

# 556形二波長自記分光光度計とその応用

## Model 556 Double Wavelength/Double Beam Spectrophotometer and Its Application

混濁試料測定を目的で考案された二波長分光測光法は、356形二波長自記分光光度計及び156形デジタル二波長分光光度計の出現により混合物中の1成分の測定というソフトの開発と相まって、その使用分野は単に生化学の分野だけにとどまらず一般分析分野へと広がっていった。356形、156形の技術、経験及びユーザーの意見をもとにして開発されたのが556形二波長自記分光光度計で、研究向け装置として次の四つの測光機能をもっている。すなわち、(1)自記分光測光、(2)二波長分光測光、(3)微分分光測光、(4)二波長走査測光である。(1)では1個のモノクロメータを使用することによりベースラインの平坦さを向上させ、X-Yレコーダの採用によりレポート スキャンの機能を付加した。(2)~(4)では、二波長光束が同一光路を通過するようにした。この論文は、上記測光法の特長及び説明を10の応用データをもとにして述べた。

本川 忠\* *Tadashi Honkawa*  
 黒石忠文\* *Tadafumi Kuroishi*  
 木村 忠\* *Tadashi Kimura*  
 丹野敏幸\* *Toshiyuki Tanno*

### 1 緒 言

1951年Chance<sup>(1)</sup>は、生体色素の反応を研究する目的で二波長分光測光を開発した。Butler<sup>(2)</sup>は植物中の色素たん白であるファイトクロームを定量するため、またBirth<sup>(3)</sup>らは、果実の熟度を測定するため二波長分光測光を用いた。筆者らは、1967年国際生化学会(東京)で356形二波長自記分光光度計<sup>(4)(5)</sup>を発表し、その使用分野を単に生化学分野にとどめず、一般分析分野へと広げていった。また、1971年二波長分光測光専用器の156形デジタル二波長分光光度計<sup>(6)(7)</sup>を開発し、研究分野からルーチン分析に二波長分光測光を広げた。迅速濃度測定装置<sup>(7)(10)(11)</sup>は、701形システム光度計の開発に大いに寄与した。薄層クロマトに二波長分光測光を採り入れた二波長薄層クロマトグラフィ<sup>(13)~(15)</sup>を発表し、性能の向上をみた。更にイソフタル酸中のテレフタル酸、排水中のフェノールなどの種々の測定データ<sup>(16)(17)</sup>を発表した。以上の経験とユーザーのニーズをもとに、556形二波長自記分光光度計(図1)を開発したので、その機能と応用例について報告する。



図1 556形二波長自記分光光度計 操作性を良くするため、つまみ類を1個所に集めた。種々の付属装置が装着できるよう、試料室は着脱が可能である。

### 2 機 能

556形は自記分光測光と二波長分光測光<sup>(5)(7)</sup>の両機能を持ち、更に両者を組み合わせた二波長走査測光<sup>(5)</sup>及び微分分光測光<sup>(18)~(22)</sup>の機能をもつ。更に付属装置との組合せで二現象測定、二波長薄層クロマトグラム、多成分混合物中の1成分の測定が可能である。556形の特長をまとめると次のようになる。

#### (1) 高性能自記分光測光

- (a) 自記分光測光には1個のモノクロメータを使用
- (b) X-Yレコーダを採用し、レポート スキャンを内蔵
- (c) 光源自動切換
- (d) 高速波長走査(最高1,200nm/min)

#### (2) 簡便操作

- (a) 操作つまみ、スイッチを前面パネルに集中し、スイッチに押しボタン方式を採用
- (b) 装置の小形化(装置の最小床面積: 120×60cm)

#### (3) 多種測光スケール

- (a) 濃度直読スケール: A 0~3, A 0~0.1, A 0~0.01スケールを装備
- (b) デジタル パネル メータによる表示

表1に356形との改善点の比較を示す。

表1 356形と556形の相異点 556形は356形に比べて、自記分光光度計としての機能を向上させた。

項目	器 種	356形	556形
1. 光源切換		手 動	自 動
2. 測光方式の切換		ロータリ スイッチ, セル ホルダ, 測光ミラーの3切換操作	押しボタンによる1切換操作
3. 波長送り		自 動	自動(レポート スキャンを含む) 手動
4. 波長送り速度(nm/min)		10, 60, 120, 240, 480	30, 60, 120, 240, 150, 300, 600, 1,200
5. スケール		T0-100, A0-1, A0-0.3, A0-0.1 A0-0.03, A0-0.01	T0-100, A0-3, A0-0.1, A0-0.01 CONC(HIGH, LOW)
6. 表 示		ストリップ チャート式レコーダ	X-Yレコーダ デジタル ボルト メータ
7. 試 料 室		2 個	1個(但し, セル位置2箇所)

\* 日立製作所那珂工場

### 3 構造

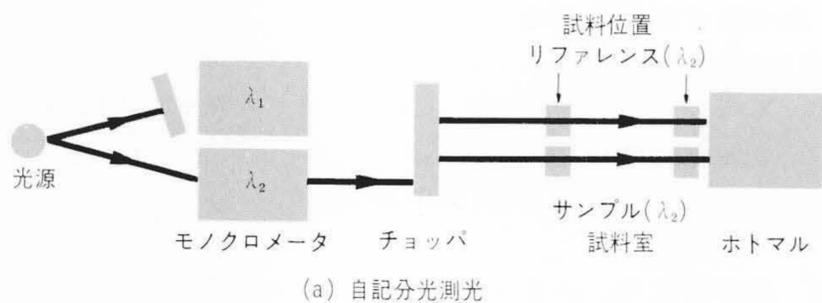
自記分光測光は、**図2(a)**のように $\lambda_1$ モノクロメータからの単色光はシャ断され、 $\lambda_2$ モノクロメータからの単色光だけがチョッパにより2光路に分割され、試料(Reference及びSample)を通過し光電子増倍管(以下、ホトマルという)に到達する。二波長分光測光、二波長走査測光及び光学的微分分光測光は、**図2(b)**のように $\lambda_2$ モノクロメータからの単色光のうちReference側単色光はシャ断され、 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ 両モノクロメータからの単色光は、チョッパを経て同一光路を通り、試料(Sample)を通過しホトマルに到達する。けい光の影響が出る試料のときは、試料位置1にセルホルダを装着し、試料をホトマルから離し、けい光の影響を低減する。通常は、ホトマルに試料が密着した試料位置2にセルホルダを装着する。ホトマルは50mmφの広光電面をもつヘッドオン形であり、試料位置2では試料からの散乱光は効率よく検知されるので、散乱による見掛けの吸収が減り混濁試料の測定が可能になる。

### 4 応用例

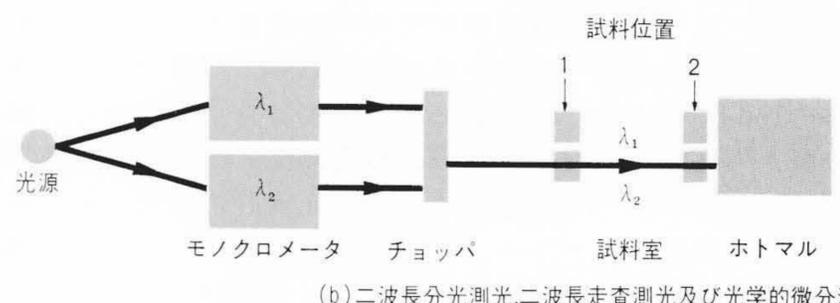
#### (1) 自記分光測光

##### (a) 全波長域走査測定

1枚のチャート上に、波長域900~190nmのスペクトルを記録することができる。光源は350nmで自動的に切り換えられる。**図3**に100%ライン及びホロミウムガラスフィルタの吸



