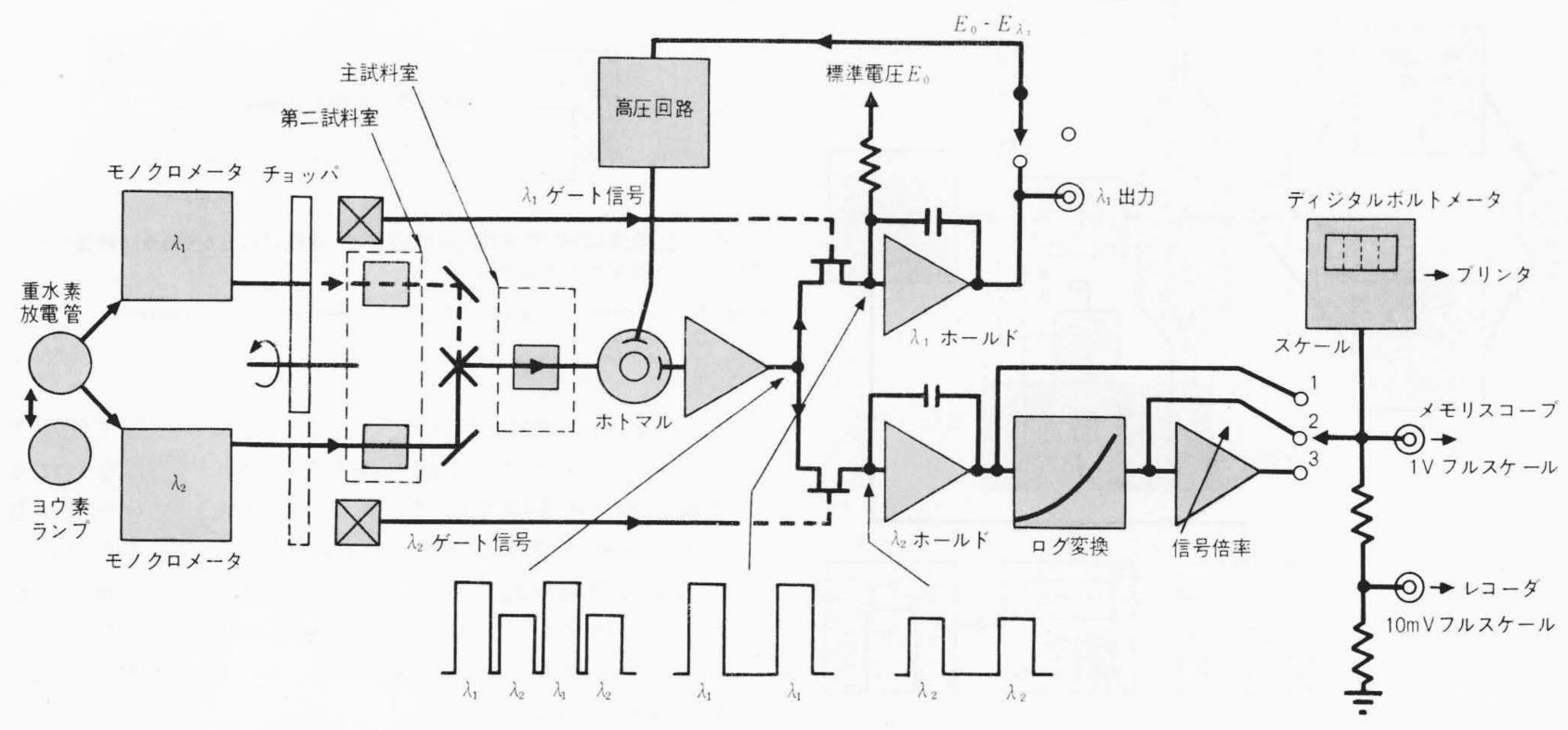


図5 156系統図 二つのモノクロメータから出た二つの単色光は、第二試料室を経て主試料室に、 そしてホトマルに至り光信号は電気信号に変換され、出力がディジタルボルトメータに表示される。

Fig. 5 Block Diagram of Model 156

4 二波長測光の応用

二波長測光は以下に示すユニークな応用が可能である。

(1) 錠剤溶出試験(錠剤自動試験器)

