

高 村 一 知

DUAL-WAVELENGTH SPECTROPHOTOMETRY

KAZUNORI TAKAMURA

はじめに

近年機器分析の普及は目ざましいものがあり中でも、吸光分析法は各分野で広く利用されている。特に最近の傾向としては、研究内容の複雑化につれて試料の取扱いが問題となり、生化学、医学、農学、栄養学など各分野において、試料を純粋に分離することが難しいときまた生細胞の懸濁液、細胞内顆粒の懸濁液、筋肉組織など成分をそのまま測ることが多く、試料の“濁り”による光散乱の影響をいかにして取り除くかが長年の課題であった。また、微量試料、高価な試薬などを使用することが多く、吸光度スケールの拡大が望まれるにいたっている。

これら諸問題の解決のためには、種々の方法が考えられているが、アメリカペンシルバニア大学の BRITTON CHANCE 教授(1951)³⁻⁸⁾ は、従来の分光光度計の測光概念の域をこえた二波長分光測光方式を開発し、多くのユニークな研究業績をつみかさねることにより二波長測光法は

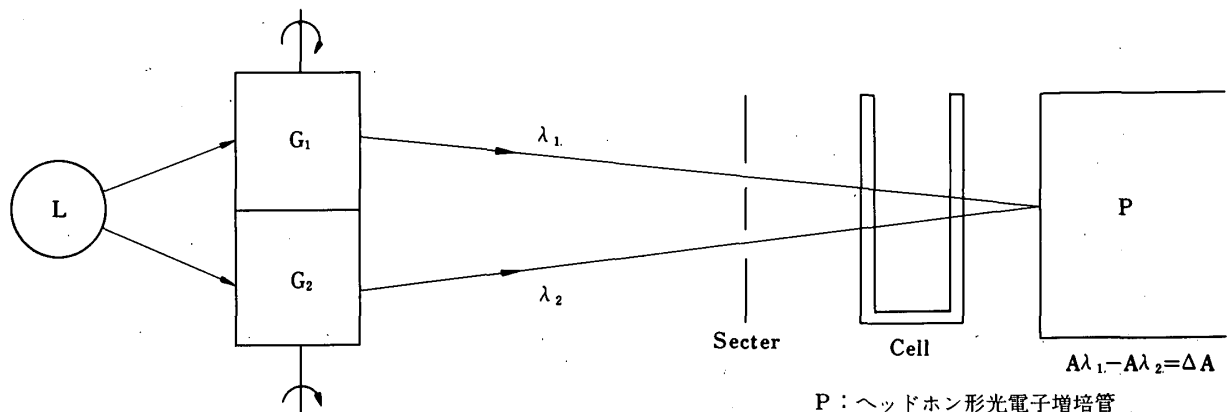
その一つの解決手段として、きわめて有効な方法であることを提唱した。

この二波長分光光度計は従来の分光光度計と測光概念を大きく変えることによって、光散乱の影響を克服し、濁りが時間とともに変化するような試料でも、十分信頼すべき結果を与えてくれる、などの点にすぐれた特徴がある。^{9, 11, 13-17, 21, 22, 25)}

1. 二波長分光測光法の原理

従来の分光測光法は Beer の法則を基礎に、目的物質の任意の一波長における透過率または吸光度を適当な溶媒をいれた対照セルと比較して測定している。

二波長分光測光法は、光源 L からの光が上下に分けられ、それぞれ自由に回転できる 2 つの回析格子 G_1 , G_2 によって任意の異なる波長 λ_1 , λ_2 の二つの単色光に分光される。そして一つの試料セルの同一場所に交互に照射され、その差透過率 ΔT , または差吸光度 ΔA を検出記録する。



第 1 図 二波長分光測光法の概念

簡単に表現すると普通の分光光度計を2台内蔵していると考えてよい、ただそれらが、1台ずつ単独にも用いられるが連動しているところに²⁸⁾応用面が広いのである。

2. 二波長分光測光法の装置

現在、分光光度計は大別して二つの型のものが用いられている。Split-beam(二光束型)とdouble-beam(dual-Wavelength)(二波長型)である。^{31,33)} Y_{ANG} の原報で a double-beam Spectrometer という名称で報告されているもの、及び市販の大部分のものは、一つの単色光を2つにわけて、二つのセルにあてる様式の分光光度計(二光束型)もdouble-beam spectrophotometer と呼ばれている。一つの単色光が二つに分離しても二つのビームにはちがいないが、一つのものを分割したものであるから、Split-beam という名称を用いるほうが合理的であると思われる。これに対して²⁾ C_{HANCE} の double-beam Spectrophotometer は二つの波長のビームを用いる(一つのセルにあてる)のであるから、このままの名称でよいわけであるが上述のように市販の分光光度計の慣用名と混同されるおそれがあるので、彼の装置を市販化した Aminco 社で“Dual-Wavelength” Spectrophotometer と名称したのは適当と思われ、日本語では“二波長”と訳し二波長分光光度計と、^{2, 31, 33)}呼ばれている。