(a) 自記分光測光



(b) 二波長分光測光、二波長走査測光及び光学的微分測光

**図2** 測光法による光路の比較 自記分光測光は、一つのモノクロメータからの単色光を2分する。二波長分光測光は、二つのモノクロメータからの単色光を一光路上に導く。

収スペクトルを示す。

#### (b) 混濁試料の吸収スペクトル

試料位置2では混濁試料の吸収スペクトルが得られる。**図4**はパン酵母混濁液の吸収スペクトルである。10枚以上重ねたる紙(ここではReferenceに12枚重ねたる紙を挿入)を透過する微量光でも測定ができる。

#### (c) 固体試料の吸収スペクトル

木の葉や野菜を前処理せず、直接測定することができる。**図5**は葉ボタンの緑赤色部、白黄色部の吸収スペクトル①、②及びSampleに緑赤色部、Referenceに白黄色部をセットした差スペクトル③を示す。

#### (d) 差スペクトル

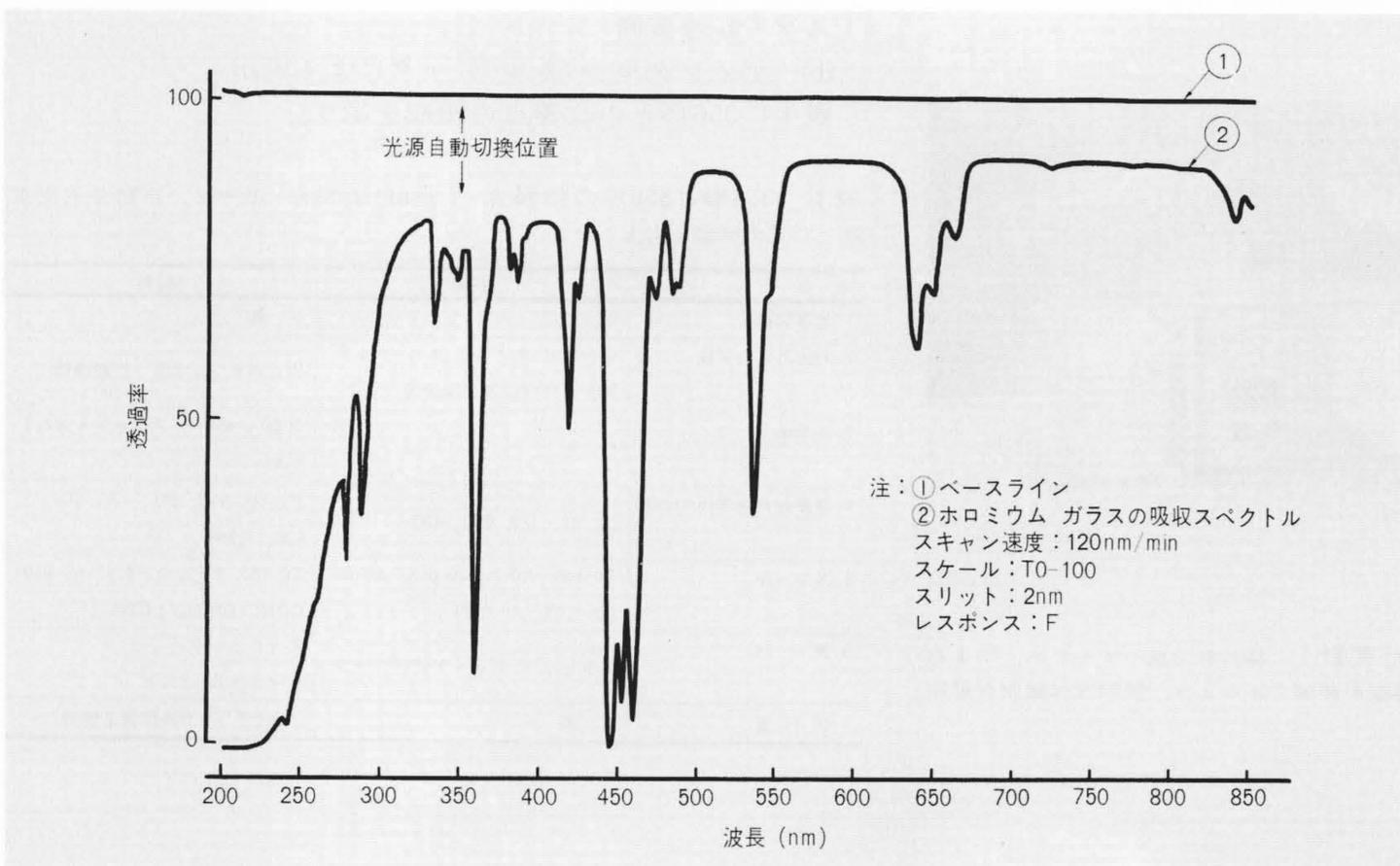
Sample, Referenceに同一試料をセットし、Sample側試料を化学的に変化させて差スペクトルを得ることができる。**図6**に酸化形チトクロームCをSample, Referenceにセットしたベースライン①、Sample側を還元させたときの還元形/酸化形チトクロームCの差スペクトル②を示す。

#### (e) レポート スキャン

任意の波長間隔で、自動的に繰り返し測定するレポート スキャンが可能である。**図7**はアスピリンが熱分解し、サリチル酸に移る過程をレポート スキャンで測定したものである。試料は恒温セルホルダを使って80°Cに保っている。