本装置の主試料室にフローセルをセットし、錠剤を崩壊させるビーカー内とフローセルを接続し、人工胃液を循環させ、ビーカー内で溶出する状態を連続的に測定する(図6)。 従来の測定法では錠剤の崩壊による濁りの影響が現われ、これらを消去するのは非常に困難であったが、二波長測光ではこの濁りの影響を消去できる。一つの波長 λ_2 を溶出した物質の吸収波長にセットし、その吸収 α と濁りによるみかけの吸収 α と濁りによるみかけの吸収 α と濁りによるみかけの吸収 α と濁りによるみかけの吸収 α とるいけの吸収 α とるいでの差 α の形響は消去され錠剤の溶出量がそのまま測定できる。図 α 1は測定例を示すものである。

また高濃度試料,たとえば1錠でも吸光度が1とか2以上ある場合,従来は一定量を取り出して希釈し測定していたが,二波長測光では,二つの波長位置での吸光度差を測定するから標準となる波長を任意に選択することにより希釈することなく循環式フローセルで連続測定できる。

(2) 試験管をセルとしたオートサンプラ(迅速濃度測定装置) 従来の測光法では市販の試験管などの円柱状セルを使用する場合は、屈折や反射(散乱)により測定値が直接影響を受け、測定値の再現性が悪く、セルとしてこれらを使用するのは非常に困難であった。しかし二波長測光では、二つの波長λ1、λ2の光を同一セル位置に照射し、λ1、λ2での吸光度差を測定するので屈折や反射(散乱)の影響を両波長で同じように受けるので互いに消去され、再現性が非常に良くなり市販の試験管をセルとして十分使用できる。本装置の主試料室を取りはずし、迅速濃度測定位置をセットすると、セルである複数個の試験管が連続的に主試料室を測定光に対し垂直方向に移動する(図8参照)。本装置は2.5秒ご