二波長分光光度計は現在、日本の日立とアミンコン社およびフェニックス社の三社が製品化しているだけである。

(1) Split-beam Spectrophotometer

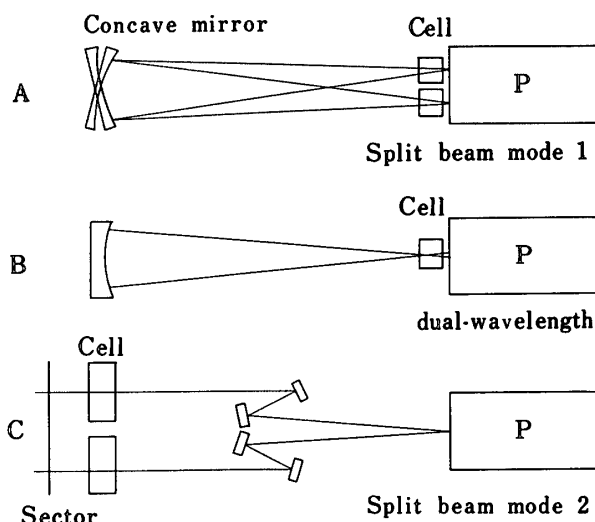
従来の分光光度計は、同一波長、同一強度の光束を二つのセル(対照および試料)に照射する方式であり次の公式が成立する。

$$-\log(I_{\lambda}/I_0) \equiv \Delta A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot \Delta C \quad \dots(1)$$

λ は目的物質の吸収スペクトル、 I_0 は対照側の透過光、 ϵ_{λ} は吸光係数、 I_{λ} は試料側の透過光、 ΔA_{λ} は二つのセル間の差吸光度、 ΔC は目的成分の差濃度、 l はセルの長さである。(第2図-A, C)

(2) dual-Wavelength Spectrophotometer

二波長分光光度計である。第2図-Bに示す



第2図 測光方式

ように試料セルが一つである。試料セルに交互に照射される単色光 λ_1, λ_2 の公式は次のように成立する。

$$\lambda_1 \text{は, } -\log(I_1/I_0) = \Delta A_1 = \epsilon_1 \cdot l \cdot \Delta C + \Delta A_s \quad (2)$$

ここで ΔA は反応による目的物質の濃度の変化量、 ΔA_s は反応の進行によって生ずる散乱の変化に伴う吸光度の変化量。

$$\lambda_2 \text{は, } -\log(I_2/I_0) = \Delta A_2 = \epsilon_2 \cdot l \cdot \Delta C + \Delta A_s \quad \dots(3)$$

二波長分光ではダイノード、フィードバック方式を採用して、 λ_2 における出力をいつでも I_0 に保つようにしているから、得られる出力は式(2)および(3)の I_1 および I_2 に式(4)を与えられる係数を乗じたものに等しい。

$$I_0/I_2 = \exp\{m(\epsilon_2 l \cdot \Delta C + \Delta A_s)\} \quad \dots(4)$$

$m = 2.31$ とする。したがって λ_1 における出力を I_{df1} とおくと、式(2)と(4)から

$$I_{df1} = I_0 \exp\{-m(\epsilon_1 - \epsilon_2) l \cdot \Delta C\} \quad \dots(5)$$

式(5)を書きなおすと

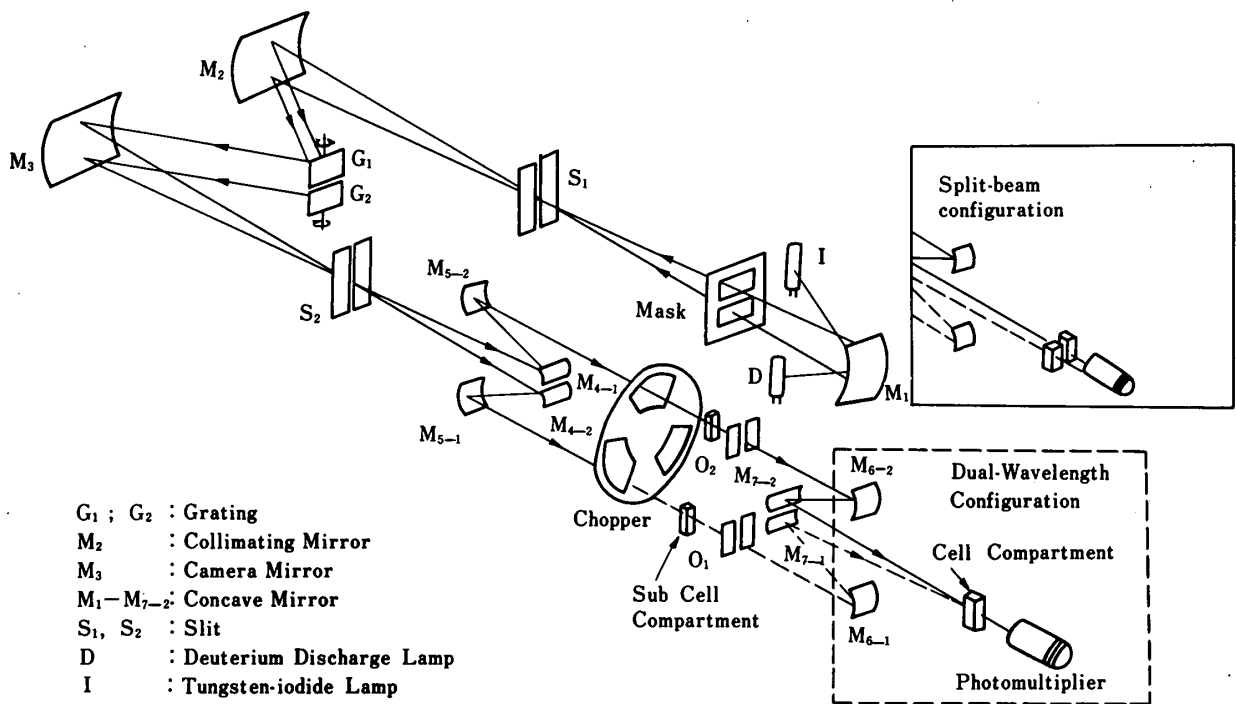
$$-\log(I_{df1}/I_0) = \Delta A = (\epsilon_1 - \epsilon_2) l \cdot \Delta C \quad \dots(6)$$

