

超高真空電子顕微鏡の開発

赤堀 宏* 齊藤尚武* 寺門貞夫*

日立高性能形電子顕微鏡HU-11Ds形の性能を保持したまま、鏡体の真空度が 5×10^{-8} Torrに入る超高真空電子顕微鏡を開発した。

この電子顕微鏡は、真空中に残留するガス分子が検鏡試料を汚染させたり変質させることなく、純粋な状態で形態観察を行なうことを目的としている。鏡体は超高真空に対する構造・材質などの検討を行ない、積極的に鏡体全体をベーキングできるなどの対策をとったものである。

また排気系は、汚れの原因となる油をまったく使用しないスパッタイオンポンプを主排気に、ソーブションポンプを予備排気に使用したものである。

図1に本装置の外観をしめす。

1. 鏡 体

従来の電子顕微鏡の鏡体構造を真真空的な立場から考察すると、

- ①磁気回路の真空シールやゴムガスケットの使用などで高温でのベーキングが不可能である。
- ②電子レンズ絞りなど真空内への挿入部品が多く、真空容積に対してガス放出源としての部品の露出表面積が大きい。また、乾板などガス源が多い。
- ③試料微動、試料交換など、可動部が多く、ゴムガスケットなどの使用が避けられないなど、超高真空を得るためには根本的対策が必要である。

今回試作した装置は磁気回路の結合に内部ヘリアーク溶接法を開発し、真空容器および内蔵部品の材料、形状仕上を検討し、ガス放出源を極力少なくした。またゴムによる真空シールをメタルガスケットやベローズにおきかえ、回転軸に対するシールはダブルローリングによる差動排気方式をとった。さらに鏡体全体を加熱流体により100℃までベーキング出来る構造とし超高真空排気に対する効果を一段と高めている。本装置の鏡体各部の放出ガス量と排気ポンプは図2にしめす如くで、これに対する到達真空度は試料室で 5×10^{-8} Torr、その他の場所でも 10^{-7} Torrに入っている。

電子顕微鏡としての性能はHU-11Dsと同じであるが、きれいな真空が得られるために、検鏡試料や電子線通路のコンタミネーションが非常に少なく、加速電圧の印加が安定しており、フィラメントの寿命もはるかに伸びて長期間安定した操作ができる。

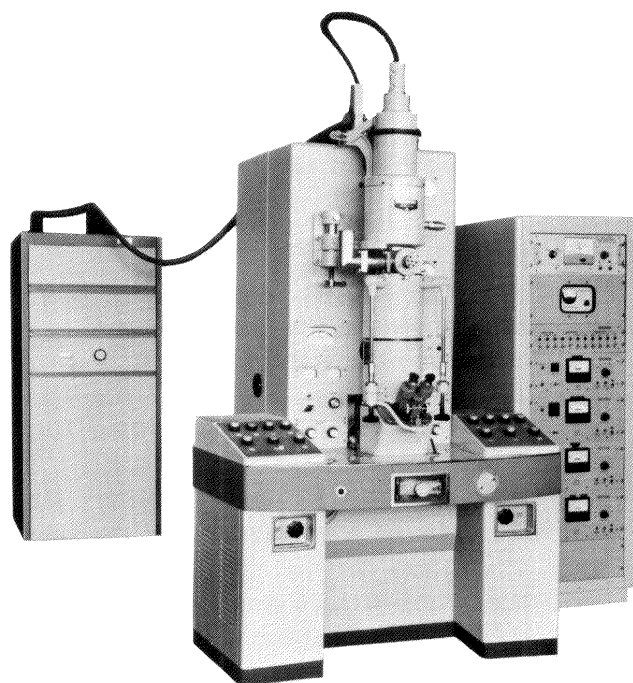


図1 超高真空電子顕微鏡

目 次

■ 超高真空電子顕微鏡の開発	1
..... 赤堀 宏, 齊藤尚武, 寺門貞夫	
■ EPS-3T形日立自記分光光度計による	4
臨床検査試薬の検討..... 白石陽一, 松本正彦, 瀬谷正子	
■ 203形日立分光蛍光光度計による	7
血漿 11-OHCS の測定..... 村中日出夫, 谷田忠久	
—— 二波長分光光度計特集 ——	
■ 分析化学と二波長測光法..... 柴田正三, 古川正道	10
■ 二波長分光光度計による	
周期的酵素反応の測定..... 横田健之助, 篠田泰機	12
■ 356形日立二波長/自記分光光度計による測定例	13
..... 保田和雄, 小森律夫	
■ 356形日立二波長/自記分光光度計による	
チトクロームCの低温スペクトル(液体窒素)の測定	20
..... 小森律夫, 黒石忠文	
■ 二波長測光法によるフタル酸異性体の極微量分析	22
..... 小森律夫, 松平俊次, 内藤茂昭	

鏡 体	放出ガス量 $\ell \cdot \text{Torr/sec}$	イオンポンプ ℓ / S	到達真空度 Torr
電子銃室	1.2×10^{-6}	25	1×10^{-7}
照射系 試料室	1.6×10^{-6}	100	5×10^{-8}
結像系 観察室	3.0×10^{-6}	200	5×10^{-7}
カメラ室	5.3×10^{-6}	200	8×10^{-7}

図2 各部の放出ガス量と到達真空度

2. 排 気 系

一般に使用されているメカニカルポンプ、蒸気噴射ポンプには油等が潤滑や作動流体として使用されているため、真空系統内にこれらの油蒸気が逆流して、試料や真空壁を汚す原因となっている。したがって本装置の排気ポンプとしては、ソーブションポンプとイオンポンプを採用した。

図3にその構成をしめす。ソーブションポンプは鏡体予備排気用として2台、試料交換室用として1台、計3台使用している。

超高真空領域への排気には4台のスパッターイオンポンプで行なう。すなわち電子銃室25 ℓ/s 試料室100 ℓ/s 、回折試料室と観察室200 ℓ/s カメラ室200 ℓ/s 計525 ℓ/s である。

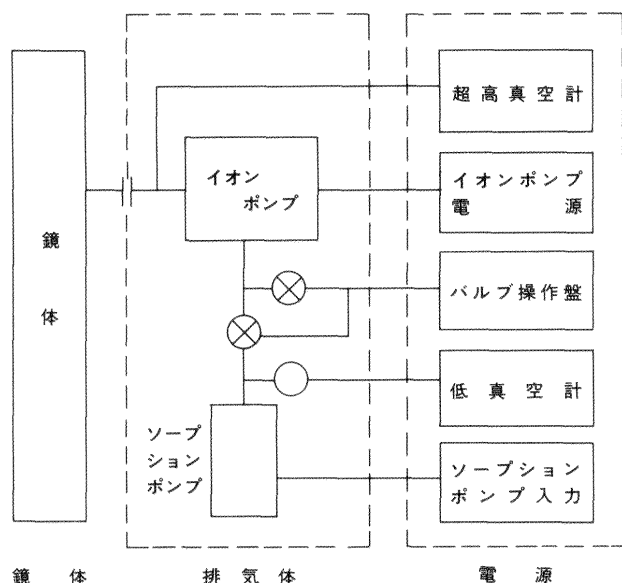


図3 排気系の構造

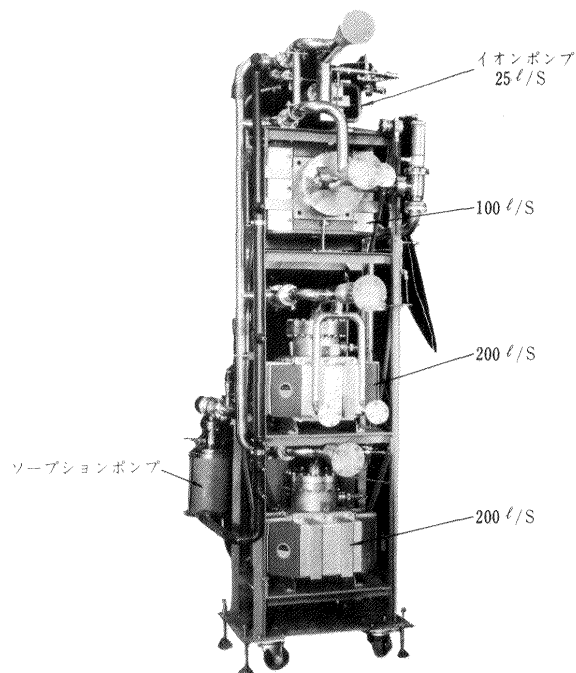


図4 排 気 系

真空操作バルブはニューマチックバルブを採用し、高真空で確実な動作と、また遠隔操作を可能にした。

鏡体のリークは乾燥窒素ガスをポンベから注入出来る構造とし空気中の水、油蒸気が真空壁に付着することを防止するとともに常にきれいな真空が得られるよう考慮をはらっている。

図4、図5に排気系、およびその電源をしめす。

この排気装置は米国パーキンエルマ・ウルテック社に製作を依頼した。

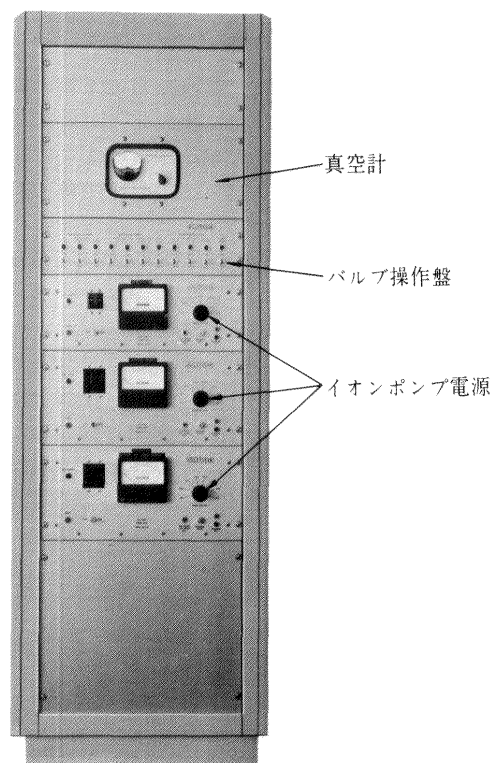


図5 排気系電源

図6は本装置の排気曲線の一例である。

大気圧から 1×10^{-7} Torr までの排気は図①の如くであり、ほぼこの点で到達真空度は飽和してくる。 10^{-8} Torr の真空を得るためには、鏡体、排気系ともベーキング操作が必要で 100°C 2 時間行なった結果が曲線②で 5×10^{-8} Torr に到達している。

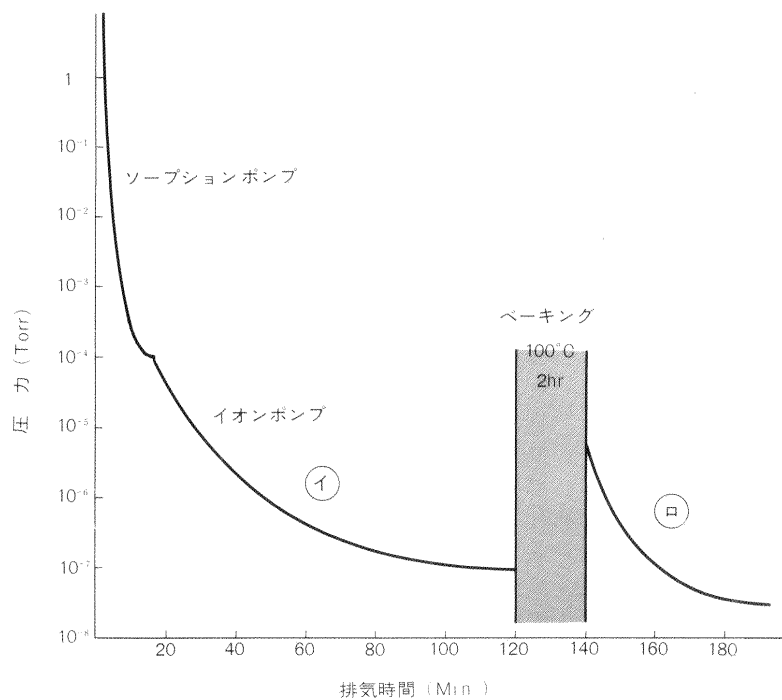


図6 排気曲線

3. 主な構成は次の通り

(1) 排気系

構成	イオンポンプ	4 台
	ソープションポンプ	3 台
	ニューマチックバルブ	
	電離真空計, 熱電対真空計	
到達真空度	5×10^{-8} Torr	

(2) コールドトラップ

試料室 および回折試料室に組込み

(3) ベーキング用パイプの組込み

電子銃室, 収束レンズ部, 対物, 中間, 投射レンズ部, 観察室

(4) 可動絞り 収束, 対物絞りとも 2 段クリックストップ方式でベロー式

絞り板	収束	150-300 $\mu\phi$	300-500 $\mu\phi$
(Mo)	対物	20-30 $\mu\phi$	50-70 $\mu\phi$

(5) 電子光学的性能

加速電圧	25, 50, 75, 100kV
分解能	4.5 $\text{\AA}$ (結晶格子) 5 $\text{\AA}$ (点間隔)
倍率	$\times 1,000 \sim 60,000$ (低倍)
	$\times 3,000 \sim 200,000$ (高倍)
低高倍の変換は投射レンズの交換で行う。	

EPS-3T形 日立自記分光光度計による臨床検査試薬の検討(血清 β -リポ蛋白測定試薬について)

白石陽** 松本正彦** 瀬谷和子**

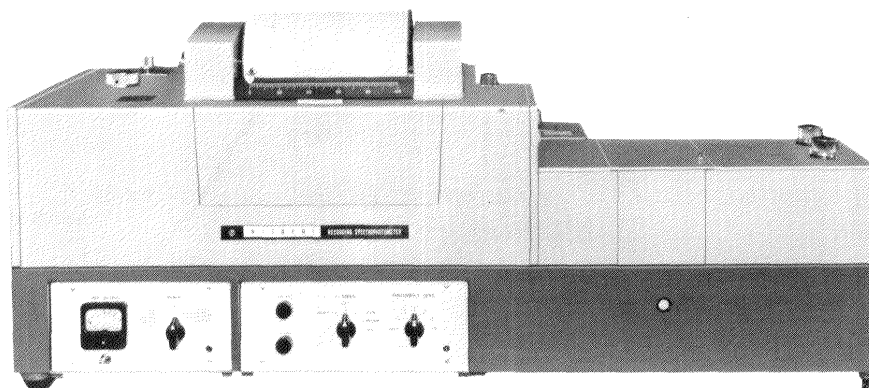
緒言

近年、臨床医学の発達の中で臨床検査は長足の進歩を遂げ、今や診断に治療に大きな貢献をなしている。

特に最近動脈硬化症と関連して血中 β -リポ蛋白は、成年病対策としても測定要求が高まり、簡易測定用キットも2、3市販されており病院の検査室などで日常盛んに測定されている。一方従来は一般に各検査室は測定に必要な個々の試薬を購入、調整に長時間を要したり、または使用量に対して余分に購入せざるを得ないことになったりしていた。その結果個々の製品の品質管理に労多く、無駄も大きなものがあったが、近年盛んに使用されるキット化の傾向は、検査室業務上能率化および品質管理の点で、その有用性はきわめて大きいといえる。

しかし、これらのキット試薬の使用にあたって、技術員が心得ておかねばならぬことは、正しい使用法の確立、キット試薬の反応特性と品質の掌握である。この観点から、われわれは血中 β -リポ蛋白質の測定試薬キット(Heinz Haury社 Serum- β -Lipoproteins-以下 β -Lキットハウリー)の諸特性を調べ、あわせて測定値の精度を高めるため、使用法を検討したので、ここに報告する。

臨床検査室で用いられる分光光度計は一般に手動タイプが大半であるが、時間経過による吸光度の追跡には不向きであり、EPS-3T形日立自記分光光度計を使用し測定した。



EPS-3T形 日立自記分光光度計

β -Lキットハウリー測定操作

下表に示す要領で試料作製を行った。冷却水中に10分間保ちただちに吸収セルに移して測定した。表からも明かなように、作製される試料は約2.3 mlであり、微量であるのでEPS-3T形の角形マイクロセル(0.6 ml)を使用した。写真に光路に装着した状態をしめした。

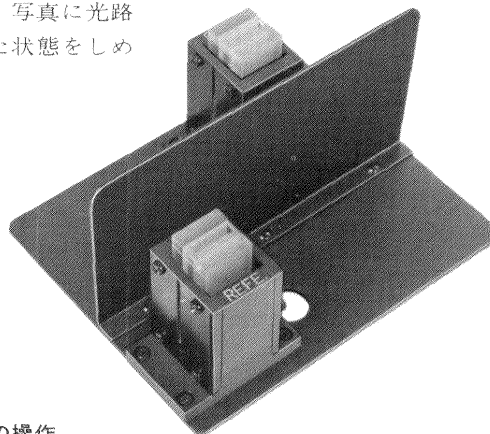


表1 β -Lキットハウリー測定試料の操作

	検体 (A)	標準 (S)	盲検 (B)
	血清 0.1ml	コレステロール 0.1ml 標準液 (400mg/dl)	精製水 0.1ml
沈降試薬	2.0ml 遠心分離、室温5分間 放置后10分間 3000rpm后沈澱 物を細粉	水 0.1ml	
呈色試薬 (保存用)	2.0ml	1.9ml	2.0ml
硫酸	0.2ml	0.2ml	0.2ml