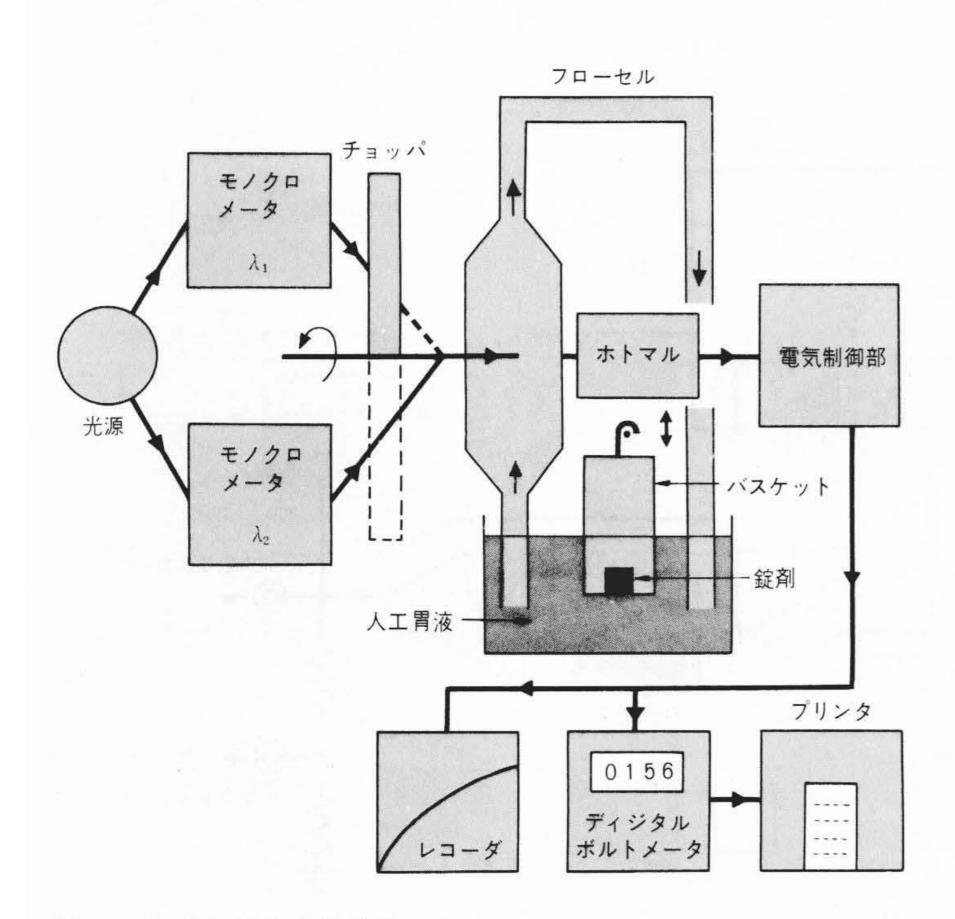


図6 錠剤溶出試験系統図 人工胃液中で錠剤を崩壊させ、この胃液をフローセル内を常に循環させ測定する。

Fig. 6 Block Diagram of Dissolution Test

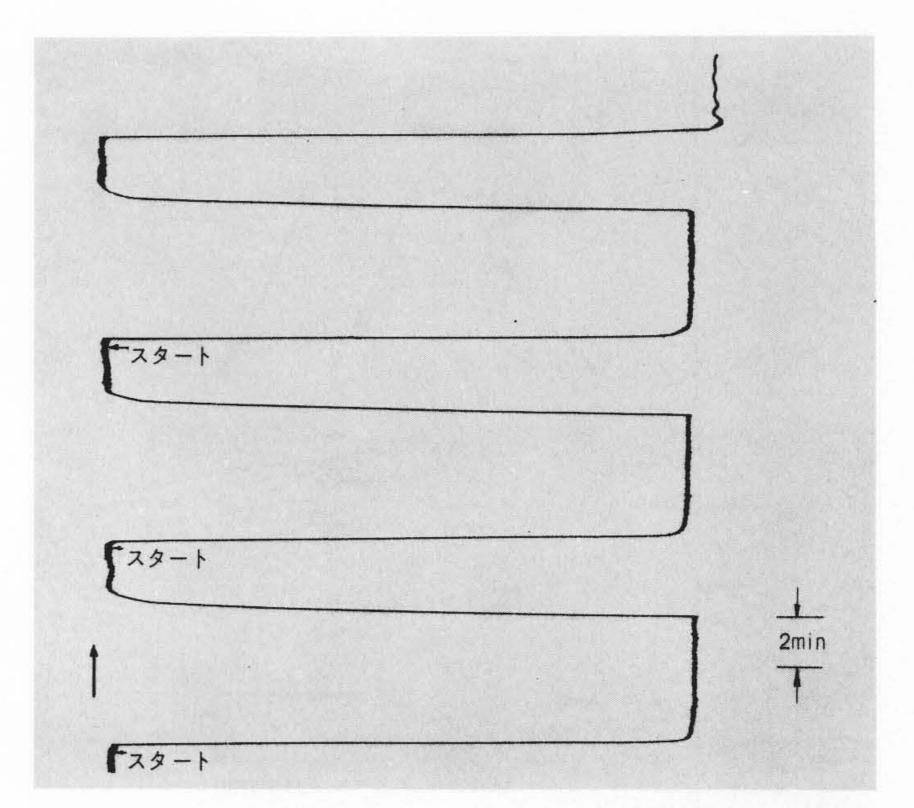


図 7 溶出試験のくり返し測定 塩酸ピリドキシン錠(4錠)のくり返し測定。波長λ₁320nm, λ₂290nm, スケールA₀-I, チャートスピード 5 mm/min Fig. 7 Dissolution Test of Tablets

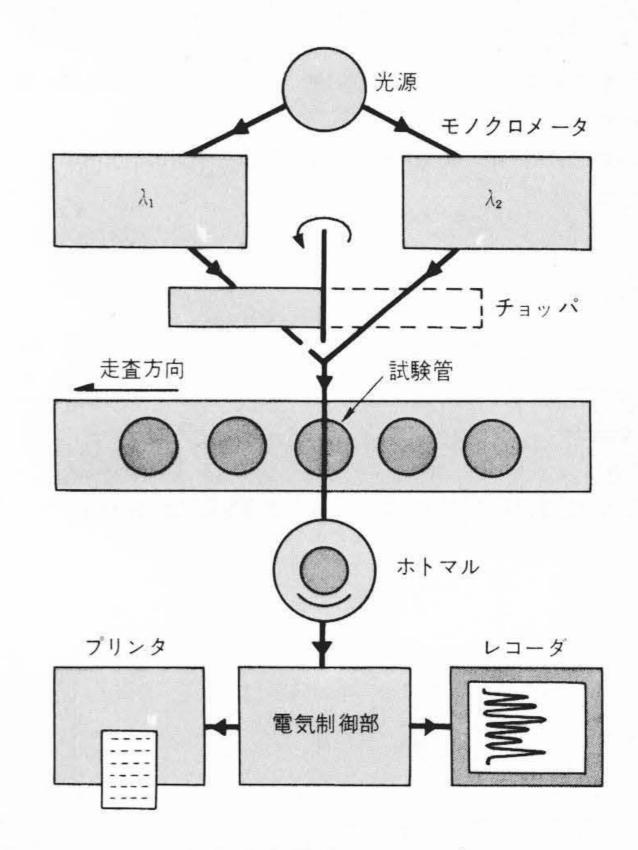


図8 迅速濃度測定装置系統図 連続的にセルである試験管を走査(矢印方向) させながら測定する。

Fig. 8 Block Diagram of Rapid Sequential Sampler

とに1試料の測定が可能で、試験管をセルとして使用するから発色させたりする前処理もそのセル内で行なわれるので移し替えの手間や時間が省ける。また、フローセル方式のオートサンプラだと粘性の高い物質は測定できないうえに汚染の問題が起こるが、本装置ではおのおのセルが独立しているので全くこれらの問題がない。臨床検査のコレステロールや糖類の測定に特に適している。図9は測定例を示すものである。