上記式から、二波長分光も二光束型も測定される吸光係数 ϵ に関して直線性が存在していることを示している。^{18, 19, 28)}

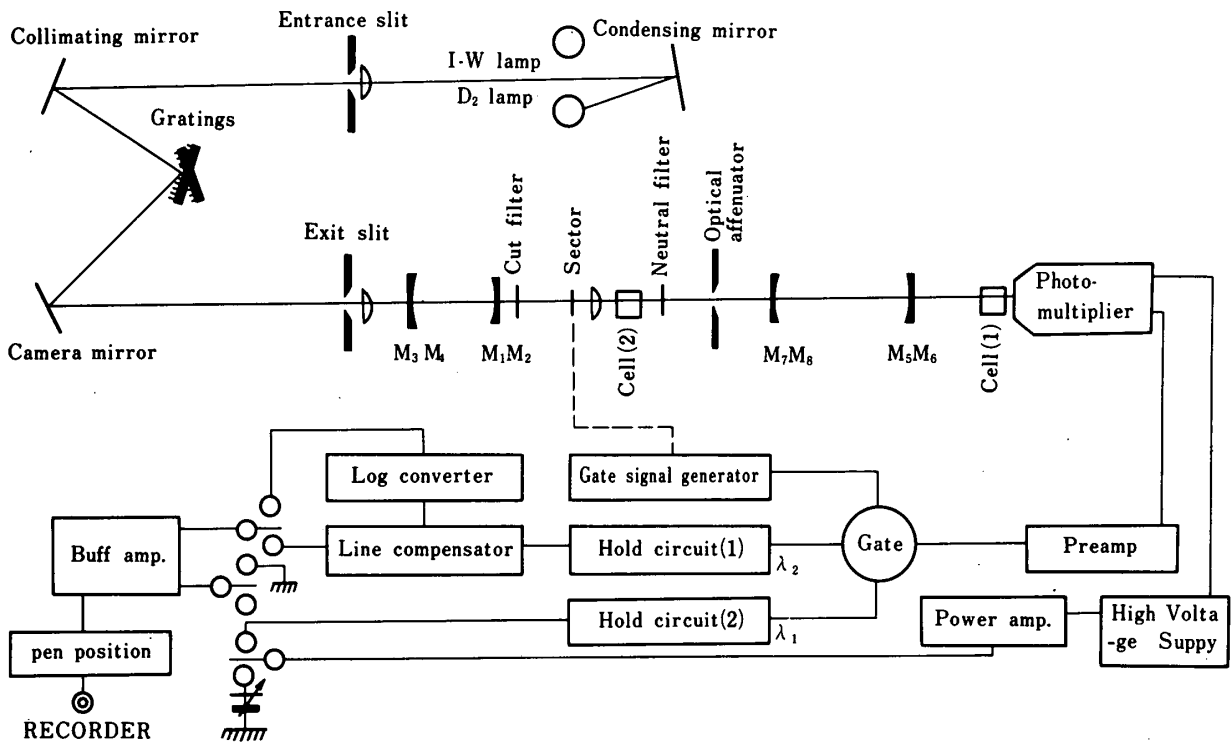
二波長分光測光法は、一つの装置で、両方法への変換が可能で応用範囲が非常に広いのである。

第3図と第4図に日立365型二波長分光光度計の光学系とブロックダイヤグラムを示した。

この装置は、大別すると、光学系と信号処置の二方式に大別される。



第3図 二波長分光光度計の光学計



第4図 356型日立二波長 自記分光光度計ブロックダイヤグラム

光学系についてみると、紫外光源には重水素放電管(185~350nm)を、近紫外~可視光源としては輝度温度の高いヨウ素タングステンランプ(300~850nm)を用いている。これから放射される光は、第3図に示されるように、上下2段に分かれて自由に可動できるグレーティングをもつモノクロメーターによって分光され、波長1と波長2の光束に分けられる。この二つの光束は、チョッパーを通り、ミラーによって1カ所に集光される。また、同じミラー角度を変えることによって、波長1と波長2とは別々の

位置に集光され、この集光したところにセルが置かれるようになっている。前者の方法によって二波長測定が、後者の方法によって自記分光測光(Split-beam)が行なわれる。二つのグレーティングは全く独立しているため、これを同一平面に合わせ(同一波長にする)波長掃引すれば自記分光測光になり、少し波長をずらし両グレーティングを同一速度で掃引すると、微分スペクトルが求められる。その他種々の測光技術上の特長をもっている。