結果と考察

(1) 吸収スペクトル分布曲線—時間の関係

β -Lキットハウリー操作手順により試料を作製して、冷却水温度 10°C の水槽に入れ、硫酸を加え、5分後に吸収セルに移して吸収スペクトルを記録させた。(図1)

つぎに10分、15分、25分、40分と間隔を置いて測定した。波長の送り時間は、波長 $500 \sim 700 \text{ m}\mu$ 間約1分である。このように吸収スペクトルは時間に対して大きく変化している。これから

- i) 時間経過につれて吸収スペクトル分布曲線の最大吸収点波長は、しだいに長波長側に移行する。5分后スタートでは $616 \text{ m}\mu$ 附近であったものが、40分后スタートでは $624 \text{ m}\mu$ までレッドシフトした。すなわち色相が変化する。
- ii) $590 \text{ m}\mu$ 、 $560 \text{ m}\mu$ における吸光度は時間とともに増加しプラトーを経て減衰する。
- iii) 指定波長 $560 \sim 590 \text{ m}\mu$ は吸収スペクトル分布曲線の急峻な位置にあり、波長 $1 \text{ m}\mu$ 当り $2.7 \sim 3.7\%$ の吸光度の変化がある。

(2) 冷却水温の変化と吸光度の時間変化

図2に硫酸を添加後の混合熱を水槽で一定水温冷却放置したあと、時間経過に対する吸光度変化を記録した。EPS-3T形の波長を固定しチャート送り速度を一定にしてチャートに記録した。手動形の分光光度計では、一定時間ごとに標準と試料を測定、吸光度を読みとりグラフに記入しているが、この方法では読みとり速度に限界があり段階的であるが、自記形では連続的な測定値が得られる。これらの結果から —

コレステロール標準液の吸収特性曲線(1)

EPS-3T形日立自記分光光度計による

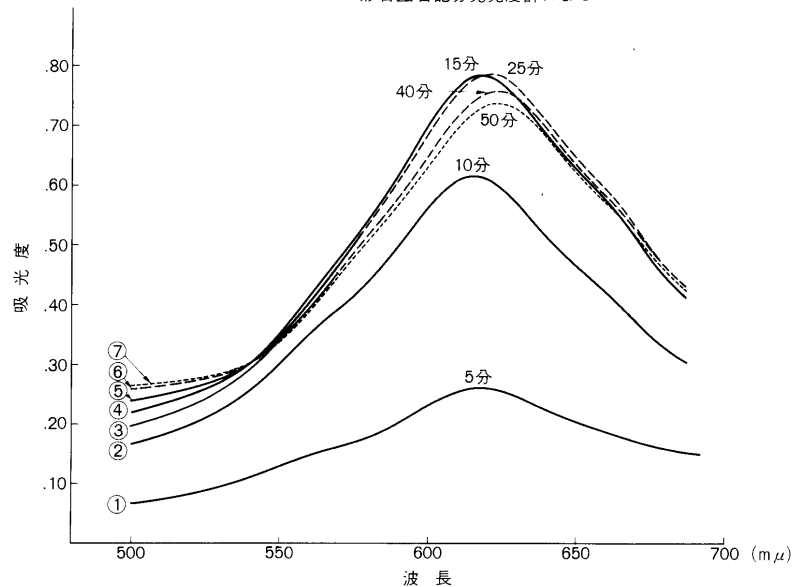


図1 コレステロール標準液の吸収特性曲線

- i) 図2-aから冷却水温 10°C 中に10分間放置し、吸収セルに移して吸光度変化を記録すると標準液、血清ともに反応進行過程にあり20分後にプラトーが得られる。その後漸時吸光度は下降に移る。検体は一般にはやくプラトーに達するが、標準液の最大吸光度位置と若干異なる。
- ii) 冷却水温 20°C 中に10分間放置し、上記と同様に測定記録した結果を図2-bに示した。15分強でプラトーが得られている。

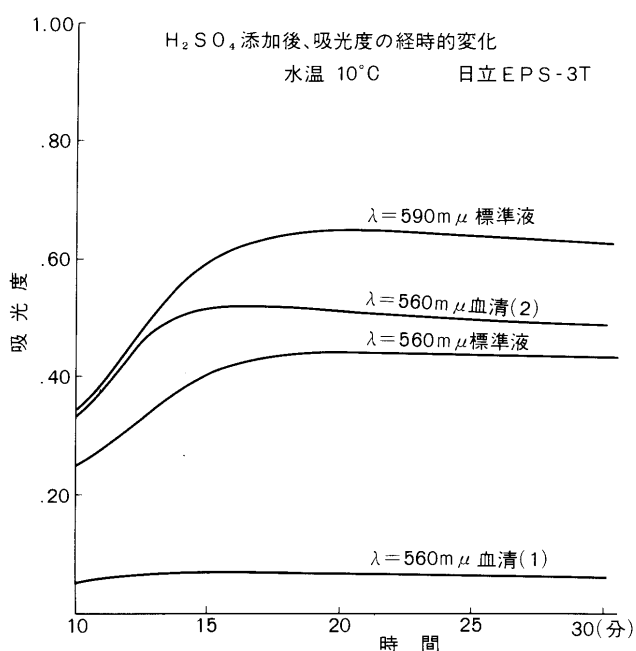


図2-a)

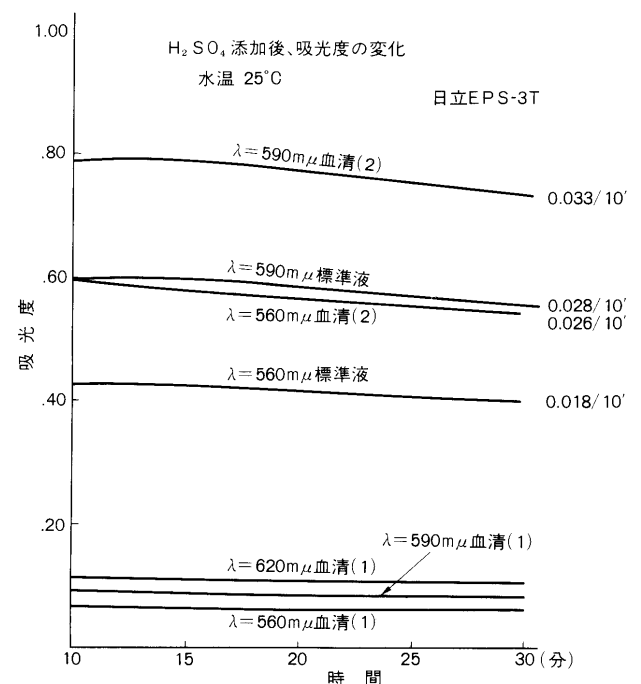
 H_2SO_4 添加后吸光度の経時的変化

図2-b)

 H_2SO_4 添加后吸光度の経時的変化

- iii) 冷却水温25°Cでは10分間放置后、ただちに測定ができることがわかる。吸光度は下降側に移っているが、測定値は比較的安定であり、10~15分間の測定値は、信頼性が高いと思われる。(図2-c)他の水温に対して標準液を基準として同一検体での差吸光度は図3に示すように大きいから検出能力において優れている。
- iv) 冷却水温30°Cでは反応は下降線をしめし、変化量はAbs. 0.04/10分(590m μ)であり、測定に注意を要する。

図2-d

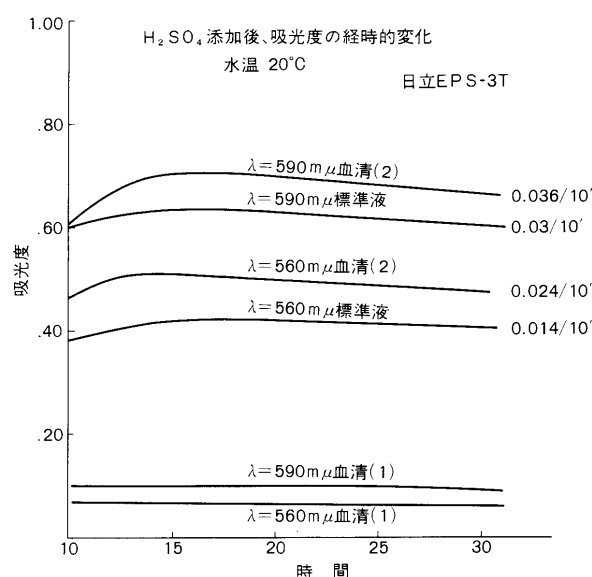


図2-c)

H₂SO₄添加后吸光度の変化

(3)他測定法との比較

β -L Testおよび血清総コレステロールと本法の比較を行なった。検体総数n=42において相関関係は、きわめて良好である。相関係数は β -L Testでは $\gamma=0.907$ 、総コレステロールでは $\gamma=0.917$ であった。

結 言

EPS-3T形自記分光光度計を使用して我々は操作簡便な、 β -Lキットハウリーの用法について考察を加えたが本法の有効性は明かである。また、測定値の信頼性を向上させるためには、

- 冷却水温および波長、測定時間は、定めて測定すべきである。20°Cではドリフトは割合少く、10分間は安定時間があるから、多試料測定に適していると考ええる。
- 本法と他測定法とはきわめて高い相関関係がある。
- 標準液に対して、検体は若干短時間でプラトーに達する。検体中にある他成分の共存による現象と思われる。測定時注意を要する。

本報告は第17回日本衛生検査学会で発表した。

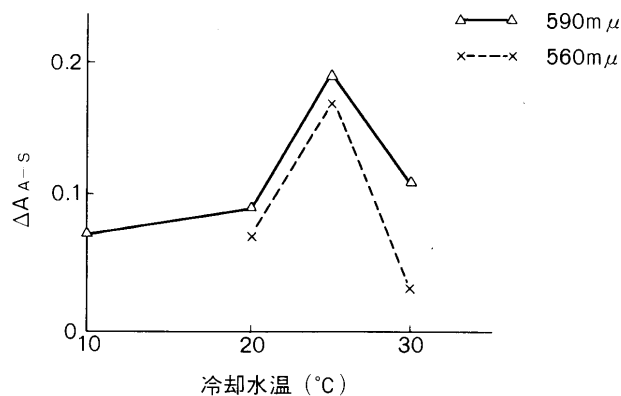


図3 冷却水温と各波長での吸光度変化量

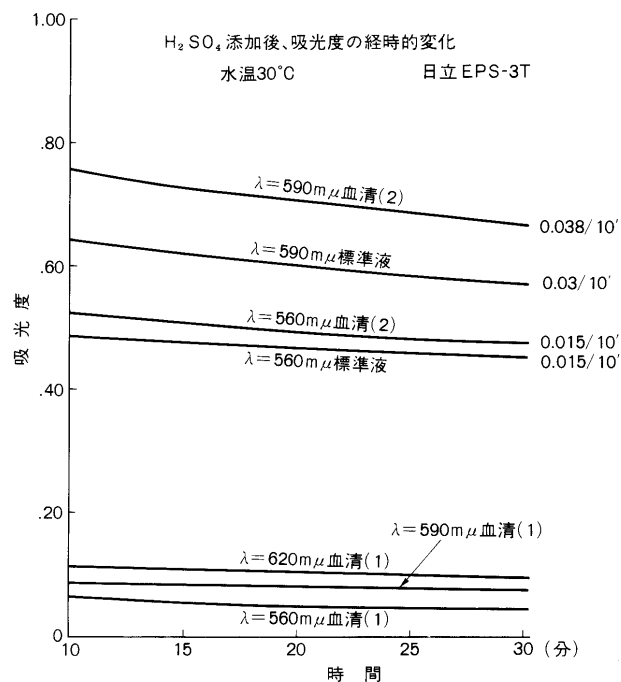


図2-d)

H₂SO₄添加后吸光度の経時的変化

文 献

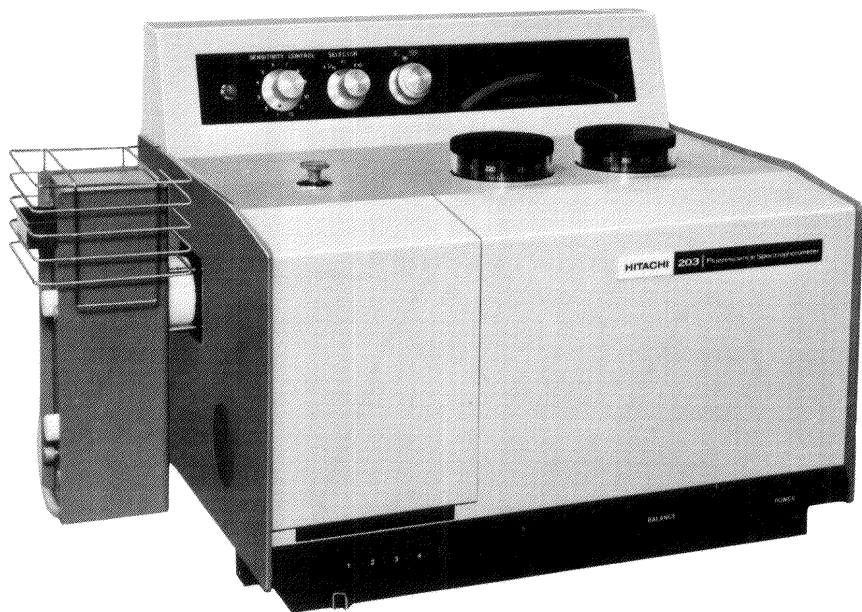
- 1) Fried, R., Hoeflmayr. J:Klin Wschr., 41:246 1963
- 2) Hoeflmayr. J., Fried, R.:Ergebn. Labor-Med. 2:119 1965
- 3) 柴田進, 佐々木匡秀:日常臨床化学超微量定量法, P189. 金芳堂, 京都1966

203形日立分光蛍光光度計による血漿11-OHCSの測定

村 中 日 出 夫* 谷 田 忠 久**

はじめに

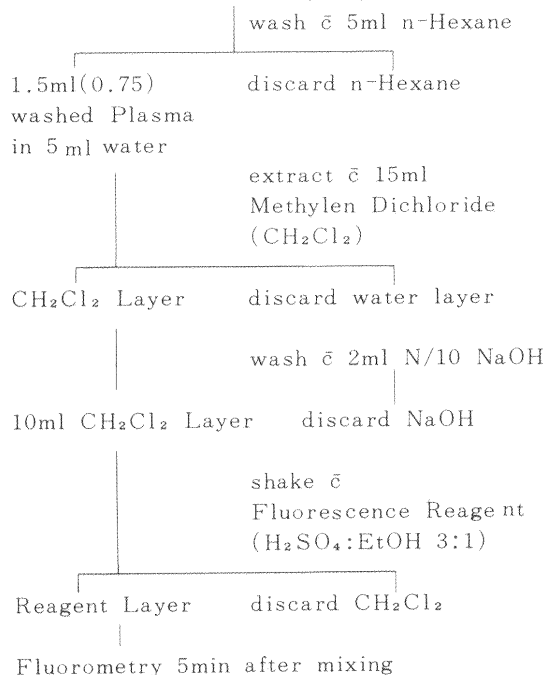
血中コルチコイドの蛍光法による測定は、最近合成ACTHの開発により所謂Rapid ACTH Testの指標として重視される様になり、種々検討が加えられている。我々も1963年よりDe Moor¹⁾³⁾法に準じた方法でEPU-2形日立分光光度計附属蛍光測定装置を用い血中11OHCSの測定を行ってきた²⁾。この際光源は水銀ランプ(Hg-L)で励起光は440 m μ 干渉フィルターを用いた。しかし血漿抽出物の濃度が正常値程度のときでさえ、蛍光スペクトルは、525 m μ のピーク(標準物質、ハイドロコチゾンによる)をしめさないこと、感度の点に不満を感じていた。最近203形日立分光蛍光光度計を入手し、血中11OHCSの測定に関して検討を加えたのでその一部を報告する。



203形 日立分光蛍光光度計

実験方法

203形はHg-Lおよびキセノンランプ(Xe-L)の二種の光源を使用し11OHCSの測定におけるその優劣を比較した。測定法はDe Moor法に準じ、原法の石油エーテル洗滌をn-Hexane洗滌とした。使用血漿量は2 mlであるがこれを1 mlの半量法とするための検討も行なった。操作の概略は表1に示した。標準物質としてはハイドロコチゾン(H·C)を用い、使用した試薬類はすべて特級乃至精密分析用である。メチレンクロライドは特級品でもロットにより盲蛍光の大きいものがあるので使用前に必ずチェックする必要がある。

表1 蛍光法による血中11-OHCSの測定操作
Plasma 2ml(1ml)

実験成績ならびに考察

a) 蛍光スペクトル：H·Cおよび血漿を上述の方法で抽出しその硫酸蛍光のスペクトルをみた。図1に示すようにHg-Lの場合励起波長は435.8 m μ 、H·Cの蛍光スペクトルのピークは525 m μ であるが、血漿抽出物では11-OHCS量の大なるものは525 m μ にピークをもつ蛍光スペクトルを得る。しかし、正常程度の11OHCS量のものではどうしても510~520 m μ の短波長側に偏したビ