(3) デンシトメトリー

薄層クロマト付属装置を取り付ける(**図10**参照)と二波長 測光を用いたデンシトメトリーが可能である。二つの異な る波長の光 λ_1 , λ_2 を薄層プレートの同一場所に照射しプレートを走査させながらその差を測定する。

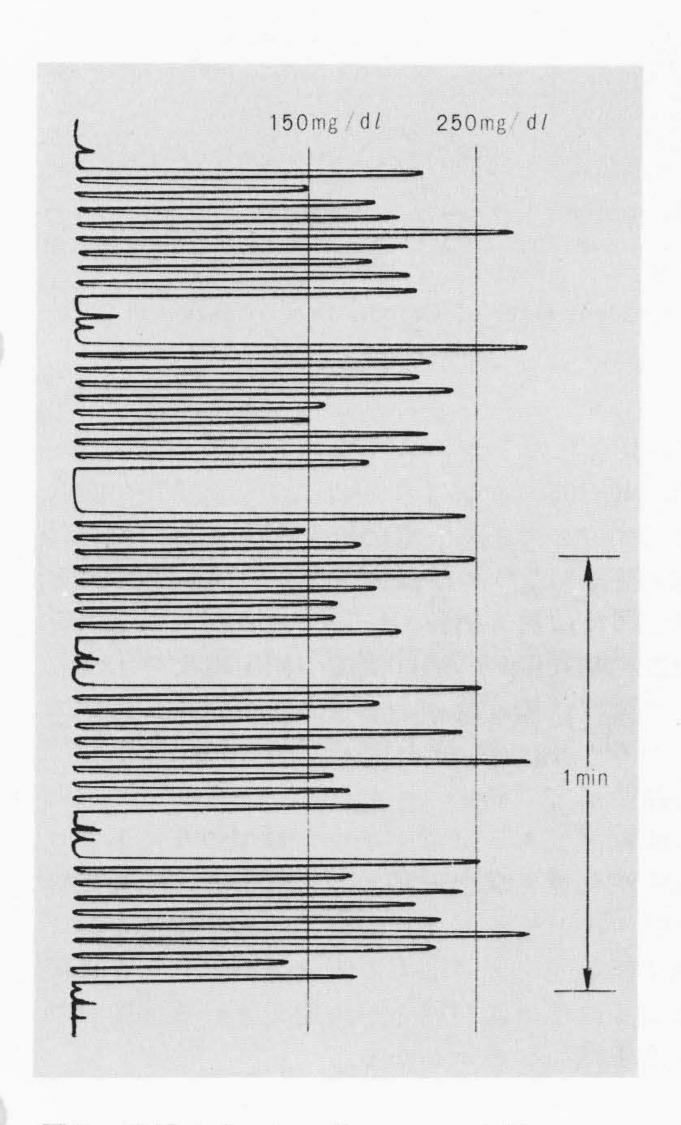
 λ_2 を吸収波長にセットしプレートや試料の不均一性によるバックグラウンドと試料の吸収を、 λ_1 を試料が吸収しない波長にセットしプレートや試料の不均一性によるバックグラウンドを検知し λ_2 と λ_1 での吸光度差を測定するからバックグラウンドが消去され試料の吸収が測定される。

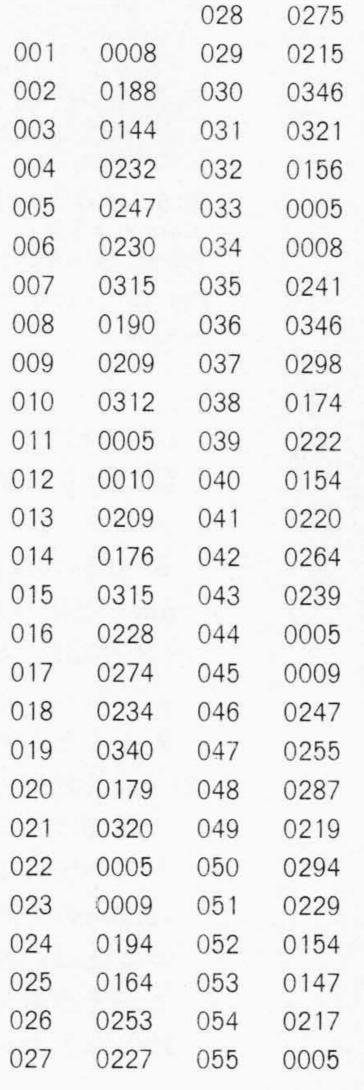
図11はシングルビーム測光と二波長測光のデンシトメータの実測例を示すものである。

