

THE HITACHI Scientific Instrument NEWS

JULY 1959

Vol. 2 No. 3

蛍光分光特性の補正法について

佐 藤 繁*

分光光電光度計に蛍光附属装置を取り付け、蛍光物質の蛍光分光特性曲線を求めた場合、この蛍光特性は蛍光物質本来の特性ではなく、受光器に使用している光電管（あるいは光電子増倍管）の分光感度特性が加味されたものである。従って第1図に示すごとく測定する器械によって蛍光特性に差異があるから、真の蛍光特性を求めるには、分光光電光度計より得られた蛍光特性を補正せねばならない。

いまある波長 λ に於ける蛍光物質の蛍光強度を F_λ 、受光器の分光感度を P_λ とすると、 F_λ および P_λ に対応して分光光電光度計の指示計器から読み取られる値 I_λ は次式によって表わされる。

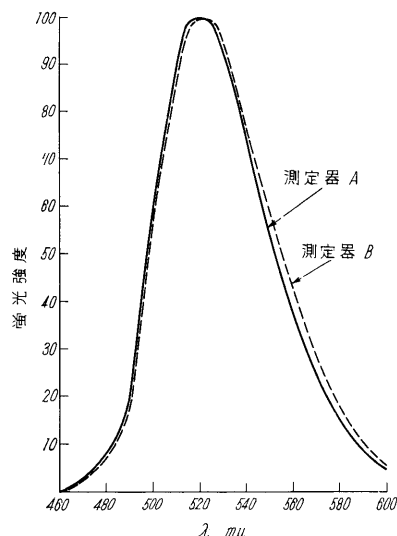
$$I_\lambda = K F_\lambda P_\lambda \dots\dots\dots (1)$$

K は次に述べるような器械の構造上からくる要素に左右される。

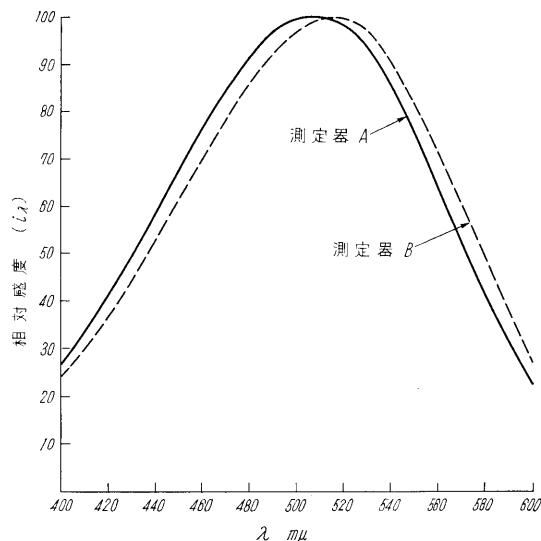
1. 試料セルの透過率
2. 分光器に使用されている窓材、プリズム、レンズ等の透過率および反射鏡の反射率
3. 受光器の窓材の透過率

しかし可視域の蛍光を対象とする場合には、上記の透過率および反射率は、波長に関係なく一定であると考えて差支えないから、若し波長に関係なく感度一定な受光器を使用すれば、単に I_λ を読み取るだけで、真の蛍光特性を求めることができるわけである。しかしかような受光器は実在しないし、同じ陰極をもった光電管でさえも例えば第2図に示すごとく分光特性を異にする。なお機械的に受光器の分光特性を一定となるよう補正することは非常に困難であるので、真の蛍光特性を求めるためには受光器の分光特性を個々の器械について知らねばならない。

受光器の分光特性を求めるには分光光電光度計を吸収測定の状態

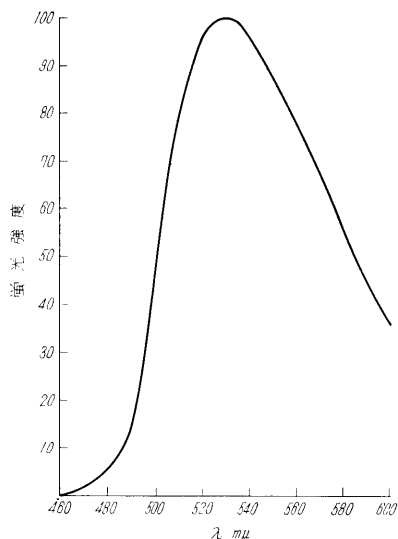


第1図 リボフラビンの蛍光特性
(受光器の分光特性を含む)



第2図 光電管の分光特性

* 日立製作所多賀工場



第3図 リボフラビンの蛍光特性
(受光器の分光特性を補正)

態に戻し、白熱電球を点灯して行う。いま波長 λ に於ける白熱電球の輻射エネルギーを E_λ とすると、 I_λ 測定時と同じ条件にて E_λ を測定したときの指示計器の読み i_λ は(1)式同様次式によって表わされる。

$$i_\lambda = K' E_\lambda P_\lambda \dots\dots\dots (2)$$

K' は(1)式の K と同じような性質をもった恒数で、 E_λ が分れば P_λ すなわち受光器の分光特性の相対値が求められる。

日立分光光度計に使用している白熱電球の色温度は3200 Kであるから、 E_λ は第1表(後尾8頁掲載)に示すような値をもつ。

(1)および(2)式より

$$F_\lambda = K'' \frac{I_\lambda}{i_\lambda} E_\lambda \dots\dots\dots (3)$$

従って分光光度計を吸収測定の状態にして E_λ に対応する i_λ を求め、蛍光附属装置を取り付けて蛍光物質の蛍光強度に対応する I_λ を求めれば、 F_λ の相対値が(3)式より求められる。すなわちリボフラビンを例にとって見ると、第1図に示すような測定する受光器からの蛍光特性の差異も、それぞれの受光器の分光特性を補正すれば第3図のように波長530 mμに最大強度をもったリボフラビン固有の蛍光特性が得られる。