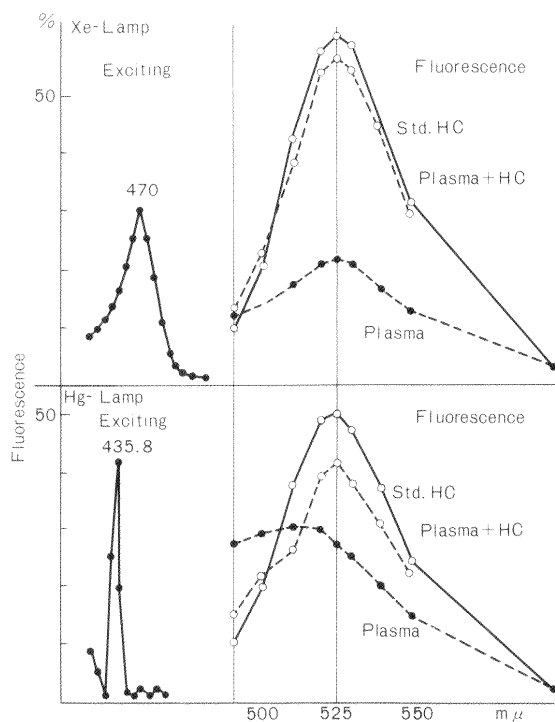


図1 励起波長と蛍光スペクトル

* 専売公社京都病院内科・検査科兼京都大学内科第二講座非常勤講師

** 専売公社京都病院検査科

ークをしめす。これは図2にみられるようにコレステロール、トリグリセライド等、血漿中の共存物質の盲蛍光によるものであると思われる。Xe-Lでは図1上段のように励起波長は470 m μ で、蛍光スペクトルはH・Cおよび血漿とも525 m μ にピークを有する両者相似たパターンをしめした。このことは励起波長としては435.8 m μ よりも470 m μ の方が110 H C Sの蛍光発生には有利で後者の方がより強い蛍光を発し、共存物質による干渉をよ

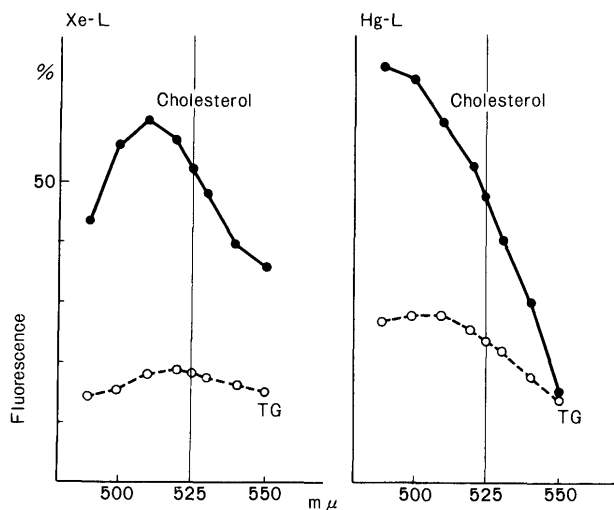


図2 コレステロールとトリグリセライドの
蛍光スペクトル—光源による差

り少なくし得るのではないかと考えられる。これは単に波長のみの問題ではなくHg-LとXe-Lの発する光のエネルギーの強さに差があることも一つの因子となっている。

b) 蛍光強度：Hg-L使用の際はSELECTOR×10, SENS. 6で5 ml 蛍光試薬中1 μ g H・Cのものを100%として測定を行っていたがXe-Lを用いるとSELECTOR×10 SENS. 5で0.25 μ gのものを80~90%として測定可能であった。この時の標準直線を図3に示した。すなわちXe-Lを使ったときは、Hg-Lにくらべ濃度のものを計器感度で約半分にして測定したわけであって、Xe-L使用により

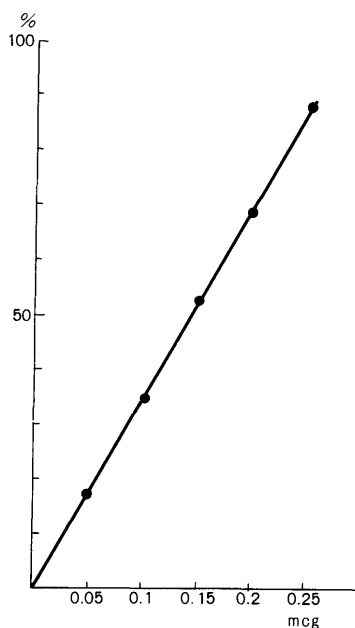


図3 ハイドロコチゾンによる標準直線

発する蛍光エネルギー強度が大きくなるため感度はHg-L使用時より約8倍に増大し得たわけである。さらにQ P D 53形日立記録計を接続することにより0.006 μ gまで検出可能であるが、直線性や試薬の盲蛍光の問題があるので定量し得る限界としては0.01 μ g程度と考えられるが、このことについては今後さらに検討を加えたい。以上の結果から血漿使用量を半量に行うことが可能である。
c) 蛍光強度および蛍光スペクトルの時間的変動：Xe-L使用が110 H C Sの蛍光発生に有利であるとはいえやは

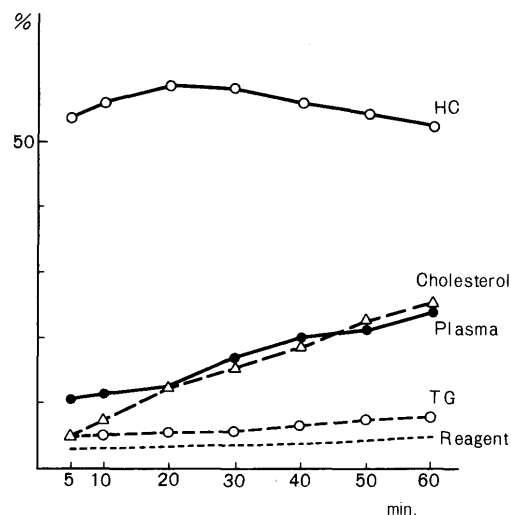


図4 蛍光強度の時間的推移

りこの時も血漿中の共存物質による盲蛍光は無視出来ない。前出の図2でもわかるようにコレステロール、トリグリセライドの蛍光スペクトルはHg-Lの時よりもそのピークが525 m μ 寄りにある。今H・C、血漿、コレステロール、トリグリセライド、試薬ブランクのおおのについて蛍光強度の時間的変動をみると図4にしめす通りである。すなわちH・Cの蛍光は蛍光試薬混和后10~20分で最大となり以後減衰するが、他のものは時間と共に蛍光が増加する。トリグリセライドの蛍光は弱く余り問題とならないが、コレステロールのそれはかなり強く、影響することが大である。しかしDe Moorの指示する混

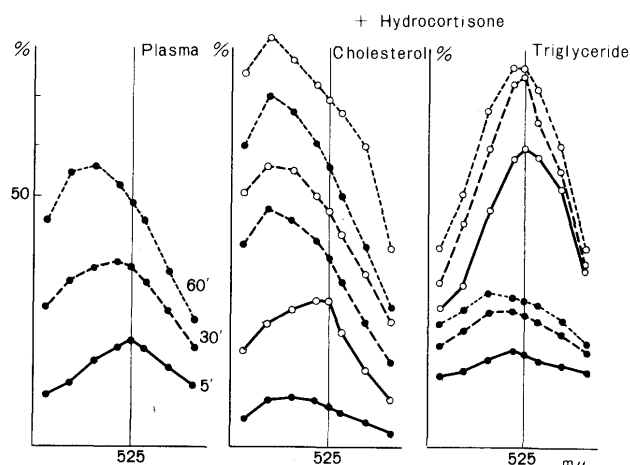


図5 各種抽出物の蛍光スペクトルの時間的変動

和5分后はその影響が少なく適切な測定時間であることがわかる。このことはDalyもSpencer-Peet⁴⁾も強調している所である。これを蛍光スペクトルの面から見たものが図5であって血漿抽出物のそれは時間と共に蛍光ピークが短波長側に偏し、コレステロールのそれに近づき、時間が経過すると11OHCSの蛍光よりも共存物質による蛍光が強くなり前景に出てくることが分る。

以上の成績からDe Moor法により11OHCSの測定を行なう際はXe-L使用がのぞましく、蛍光、試薬混和后5分間で測定すべきであるといえる。

d)我々の測定値：試料として血漿2mlと1mlを用いる二方法における相関をみると図6の如く大体よく似た測定値を得ている。正常勤務者の血漿1mlを用い上述の方法

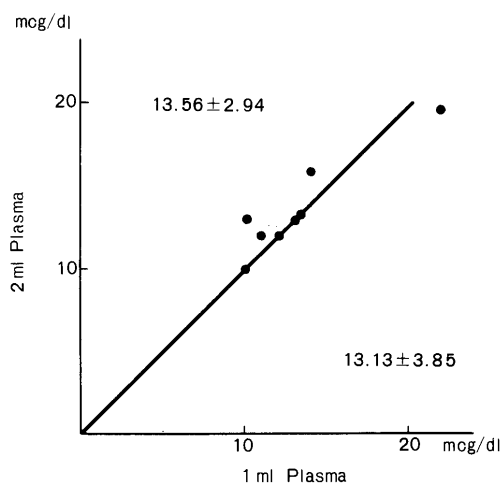


図6 血漿使用量による測定値の差

測定した値は表2に示したが、この平均値は $14.93 \pm 2.714 \mu\text{g/dl}$ ($M \pm 2SD$ は $20.36 \sim 9.50 \mu\text{g/dl}$)であった。

総括

203形日立分光蛍光光度計によりDe Moor法によって血中11OHCS測定を試みたが、Xe-Lを使用することにより正確に且つ少量の血漿をもって測定することができた。また本機器の感度には記録計によるスケール拡大を併用することで余裕がありさらに増加せしめ得ると考えられるので今後微量化することも可能であろう。このことはさらに検討を加えたい。

表2 正常人における測定値

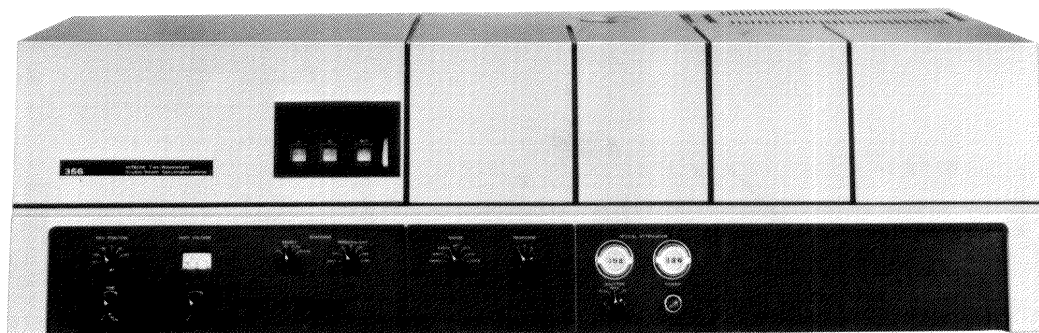
	male		female
1	13.8	1	20.0
2	10.8	2	12.0
3	18.8	3	13.4
4	12.8	4	14.8
5	15.7	5	14.9
6	17.1	6	15.1
$14.93 \pm 2.71 \text{mcg/dl}$			
$M \pm 2SD : 9.50 - 20.36 \text{mcg/dl}$			

参考文献

- 1) P.De Moor et al: Fluorimetric Determination of Free plasma 11-Hydroxycorticosteroid in Man, Acta Endocrin. 33, 297-307, (1959)
- 2) 村中日出夫: 未発表
- 3) P.De Moor and O.Steens: Comparison of Three Techniques for the Fluorimetric Determination of plasma Corticosteroids, J.Endocrin. 28, 59-64, (1963)
- 4) J.R. Daly and J.Spencer-Peet: Fluorimetric Determination of Adrenal Corticosteroids: Observations on Interfering Fluorogens in Human plasma, J.Endocrin. 36, 255-263, (1964)

二波長分光光度計特集

本誌では、先に二波長分光光度計特集号 (Vol. 11-No. 5(1968)) を発行し、二波長分光法の原理、装置の概要、応用分野並びに2, 3の測定例について発表いたしました。今般、更に基本的データから、応用例までを特集号として、お送りいたします。



356形 日立二波長分光光度計

分析化学と二波長測光法

柴田正三* 古川正道*

—期待される微分分光光度法—

著者らはさきに二波長測光法の比色分析への適用に関する基礎的な取り扱いとそのメリットについて報告した。^{1) 2)} 本文では微分分光光度法(Derivative Spectrophotometry)に関する一例をあげ、各方面での今後の活躍に期待したい。

小森らの解説にある如く、日立二波長分光光度計において二波長 λ_1 , λ_2 をごく接近して設定し、走査すれば、いわゆる微分スペクトル(Derivative Spectrum)が得られる。吸光度A(あるいはT)の波長 λ に対する一次微分 $dA/d\lambda$ の波長に対する曲線を直接記録することに価値があることは Giese French, Saidel ら^{3) 4)}によって指適されている。さらに二波長測光法のすぐれた性質を考慮して、微分スペクトルを用いる効用の主な点として

- 1) 二つあるいはそれ以上の吸収帯が全く、あるいは僅かの波長差で重なり合っている場合でも各吸収帯を確認できる。
- 2) 同様に非常に立ち上りの鋭い吸収曲線上に存在するほんの僅かの吸収帯を容易に確認できる。
- 3) 逆に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。
- 4) これらの微分値は一般に関係成分の濃度との間に直線関係が存在するので定量も可能。
- 5) さらに λ_1 , λ_2 が近接して設定してあるので、“にがり”の変化などに全く影響されない。

などがあげられる。

このように微分分光光度法によれば、たとえばいろいろな食品中に添加されている物質、あるいは腐敗、その他各種医薬、工業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と考えられる。

一例として当研究室で行なった廃水中のフェノールの分析に関する結果の一部を示す。図1および図2にフェノールの吸収スペクトルおよびその微分スペクトルを示した。その微分値を用いた検量線であるが、大変良い結果が得られている。

さらに、汚濁水を考慮に入れて、溶液の“にがり度”を変えて測定を行なったが、この濃度範囲ではその影響が全く見られなかった。

しかし、フェノールと類似した吸収スペクトルを与える他成分の濃度が刻々変化する場合、どのような影響を与えるか、また妨害する場合それを補償する手段があるかどうか現在検討中である。

微分スペクトルを測定するための特別な装置はFrenchらによって考案されているが、^{5) 6)} 日立二波長分光光度計の出現によって全く手軽に微分スペクトルを記録することができるのでたいへん便利である。