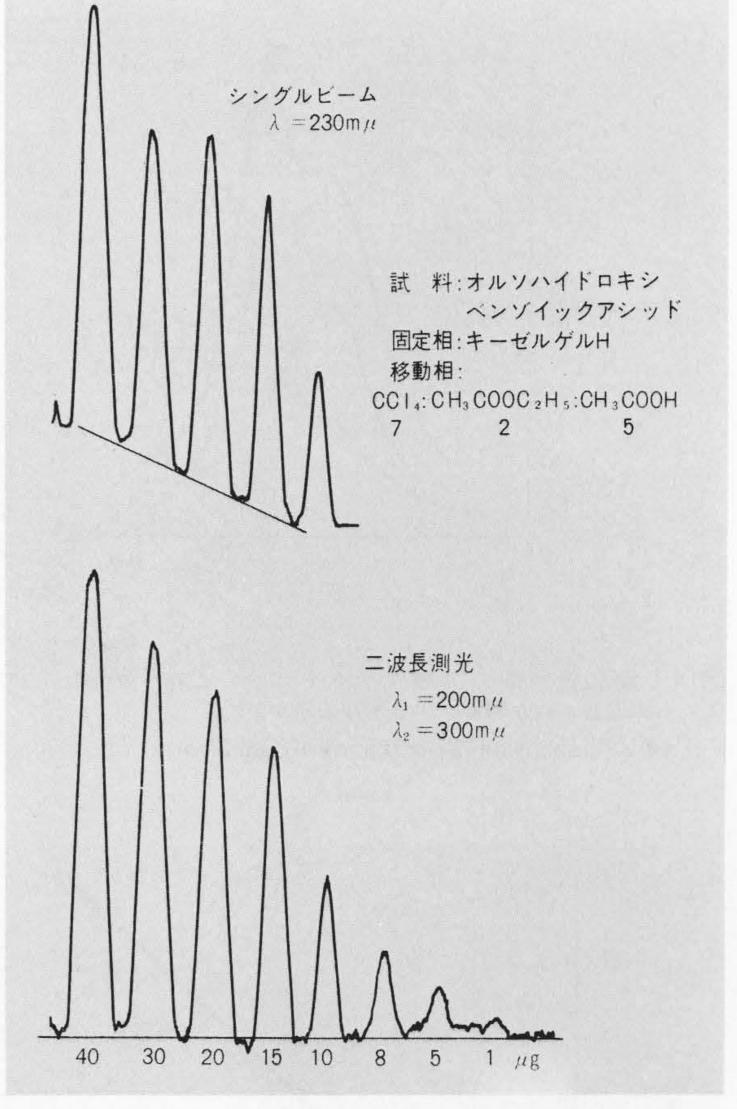
(4) 迅速反応の測定

ラピッドミキシング付属装置を本装置の主試料室を取りはずしセットする(図12参照)。本付属装置は、二つの物質を迅速に混合させ迅速反応(1秒以下)させるものである。二つの物質の混合比は70:1で少量の試薬と多量の試量を迅速混合させる。これは試料の回復時間を短くし、試料をくり返し使用できるようにしている。反応状態を二波長測光で測定する場合の原理は混濁試料の微少反応の測定と同じで出力はメモリスコープのブラウン管上に表示される。

図13は実測例を示すものである。







図II 従来のデンシトメトリと二波長デンシトメトリ 反射方式による従来のデンシトメトリと二波長デンシトメトリを同 一試料にて比較した。二波長デンシトメトリには、ベースの浮き上

がりがない。 Fig. II Conventional and Two-Wavelength Densitometry

図 9 血清中のコレステロールの定量 Zak-Henly法によるコレステロールの定量。 正常値は $150\sim250\,\mathrm{mg}\,/\mathrm{d}\,l$ である(波長 $\lambda_1:650\,\mathrm{nm}$, $\lambda_2:560\,\mathrm{nm}$)。