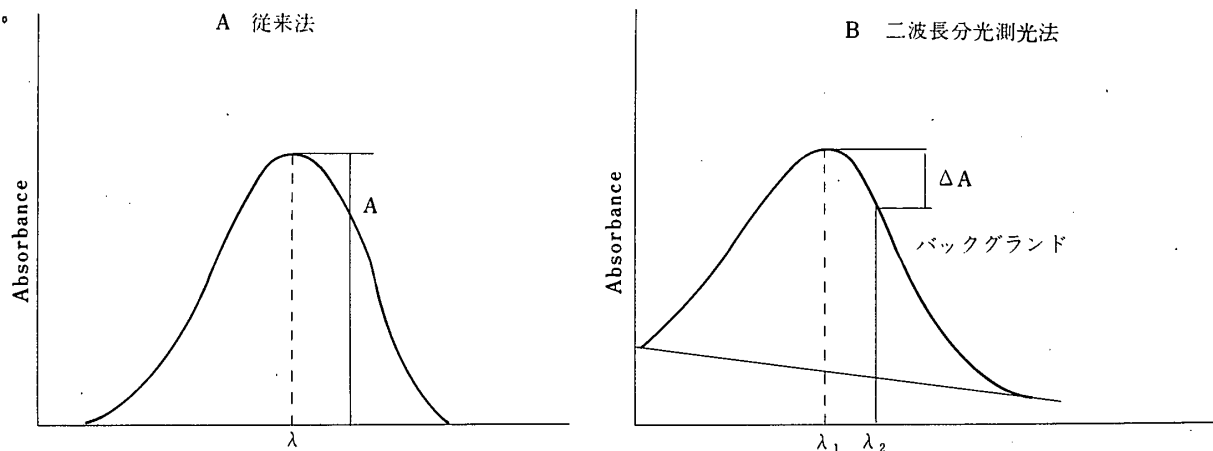
表1 測光モード

	測光モード	光源・分光器・セル・検知器・増巾器・記録計	波長走査	解 説
1-1	2波長測光 (2現象測光)		λ_1 } 固定 λ_2 }	2つの単色光を異なる波長に固定し、1つのセルに照射し、各々の信号を独立に2ペンレコーダで記録する。1つの試料で異なる2つの波長位置での変化を記録する。
1-2	2波長測光 (定量分析)		λ_1 } 固定 λ_2 }	2つの単色光を異なる波長位置に固定し、1つのセルに照射し、その差を記録する。
2	分光特性測光		λ_1 固定 λ_2 走査	1つの単色光をある波長位置に固定し、もう1つの単色光をある波長範囲で走査し、1つのセルを照射し、その比を記録する。
3	微光測光		$\lambda_1 - \lambda_2 = \Delta \lambda$ 同時走査	2つの単色光を一定波長差に保ち、波長走査し、1つのセルに照射し、その比を記録する。吸収スペクトルの微分曲線。
4	ダブルビーム測光		$\lambda_1 = \lambda_2$ 同時走査	2つの単色光を同一波長にして波長走査し、2つのセル(試料, 対照)を照射し、その比を記録する。

3. 二波長分光測光法の特長

従来の一波長複光束法では、任意の一波長における目的物質の吸収を適当な対照液を用いて零点からの透過率または吸光度の絶対量として

測定している。(第5図-A) このような方法では光散乱その他共存物質の吸収などによるバックグラウンドが存在するときには、正確な測定は不可能である。ところで、化学反応、定性、



第5図 従来法と二波長分光測光法との相違

定量分析などの場合、必ずしも目的成分の光吸収に関する絶対量を知る必要はないだろう。この観点に立って生まれたのが二波長分光測光法である。

この方法は、第5図-Bに示すように、目的成分の吸収スペクトルの吸収極大波長を基点として、他の任意の波長との間の差透過率または差吸光度を測定するわけである。そこで第5図-Bに示すように、二波長のうち λ_1 を測定波長とすればもう一方の波長 λ_2 が従来の対照セルに相当すると考えられる。

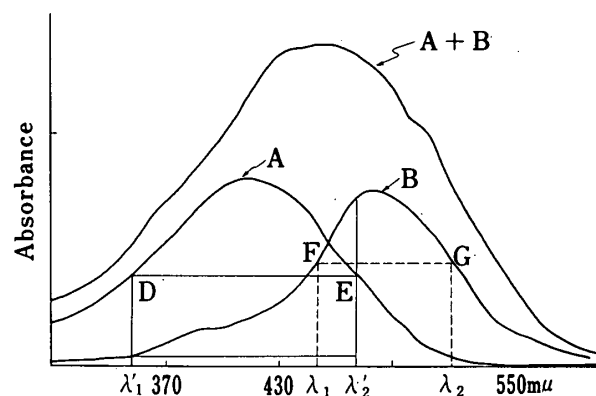
その他、いくつかの装置あるいは測定上の特長があり、詳細は各論で述べることにし、本項ではそれらを列挙するにとどめる。

- (1)混濁試料の測定ができる。
- (2)二成分混合物質中の1成分の定量分析が容易にできる。
- (3)微分測光ができる。
- (4) λ_1 , λ_2 をそれぞれ単独に設定すると、二現象測光ができる。
- (5)高感度測定ができる。
- (6)一波長固定一波長走査により特殊なスペクトルが得られる。
- (7)その他低温測定、励起光照射状態にて測定できる(日立 356型二波長分光光度計)

4. 二波長分光測光法による測光例

(1)混合成分の分別定量

二成分混合物質でそのうちの一成分が不純物



第6図 $\lambda_1-\lambda_2$ の決定と作図法

としてまたは添加物として混在する例は非常に多くある。また、異性体の分別定量をするさい吸収スペクトルがほとんど類似している場合でも適当な対照波長を選択することにより測定が可能である。

a. $\lambda_1-\lambda_2$ の決定法

12, 28, 30)

a-1 $\lambda_1-\lambda_2$ の決定法と作図法

(a)二成分の各吸収スペクトルを書く。(第6図)