注)

蛍光特性を測定する場合、スリット幅一定で行う方法と波長幅一定(分光器の分散体に廻折格子を使用した場合はスリット幅を一定にすれば波長幅も一定となるが、プリズムを使用した場合は波長により分散が異なるから波長幅を一定にするためには波長によりスリット幅を変える必要がある)で行う方法とがあるが、 I_λ と i_λ の測定条件さえ同じにすればいずれの方法を用いても同じ結果が得られる。従って操作の簡易さという点から一定スリット幅で測定することが望ましい。

近赤外吸収スペクトルによる ブタノール中の水分迅速定量

酒 井 馨* 水 庭 文 雄*

日立研究所ではNa, K使用機器の後処理作業に、ブタノール洗浄法が採用されているが、使用するブタノール中の水分含量が多くなると、発火爆発の危険をとまなうので、その含水量を迅速に定量して事故を防止するため、本研究を行った。

有機溶剤中の水分定量には従来次のような方法が知られている。

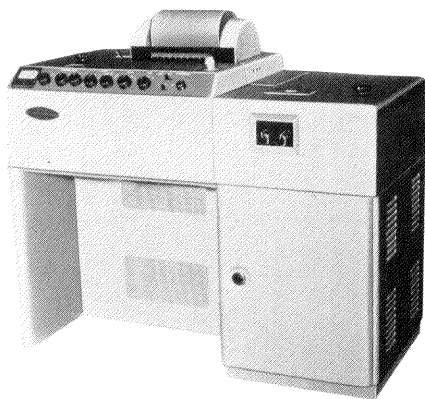
- (1) カールフィッシャー法
- (2) 重量法(五酸化リン)
- (3) 電解法
- (4) 帯スペクトル法
- (5) γ 線分析法
- (6) 赤外吸収スペクトル法

これらの中で(1),(2)の方法は測定に多くの時間を要し、操作法が複雑である。(3)は例えば MEECO 製のガス微量水分測定器による方法などがあるが、測定時間は1時間もかかり、又取扱にも細心の注意を要する。(4),(5),(6)は現場分析には不適當であり、操作法も複雑である。

以上のような欠点を補う迅速分析の目的に、EPS-2形日立自記分光光度計を用いて、近赤外吸収スペクトルの水の吸収による定量分析を実施した。本装置は200mμ(紫外)より2,700mμ(近赤外)の範囲の吸収測定に有効で、従来の自記式でない分光光度計が1,200mμ程度しか測定できなかったのに較べて、測定可能な近赤外領域が広いため、本研究に有利である。しかも、2.5μ付近では、赤外用 NaCl プリズムと、近赤外用石英プリズムとは分解能が殆んど同程度であるので、近赤外用検知器たる硫化鉛光伝導セルの検知能が赤外用熱電対のそれに比してはるかにすぐれていることから(第1図)、近赤外域の研究は今後極めて有望である。なお、スリット巾は標準側を通過する光束による光電信号が一定になるよう自動的に開閉されるメカニズムであるため、硫化鉛検知能の許す範囲では、相当に吸収の大きい物質でも標準物質または溶媒として使用できる。

使用ブタノールは某社製工業用ブタノールで、カールフィッシャー法で水分定量した結果、0.010 重量%の含水量であった。われわれはこれを標準とし、これに0.01、0.02、0.05、0.10、0.30、0.50、0.70、1.00、1.2 重量%の水を加えた溶液を調整して実験した。この工業用ブタノールと和光純薬株式会社製最純ブタノールを蒸溜脱水したものとを記録したところ、第4図(C)曲線のように、和光の蒸溜ブタノールは点線のように水の吸収が出ないが、工業用ブタノールでは実線のように水の吸収が示される。尚、その他の部分は全く同じ吸収曲線となることは、工業用ブタノールが意外に純粋であることを示している。

* 日立製作所日立研究所

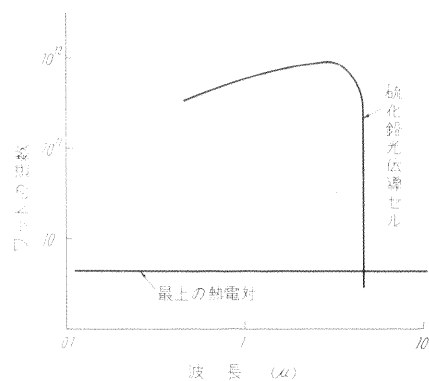


EPS-2 形日立自記分光光度計

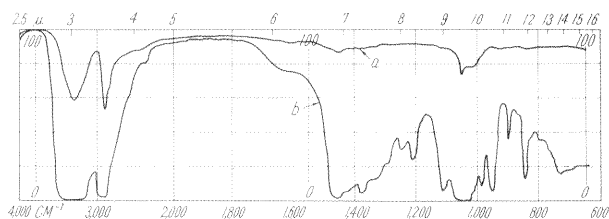
第2, 第3図はそれぞれ工業用ブタノールおよび水の赤外線吸収スペクトルである。何れも曲線aはセルにスペーサを使用しない場合、曲線bは 0.025 mm のスペーサを使用した場合を示す。第2図でブタノールは $3\sim 3.5\mu$ 付近にきわめて大きいO-Hの吸収、 7μ 以上の長波長域に比較的弱い多くの吸収がみられる。第3図では水が 3μ 付近に大きなO-Hの吸収、 6.2μ 付近にやや弱い吸収がみられる。このことから、 6.2μ の水の吸収を利用する以外には赤外域での水の定量の可能性はなく、これは微量の水の定量には効果がないことを知る。