#### (f) 吸収スペクトルの部分拡大

ゼロ サプレッションにより、吸収スペクトルの任意の吸収位置での拡大を可能にした。**図8**に過マンガン酸カリウムの



**図3** 吸収スペクトル  
1枚のチャートに波長域850~190nmのスペクトルが描ける。波長350nmで光源は自動的に切り換わる。

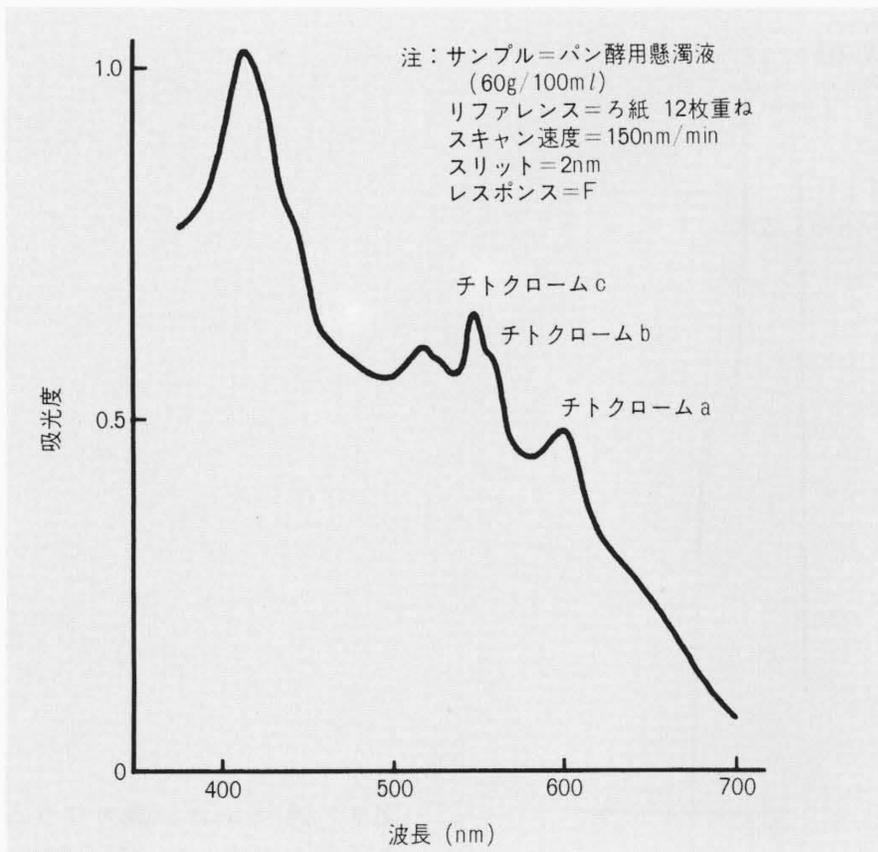


図4 パン酵母懸濁液の吸収スペクトル 高混濁液の吸収スペクトルが得られる。12枚重ねたろ紙を通過する単色光をも検知する高感度な分光光度計である。

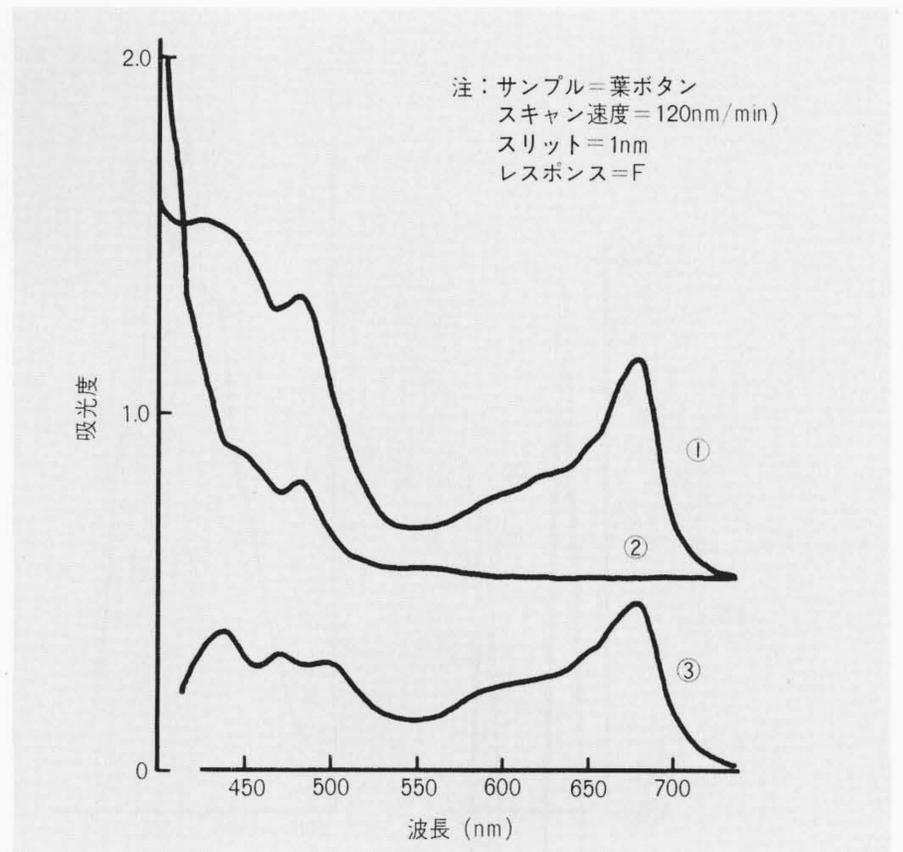


図5 葉ボタンの吸収スペクトル 植物や野菜を直接透過法で吸収スペクトルが得られる。①、②は葉の緑赤部、白黄部の吸収スペクトル、③は緑赤部/白黄部の差スペクトルである。