*工業技術院 名古屋工業技術試験所

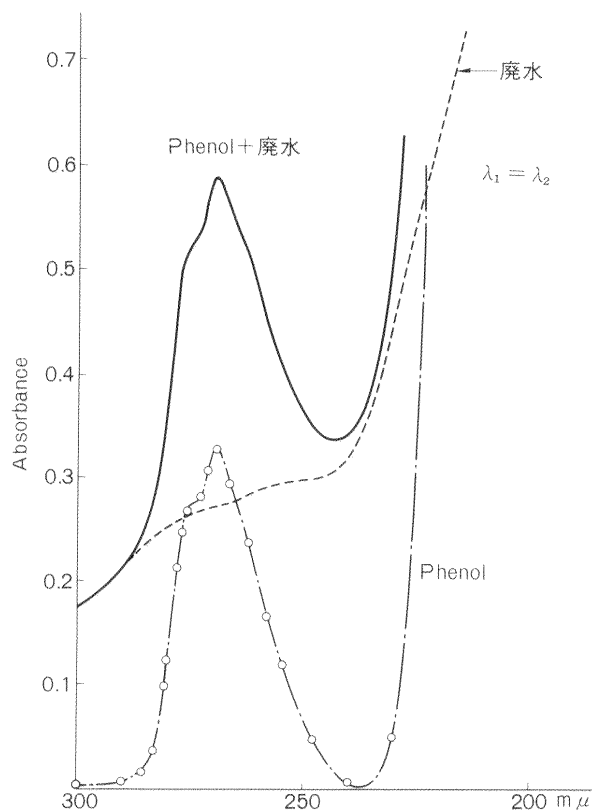


図1 廃水、フェノールおよび廃水中の吸収曲線

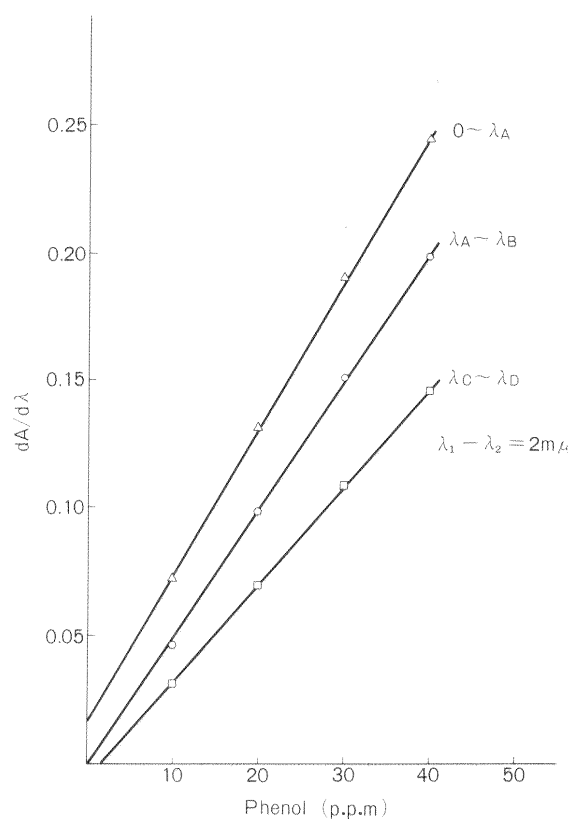


図3 フェノール微分スペクトル検量線

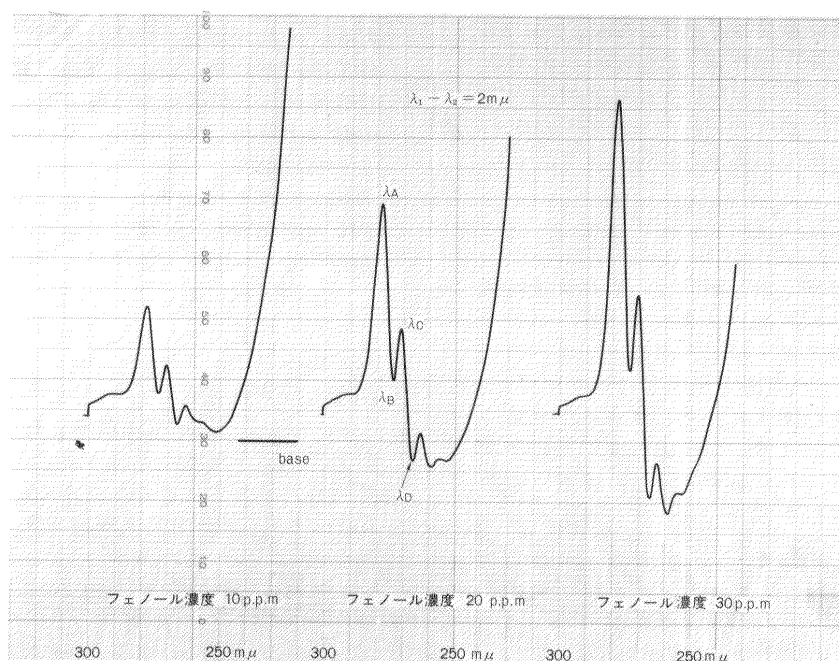


図2 廃水中のフェノールの微分スペクトル

参考文献

- 1) 柴田正三, 古川正道: The Hitachi Scientific Instrument News, 11, 595 (1968)
- 2) S. Shibata, M. Furukawa, K. Goto, Anal. chim Acta (1969) in printing
- 3) A. T. Giese, C. S. French Appl. Spectroscopy **9**, 78 (1955)
- 4) L. J. Saidel, Arch. Biochem. Biophys. **54**, 185 (1955)
- 5) C. S. French, A. B. Church Carnegie Fust. Wash. publ., Year Book No. 54 162 (1955)
- 6) 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

二波長分光光度計による周期的酵素反応の測定

—二波長独立測光モードの応用—

横田 健之助*

篠 田 泰 機*

はじめに

生物にみられるさまざまな周期現象を酵素反応のレベルで理解しようという試みが最近盛んになり複合酵素系で見られる周期反応の例が二、三発表されている。

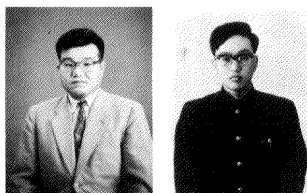
西洋ワサビペルオキシダーゼはNADPH（及びNADH）の分子状酸素による酸化を触媒するがこの反応中酵素はヘム鉄が3価の状態とCompound IIIの状態（恐らく3価鉄と O_2^- ラジカルとの複合体）との混合したようすをとる。

3価鉄のペルオキシダーゼに好気条件でNADHを加えた場合Compound IIIへのゆるやかな変換が始まるが、その間NADHの酸化はほとんど起らず(State I)、Compound IIIの蓄積が酵素量の半ばに達すると急速なNADHの酸化が始まり(State II)、これに伴ってCompound IIIは速やかに極大値に達し溶液中の酸素濃度も減少する。やがて酸素濃度が零付近に達するとCompound IIIは急速に分解し3価鉄の状態にもどる(State III)。反応液中に適量の酸素を通気し反応を開放系に近づけると再びState Iから始まりサイクルを繰り返す。

この周期反応は系を完全な開放型に近づけると長続きするようになる。この周期反応を解析するには酵素の状態変化、酸素濃度、NADH濃度の同時測定が必要となるが二波長分光光度計と白金酸素電極の使用により、これが可能となった。

実 験

図1に標準反応セルの構造をしめした。これは光路長10mm、高さ60mm、幅20mmの石英ガラス製である。このセルは右下隅を測定光が通るようにした恒温セルホルダー(25°C)に装着して356形二波長分光光度計に取りつけた。反応液は6mlでその組成は図1にしめしてある。光路の直上部に蒸着白金電極を取り付けて酸素濃度を記録できるようにし、またセル左側の光路を妨げない位置に酸素供給と攪拌のための毛細管を取り付けこれに濃度が5%



横田 健之助 篠 田 泰 機

になるように窒素で薄めた酸素を毎分6mlの速度で連続的に通気した。二波長分光光度計は二波長独立記録ができるように回路を切り替え、対数増幅器を1台外付けして2つの異った波長での吸光度変化を2ペン記録計で同時に記録した。測定した波長は309m/h, NADPHの濃度変化, 418m/hでCompound IIIの濃度の変化を測った。

結果と考察

反応液に通気を始め、液中の酸素濃度が平衡に達してからグルコース・6・リン酸脱水素酵素を加えると直ちにNADP⁺の還元が続いて周期反応が始まる。この周期の繰り返しはグルコース・6・リン酸が減少しNADPH濃度がある限度に低下するまで続く。図2は18回であった。

図1にしめす反応液の組成はかなり複雑であるが周期反応の主役となるのはNADPH、連続供給される酸素、ペルオキシダーゼである。しかし持続する周期反応を得るにはさらに周期機構の安定化剤としてメチレンブルーと2, 4-ジクロロフェノールを、また系を完全な開放型に近づけるためにNADPH再生系、即ちグルコース・6・リン酸とその脱水素酵素を必要とする。

従来この周期反応の解析は酸素電極による酸素濃度とEPS形分光光度計によるある波長における吸光度変化の同時連続測定から得られたデータによって行っていたが、それでは不連続的に急激に変わる情報の相互の関係を明らかにすることが極めて難しかった。今回二波長分光光度計と酸素電極の組み合わせにより得られた図2の結果を解析して判った主なことは、まず図1の条件による周期反応はNADPHの還元レベルが0.28~0.35mMの間で起りそれ以下になると停止すること、つぎにNADPHの酸化はState IIIにおいてもState IIと同じ位速く進行することなどである。この装置によりさらに微細な反応機構を解析することが可能であり現在研究中である。

われわれは、この周期反応はペルオキシダーゼの酸化反応機構によって完全に説明できると考えており、その中でも酵素の状態変化が周期反応成立に果す役割を重視している。この周期反応機構に対する最終的結論は、電子計算機により反応をシミュレートすることによって始めて得られるものと思われるから、その基礎データを得る道具として二波長分光光度計を大いに活用して行きたい。

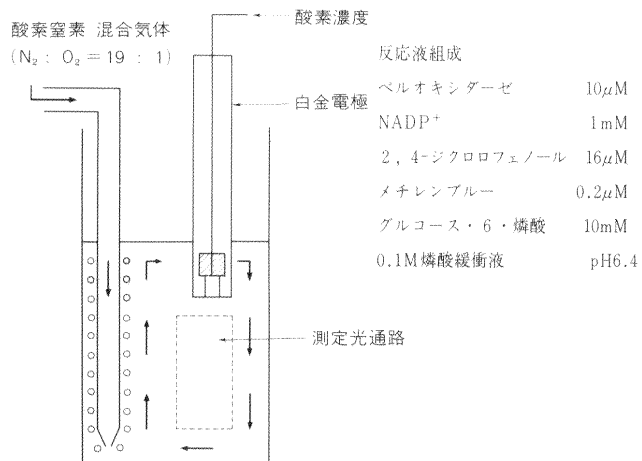


図1 反応に用いたセルの構造と反応液の組成

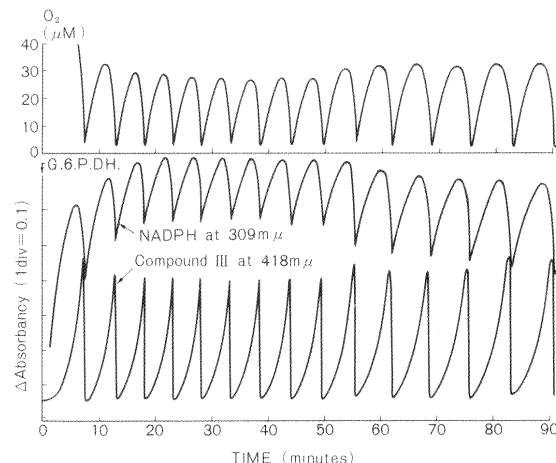


図2 二波長独立測光モードによるペルオキシダーゼ周期反応の測定例

* 北海道大学 応用電気研究所

356形 日立二波長／自記分光光度計による測定例

—主として微分スペクトルについて—

保田和雄* 小森律夫*

1. はじめに

吸光光度法の発展は、分光光度計および試薬の開発に支えられて、今日見られるような有力な分析方法として多くの人々に用いられるようになった。しかしながらこの分析法は目的元素のみを検知するために沈澱・分離・マスキングなどの化学的手段によって共存物質の干渉を除くことが本質的に必要であった。このような分析手法は分光光度計によって支えられているので、もし分光光度計の本質がかわるとするなれば分析方法もまた変わるものである。今までの分光光度計の概念は総て対照試料に対する測定試料の吸光の比を特定の一波長について測定することから成り立っていたものである。この概念とは全く別のことから考えられるものに、一つの試料に対して二つの測定光を透過しこの二つの信号の比・差を測定する方式がある。これは二波長測光法といわれるものであるが、これの本質の一つは微分スペクトル測光である。ある吸収帯に重さなった目的元素の吸収のみを検知するのに、またこの共存物質の吸収強度が変動するときこれに重さなった目的の吸収を検知・定量するとき微分スペクトルはもっとも有効な手段になる。

このように検知手段がかわれば、これによって行なわれる分析方法もかわることが当然考えられる。

本報告は微分スペクトルの有用性について述べる。

2. 装置について

本装置は大別して測光系と信号処理系と2つに分けることができる。図1には測光系の大略を示した。分散子はグレーティングを使用し、上下2段に設置されており、これらは各々独立にセットできるようになっている。このため波長 λ_1 , λ_2 を任意に選定できる。また、波長機構系の操作により一方の波長を固定、他方を走査、同時走査、同一平面合せによる($\lambda_1 = \lambda_2$) 自記測光等ができる。

いま、それぞれ独立に走査できる2つの波長を僅かずらし($\lambda_1 - \lambda_2 = \Delta\lambda$) 同時走査を行えば微分スペクトルが記録できる。本器の信号処理系は差または比を取れるようになっているから、いま波長 λ_1 と λ_2 を1つのセルに照射して、それぞれの吸光度 A_1 , A_2 を検知し、その差信号 $A_1 - A_2 = \Delta A$ を記録することができるため、理想的な値が得られる。

本器による微分スペクトルは、グレーティングの使用により波長がリニアである特徴が生かされ、波長全域に対して $\Delta\lambda = \text{一定}$ であるため正確な微分スペクトルが測定できる。 $\Delta\lambda$ は1~2 m μ が最適である。

*二つの波長をずらして掃引することによって得られるものは、吸収スペクトルの微分値に装置函数のかかったものである。初めに対照液で微分測光でのベースラインをとり、次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。

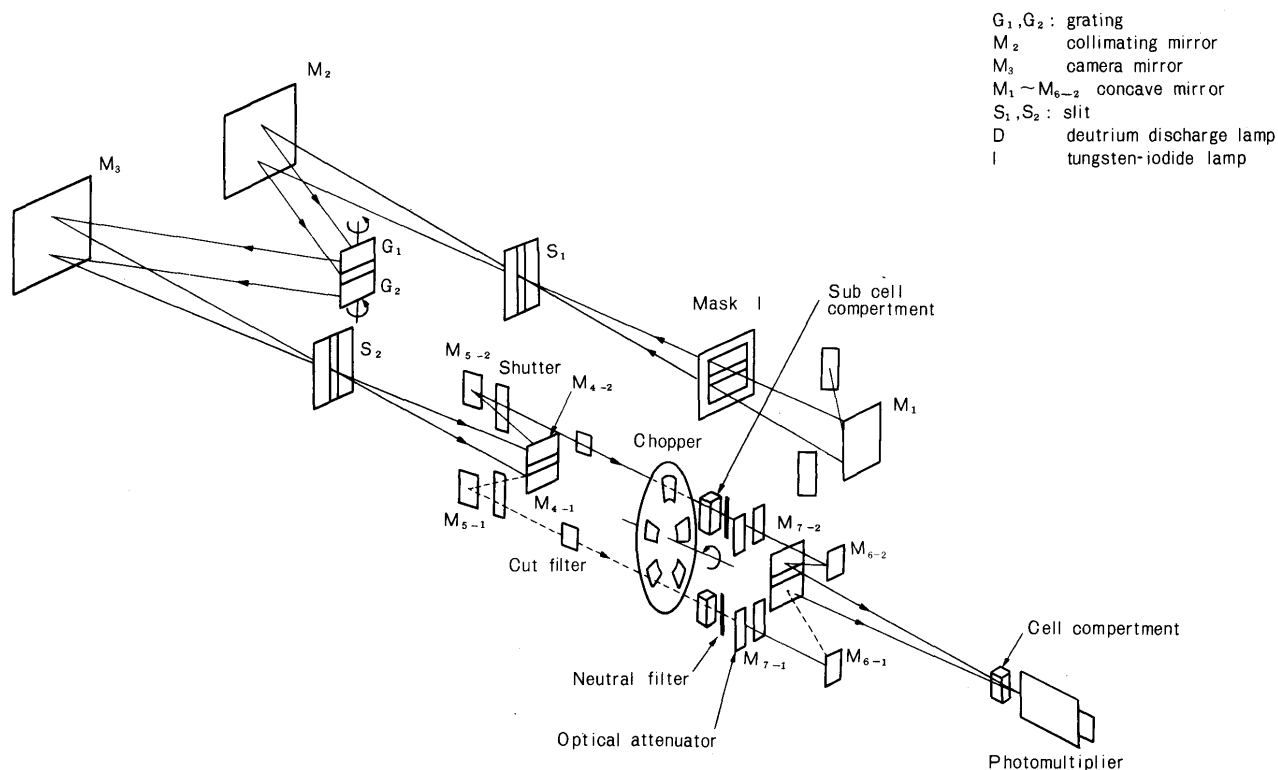


図1 356形 二波長／自記分光光度計光学系統図

3-1 微分スペクトルについて

紫外、可視域の吸収スペクトルには、その傾斜部にいわゆるショルダーを有する試料が極めて多い。

これは物質そのものの形態か、または試料と混在する他物質の吸収スペクトルが重畳しているかによる。

後者の場合はその分別は一般に極めて困難であり予め抽出、その他の人為操作を加えるか、化学的処置による固有物質、標的物質の変性や吸光度の減弱を生ずる危険がある。またこれらの操作には、多大な処理時間や費用を要するため、十分検討する必要がある。

このような見地からショルダー成分を有する試料の研究には、直接被検標本として用いるためにも、これらのショルダーの波長位置や定量も可能であることが望まれる。自記分光法により波長軸を拡大しショルダーを検討することには限定される。波長位置も定量もベースライン法によるが、急斜面の僅かなショルダーは作図的に精度が問題となり、期待できない。

このような観点から、微分スペクトル法は、吸収帯の数や、波長位置等が明確に判り、定性的確認に威力を発揮する。

微分値は、濃度に対してBeer's lawが適用できるから定量も可能である。混合液の場合には大いに活用領域が拡大されるものと思われる。

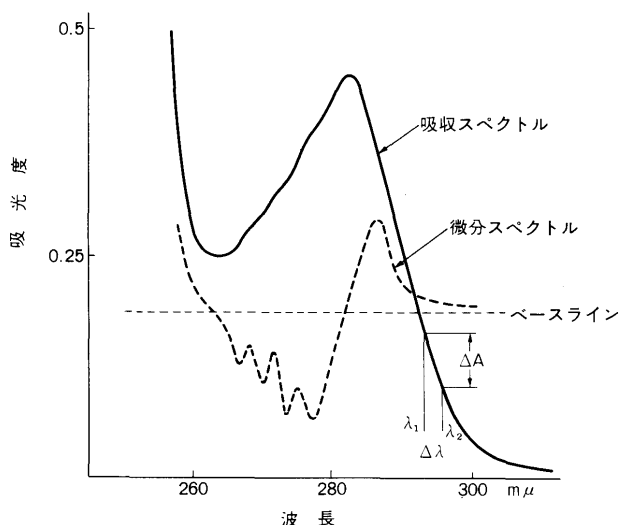


図2 吸収スペクトルと微分スペクトル

3-2 吸収スペクトルの微分スペクトル

(Derivative Spectrum)