かくて、近赤外域を利用する定量法に着目した。この領域には Overtone Band や Combination Band が多く、吸収帯の帰属の不明なものが極めて多く、しかも、O-H や N-H のような水素結合を形成しやすい基を有する化合物では、一般に会合状態を示し、それが、水分の含量増大とともに解離したり、イオン化することが予想されるので、そのため、Beer の法則が成立しなくなる不安もあって、これまで近赤外域を利用する分析法の検討はあまりなされなかった。しかし前述のように、機能的にも赤外域の測定よりも近赤外の測定は有利な点があるので、最近、Whetsel ら⁽¹⁾、Gordes ら⁽²⁾、White ら⁽³⁾によりこの種の研究がなされるようになった。

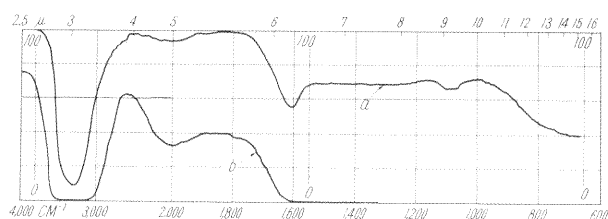
第4図は工業用ブタノール、第5図はイオン交換水の吸収曲線である。何れも吸収曲線 a は 10mm セルでの吸収、b は厚さ 1.25mm の光学的平面のガラス製スペーサ4枚挿入時の吸収、c は7枚挿入時の吸収を示す。第4図で、点線は和光製蒸溜脱水純ブタノールの吸収で実線は工業用ブタノールのそれであるが、水の含有による吸収曲線の変化の影響は 1.92μ において最も著しく現われ、 1.45μ 、 1.18μ 、 0.92μ での水の吸収の影響は少いことがうかがわれる。従って、微量の水の定量には 1.92μ の水の吸収を利用することが有利であると判断される。尚、吸収曲線 d は7枚スペーサ入のみのものである。



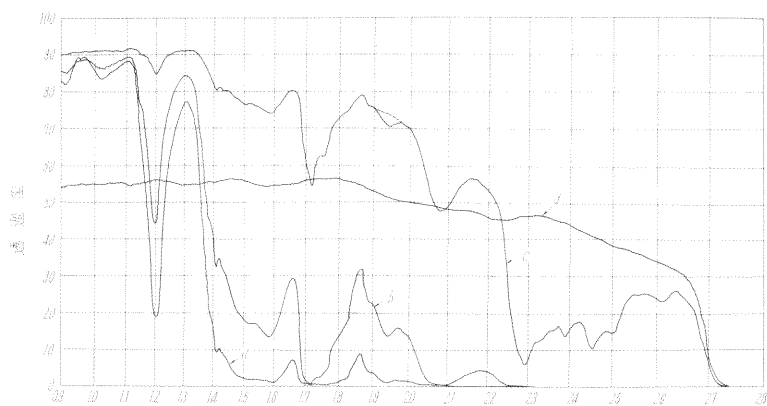
第1図 検知能の比較



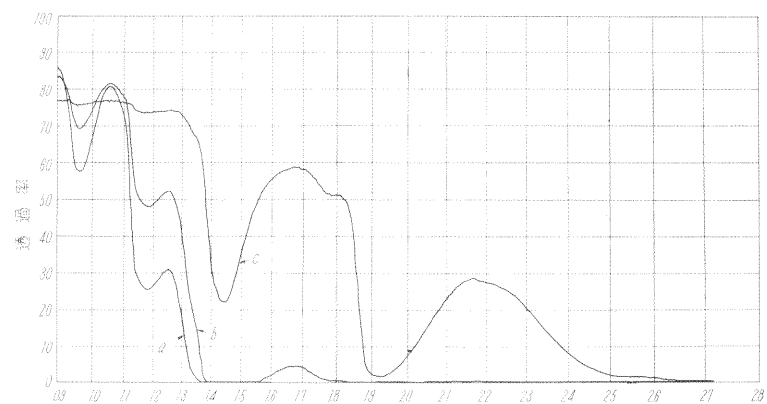
第2図 工業用ブタノールの赤外吸収スペクトル



第3図 イオン交換水の赤外吸収スペクトル



第4図 工業用ブタノールの吸収曲線



第5図 イオン交換水の吸収曲線

吸収曲線の相違を利用する定量分析にも、通常法、補償法、Ratio method などがあるが、比較的純粋な物質で、その品質が大して変化しない場合には補償法が有利であるので、本報ではこれを利用した。すなわち、標準となる純物質 A を Reference 側に入れて、被検物質を Sample 側に入れて吸収曲線を描かしめると、不純物 B の吸収の大きいところのみ吸収が現われる。

今、純物質 A を透過した光の強さを I_A 、A 中に少量の不純物 B を混在する試料を透過した光の強さを I_B 、セルのみを透過した光の強さを I とすると、不純物 B の key band λ_B では次式が成立する。すなわち、

$$\left. \begin{aligned} \log (I_0/I_A) &= a_A b C_A \\ \log (I_0/I_B) &= a_A b C'_A + a_B b C_B \end{aligned} \right\} \dots\dots(1)$$