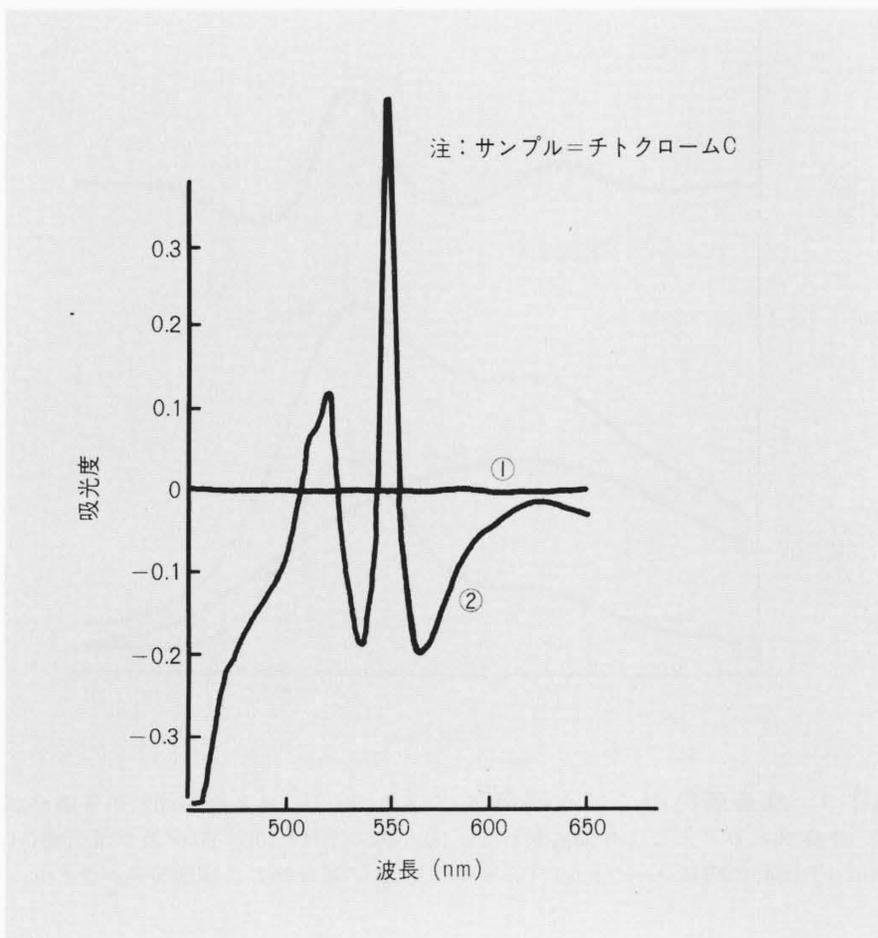


図6 チトクロームCの差スペクトル 図中①は酸化形チトクロームCによるベースライン、②は還元形/酸化形チトクロームCの差スペクトルである。

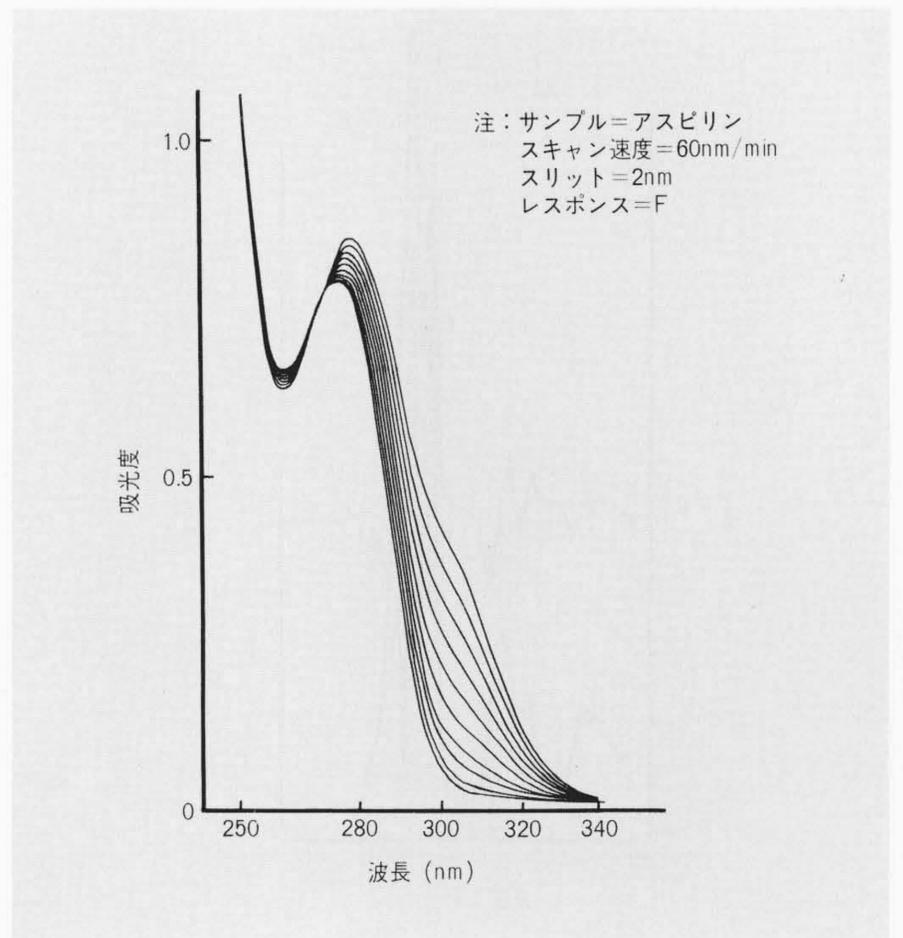


図7 アスピリンの熱分解 アスピリンが熱分解し、サリチル酸に変化する過程をレポート スキャンにより自動記録した。

吸収スペクトル①及びその吸収ピーク部、中間部をそれぞれ10倍に拡大した吸収スペクトル②、③を示す。

## (2) 微分分光測光

### (a) 一次微分スペクトル

556形は標準で吸収スペクトルの波長に対する一次微分スペクトル $dA(\lambda)/d\lambda$ が得られる。

図9にNd(ネオジウム)ガラス フィルタの吸収スペクトル①及び波長差( $\lambda_2 - \lambda_1$ )を1nmに保ち、走査した微分スペクトル

②を示す。①でのショールダの部分が、②ではピーク(矢印)になっている。

### (b) 二次微分スペクトル

自記分光測光と微分付属装置を組み合わせ二次微分スペクトル $\frac{d^2A}{d\lambda^2}$ が得られる。図10に食品着色剤R102、R104及びその混合物の吸収スペクトル①、②、③を示す。②、③の二次微分スペクトルを④、⑤に示す。両スペクトルはかなり良い一致を示し、また二次微分スペクトルの吸収ピーク位置は