二波長分光光度計の微分方式で測定される信号は次の二つがある。

$$S_{\lambda} = I_{\lambda} \cdot D_{\lambda} \cdot \ell - E_{\lambda} \cdot C \cdot \ell \quad (1)$$

$$S_{\lambda+\Delta\lambda} = I_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot D_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot \ell - E_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot C \cdot \ell \quad (2)$$

ここで

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} : " 装置関数

E_{λ} : " 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次のようになる。

$$S_{\lambda+\Delta\lambda} / S_{\lambda} = \frac{I_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot D_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot \ell - E_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot C \cdot \ell}{I_{\lambda} \cdot D_{\lambda} \cdot \ell - E_{\lambda} \cdot C \cdot \ell} \quad (3)$$

さらにこれの対数形で出力信号をとると (3') になる

$$\log S_{\lambda+\Delta\lambda} - \log S_{\lambda} = \log I_{\lambda+\Delta\lambda} - \log I_{\lambda} + \log D_{\lambda+\Delta\lambda} - \log D_{\lambda} - E_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot e \cdot \ell + E_{\lambda} \cdot C \cdot \ell \quad (3')$$

試料を測定しないときのベースラインは (4) 式のように表わせる

$$\log S'_{\lambda+\Delta\lambda} - \log S'_{\lambda} = \log I_{\lambda+\Delta\lambda} - \log I_{\lambda} + \log D_{\lambda+\Delta\lambda} - \log D_{\lambda} \quad (4)$$

このため初めにこの値を記録し、次に測定された (3) 式から (4) 式を引算すれば、得られる値は (5) 式のように微分スペクトルを示す。

$$\log \frac{S_{\lambda+\Delta\lambda}}{S_{\lambda}} - \log \frac{S'_{\lambda+\Delta\lambda}}{S'_{\lambda}} = -E_{\lambda+\Delta\lambda} \cdot C \cdot \ell - E_{\lambda} \cdot C \cdot \ell \quad (5)$$

4. KMnO₄水溶液による吸収スペクトルと

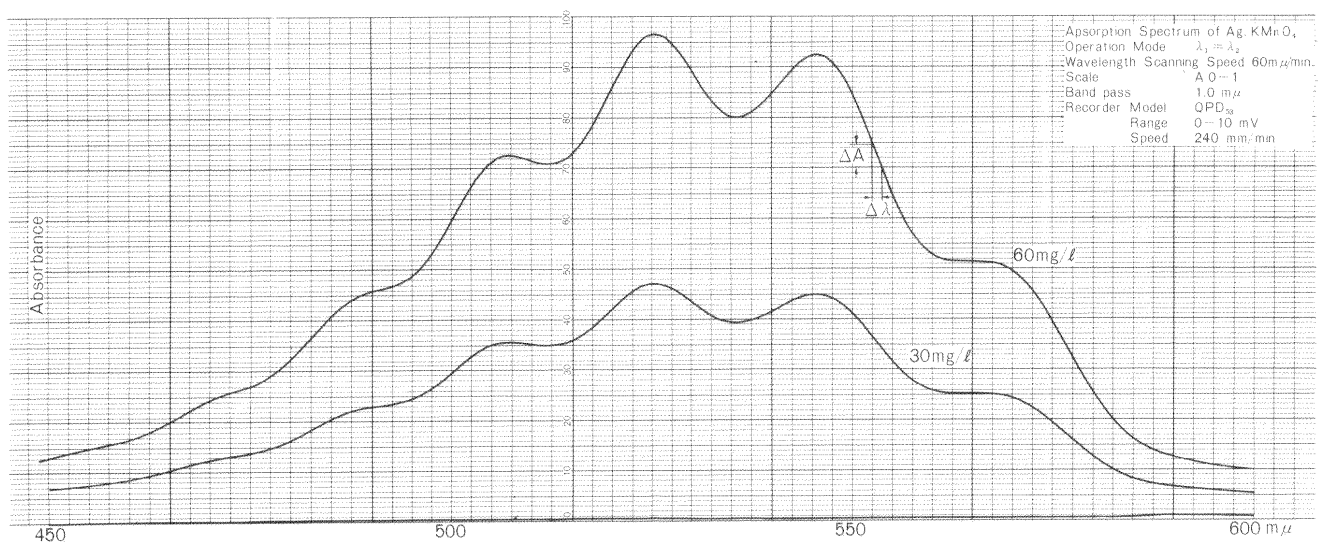
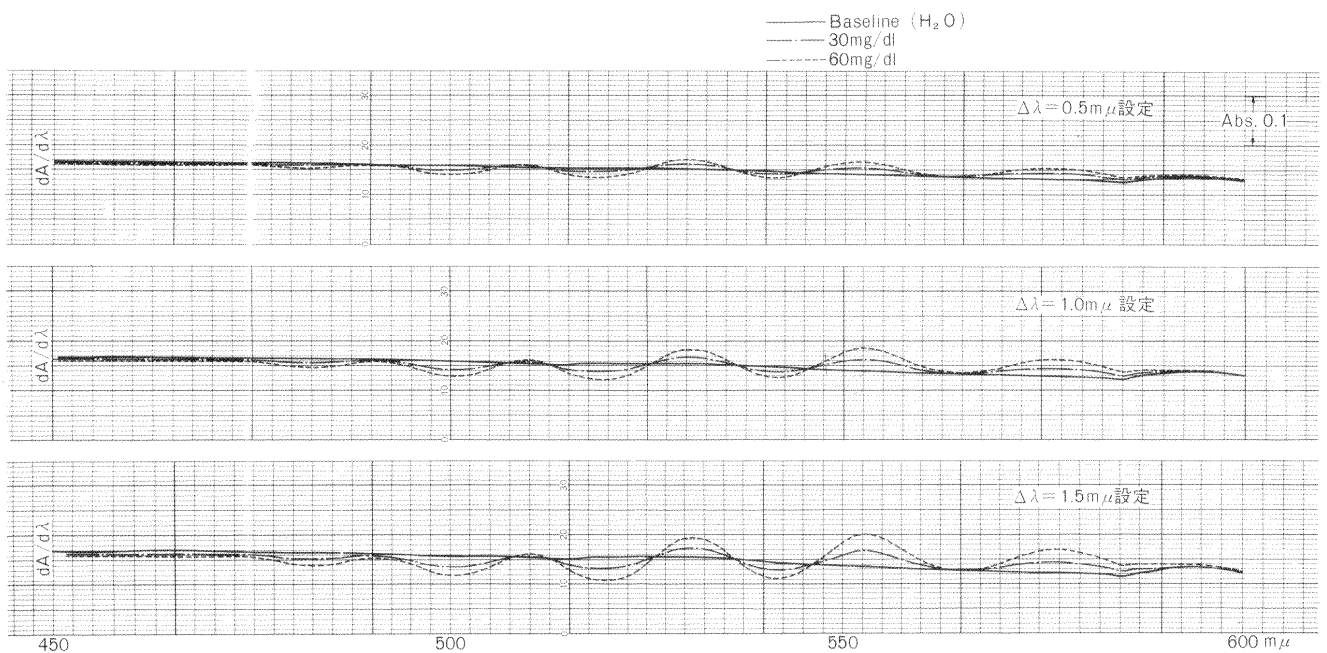
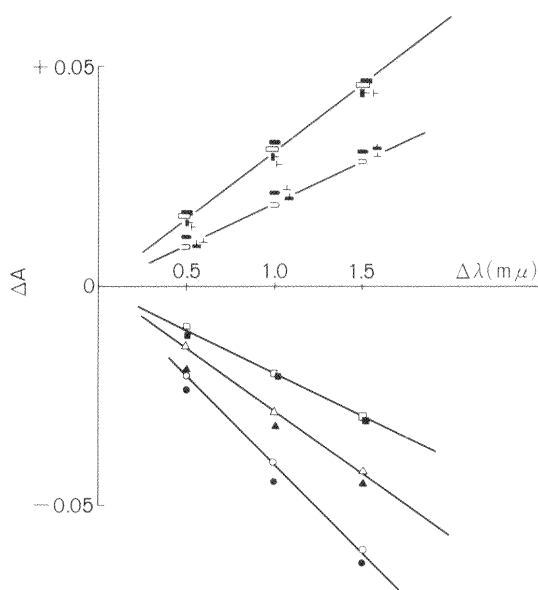
微分スペクトルの比較

吸収スペクトル分布曲線の形から計算した微分値 (作図法) と、微分スペクトル測定した値とが合致または同率の係数を乗ずることにより正しい値が得られることが基本的に必要となる。図3には、KMnO₄水溶液 (60mg/ℓ, 30mg/ℓ) の吸収スペクトルを波長拡大により測定した。この記録から作図により $d\lambda$ 0.5, 1.0, 1.5 mμ における吸光度変化量を読みとり $\Delta A / \Delta \lambda$ 値を計算により求めた。次に、本器を微分スペクトル測定にして、 λ_1, λ_2 をそれぞれ 0.5, 1.0, 1.5 mμ 波長間隔にセットし、各濃度試料を測定した結果を図4に示した。吸収スペクトルで急傾斜部分は微分値は極大を示し、吸収ピーク位置は微分値は零となっている。即ち蒸留水でのベースライン値と交わる。

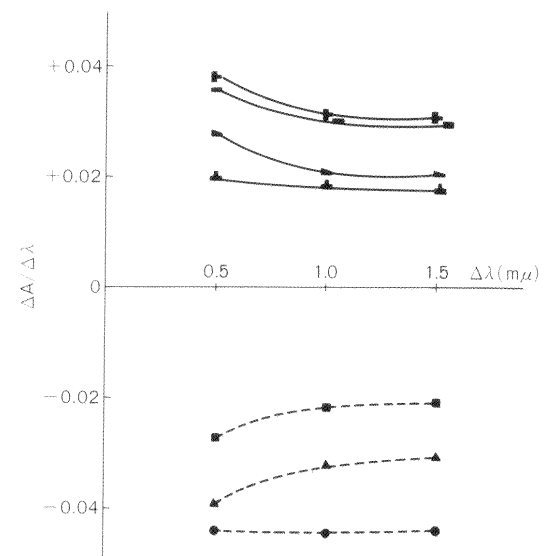
このように、吸収スペクトルからの計算値と微分スペクトル測定による記録値を比較したのが、図5である。よく合致しており、また相関はきわめて高い。これからまた図6に $\Delta \lambda$ 値を変えた場合の $\Delta A / \Delta \lambda$ 値の変化を示した。

- i) 本器による微分スペクトル測定値は、吸収スペクトルから計算した値とよく合致している。
- ii) 自明ではあるが微分スペクトル値は試料濃度に比例する。Beer's lawの適用ができる。
- iii) $\Delta \lambda$ 値を 0.5, 1.0, 1.5 mμ に選択して測定したが、ほぼ $\Delta A / \Delta \lambda$ 値は変らなかった。 $\Delta \lambda$ 値は 1 ~ 2 mμ が適当と思われる。 $\Delta \lambda$ 値が余り大きくては本来の意味を失い、また $\Delta \lambda$ 値を 0.5 mμ 以下にすることは機構上、スケール拡大の点からも問題を生ずると考える。
- iv) 本器はグレーティング分散方式であり、波長はリニアであるから $\Delta \lambda$ 値は全域変化しない。

以上の結果から微分スペクトル測定の定量性が確認されたが、本測定法の有用性が証明された。これは急峻な吸収帯上のショルダーの定量にも適用できる。

図3 KMnO_4 水溶液の吸収スペクトル図4 KMnO_4 水溶液の各濃度における微分スペクトル図5 $\Delta\lambda$ 幅選択と ΔA 量の関係

波長	$\Delta A/\Delta\lambda$ 値	
	実測	計算
578	▲	△
556	●	○
543	■	□
533	■	□
522	┐	┐
503	■	□
485	┐	┐

図6 $\Delta\lambda$ 選択と $\frac{\Delta A}{\Delta\lambda}$ 値の関係

5. 牛乳による微分スペクトル

市販牛乳を蒸留水にて稀釈して、吸収スペクトルを測定したのが図9である。散乱によるバックグラウンドのうえに、蛋白の吸収が認められる。本器では散乱性試料でも効率よく測定できることを示している。ベースライン法により検量線を作製すれば図10に示すように、濃度に対して良好な直線性を有している。この吸収スペクトルを注意深く観察すると、290m μ 付近に僅かなショルダーがあることが判る。これの波長位置および定量は吸収スペクトルからはほとんど不可能であろう。図11に拡大して(Abs, 0-3スケール、波長拡大4倍)ショルダー部分(矢印)を記録したが、拡大操作ではその定量化はできない。このように傾斜面のショルダー成分が対象になる場合には微分スペクトル測定が効果的である。

図12に各濃度における牛乳混濁液の微分スペクトルの記録を示した。 $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$ を2m μ に設定して波長340~260m μ 間を走査した。これから谷の部分の微分値の少ない位置即ち傾斜のゆるやかになるショルダー位置を示している。測定では波長290m μ 位置にあり、また微分値は

濃度に比例していることが図13から判る。 $\Delta A / \Delta\lambda$ 値のチャート読みと濃度の関係は直線的である。

また、微分スペクトルの有用性は下記の点にもある。即ち図7において、バックグラウンドの上に乗っている吸収を定量する場合、一般にベースライン法で補正する。即ち、谷と谷間を直線で結んでこれをベースとして吸収ピークの値(吸光度)を求め、定量している。

このような吸収スペクトルを微分スペクトル測定すれば図8のごとくなりピークが2つ得られる。このとき λ_4 とベース間 $dA'/d\lambda$, または λ_5 とベース間 $dA''/d\lambda$ を求めれば3点補正したのと同じことになる。

λ_1 , λ_3 を直線近似するよりも二次曲線近似の方が、よりよい結果が得られよう。即ち微分スペクトルでは、この2次曲線は1次曲線になる。このため λ_1 , λ_3 を一次曲線で結び $dA'/d\lambda$, $dA''/d\lambda$ を求めれば、これから定量ができ、これは吸収スペクトルのベースを2次曲線補正して定量したことになり、より理想的になる。

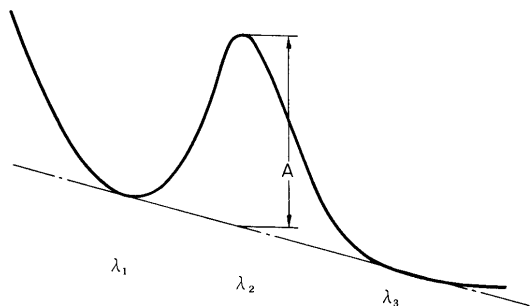


図7 バックグラウンドを有する物質の吸収スペクトル

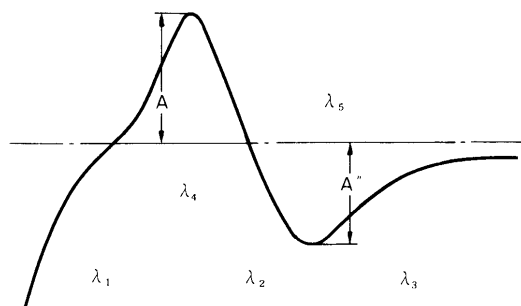


図8 微分スペクトル

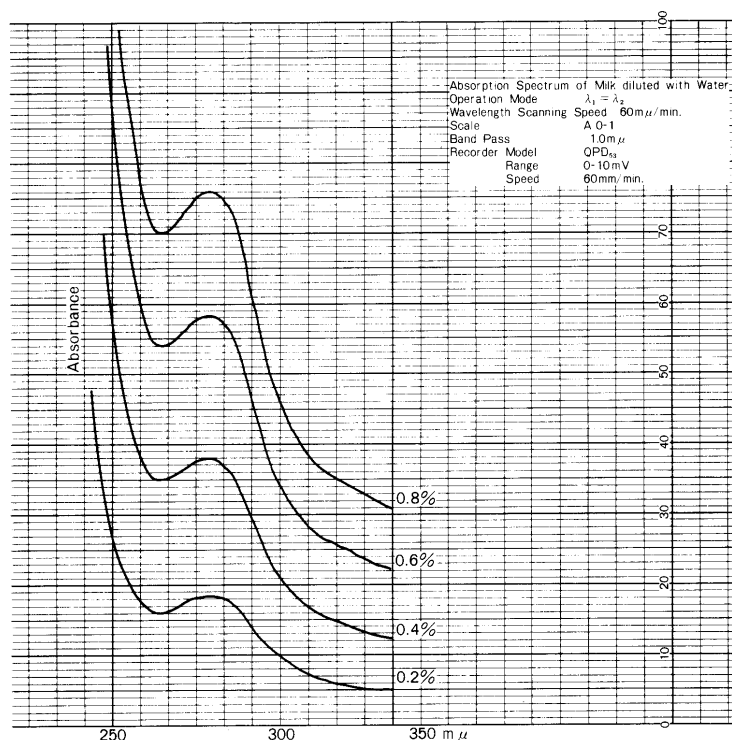


図9 牛乳の混濁液の吸収スペクトル

Relationship between the concentration of Milk and the differential value of the shoulder