ここに $a_A \ll a_B$ 、 $C_A \approx C'_A$ であるから

$$a_A b C_A \approx a_A b C'_A \dots\dots\dots(2)$$

とみなすことができる。従って、(1)、(2) 式から、

$$\log (I_A/I_B) = a_B b C_B \dots\dots\dots(3)$$

なる関係式が導出される。すなわち、(3) 式は不純物 B の key band λ_B で I_A を 100% 透過率とみなしたときの試料の吸光度 ($-\log I_B/I_A$) は $a_B b$ が一定であることから、不純物 B の濃度のみにによって決定される。従って、吸光度と濃度との関係を検量線で見れば、それを用いて未知濃度物質を定量分析できることになる。

第 6 図は純ブタノールを対象液とし、ブタノール中に 0.7% の水を入れた溶液を補償法で 1.45μ 、 1.92μ の吸収曲線を中心にスペーサを 1 枚から 5 枚まで順次増加させて記録したもので、多少の誤差はあるにせよ、スペーサを利用しての定量分析は十分可能であることと、 1.45μ の利用は強いて必要ないことが知られる。

第 7 図は純ブタノールを対象液としたときの各種含水量のブタノールの吸収を 1.92μ 付近で記録したものである。水の増加とともに、水素結合の変化による構造特性の変化が予想され、そのため、波形のみだれや吸収位置のずれなどがおこる可能性があるが、第 7 図で示されるようにその現象は見られなかった。第 8 図はこれにもとずいてつくられた検量線で十分直線性を保持している。第 1 表はこれらのデータから求めた精度であって、1 本の吸収曲線について 10 回の繰返しから算出した。この記録に要する所要時間はせいぜい 5 分までであり、現場での迅速分析には申し分がない。

一体、水には第 9 図のように ν_1 、 ν_2 、 ν_3 なる 3 種の基準振動があり、赤外活性な吸収として 100°C での水蒸気の吸収帯は、Herzberg⁽⁴⁾ によれば第 2 表のようなものが知られる。われわれが水について観測した吸収帯は第 2 表の左の如くであって、 1.38μ に対応するものがないが、それ以外は全部存在する。われわれの研究に利用した 1.92μ の吸収は ν_2 と ν_3 との合成帯であることが容易に知られる。尚、大量の水の定量の際は 1.45μ 、 1.18μ などの吸収を適宜利用すればよい。

文 献

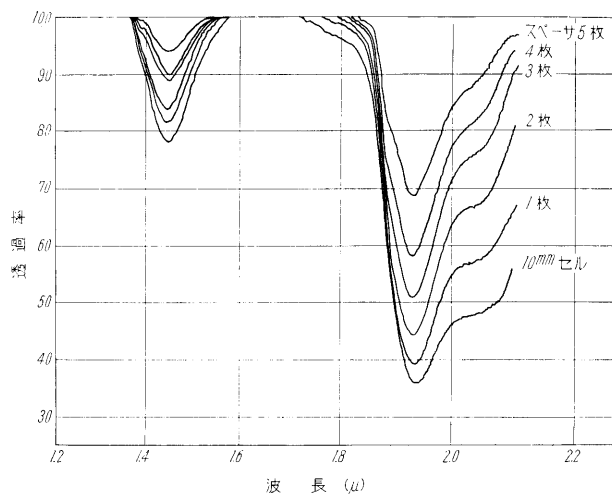
- (1) K. Whetsell, W.E. Robertson, M. W. Krell, Anal. Chem. **30**, 1594, 1598 (1958) ; **29**, 1006 (1957).
- (2) H. F. Gordes, C. W. Tait, ibid. **29**, 485 (1957).
- (3) L. White, Jr, W. J. Barrett, ibid. **28**, 1538 (1956).
- (4) G. Herzberg, Molecular Spectra and Molecular Structure II. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules (1954).

第 1 表 精 度

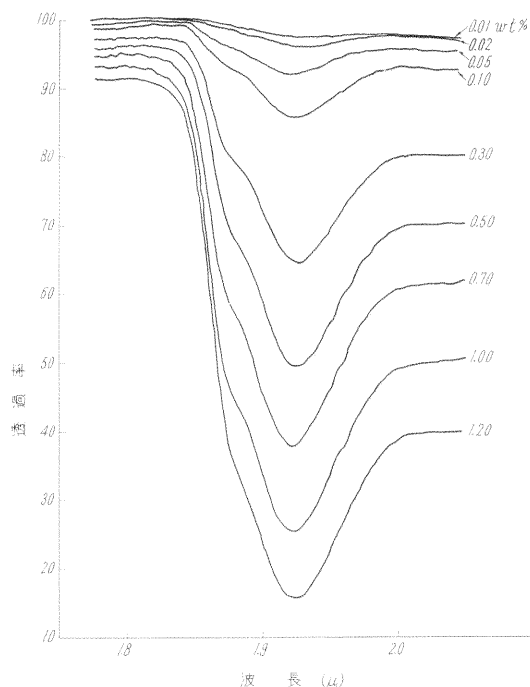
濃 度 範 囲 (%)	標 準 偏 差 率 (%)
0 ~ 0.02	1.10
0.02 ~ 0.05	0.55
0.05 ~ 0.10	0.41
0.10 ~ 0.30	0.31
0.30 ~ 0.70	0.25
0.70 ~ 1.20	0.81