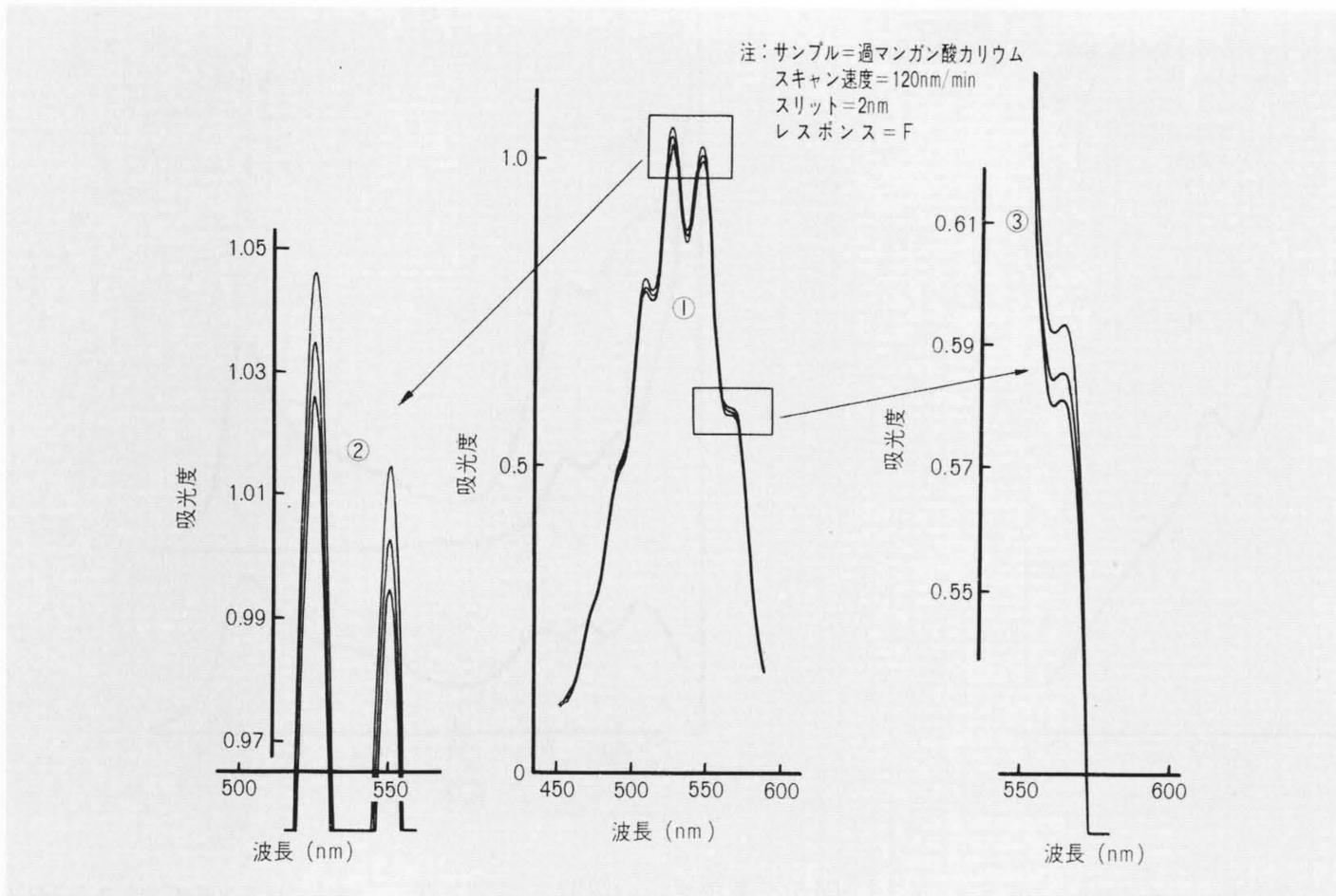


図8 過マンガン酸カリウムの吸収スペクトルの部分拡大  
スペクトルの任意の吸収位置を、スケール拡大することができる。

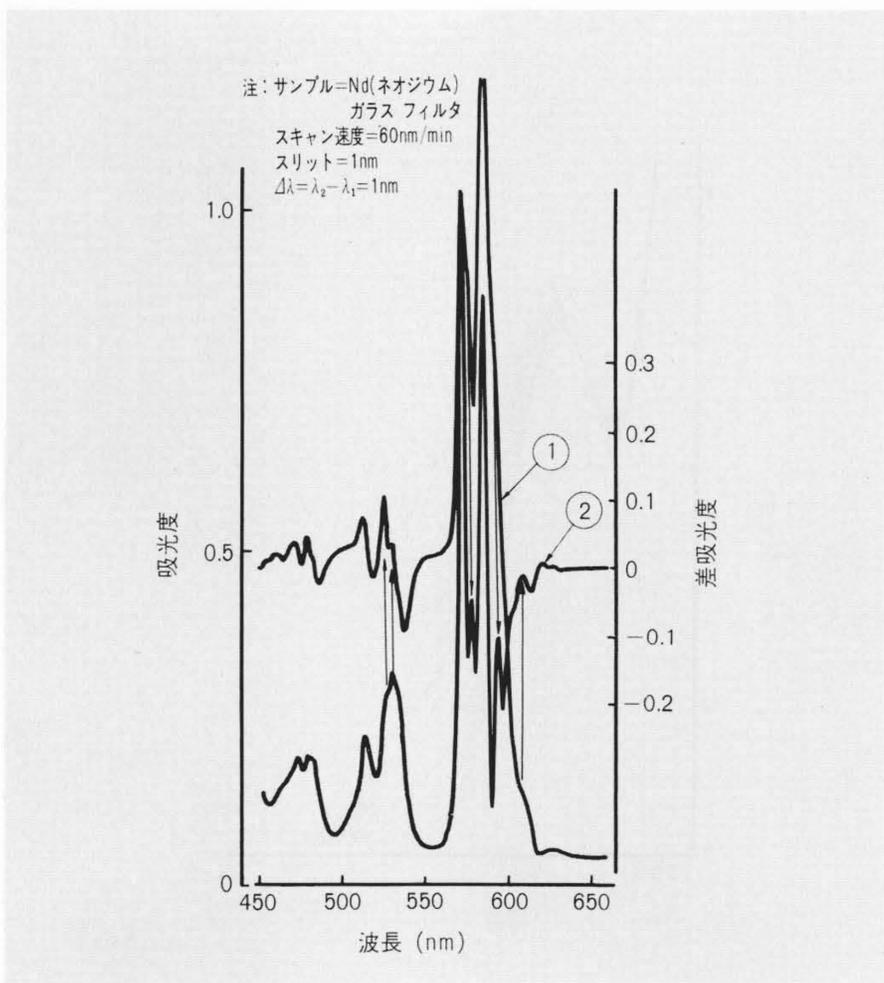


図9 Nd(ネオジウム)ガラス フィルタの微分スペクトル 吸収スペクトル①のショルダ部が、一次微分スペクトル②でピークになって現われる(矢印)。

②のそれと一致する。このことから、共存物 R 102 の影響が消去されたことを示している。

(3) 二波長走査測光

(a) 二波長走査スペクトル/二次微分スペクトル

混濁試料や標準試料の得られない場合は、二波長走査測光が適している。図11の牛乳の吸収スペクトル①では、波長285 nm付近で吸収は識別できない。二波長走査スペクトル②では、吸収が現われ識別できる。更にこの出力を二次微分したスペ

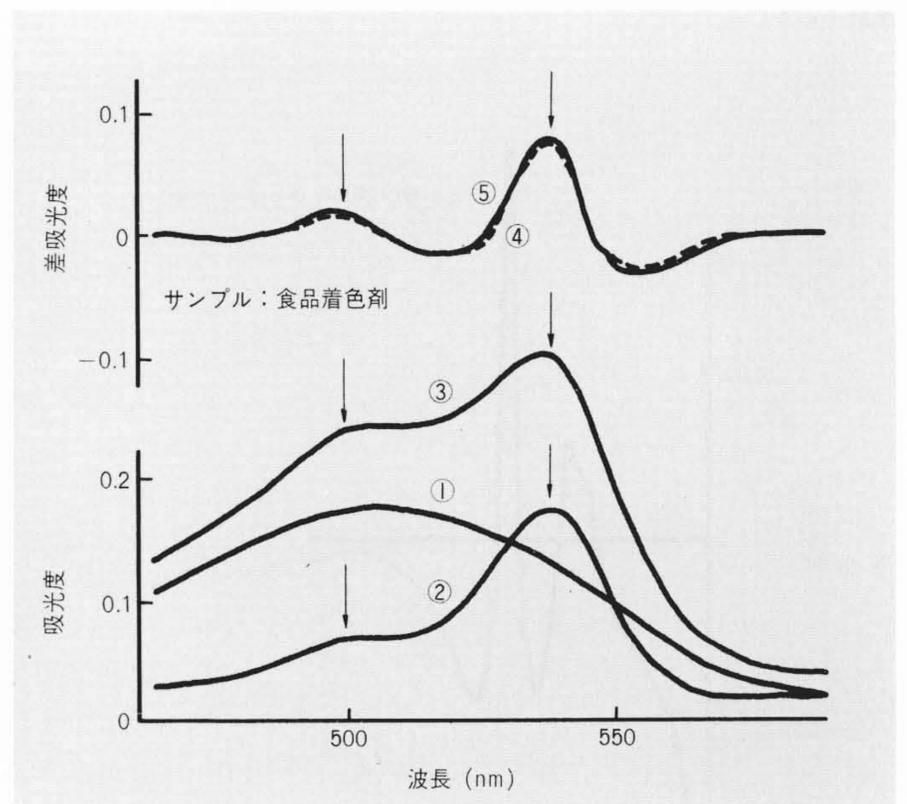


図10 食品着色剤の二次微分スペクトル 共存物(R102)の影響が二次微分スペクトルにより消去される。①, ②, ③はR102, R104及び混合物(R102+R104)の吸収スペクトル, ④, ⑤はR104及び混合物の二次微分スペクトル。