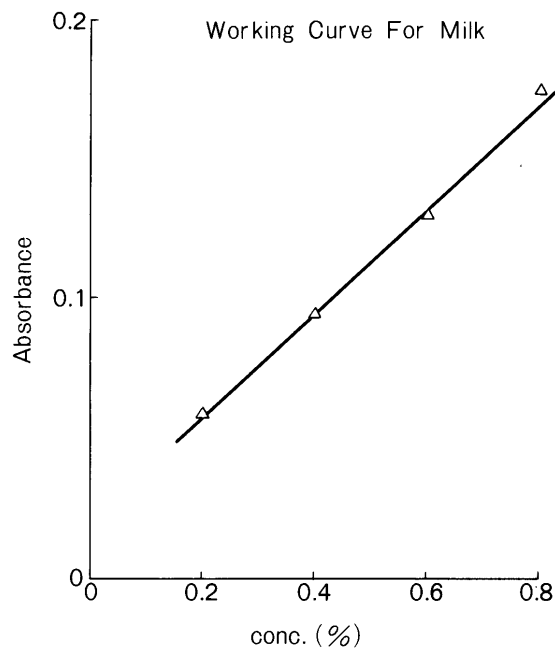


図10 牛乳混濁液のベースライン法による検量線

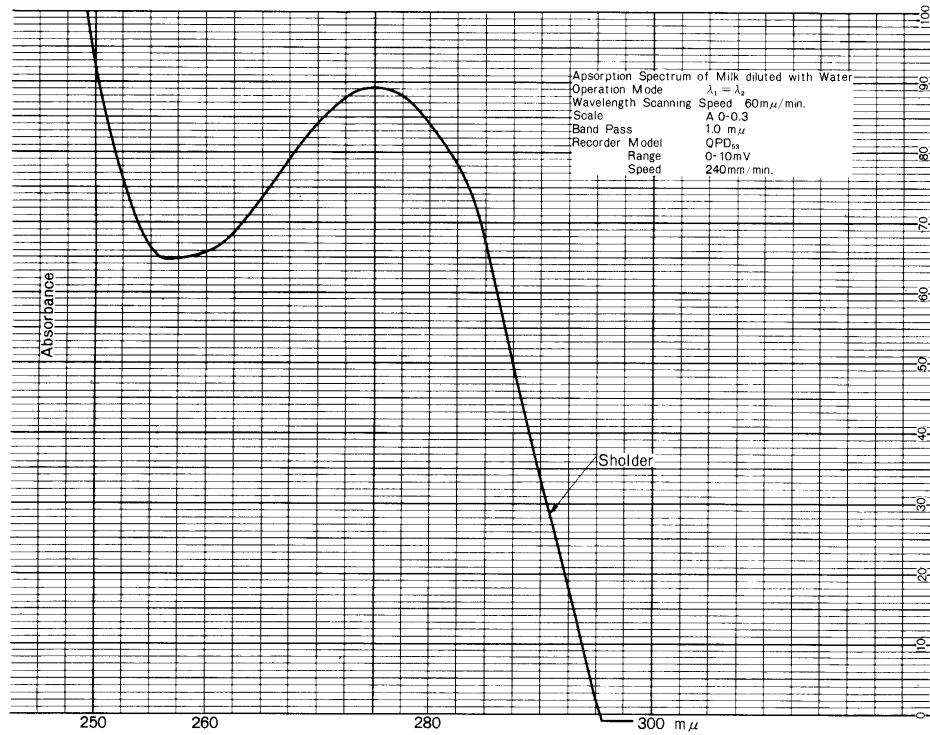


図11 牛乳混濁液の吸収スペクトル

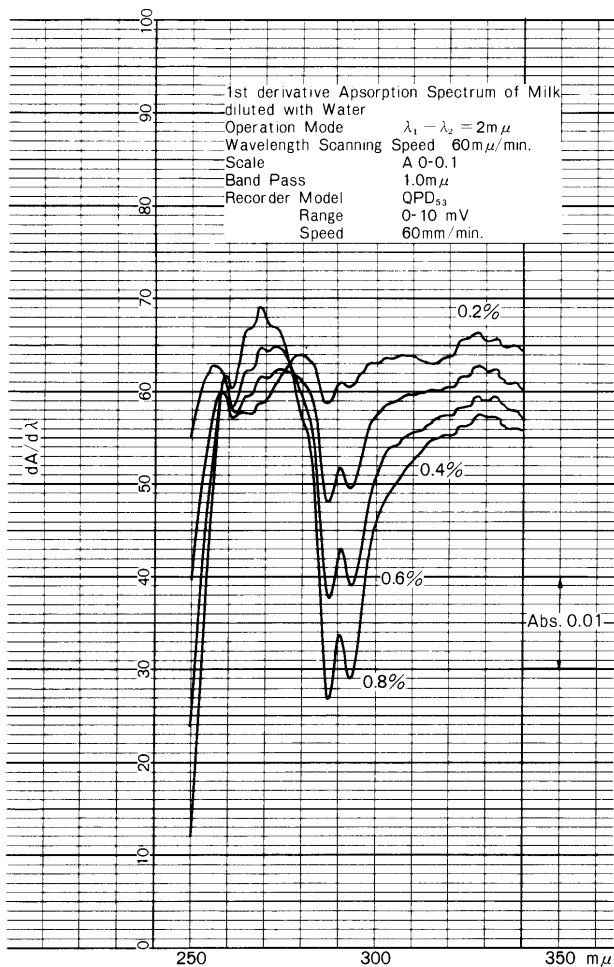


図12 牛乳混濁液の微分スペクトル

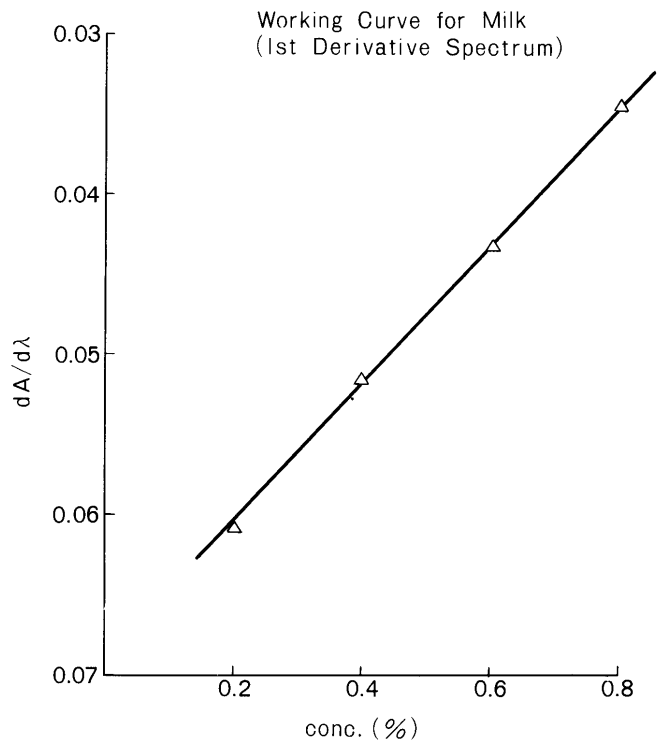


図13 微分スペクトルによる検量線

6. アルブミン試薬による微分スペクトル

ウシ血清アルブミンの吸収スペクトルは、周知のように波長277m μ に吸収ピークをもつ特長ある形をしている。

図14に20mg/d ℓ 、80mg/d ℓ 各濃度の吸収スペクトルを示した。よく観察すると270~250m μ の波長間に幾つかの弱い吸収帯が斜面に凸凹を形成しているのがうかがえる。肉眼で識別できるのは3つあり波長270m μ 位置にあるショルダーは発見が困難か、または、判別の限界と思われる。

図15に濃度20mg/d ℓ 試料の、波長および吸光度スケール共に拡大して記録したデータを示したが、やはりショルダーの数は不明瞭であり、定量はもち論、ベースライン法の適用も不可能であろう。せまい波長間に多数のショルダー吸収帯をもつ場合や急斜面では困難である場合が多い。

次に $\lambda_2 - \lambda_1 = \Delta\lambda$ を1m μ に設定して波長300~240m μ 間を走査したときの微分スペクトルを各試料について記録したのを図16に示した。二波長分光光度計は、その機能上の特徴から微量な吸光度スケールが可能になることである。Abs, 0~0.03フルスケールを使用した。

まず蒸留水 Blank における ($dA/d\lambda = 0$ の試料) 微分スペクトルベースラインを記録する。若干ドリフトするが、これは、 λ_2 と λ_1 をズラしてあるため、2つの分光特性が、少し異なるためである。

各試料をこの上に記録したのが図16であり、それぞれの波長におけるベースラインからの距離が $dA/d\lambda$ 値を示している。ショルダーが4つ明瞭に分離されており、その波長位置が明らかである。

図17にベースラインを補正した結果を示した。

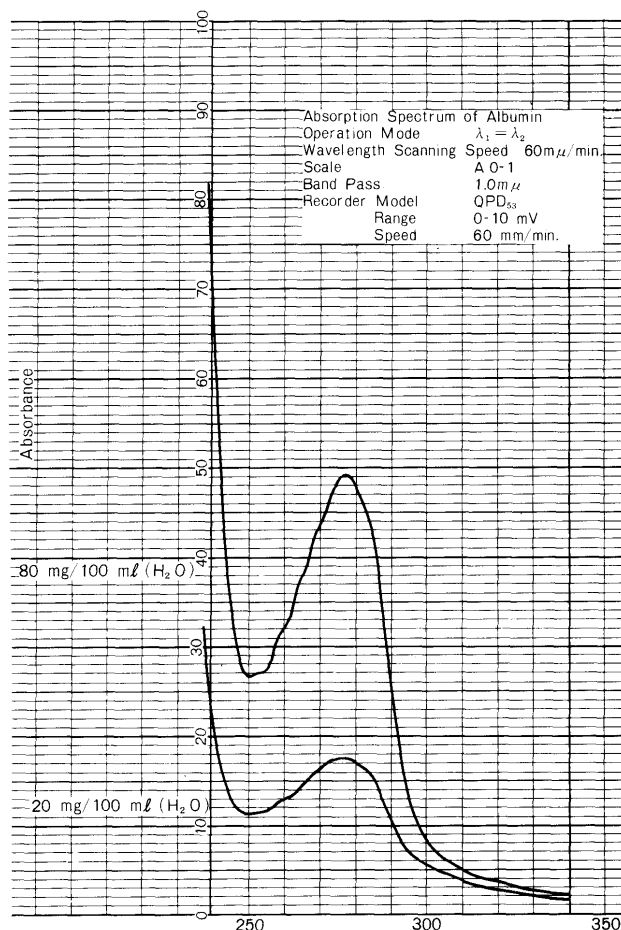


図14 アルブミン試薬の吸収スペクトル

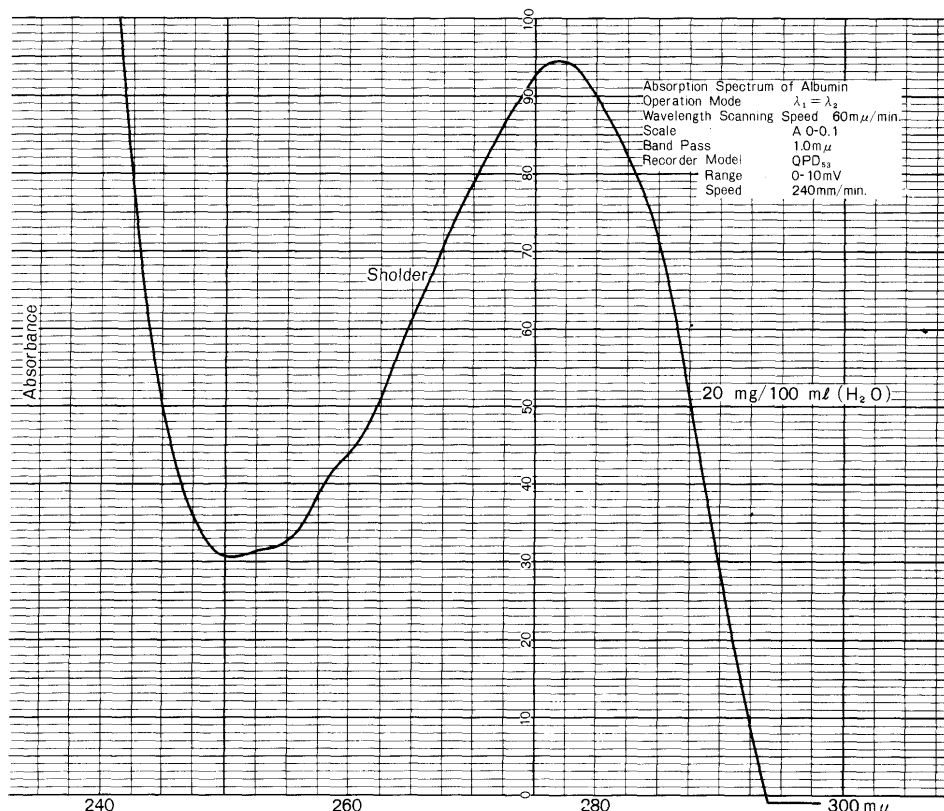


図15 アルブミン試薬の吸収スペクトル

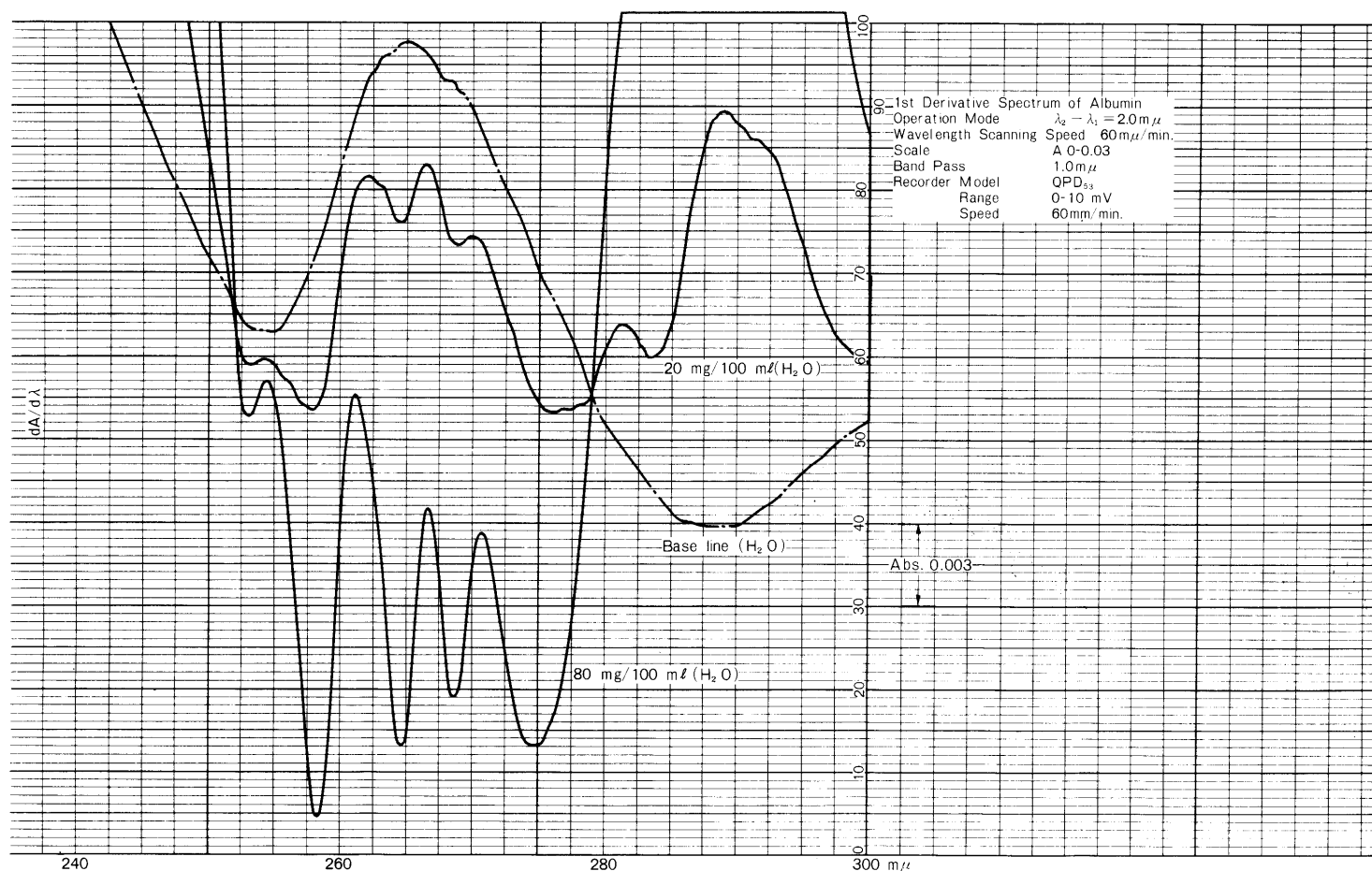


図16 アルブミン試薬の微分スペクトル

Differential Spectrum of Albumin aq. Soln.