第 2 表 水と水蒸気の吸収帯およびその帰属

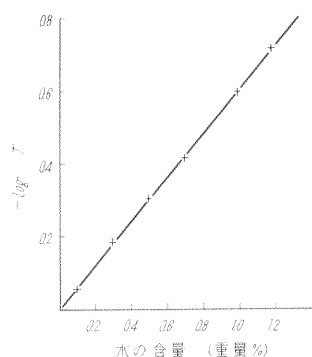
水の吸収帯 (18°C)(酒井ら)	水蒸気の吸収帯 (100°C) (Herzberg ら)		帰 属
	波 長 (μ)	波数 (cm^{-1})	
6.25	6.26	1,595.0	ν_2
3.10	3.15	3,151.4	$\nu_2(0)$
2.7~	2.73	3,651.7	ν_1
2.7~	2.66	3,755.8	ν_3
1.92	1.88	5,332.0	$\nu_2 + \nu_3$
1.45	1.46	6,874.0	$\nu_2(0) + \nu_3$
なし	1.38	7,251.6	$\nu_1 + \nu_3$
1.18	1.13	8,807.05	$\nu_1 + \nu_2 + \nu_3$
0.92	0.94	10,613.12	$\nu_1(0) + \nu_3$



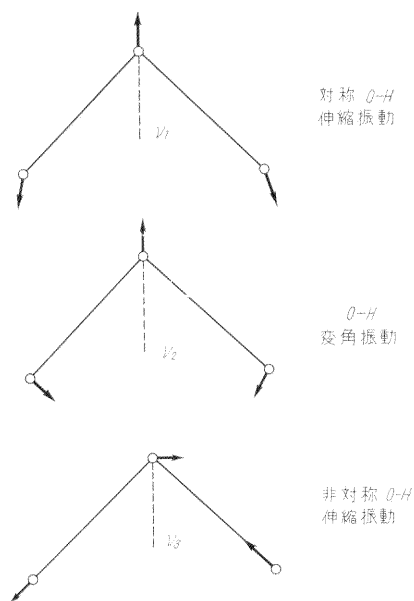
第 6 図 スペーサ挿入時の補償法による吸収曲線



第7図 補償法による吸収曲線の濃度変化



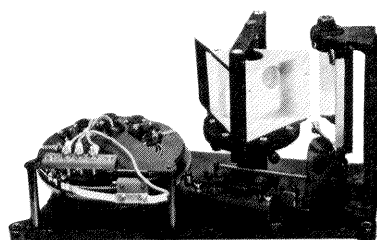
第8図 ブタノール中の水分定量用検量線



第9図 水の基準振動

KBr 交換プリズムについて

渡 辺 仁*



日立 EPI-2 形赤外分光光度計用 KBr 交換プリズム

赤外分光光度計では一般に NaCl プリズムを使用し、1~15 μ の波長域の測定が行われているが、更に KBr プリズムを使用すると 25 μ まで波長域を延長出来ることは周知の所である。最近赤外吸収の研究の発達と共に KBr 交換プリズムの利用も急速に増加してきた。KBr 交換プリズムを使用する場合最も重点となるのは機構的にはプリズム交換法が簡単で且再現性が良いこと、又測定性能としては波長精度がよいこと、迷光が少いことである。本稿においては EPI-2 形赤外分光光度計用の KBr 交換プリズムの諸性能につき説明する。

プリズム交換

本装置の構造は写真の如くなっており KBr プリズム、リトロミラー、波長交換カム、スリット幅自動制御用抵抗板が一体となって鋳物ベースの上に組立てられている。プリズム交換の際はブロック全体がベースごと NaCl ブロックと交換されるので操作も簡単であり、また位置の設定はテーパースピンにて正確に再現性を有するように設計されている。更に EPI-2 形赤外分光光度計は記録計を後方に 90°回転させると簡単に分光器の蓋が取れる構造になっているのでプリズム交換には時間を要せず、非常に便利に交換出来る。測定波長域は等波数機で 1,100 cm^{-1} ~400 cm^{-1} 等波長機で 11 μ ~25 μ である。

(1) 再現性

交換プリズムにおいて記録の再現性は生命となる ところである。第1図はメチルシクロヘキサン溶液にて再現性を見たもので先づ記録を行った後プリズム交換部を脱し、再び無作意的に取付けて二重記録を行ったもので、良好な再現性を有していることが認められる。中央の縮小記録はサブドラムにより同様に再現性を検したものである。

(2) 波長精度

波長精度はプリズム交換による誤差も含め全域 $\pm 0.03\mu$ におさえている。第2図はアンモニアガス、炭酸ガス、メチルシクロヘキサン等の既知の吸収帯を測定したものでいずれも許容誤差範囲に入っていることを示す。精度の試験は、実際に多くの吸収帯を持つ試料がないので干渉縞を記録し、厳密に行っている。

(3) 分解能

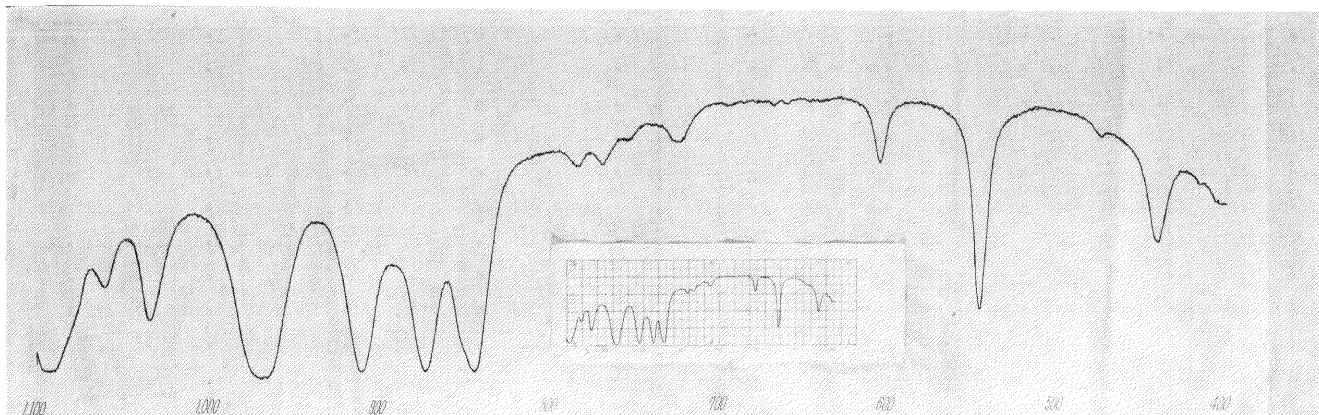
一般的な測定における標準条件としては 3 $\text{cm}^{-1}/20\mu$ を使用し