(b)妨害成分Aの吸収スペクトルに濃度の等しい、D点とE点を選び、それぞれ λ'_1 および λ'_2 と仮設定し、精密決定法を行ない決定する。

*注 $\lambda_1-\lambda_2$ の波長位置でのA成分の濃度に対するベースラインは $\Delta A(\lambda_1-\lambda_2) = 0$ の関係から変動がない。また目的成分Bに差吸光度 $\Delta A = A\lambda_1 - A\lambda_2$ が存在することになる。

a-2 一波長固定、一波長走査スペクトル法

と作図法。

(a) 妨害成分Aの吸収スペクトルから適当なD点を選びこれを λ_1 とする。この λ_1 を固定する。

(b) A成分の各種濃度で λ_2 を走査すると第7図のようになる。等吸収点E点を λ_2 と仮設定し精密決定法を行なう。

b 精密決定法

分析精度をあげるために、つぎのような操作を行なって最終的に、a-1, a-2 両方法の $\lambda_1-\lambda_2$ を決定する。

(a) λ_1 および λ_2 を固定しておき、各種濃度のフルスケール Absorbance 0.1 を測定すると第8図の結果になる。

(b) そこで λ_1 あるいは λ_2 をわずかに移動させると、 $A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} = 0$ になるような点がある。これを最終的に $\lambda_1-\lambda_2$ と決定する。

c-1 検量線の作成

$\lambda_1-\lambda_2$ を固定しておき、目的成分の各種濃度を各range (日立 356型二波長分光光度計, Abs 0.01~1.0 まで) にて測定する。(第9図)

c-2 相関係数および定測値 (吸光度) より濃度を求める計算式

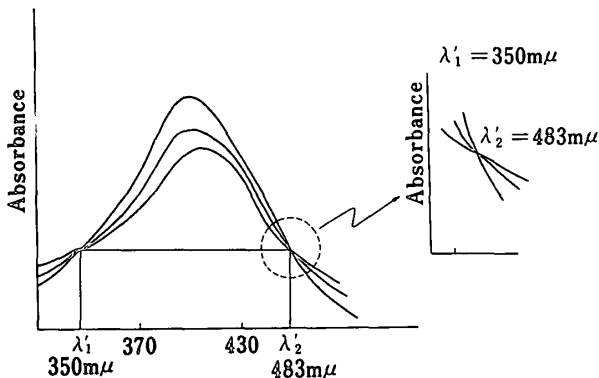
$$y = a_x + b \quad y \cdots \cdots \text{吸光度}$$

$$x \cdots \cdots \text{濃度}$$

$$a = \frac{n \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad r \cdots \cdots \text{相関係数}$$

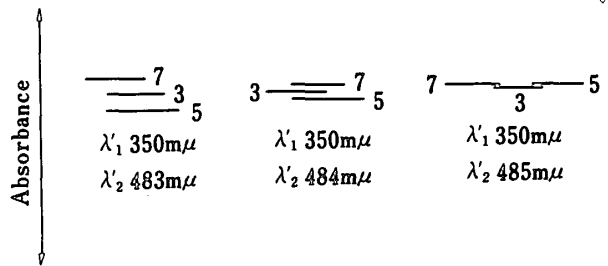
$$b = \frac{\sum x^2 \cdot \sum y - \sum x \cdot \sum x \cdot \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{\{n \sum x^2 - (\sum x)^2\} \{n \sum y^2 - (\sum y)^2\}}}$$

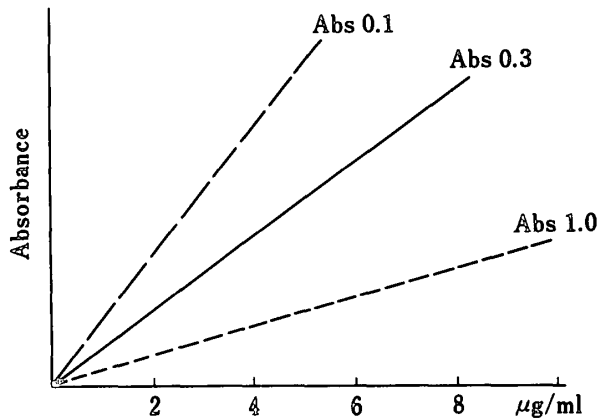


第7図 吸収曲線

*注 一般に多種類の検体測定には、c-2の方法が便利である。



第8図 精密決定法



第9図 検量線

(2) 微分測定法 (Derivative Spectrophotometry)

吸光度A (またはT) の波長 λ に対する一次微分 $dA/d\lambda$ (または $dT/d\lambda$) の波長に対する曲線を直接測定するとつぎのような利点がある。^{9,10,27,29)}

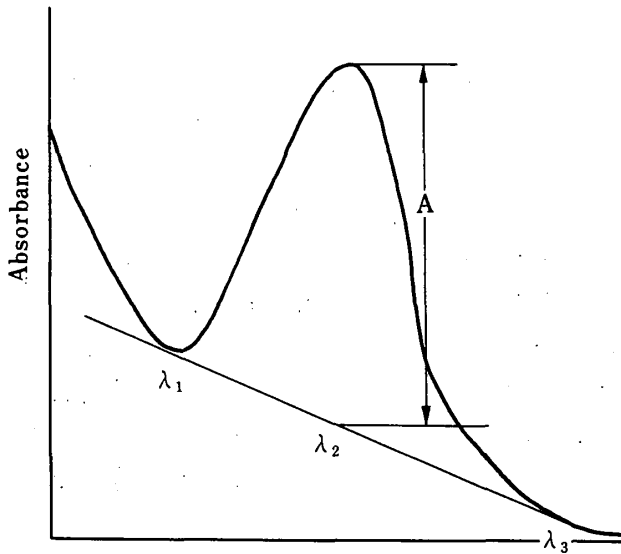
a. 二つあるいはそれ以上の吸収帯がまったくあるいはわずかの波長差で重なり合っている場合でも吸収帯を確認できる。