クトル③では、ピークになり定量可能となった。このピーク  $\Delta A$  により定量した結果を図12に示す。直線性のよい検量線が得られた。

(4) 二波長分光測光(混合物中の 1 成分の測定)

(a) 共存物が吸収の等しい二波長をもつ場合

混合物を測定し、その 1 成分の定量が可能である。図13にアスピリンとサリチル酸の吸収スペクトルを示す。共存物アスピリンの吸収スペクトルの吸光度の等しい二波長(261nm, 282nm)を選ぶ。アスピリンの存在中のサリチル酸の定量結果を図14に示す。直線性のよい検量線が得られた。

混合物中の一成分の測定は、共存物の吸収スペクトルが吸収の等しい二波長をもつ場合、二波長分光測光法<sup>(5)(23)</sup>でその

まま混合物を測定することにより可能である。しかし、共存物の吸収スペクトルが吸収の等しい二波長をもたぬ場合は不可能であった(図15参照)。この測定を可能にするため、係数倍器(多成分測定装置)を用いる。共存物Aの存在する混合物

Cを測定し、測定物Bを定量する。物質A, B, Cの濃度を  $a, b, c$  とすると、 $c(\lambda) = a(\lambda) + b(\lambda)$  となる。Aの影響を消去するため二波長  $\lambda_1, \lambda_2$  の濃度の低い  $a(\lambda_1)$  を、高い  $a(\lambda_2)$  に等しくなるよう係数倍器を合わせる。すなわち、 $a(\lambda_2) = ka(\lambda_1)$  とする。

$$\begin{aligned} c(\lambda_2) - kc(\lambda_1) &= a(\lambda_2) + b(\lambda_2) - k\{a(\lambda_1) + b(\lambda_1)\} \\ &= b(\lambda_2) - kb(\lambda_1) \dots\dots\dots(1) \end{aligned}$$

となり、混合物Cを測定することにより測定物Bが定量される。更に3成分A, B, Cからなる混合物D中の一成分Cの定量も以下に示す条件の場合可能になる。上と同様に

$$d(\lambda) = a(\lambda) + b(\lambda) + c(\lambda) \dots\dots\dots(2)$$

となり、係数倍器を次の条件で合わせる。すなわち、共存物A, Bの任意の濃度下での吸収スペクトルの交点に二波長  $\lambda_1, \lambda_2$  を選択し、AあるいはBの波長  $\lambda_1, \lambda_2$  で吸収が等しくなるよう係数倍器を合わせる。

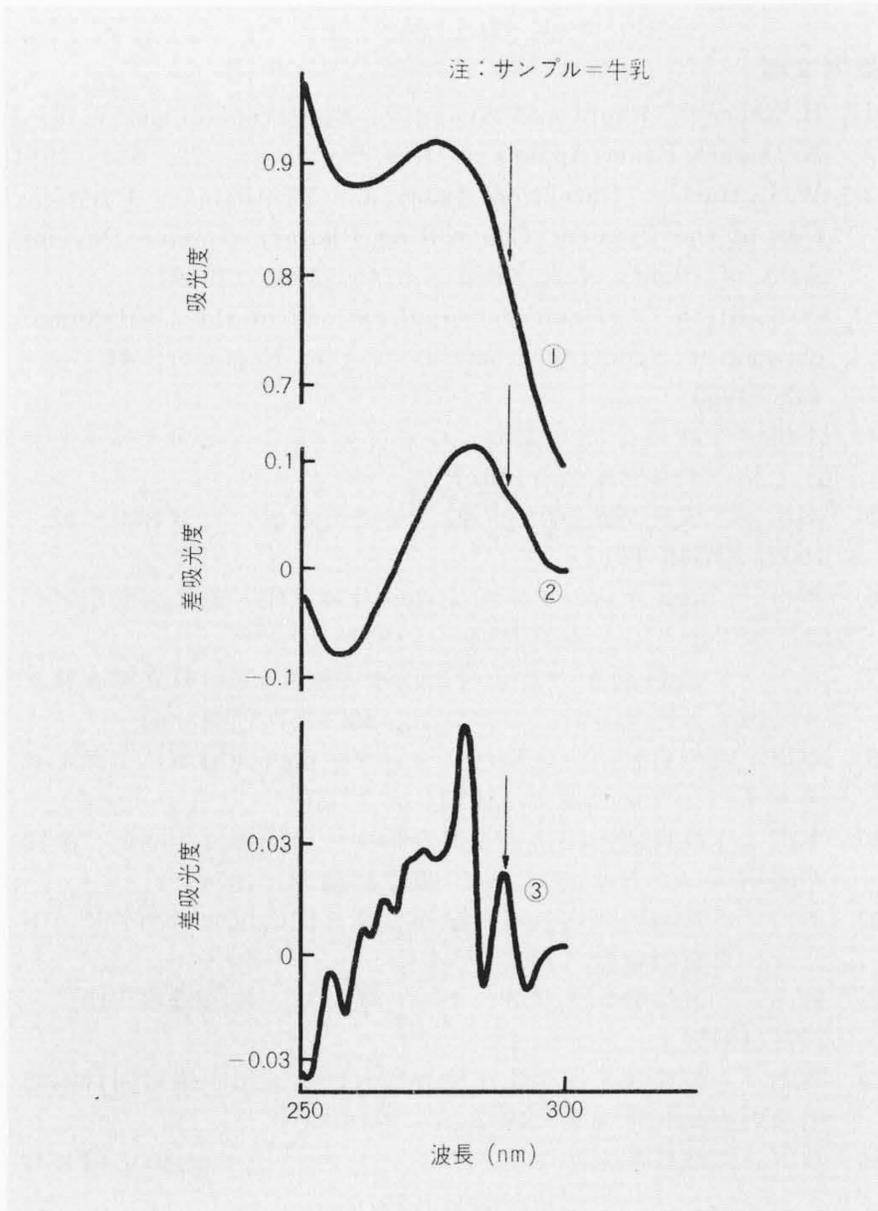


図11 牛乳の二波長走査スペクトル及びその二次微分スペクトル ①は牛乳のスペクトル, ②は牛乳の二波長走査スペクトル( $\lambda_1=300\text{nm}$ ,  $\lambda_2=$ 波長走査), ③は②の二次微分スペクトルである。