* 日立製作所多賀工場

ており、この場合 10μ では約 6cm^{-1} のスペクトル純度となっている。第1図はこの条件で記録を行ったものである。更にスリット幅を狭くしてゆくと $1.5\text{cm}^{-1}/20\mu$ (10μ では約 3cm^{-1}) まで分解能を上げることが可能である。第2図は $1.5\text{cm}^{-1}/20\mu$ による記録で波数 888.1 、 892.2cm^{-1} の吸収の分解が可成深く公称値にはほぼ一致していることを立証している。

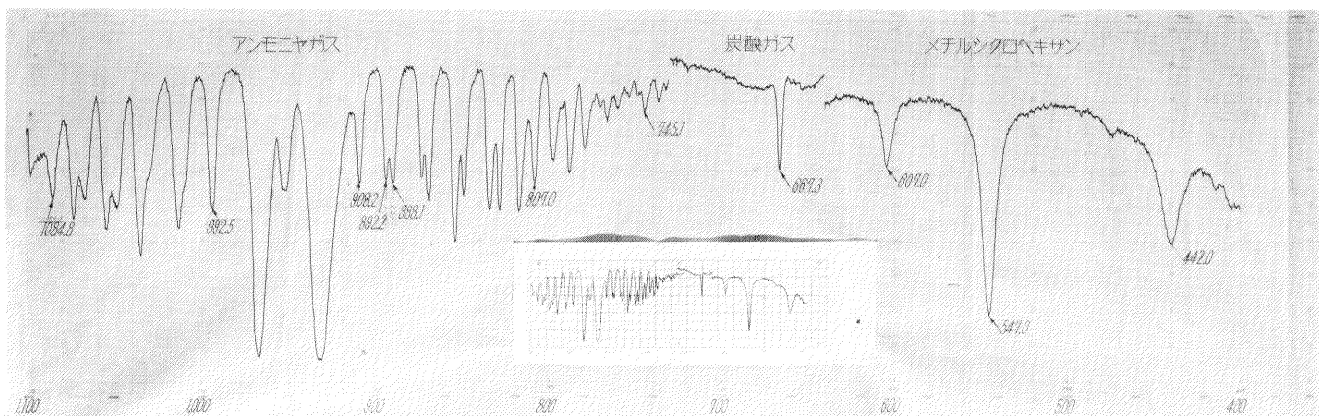
(4) 迷 光

KBr 領域では、光源のエネルギーが弱くなるので迷光が非常に多くなるのは止むを得ない。したがって全域迷光除去フィルターを使用しなければならない。通常 400cm^{-1} で20%程度ならば実用差支へない程度と言へよう。第3図は LIF 板を使用して迷光の測定を行ったもので 400cm^{-1} (25μ) で散乱光は10%以下におさえられている事が認められる。



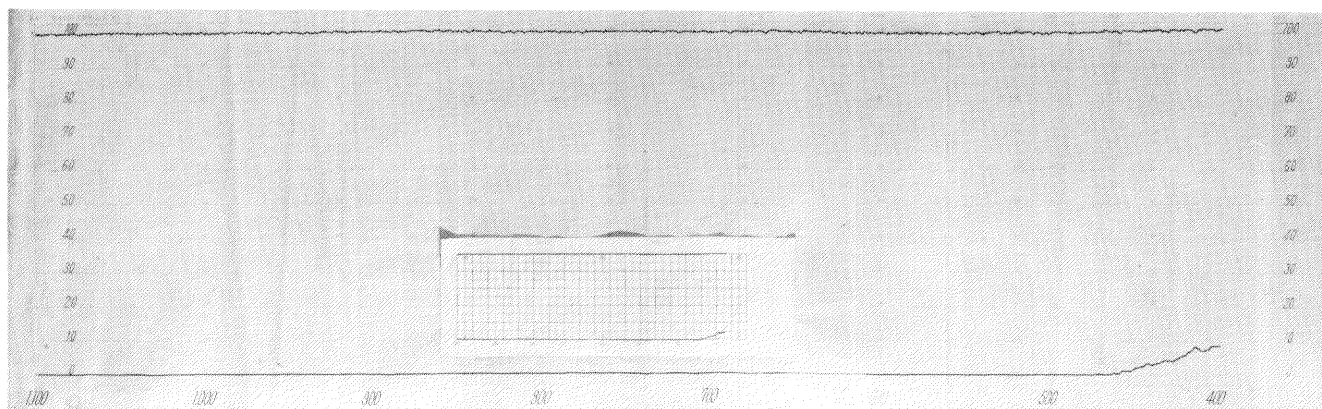
第1図 メチルシクロヘキサンによる再現性

プリズム	KBr	記録速度	15分
スリット幅	$0.88\text{mm}/20\mu$	分解能	$3\text{cm}^{-1}/20\mu$



第2図 波 長 精 度 測 定 例

試 料	アンモニアガス、炭酸ガス、メチルシクロヘキサン
プリズム	KBr
スリット幅	$0.44\text{mm}/20\mu$
記録速度	20分
分解能	$1.5\text{cm}^{-1}/20\mu$