b. 吸光度が波長に対して急角度に上昇する部分に重なった弱い吸収帯を確認できる。

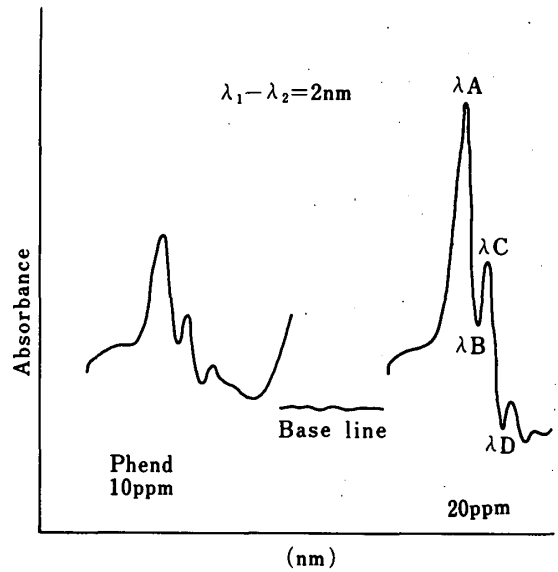
c. 非常にブロードな吸収帯での吸収極大位置を正確に決定できる。

d. 微分値と濃度間に 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。

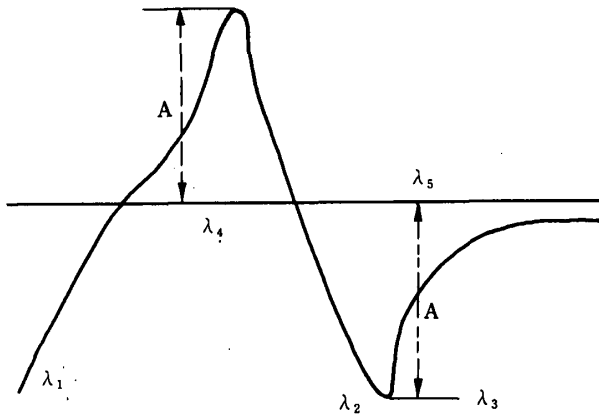
第10図-aのようにバックグラウンドの上のっている吸収スペクトルから定量しようとする場合、 λ_1 と λ_3 を直線でむすんでこれをベースとして吸収ピークの吸光度を求めて定量している。このような場合、微分スペクトルで測定すると



第10-a 図 バックグラウンドを有する物質の吸収スペクトル



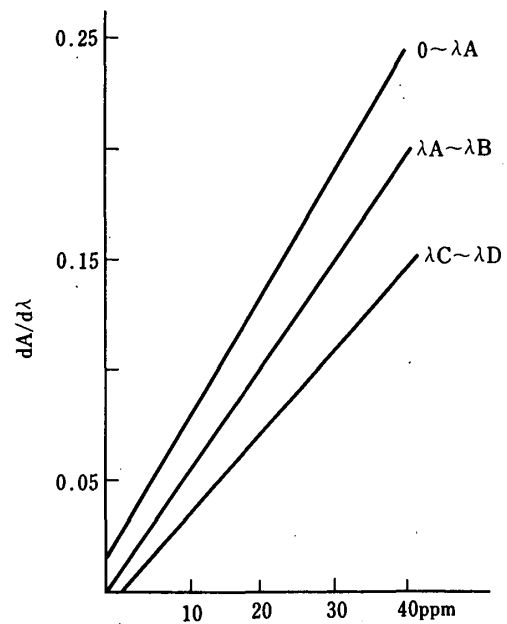
第11図 フェノールの微分スペクトル



第10-b 図 微分スペクトル

第10図-bのようなピークが二つ得られる。吸収極大位置はベースラインと交わる。このとき λ_4 とベース間 $dA/d\lambda$ または $dA'/d\lambda$ を求め定量すれば三点補正したと同じことになり、ベースライン補正法よりは、よりよい結果が得られる。^{9, 23, 24, 28)}

定量方法は、まず、対照液で微分測光での



第12図 フェノールの検量線

ベースラインをとり、つぎに測定試料で微分測光を行ないこの差を波長に対してプロットしたものが微分吸収スペクトルである。

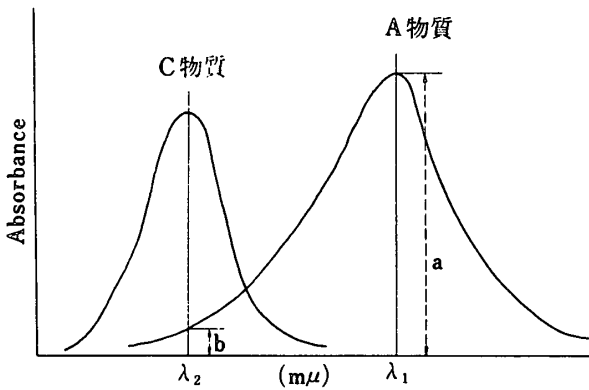
このように微分分光光度法によれば、たとえばいろいろの食品中に添加されている物質、あるいは腐敗成生物、その他各種医薬品中に添加されている物質または不純物の確認、定量が容