Fig. 9 Estimation of Cholesterol in Serum by Means of Zak-Henly Method

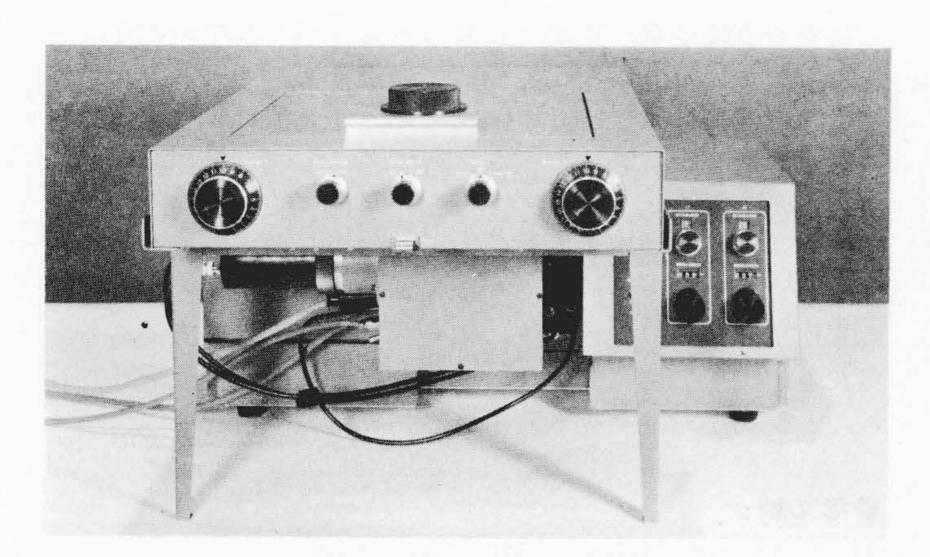


図10 薄層クロマト付属装置 薄層プレートに展開された物質を二波長測光により直接測定する。

Fig. 10 Thin Layer Chromatograph Accessory

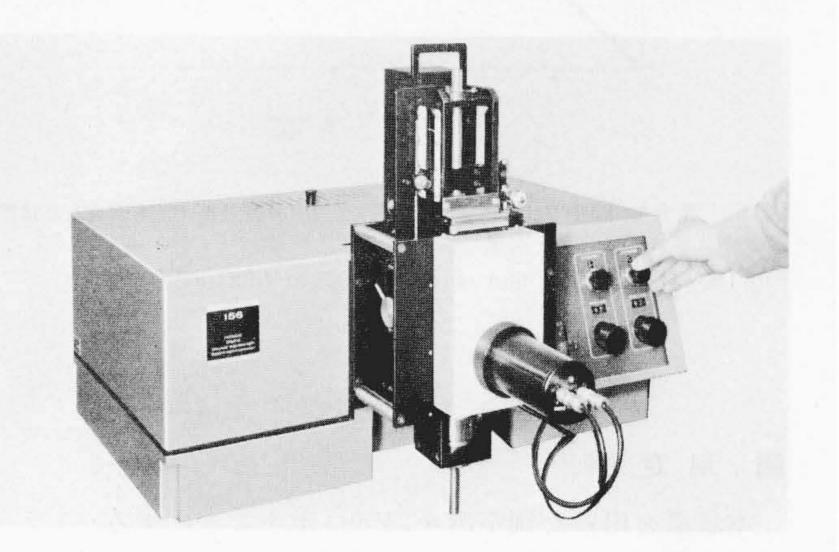


図12 ラピッドミキシング付属装置 出力はメモリスコープなどで表示する。

Fig. 12 Rapid Mixing Accessory

試料比1:70にて高速混合する。

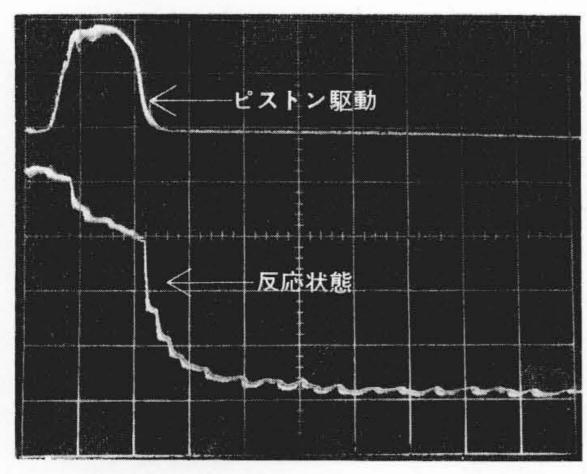


図13 イースト中の サイトクローム a₃の 酸化反応

サイトクロームの高速反応をメモリスコープのブラウン管に表示したもの。 50ms/cm波長445~455 nm。