第3図 100% Line と散乱光の測定例

プリズム	KBr	記録速度	10分
スリット幅	$0.88\text{mm}/20\mu$	分解能	$3\text{cm}^{-1}/20\mu$

HS-6 形電子顕微鏡とその 撮影の1例

大 沼 嘉 郎*

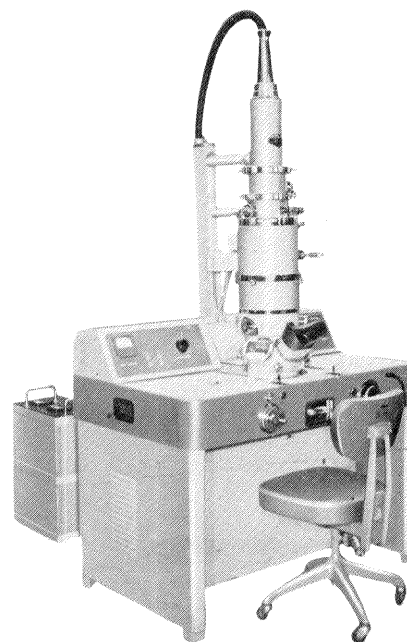
HS-6 形電子顕微鏡は、電子レンズの励磁電源として永久磁石を使用して商品化したことに於て大なる特長を有する。此の永久磁石を用いる場合、最も問題となるのは永久磁石の経年変化である。勿論これは永久磁石の材質の優劣にもよるが磁路設計の適否にも関係する。

我が国に於ては、此の永久磁石の材質の研究は諸外国に比して進んでおり、HS-6 に於て使用している永久磁石は、残留磁気 $B_r = 12,000 \sim 13,000$ gauss 抗磁力 $H_C = 550 \sim 650$ Oersted、 $B \cdot H$ max $= 4 \sim 5 \times 10^5$ のものである。又永久磁石を使用した場合の経年変化は、日立に於ては積算電力計や各種電気計器に於て数多くの研究を重ねられ現在に及び多数の文献がある。漏洩磁束の影響を考慮して、磁石の起磁力に対しギャップの間隙で消費される起磁力の比、即ち安全率を適当に選べば自然減磁率は極めて小さくすることが出来る。第1図は種類の材質の永久磁石に就いて、安全率と経年変化の関係を示したものである。

又此の電子顕微鏡は、中間レンズに永久磁石励磁の3磁極を有する2段間隙の電子レンズを使用している。そのため普通の電磁石形の電子顕微鏡のように、倍率を変えた場合、終像に回転を伴うことが全然なく、終像が放射状に拡大縮小され観察に便利である。第2図に中間レンズの構造を示す。歯車Gを廻すと可動片Pが上下に移動し、レンズLと可動片Pとの接触面積が変わると共にPと磁路上部の板との距離が変わり中間レンズの磁束が変化する。此の場合、中間レンズの二つの間隙の間に出来る2つのレンズは極性の向きがそれぞれ反対で磁場の強さは常に等しい状態を保ちながら変化するので、上下2つのレンズでそれぞれの像の回転が打消され結局終像は回転しないことになる。このように、この電子顕微鏡は永久磁石を用いたことにより、レンズ励磁電源の複雑な直流安定回路が不要となり、この為の故障は全く無く又露出時間中の永久磁石の起磁力の安定性は電磁石の場合の $2 \sim 5 \times 10^{-5}$ より一桁高く、鏡体自体としても調整箇所が少く据付場所が制限されない等一般用として国内は勿論、米国、欧州に於ても広く使用されている。最近性能テストの意味でしばしば大形電子顕微鏡等で行われている銅フタロシアニンの原子面配列干渉縞の撮影に成功した。仕様では、分解能は $25\text{\AA}$ となっているが此の縞より $12.5\text{\AA}$ の解像度を有していることが立証できる。

銅フタロシアニンは、銅とフタロシアニンとの分子が第3図の如く配列し、面心立方格子の構造でこれが規則正しく整列し、試料がうすい場合には試料中の透過する散乱電子線によって、対物レンズの後焦点に電子廻折像を中間レンズの上部にその電子顕微鏡像が出来る。此の電顕像を中間、投射両レンズで蛍光板上に拡大結像させる。唯此の結晶は熱に弱いので実際の撮影の場合には

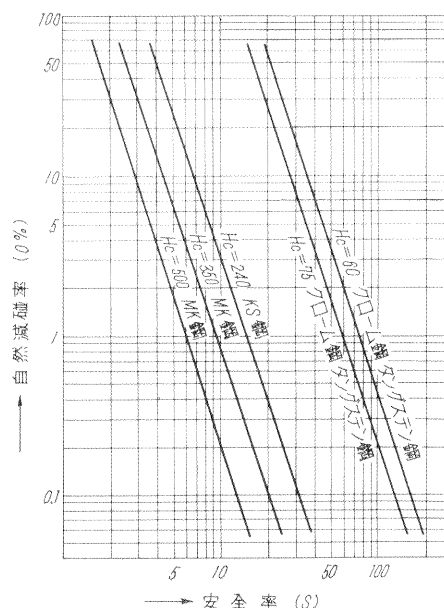
* 日立製作所多賀工場



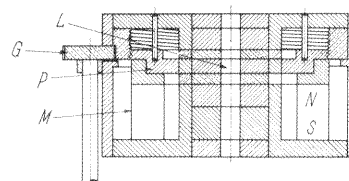
HS-6 形 電 子 顕 微 鏡

コンデンサーレンズを強くして最大輝度で行うことが出来ないの
で縞を終像で直接観察することが困難である。

それ故実際の撮影には制限視野電子回折像の出る状態にしてお
き試料微動を動かして、蛍光板上に回折像を出しておき次に中間
レンズで拡大して電子顕微鏡像に切りかえて撮影する。