易に行なえるようになるだろう、そのためには数多くの実験例がまたれる。

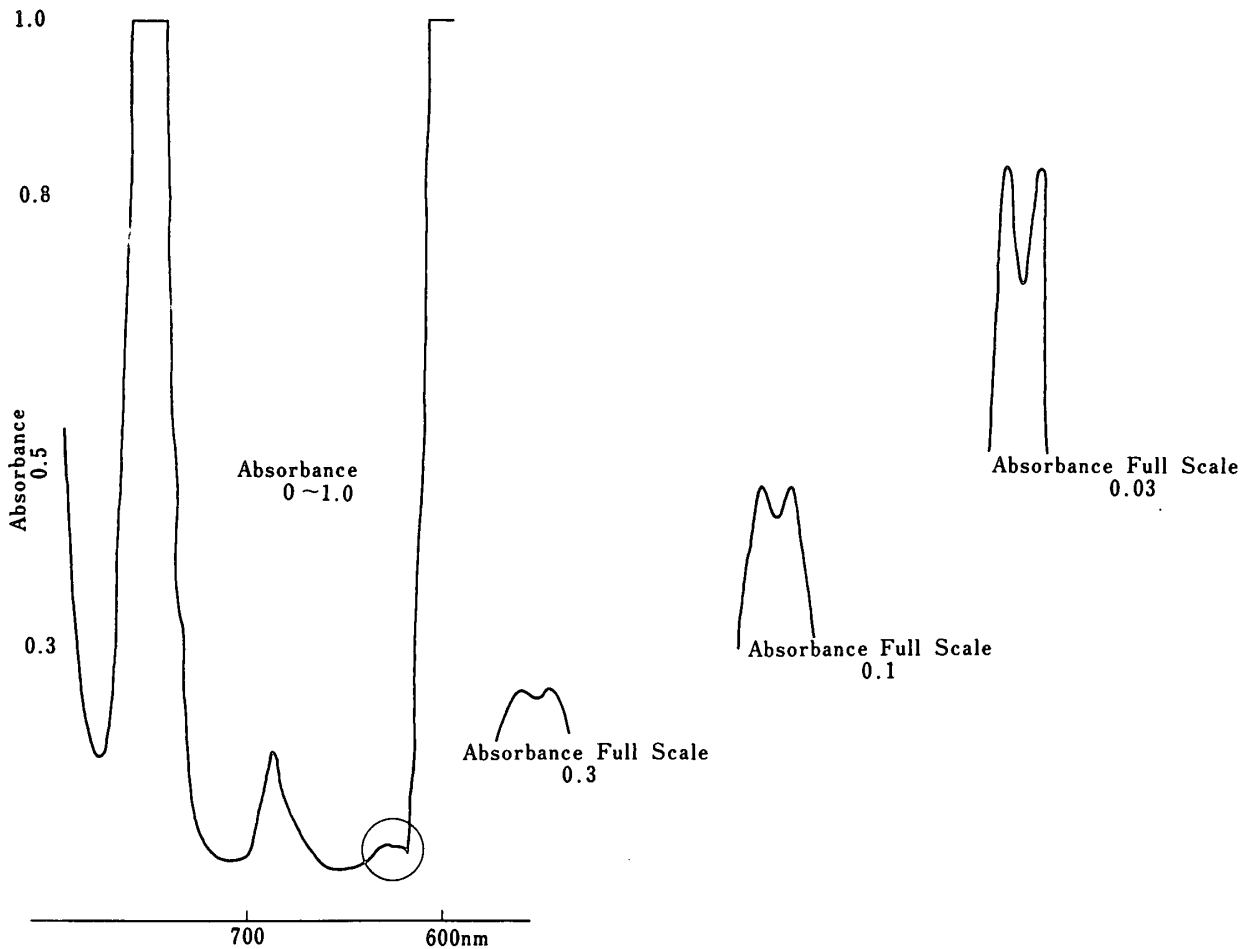
(3)二現象測光法

反応の相互関係を明らかにするために、異なる二つの波長における試料の吸収の変化を同時に測定できる。

たとえば、 $A + B \rightarrow C$ という反応があり、Aの



第13図 二つの物質を同時に分離定量



第14図 高感度測定

量を λ_1 で、Cの量を λ_2 で測れるとすると、この反応の速度論的解析が非常に容易にできる。^{26,32)}

A…… λ_1 の吸光度から

C…… $(\lambda_2$ の吸光度) $-\frac{b}{a} \times (\lambda_1$ の吸光度)

というように、両者を分離測定できる。

*注 電氣的に λ_1 に函数をかけて差をとる。

(4)高感度測定法(第14図)

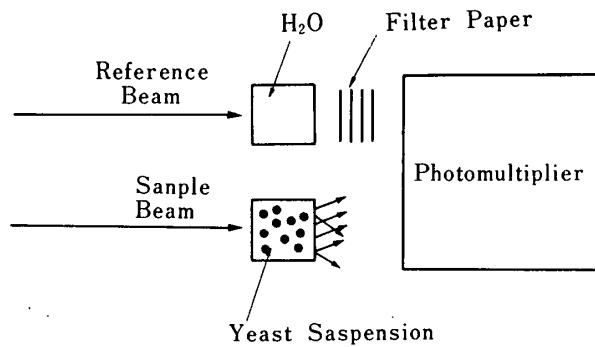
吸光度測定で、100倍のスケール拡大ができる。

(5)混濁試料の測定(第15, 16図)

検知器にヨウソランプを採用して、どうじにセルを受光部に密着させているので、受光面積が広く、透過光および散乱光の集光率が高くなった。このため混濁試料でも測定が可能となった。