Fig. 13 Cytochrome a₃ Oxidation in a Suspension of Baker's Yeast

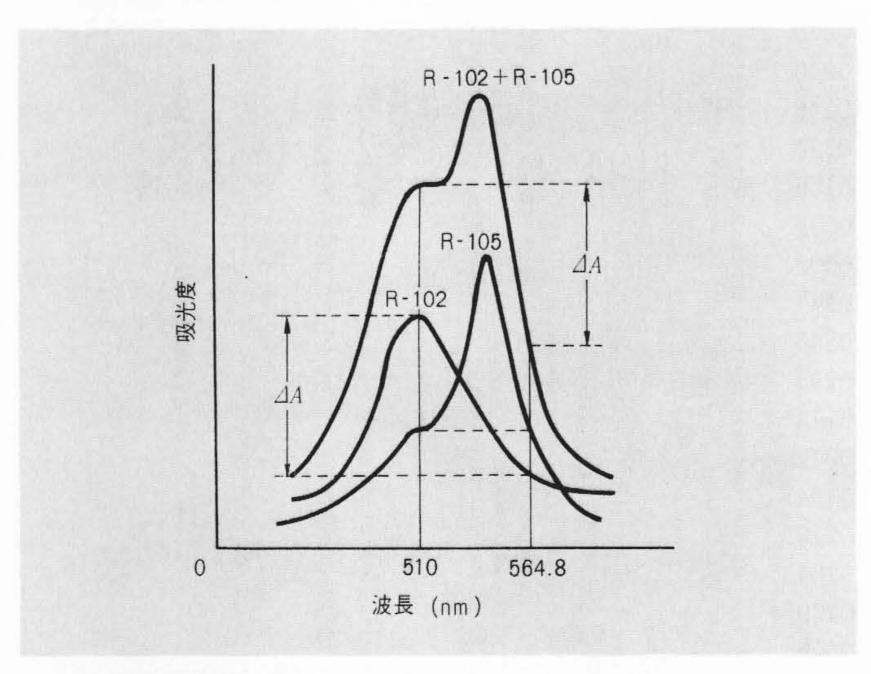


図14 食品着色剤の吸収スペクトル 二種の着色剤 R-102, R-105と, これらの混合された吸収スペクトルを示す。

Fig. 14 Absorption Spectra of Food Dye

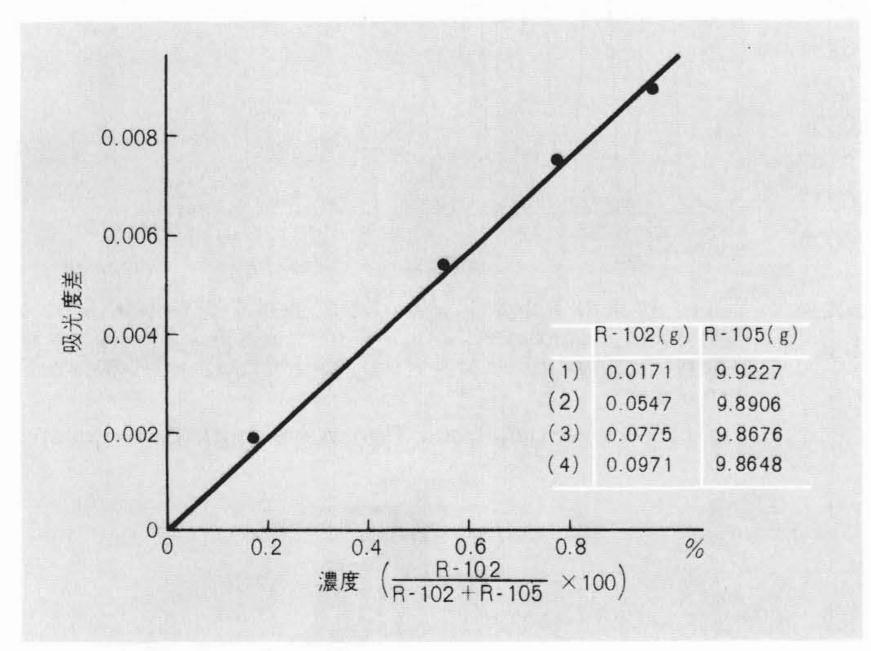


図15 混合物質中のR-102の定量 R-102とR-105を混合した状態で二波長測光によりR-102を定量した。

Fig. 15 Calibration Curve of R-102 in Mixture

5 測定例

本装置を用いた測定例を以下に示すことにする。

 (1) 二種混合物質の一成分の定量 食品着色剤である食用赤色102号New Coccine (以下, R-102と略す)と食用赤色105号Rose Bengale(以下, R-