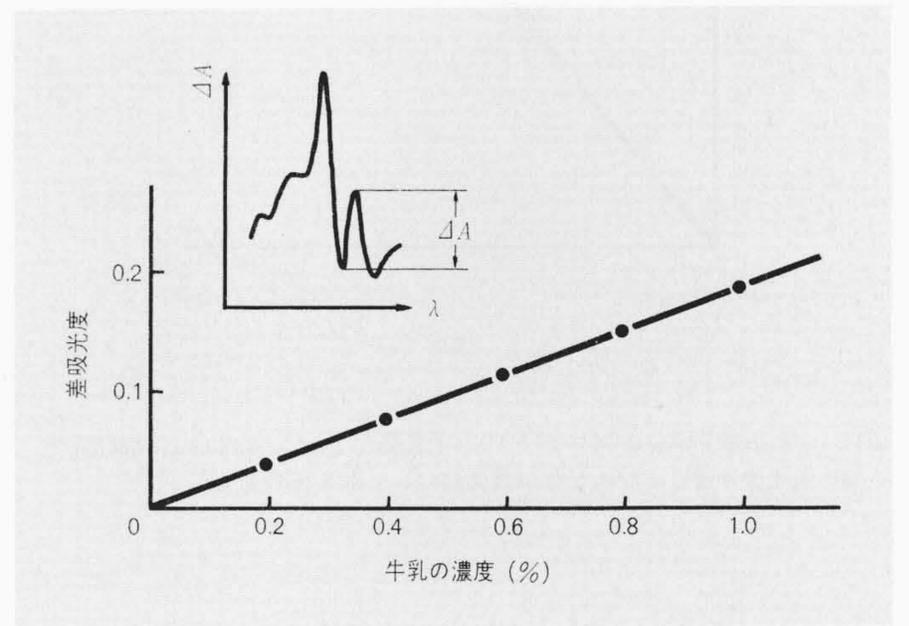


図12 牛乳の二波長走査測光の二次微分による定量 二波長走査スペクトルの二次微分のピーク値( $\Delta A$ )により牛乳を定量した。

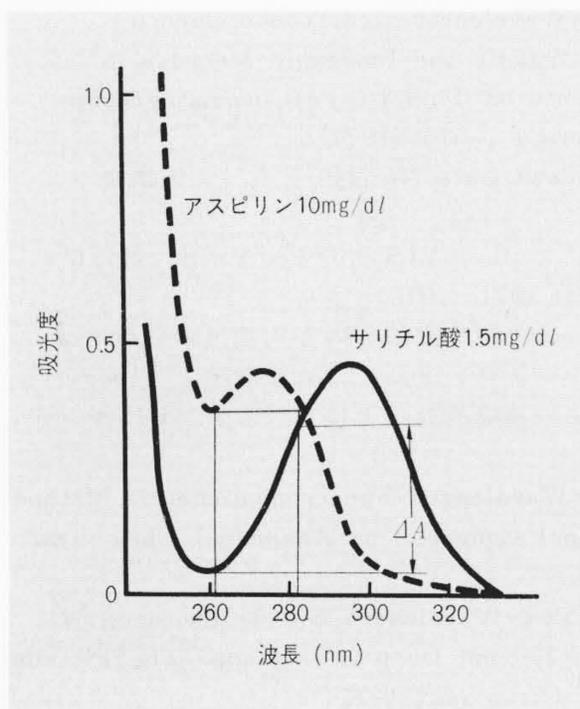


図13 アスピリン及びサリチル酸の吸収スペクトル アスピリンの影響を除くため、アスピリンの吸収の等しい二つの波長261nm, 282nm を選ぶ。

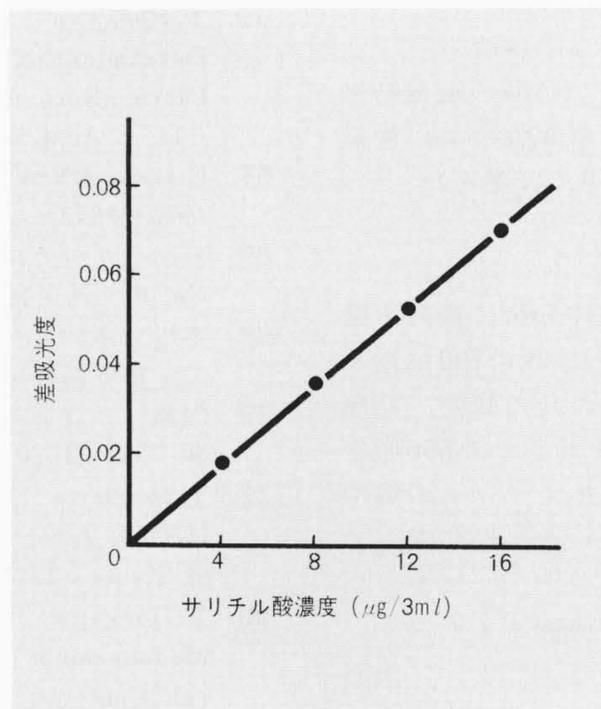


図14 アスピリン中のサリチル酸の定量 波長261nm, 282nmにセットし、アスピリン(0.3mg/3ml)の影響を消去した。

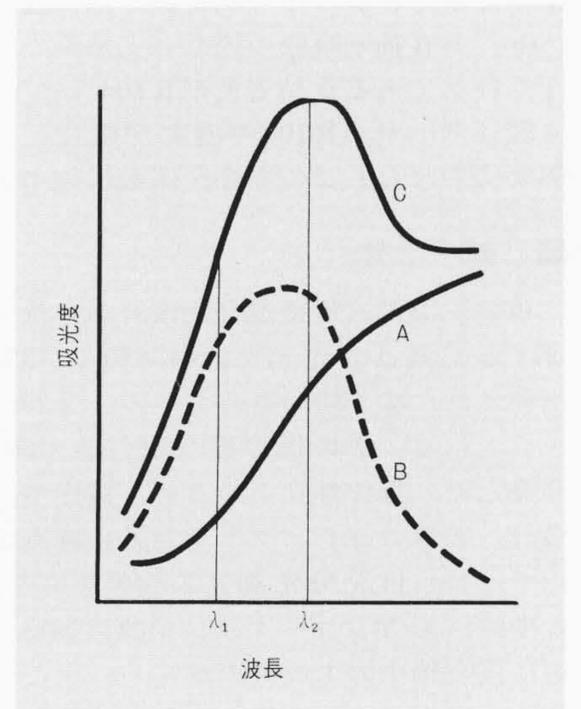


図15 混合物中の1成分の測定 共存物が吸収の等しい二波長をもたない場合の共存物の影響を消去する。

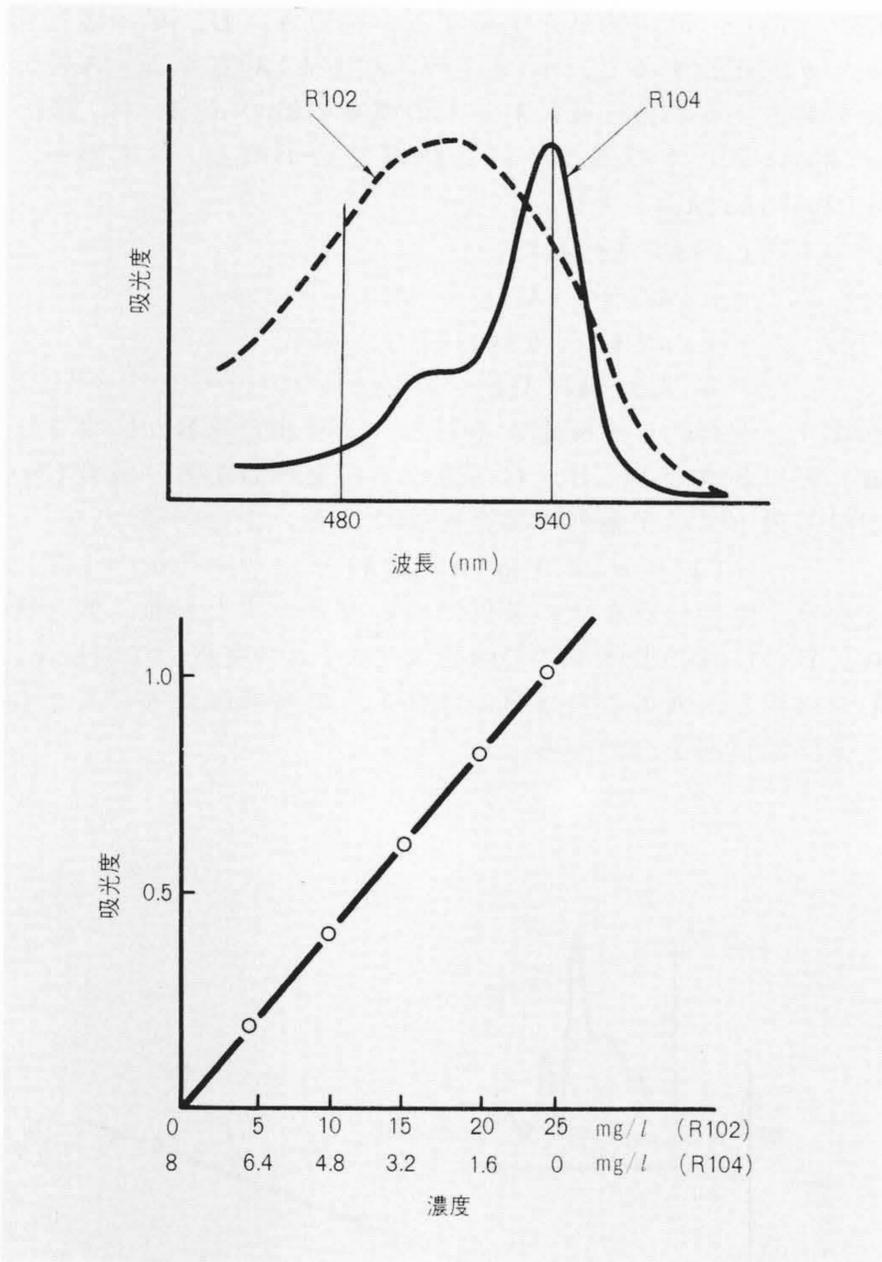


図16 食品着色剤R104中のR102の定量 二波長480nm, 540nmで, R104の吸光度が等しくなるよう係数倍器(k=9.5)を合わせる。

$$a(\lambda_2)/a(\lambda_1) = b(\lambda_2)/b(\lambda_1) = k^1 \dots\dots\dots(3)$$

になるので,

$$d(\lambda_2) - k^1 d(\lambda_1) = c(\lambda_2) - k^1 c(\lambda_1) \dots\dots\dots(4)$$

となり, 3成分混合物中の1成分が混合物を測定することにより定量される。その測定例を次に述べる。

(b) 共存物が吸収の等しい二波長をもたない場合

共存物である食品着色剤R104存在下でのR102の定量結果を図16に示す。R104の濃度が増減しても直線性のよい検量線が得られた。この場合, 係数倍kの値を9.5に選んだ。

**5 結 言**

現在, 混濁試料や混合物試料の定量・定性分析に威力を発揮する二波長分光光度計(156形及び356形)は既に700台近く出荷され, 広く使用されている。今回, これらの技術, 経験をもとにし, 更に操作性及び性能の向上をねらった556形を開発した。操作性向上のため, 操作つまみやスイッチの集中設計, 装置のコンパクト化設計に重点をおいた。性能向上の点では特に自記分光測光の改善を図り, レポートスキヤンの内蔵, X-Yレコーダ及び光源自動切換の機能をもたせた。更に混合物中の1成分の測定, 一次だけでなく二次, 三次微分スペクトル, 二波長走査測光などの新しいソフトを開発し, 556形をより効果的に活用できるように, 各種特別付属装置の充実を図った。

我々は, 356形を開発して以来8年を経過し, 現在この種

の装置が一般分析分野にもようやく浸透しはじめたのを機に, 今後ますます発展し, 高度な研究に際し良い手助けになることを確信する。

**参考文献**

- (1) B. Chance, "Rapid and Sensitive Spectrophotometry III, A Double Beam Apparatus. Rev. Sci. Instr., 22, 634 (1951)
- (2) W. L. Butler "Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants, Natl. Acad. Sci, 45, 1703 (1959)
- (3) G. S. Birth "Agricultural Applications of the Dual-Monochromator Spectrophotometer" Agric. Engineer, 41 432 (1960)