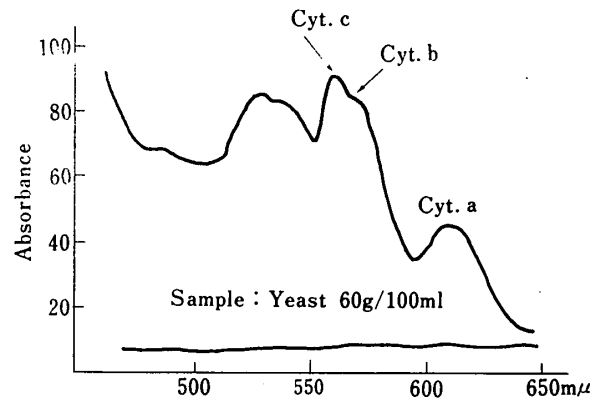
おわりに

Chance らの二波長分光測光法が生化学分野への業績は偉大なものである。



第15図 混濁試料の測光方式

日本でも日立製作所（日立 356型二波長分光光度計）により開発され、取扱いも簡単にできている。著者も使用する機会に恵まれ若干の測定結果も得ているが未だその結果を発表するには充分といえない。ただしその利用方法の多様さに感心すると共に各種の研究上利用価値も多



第16図 パン酵母のチトクロームの定量

いのではないかと考え、敢えて稿を起した訳で何らかのお役に立てば幸長の至りである。

執筆にあたり、文献収集その他に御助力をいただいた国立衛生試験所叶多謙蔵氏ならびに本学栄養学研究室鈴木俊一教授ならびに食品学研究室箕口重義教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) BIRTH, G. S. NORRIS, K. H. and YEATMAN, J. N. : *Food Tech.* 11, 552(1957).
- 2) BUTLER, W. L. NORRIS, K. H. SIEGELMAN, H. W. and HENDRICKS, S. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, 1703(1959).
- 3) CHANCE, B. : *Rev. Sci. Instr.*, 22, 634(1951).
- 4) CHANCE, B. : *Science.*, 120, 767(1954).
- 5) CHANCE, B. MELA, L. : *J. Bio. chem.*, 241, 4588 (1966).
- 6) CHANCE, B. and MELA, L. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 55, 1243(1966).
- 7) CHANE, B. WILLIAMS, G. ADUAN : *Enzymol.* 17, 65(1956).
- 8) COWLES, J. C., : *J. Opt. Soc. Am.*, 55, 690(1965).
- 9) 保田和雄, 小森律夫, *Hitachi. Sci. Instr. New News.* 12, 683(1969).
- 10) FRENCH, C. S. and CHURCH, A. B. : *Carnegie. Fust. Wash. publ., Year Book.* 54, 162(1955).
- 11) GIESE, A. T. and FRENCH, C. S. : *Appl Spectroscopy*, 9, 78(1955).
- 12) 小森律夫, 松平俊沢, 内藤茂昭 : *Hitachi. Sci. Instr. News.*, 12, 682(1969).
- 13) 神蔵美枝子, 遠藤英美, 佐々木英人 : *食衛誌*, 13, (6) 555(1972).
- 14) OHNISHI, T., : *J. Bio. Chem.*, 55, 172(1964).
- 15) OHNISHI, S. HAGIHARA, B. and OKUNUKI, K. : *J. Bio. chem. (Tokyo)*, 54, 287(1963). T
- 16) OHNISHI, T. and EBASHI, S., : *J. Bio. chem. (Tokyo)*, 55, 599(1964).
- 17) OHNISHI, T. : *J. Biochem.* 55, 172(1964).
- 18) OHNISHI, T. and EBASHI, S. : *J. Bio. chem. (Tokyo)*, 54, 506(1963).
- 19) RIKMENSPOEL, R. : *Appl. Opt.* 3, 351(1964).
- 20) RIKMENSPOEL, R. : *Rev. Sci. Instr.* 36, 467(1965).
- 21) SHIBATA, S. FURUKAWA, M. and GOTO, K. : *Anal. Clim. Acta* (1969) in printing.
- 22) 柴田正三, 古川正道 : *Hitachi. Sci. Instr. News*, 11, 595(1968).
- 23) 柴田正三, 古川正道, : *Hitachi. Sci. Instr. News*, 12, 680(1969). 柴
- 24) 柴田正三, 古川正道, 後藤一男 : 日本分析化学会第18年会(1969) 札幌要旨集.
- 25) 柴田正三, 古川正道, 後藤一男 : 日化第23年会(1970) 東京, 予稿集.
- 26) 柴田正三, 古川正道 : *Hitachi. Sci. Instr. News*, 12, 68(1967).

- 27) SHIBATA, S. FURUKAWA, M. and GINTO, K. :
Anal. chim. Acta. 46, 271(1969).
- 28) SAIDEL, L. J. : *Arch. Bio. chem. Biophys.*, 54,
185(1955).
- 29) 柴田正三, 古川正道 : 化学と工業, 23, 126
(1970).
- 30) 柴田和雄 “生化学領域における光電比色法”
P.159 南江堂 昭和40年.
- 31) 太幡利一, 飯尾利弘, 大熊哲注 : *Hitachi. Sci.
Instr. News*, 14, 871(1971).
- 32) YANG, C. C. and LEGALLAIS, V. : *Rev. Sci.
Instr.*, 25, 801(1954).
- 33) 横田健之助, 篠田泰機 : *Hitachi. Sci. Instr.
News*, 12, 682(1969).
- 34) 萩原文二 : 蛋白質・核酸・酵素. 13, (5)382
(1968).