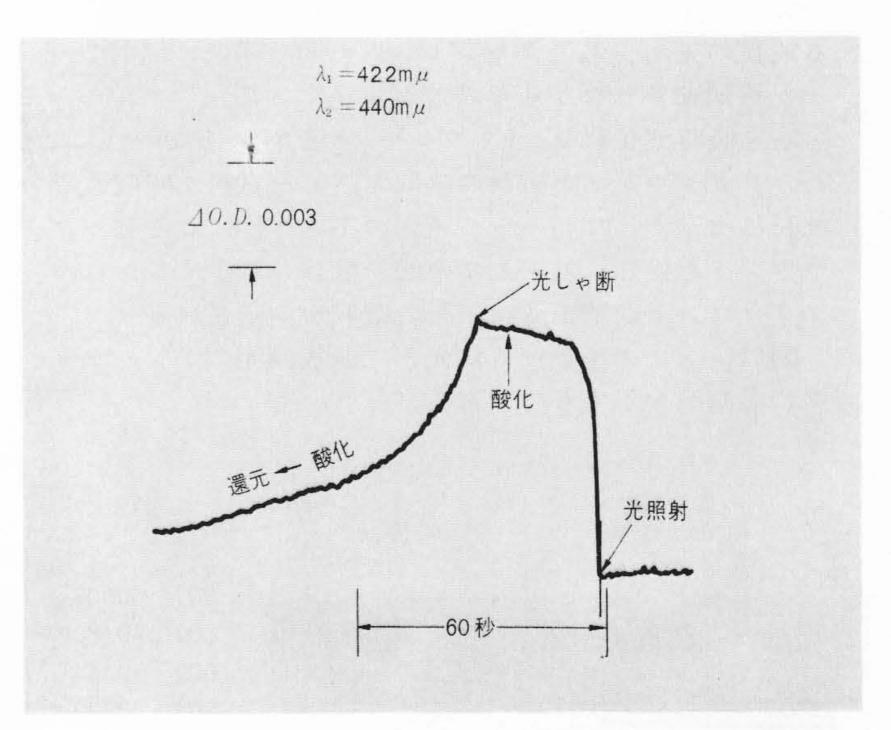


図16 クロマチウム中のサイトクローム C_2 の酸化反応 クロマチウム中のサイトクローム C_2 が赤外光により酸化され、赤外光の照射をやめると還元状態に戻る反応を示すものである。

Fig. 16 Light-dependent Rate of Cytochrome Oxidation in Chromatium

105 と略す)を混合したときの R-102 の定量を行なった。 $\mathbf{Z}14$ は R-102, R-105 およびこれらの混合した場合の吸収スペクトルを示すものである。 R-105 の影響を除くために R-105 の吸収の等しい二つの波長位置 λ_1 : 510nm, λ_2 564.8 nmを選択した。 $\mathbf{Z}15$ は共存物質 (R-105) の濃度が測定物質 (R-102) の濃度の約100倍から500倍での測定結果を示すものである。この程度の濃度比があっても十分定量が可能であることがわかる (3) 。

(2) 混濁試料の微少反応の測定

図16は光合成細菌であるクロマチウムD中のサイトクロームの光による酸化還元反応を示すものである。赤外光線 (850nm)を照射するとサイトクロームC2は酸化される。この変化は急速で照射光をカットするとはじめのレベルに戻るが光照射による酸化は光照射をやめ還元される速度の約10倍以上の速度を持つことがわかる。

6 結 言

現在、非常に多くの種類のシングルビームやダブルビームの分光光度計が開発発売され、ルーチン分析に使用されているが、測定上のいろいろな制限があった。混濁試料の測定混合物質の直接定量、高濃度試料の定量や微少反応の測定などができなかった。この比色分析での限界を打ち破るために簡易形の二波長分光光度計を開発した。本装置により混濁試料の測定、混合物質の直接定量、高濃度試料の定量や微少反応の測定ができるばかりでなく、従来不可能であった市販の試験管をセルとして使用することが可能になった。二波長測光法はまだまだ発展段階にあり、今後新しい測定法が考案され、あらゆる種類の分光光度法に用いられることは確実である。現在、すでに二波長測光法が発光分光や原子吸光に取り入れられ、製品として発売されるようになった。

参考文献

- (1) B. Chance: Science 120, 1967 (1954)
- (2) 本川, 黒石:日立評論「二波長測光を用いた自記分光光度計」
- 52, 1002 (昭45-11)
- (3) 横瀬:日立UVテクニカルデータNO.10