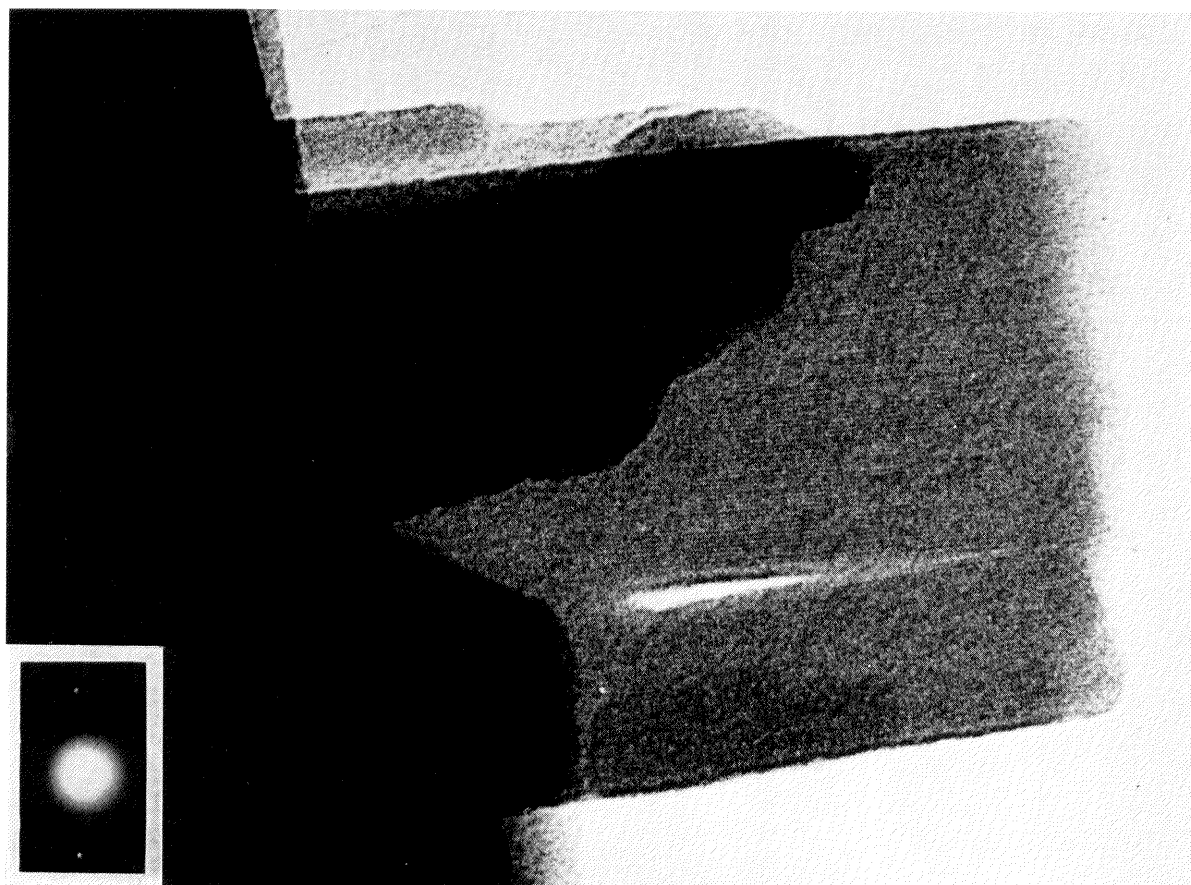


第1図 永久磁石の材質による自然減磁率と安全率の関係



L : 3磁極レンズ G : 歯車
P : 可動磁極 M : 永久磁石

第2図 3磁極中間レンズ

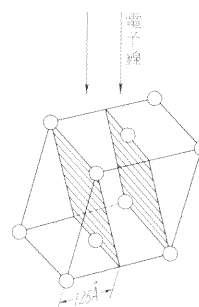


第3図(A) 銅フタロシアニンの電子顕微鏡像 (縞間隔 12.5Å)

蛍光分光特性の補正法について (2 頁)

第1表 白熱電球の輻射エネルギー

$\lambda_{m\mu}$	E_{λ}	$\lambda_{m\mu}$	E_{λ}	$\lambda_{m\mu}$	E_{λ}	$\lambda_{m\mu}$	E_{λ}
380	0.0087	455	0.0330	530	0.0800	605	0.1400
385	0.0097	460	0.0355	535	0.0835	610	0.1450
390	0.0108	465	0.0385	540	0.0870	615	0.1500
395	0.0118	470	0.0413	545	0.0910	620	0.1550
400	0.0128	475	0.0440	550	0.0946	625	0.1600
405	0.0139	480	0.0470	555	0.0980	650	0.1755
410	0.0150	485	0.0500	560	0.1020	700	0.2120
415	0.0170	490	0.0530	565	0.1060	750	0.2450
420	0.0181	495	0.0560	570	0.1100	800	0.2730
425	0.0204	500	0.0590	575	0.1140		
430	0.0218	505	0.0625	580	0.1180		
435	0.0236	510	0.0660	585	0.1225		
440	0.0265	515	0.0695	590	0.1270		
445	0.0287	520	0.0730	595	0.1310		
450	0.0309	525	0.0765	600	0.1345		



第3図(B) 銅フタロシアニンの結晶模型図 (○印は分子を示す)