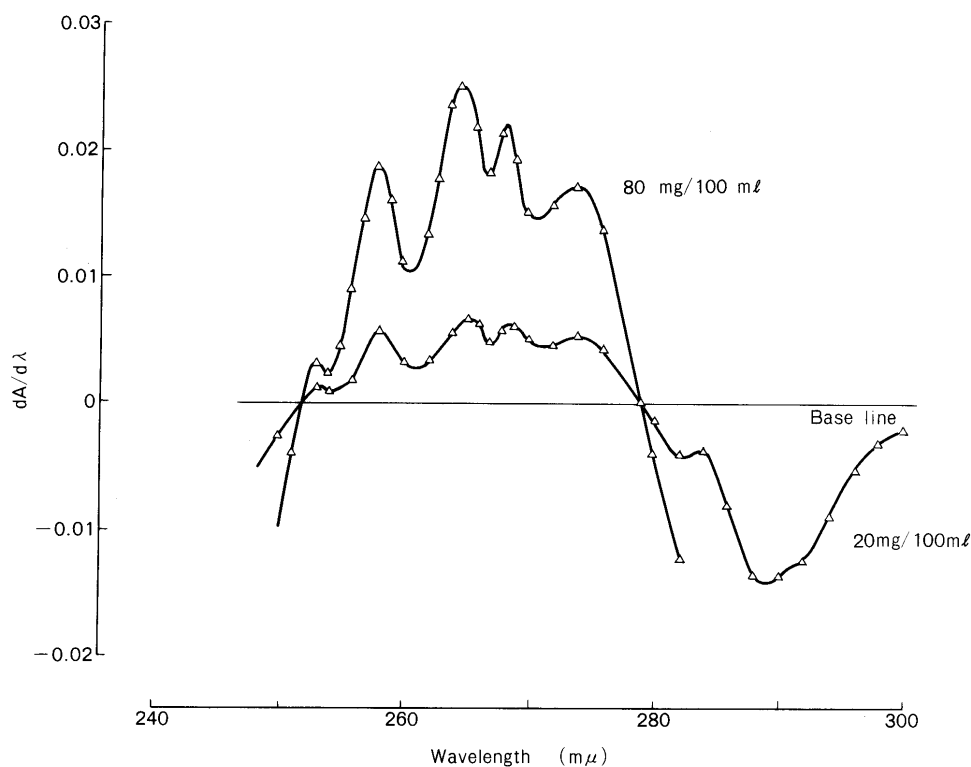


図17 アルブミン試薬の微分スペクトル

以上 2, 3 の測定例を示したが、これから

- i) 微分スペクトル測定は、吸収スペクトルの急峻なカーブのうえにある、僅かな吸収帯の波長位置の確認ができる。
- ii) 微分スペクトル測定は、急傾斜上の吸収帯でも定量が可能である。従来、吸収スペクトルからベースライン法による定量が便宜的に用いられたが、僅かな吸収帯では、きわめて困難であり、活用が期待される。
- iii) 混濁試料でも微分スペクトルが効率よく測定できる。
- iv) 混合溶液でも微分スペクトルから、分離測定が可能である。

356形 日立二波長／自記分計光度光による —チトクロームcの低温スペクトル(液体窒素)の測定—

小 森 律 夫* 黒 石 忠 文*

はじめに

近年、生化学領域において低温スペクトルが注目をあびてきた。この由因は常温スペクトルに比べて、低温スペクトルの観察により新たな知見を豊富に得られることによる。¹⁾

そこで、チトクロームcの低温スペクトルは、よく知られているので、これを供試試薬として356形日立二波長自記分計光度計の低温附属装置を使用し測定した。

周知のように、チトクロームc(環元形)の常温スペクトルは550 m μ 521 m μ に特徴ある吸収ピークを有する吸収スペクトルを示すが、液体窒素温度(77°K)では、550 m μ の吸収ピークは、2つに分離されまた吸収ピーク波長位置は548 m μ に移行する。

また521 m μ 附近の比較的中広い吸収帯では3つに分かれることが判る。このようにチトクロームcは試料として最適であるから、これを使用して、主として分離能について評価した。

装置の説明

図1に自記測光用および二波長測光用の低温附属装置を示した。1つのジュワーを使用し、これに標準側、試料側のセルが取外し可能なセルホルダーを装着できるようになっている。

この構造の概略を図2に示した。冷却板は液体窒素中に浸たされこの伝導により試料は、ほぼ液体窒素温度に保たれる。冷却板はスペーサを兼用し1, 2, 3 mmと任意厚さのものを使用すれば液層を変えられる。

冷却板をスペーサに使用することは冷却能率の面からも効力を発揮するものと考ええる。また窓板は、全波長域をカバーするときには石英板を必要とするが、本実験ではアクリル板を使用した。

アクリル板は360 m μ 附近に吸収があり、また、340 m μ 以下の紫外域では、吸収のため使用できないが、本試料

のように可視域では差支えない。微分スペクトルを測定する場合に用いるものと同様に二波長測光用も同じ要領で製作された。一般に低温スペクトルは氷の析出した状態で測定されるから試料の様相は、半透明状態となっている。このため混濁試料測定の場合が必要となってくる。この意味から散乱光を効率よく集めることを要するが、本器ではヘッドオン形二次電子増倍管を使用している。検知器は移動可能でありジュワー一面に、近接密着できる。

図3に低温附属装置に本体装着および各部分の写真を示した。

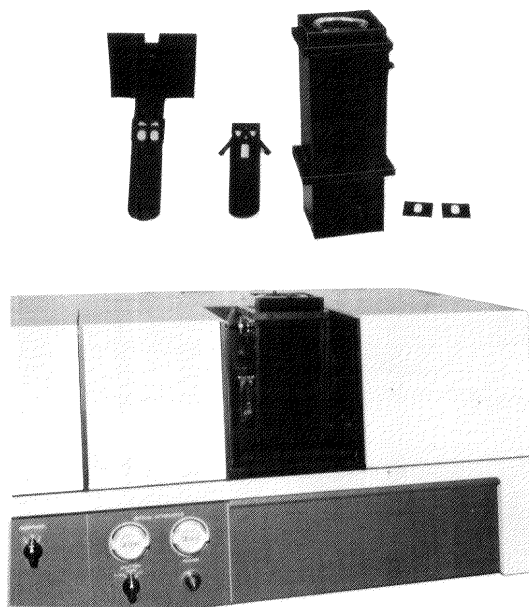
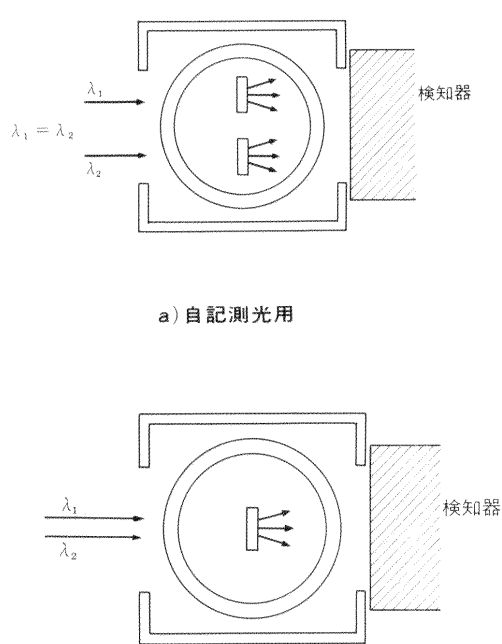


図3 本体装着および各部分



a) 自記測光用

b) 二波長用

図1 低温附属装置

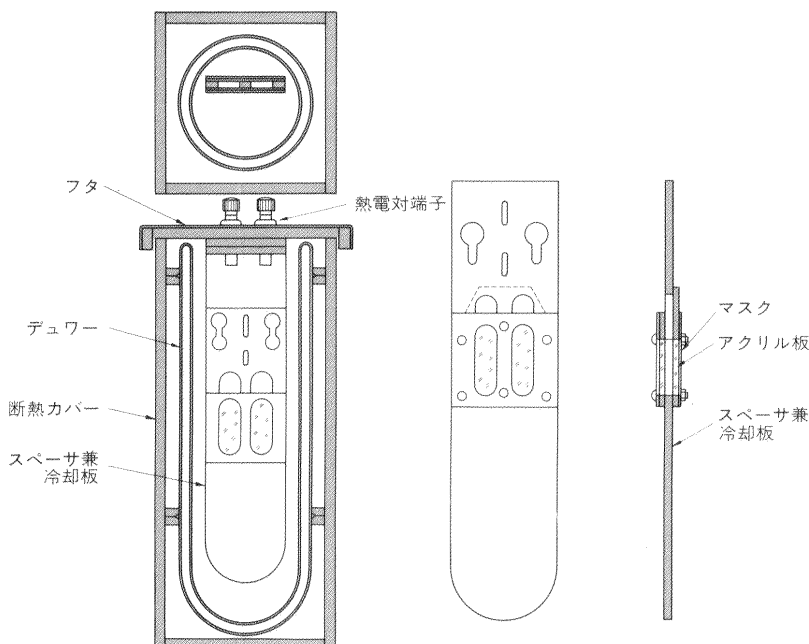


図2 低温附属装置の構造図

試料作成および測定結果

グリセリン50%水溶液を作成し、これを溶媒としてチトクロームcを適量溶解した。図2のセルホルダ標準側には、グリセリン50%水溶液を、試料側には試料液を入れる。冷却附属装置ジュワーに液体窒素を注入し予冷しておき、セルホルダーをジュワー内にセットし冷却する。約2分後にセルホルダーを取出してセル面を観察すると、透明な氷状を生成しており、下方にクラックが入りはじめているときが第1段階であり、この状態でセルホルダーを60W白熱ランプに近づけて暫く表面を加温すると氷の結晶が相変化を起し曇りはじめ、たちまち全透過面上に波及し半透明体となる。

このようにして作成した試料を再びジュワー内に装着し、測定する。作成には若干要領を要するがそれ程困難ではない。

ウマ心筋チトクロームc（還元形）の α 、 β 吸収帯の常温スペクトルおよび低温スペクトルの記録を図4に示した。スケールはAbs 0—0.1を波長巾は0.2 m μ に設定し、波長送り速度は10 m μ /minで走査した。本器はグレーティング分散方式を採用しており分散は大きいから波長巾を狭く選定できる。

周知の常温スペクトルは波長550 m μ に1つの吸収ピークを有するが、液体窒素温度では2つに明瞭に分離される。この意味づけは現在の所明らかではないが¹⁾現象的にはあきらかである。

550 m μ の吸収ピークは548 m μ にシフトし、常温では感知されなかった545 m μ の波長位置で明らかに分離識別できる。

その分離の程度は約3目強であり、充分に吸収波長位置を観察できる。フルスケールAbs, 0—0.1でノイズレベルは約0.5目(Abs 0.0005)であり、信頼性の高いデータが得られると考える。

また図5には、波長巾0.5 m μ で測定した結果を示した。

545 m μ の分離は若干おちるがノイズレベルは改善される。

チトクロームcの濃度と吸光度の関係は、試料原液を1とし、その $\frac{1}{2}$ 、 $\frac{1}{4}$ と希釈したものを測定した結果は、良好な直線性が得られ定量も可能であることが判った。

また、分離の状態を観察するために微分スペクトルは有用であり、図7に波長540—560 m μ の微分スペクトルを示した。

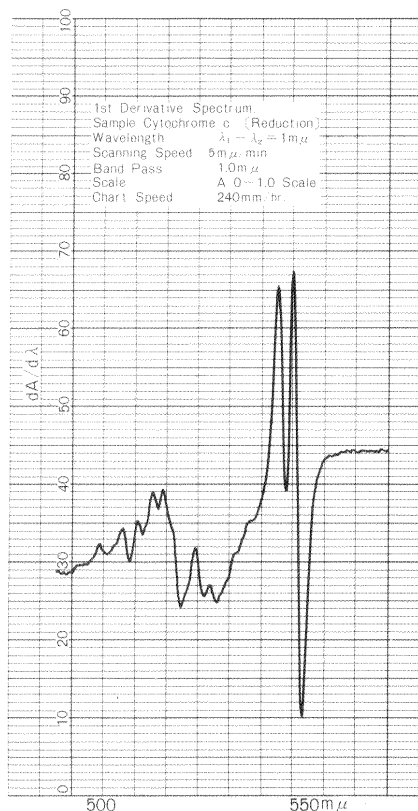


図7 チトクロームcの微分スペクトル

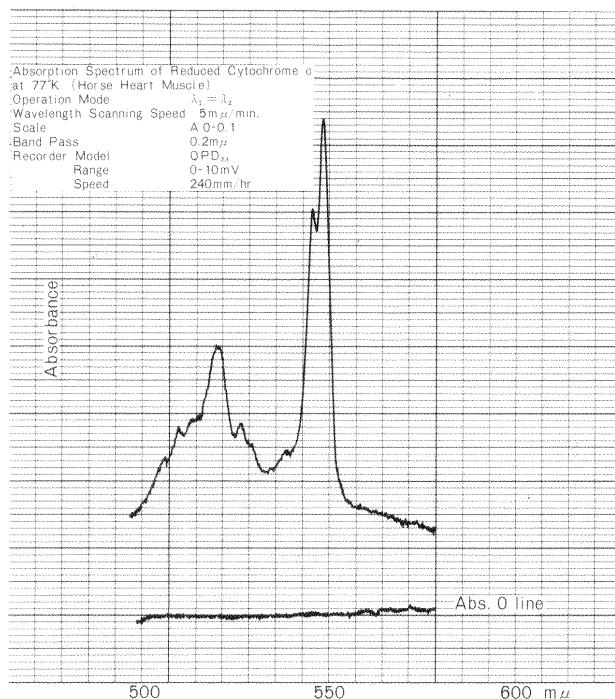


図4 チトクロームcの低温スペクトル 77°K液層1 mm

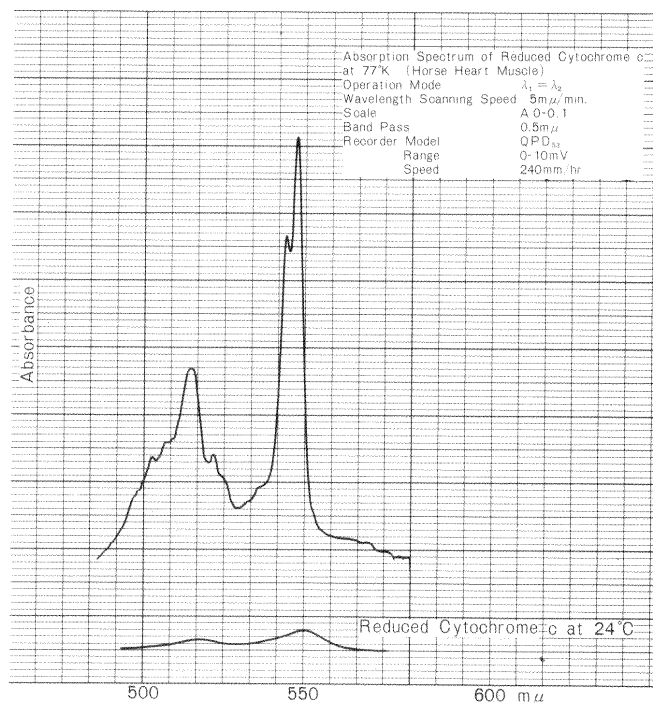


図5 チトクロームcの低温スペクトル 77°K液層1 mm

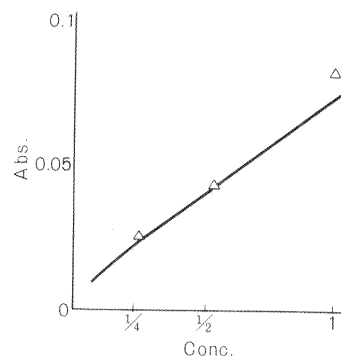


図6 チトクロームc濃度と吸光度の関係

1) 山野俊雄 河内清三 蛋白質、核酸酵素13巻第5号生体試料の低温スペクトル

二波長測光法によるフタル酸異性体の極微量分析

——イソフタル酸中のテレフタル酸の定量——

小森 律夫* 松平 俊次* 内藤 茂昭*

はじめに

吸光分析法の適用は、近時各分野でますます普遍化の傾向にあり、とくに分析化学の領域では、利用度は高く機器分析の主流を占めていることは周知の事実である。

我々は分光光度計と若干異質な二波長／自記分光光度計を製作したので、その応用面を評価した。二波長測光方式を活用すれば、微量成分の分析に新活路を見出し得ることがわかった。今日高分子化学工業において重要な化合物の一つであるフタル酸は、その異性体として、いわゆるフタル酸 (*o*-Phthalic Acid)、イソフタル酸 (*m*-Phthalic Acid) およびテレフタル酸 (*p*-Phthalic Acid) があり、紫外域においてそれぞれ似かよった吸収をもっている。これらは原料として工業的生産過程における純品化が問題となると推測されるが、一般に技術的な要因から2成分の混在が考えられる。しかるにこれら各異性体相互の分離操作は化学的処理に困難があり、しかも多量物質中の少量物質の検出という悪条件下で分析を行なわねばならない。