- (4) 本川 「二波長分光光度計について」, 第3回応用スペクトロメトリー東京討論会 (1967)
- (5) 本川 「二波長測光を用いた自記分光光度計」 日立評論 52, 1002, (昭45-11)
- (6) 本川 「二波長デジタル分光光度計の試作」 第7回応用スペクトロメトリー 東京討論会 (1971)
- (7) 本川 「二波長測光の比色分析への応用」 156形日立デジタル二波長分光光度計」 日立評論 55, 567 (昭48-6)
- (8) 本川 「錠剤自動溶出試験器について」 第9回応用スペクトロメトリー 東京討論会 (1973)
- (9) 本川 「二波長測光法による混合物中の目的物質の測定」 第10回応用スペクトロメトリー 東京討論会 (1974)
- (10) 本川 「迅速濃度測定装置の試作」 第8回応用スペクトロメトリー 東京討論会 (1972)
- (11) 横山 「二波長分光光度計による化学分析」 臨床検査 19, 247 (1975)
- (12) 高畑 「二波長測光法の臨床検査における適用」 第6回日本衛生検査自動化研究会 (1974)
- (13) 本川 「二波長測光法によるデンストメトリー」 第6回応用スペクトロメトリー 東京討論会 (1970)
- (14) T. Honkawa "Analysis of Trace Amount of the Organic and Inorganic Mercury by Two-Wavelength with Thin Layer Chromatograph" New Methods in Env. Chem, and Tox. at the Int. Symp. on Ecological Chem., Susono, Nov. 1973
- (15) T. Honkawa "Two-Wavelength Spectrophotometric Determination of Organic and Inorganic Mercury in Ultra Micro Amounts on Thin Layer Chromatography (I)" : Anal. Letters, 7, 575 (1974)
- (16) Hitachi UV-VIS Tech. Data No. 4 ~ 7 (日立製作所 1970~1973)
- (17) 日立テクニカルデータ UV-VIS No. 1, No. 3, No. 6 ~ No. 8 (日立製作所 1971~1973)
- (18) 本川 「微分スペクトルの吸光度法への応用希土類分析について」 第5回応用スペクトロメトリー 東京討論会 (1969)
- (19) 保田 「二波長測光法の基礎的なことについて」 ファルマシア 6, 317 (1970)
- (20) T. Honkawa "Two-Wavelength Spectrophotometric Method", IUPAC International Congress on Analytical Chemistry at Kyoto (1970)
- (21) T. Honkawa "The Two-Wavelength Spectrophotometric Measurement with Second Derivative Mode" The Pittsburgh Conference at Cleveland (1975)
- (22) 本川 「二波長測光による微分スペクトル」 第36回分析化学討論会 金沢において (1975)
- (23) 柴田 「すぐれた測定結果をもたらす二波長分光測光」 化学と工業 23, 668 (1970)