これら2種混合物質を比色分析法で定量することは、従来の分光光度計でも行われていた。しかし混在比に制限があり計算による誤差も加わって、精度には期待がもてない。このような観点から二波長測光法を用いて、フルスケール O.D. = 0.01 を活用すれば、分析手段の改革であり、極微量精密分析の可能であることを示す。

本文中ではイソフタル酸中のテレフタル酸の定量について検討した、不純物の混在比は0.02%程度まで定量ができることが明らかとなった。

1) 分光光度計法による定量

従来の分光光度計では複雑な計算を要した2種混合試料の吸光分析が、二波長測光法を応用すれば容易に、しかも高精度で測定できる。

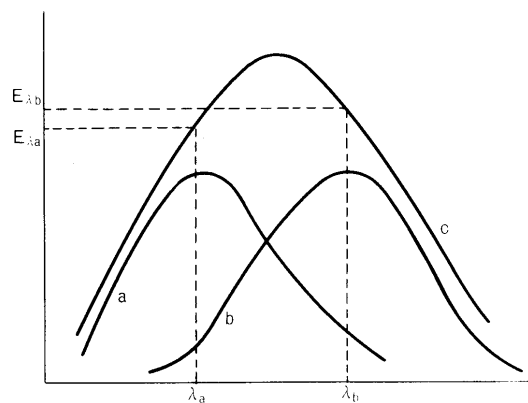


図1 吸収スペクトル分布曲線

一般には吸光分析は単味試料で行なうが、2つ以上の成分が存在し、分離不能か極めて困難な分別操作を必要とする場合がある。

溶液中に存在する成分がそれぞれベールの法則に従って、その上各物質間に相互作用がないときには、その混合溶液の吸収スペクトル分布曲線は、独立単味で存在したときのおおのの吸収スペクトル曲線の和となる。¹⁾

いま A, B 2 成分系の各成分を定量する場合、おおのの純物質の吸収曲線を a, b, とし、ある波長 λ_a , λ_b における吸収係数が A 成分につき $\epsilon_a \lambda_a$, $\epsilon_b \lambda_a$, B 成分につき $\epsilon_b \lambda_b$, $\epsilon_a \lambda_b$ であるときは、混合物質の吸収曲線 C の波長 λ_a , λ_b における吸光度はそれぞれ次式で与えられる。

$$E_{\lambda a} = C_a \epsilon_a \lambda_a + C_b \epsilon_b \lambda_a \cdots \cdots (1)$$

$$E_{\lambda b} = C_a \epsilon_a \lambda_b + C_b \epsilon_b \lambda_b \cdots \cdots (2)$$

この両式で $E_{\lambda a}$, $E_{\lambda b}$ は実測できる値であり、それぞれ分子吸光係数は、あらかじめ求めておくことができるので両式から C_a , C_b を計算で求めることができる。

このようにいままで使用していた分光光度計でも計算により測定できるが、

- i) A, B 両成分の吸収曲線が近接しないこと。
- ii) 読み取り誤差などのため高精度が期待できないこと
- iii) 連立方程式を解く必要があり計算に時間がかかることなどが問題となる。二波長測光法によれば、これらの諸制約が一挙に解決できる。柴田、古川ら²⁾は、既にアルセナゾⅢ法によるトリウム定量法で二波長光度計を使用して測定している。

2) 二波長測光法による定量

柴田、古川ら²⁾はいろいろな混合物質における測定を行ない、妨害成分の測定上でのマスキングについて詳述している。

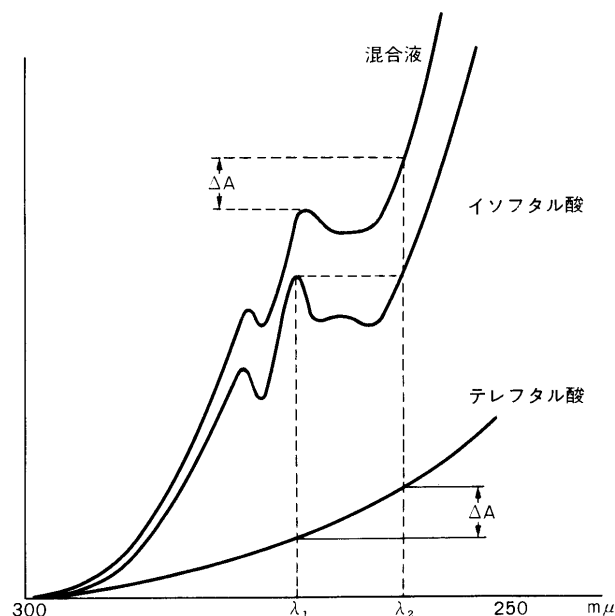


図2 イソフタル酸とテレフタル酸の吸収スペクトル

ここに混合溶液A,Bという2成分があった場合、Aを消去して、Bを測定するときには、A試料の吸収スペクトルから同吸光度の波長位置を選定する。これらの波長位置では、A試料の濃度に対するベースラインは、 $\Delta A_a(\lambda_1 - \lambda_2) = 0$ の関係から、変動がない。

この状態の波長位置でB試料の差吸光度 $\Delta A_b(\lambda_1 - \lambda_2)$ が適当な値を示していることを確認する。

この λ_1 , λ_2 の選択は、各試料の吸収スペクトルの形から決定される。したがって、

- i) 共存物質の吸収スペクトルから、共存物質の濃度が変化しても吸光度の変化がない。即ち同吸光度点の波長位置に λ_1 , λ_2 を選ぶ。

($\Delta A \lambda_1 - \lambda_2 = 0$ の点)

- ii) i) の条件を満足し、かつ指標物質では差吸光度 $\Delta A' \lambda_1 - \lambda_2$ が得られる波長位置

の条件が必要となる。

イソフタル酸とテレフタル酸の場合には i) ii) の必要条件が充たされる。

図3に紫外全域320-220m μ の図4に320-240m μ の吸収スペクトルを示した。イソフタル酸の同吸収点は280-260m μ のショルダー部分にある。吸収ピーク位置 λ_1 を277m μ に設定し、これとほぼ同じ程度の吸光度を示す波長 λ_2 を262m μ に仮設定した。共存物質のマスクングであるからイソフタル酸の濃度変化即ち吸光度の変動に対して、差吸光度 $\Delta A_i(\lambda_1 - \lambda_2) = 0$ になる2つの波長を見付けなければならない。

そこで濃度変化に対する差吸光度変化を仮設定波長の前後で4,5回測定し、変動が最小を示す位置に波長を設定する。この選定は特に面倒なものではない。最初波長 λ_1 を1m μ 程度大きく前後に変えて差吸光度変化の方向及び量を記録し、濃度変化に対して合致する方向に追い込めばよい。図5に $\lambda_1 \lambda_2$ の決定の経過を示した。

Abs. 0.1では、この操作は殆んど問題はないが、Abs.0.01フルスケールになると慎重を要する。このスケールは従来の自記分光光度計の100倍拡大であるから、わずかの吸収セルの位置が変わっても、セルの透過面の正反射光の影響が問題となるから、吸収セルを一旦セルホルダーに装着したならば、動かさないことが必要となる。

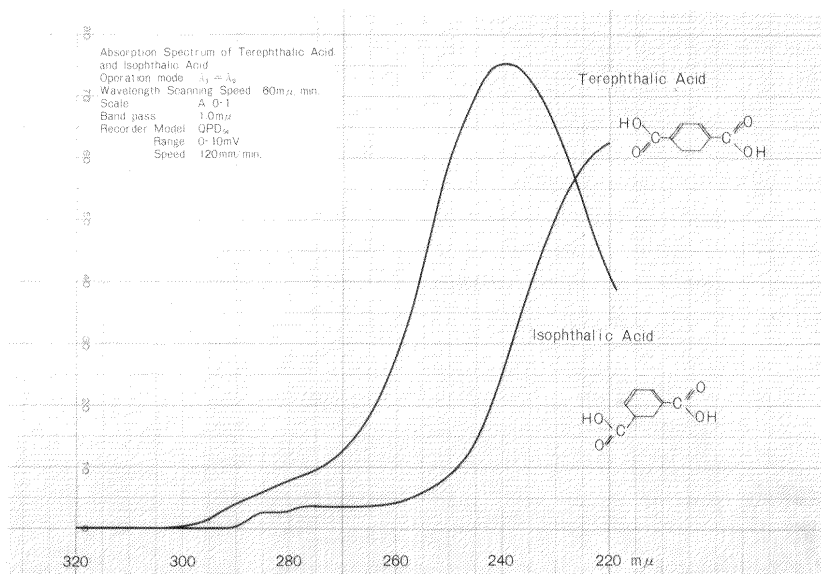


図3 イソフタル酸、テレフタル酸の紫外吸収スペクトル

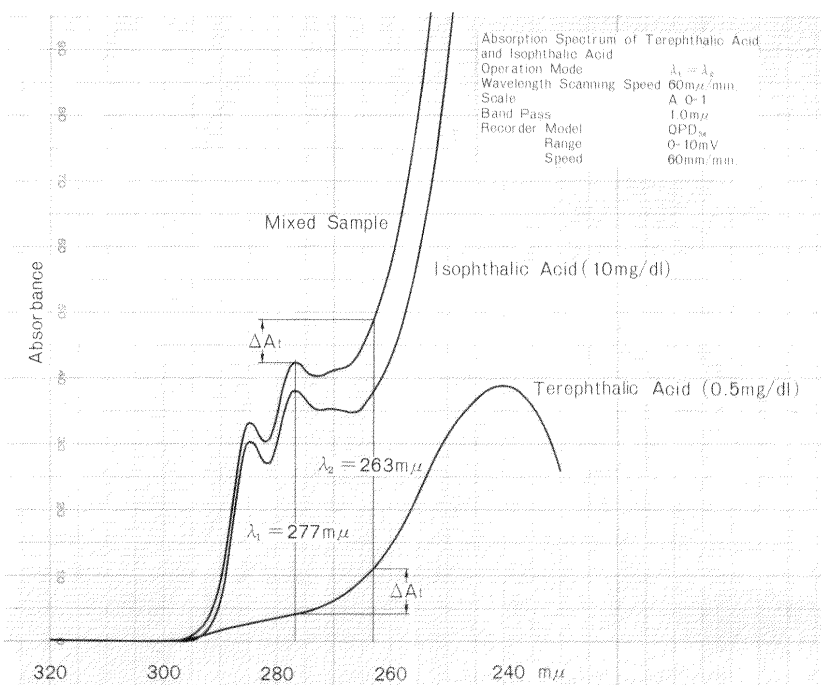


図4 イソフタル酸、テレフタル酸の吸収スペクトル

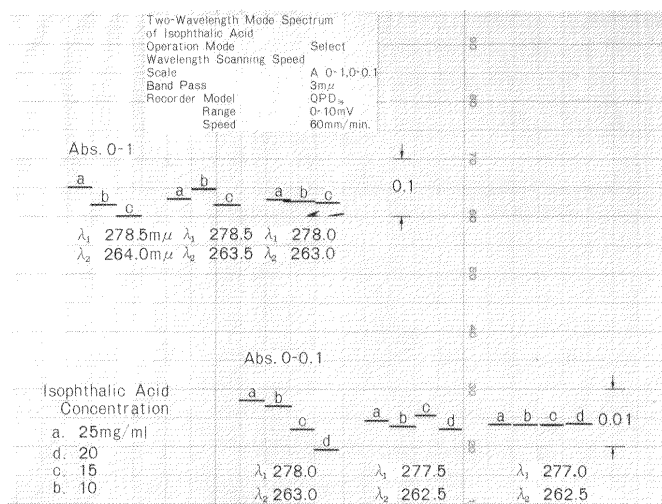


図5 二波長測光法によるベースラインの選定

そこで筆者らは図6に示すように注射器を用いて、試料液の交換を行なった。このようにすれば所期の目的を達することができる。また、Abs.0.01スケールは、共存物質に対して指標物質が微量であるときに使用するものであり、吸収スペクトルは、ほとんど共存物質のそれに近似である。したがって濃度は、大体見当がつき、ベースラインの決定は、実質的に、その濃度の近辺でチェックすればよい。図7に示すようにイソフタル酸濃度25~15 mg/dℓー吸光度0.95~0.57ーの範囲においてベースラインの変動をチェックした。Abs.0.0003程度に押えることができる。

また図4からも判るように、設定波長 λ_1 、 λ_2 ではテレフタル酸の吸収スペクトルの傾斜部分を用い定量するが、ベールの法則は、各波長に対して成立するので差し支えない。

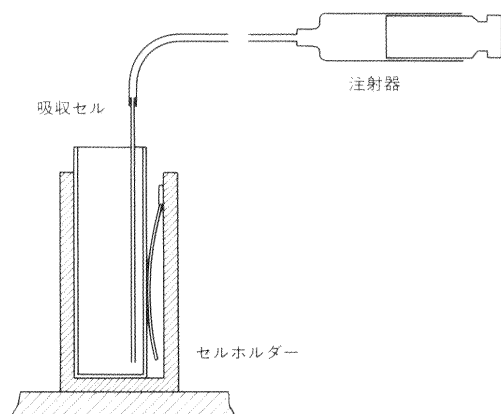


図6 試料溶液の交換の一例

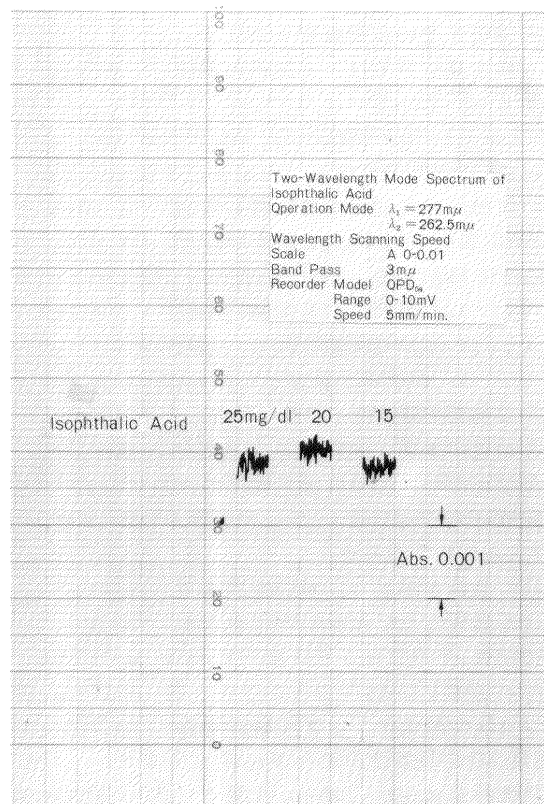


図7 二波長測光法によるイソフタル酸の濃度変化による

結果と考察

二波長測光方式は2つの波長における各吸光度の差を測定するため外部の影響を受けにくい。この特長を活かして高感度の測定が可能である。本器にはフルスケール Abs.0.01があるので非常に微弱な変化量も測定できる。

供試試薬はおのの市販特級試薬を使用し、これをアルカリ水溶液(0.5N)に溶解して適宜混在比(重量比)を変えて試料を調整した。イソフタル酸とテレフタル酸の混合溶液でおのの試料の吸光度が同じ程度の場合には、従来の方法でも問題がないので省略する。

そこで、多量のイソフタル酸—20mg/dℓ, Abs.0.76相当—をベースとし、少量のテレフタル酸—0.2mg/dℓ附近—を指標物質として両者で比較測定した結果を表1および図8、図9に示した。前段階として共存物質を消去するためイソフタル酸の濃度を変化させ、ベースラインの変動をチェックした。

ベースラインの変動は測定精度におよぼす影響が直接的であり、本測定法の根幹となる原則であるから、徹底的かつ慎重に行なわねばならない。この操作過程は、紫田、古川²⁾らが詳述している。

これらのデータから明かなことは、分光光度計法では±10%程度の誤差が避けられないが、この原因は主として読取り精度によるものと考えられる。しかるに2波長測光法によれば、1%以下であることが確認できた。0.2mg/dℓでAbs.0.024(記録計読みで24目)であり、これから不純物(テレフタル酸)0.5%以下、含有しても検出できることが、明らかである。

次に、イソフタル酸共存物質のマスキングについて、高濃度領域で検討した結果を述べる。図10にイソフタル酸濃度を40mg/dℓ(Abs. 1.56/278mμ) 60mg/dℓ(Abs. 2.34/278mμ)にして、テレフタル酸をそれぞれに一定量加えて、高濃度域で ΔA277-262.5の定量性を測定し

表1 分光光度計法と二波長測光法との比較

混合試料 mg/dℓ		分 光 光 度 計 法			2 波 長 測 光 法		
iso-ph.	tere-ph.	吸 光 度	重 量	誤 差	吸 光 度	重 量	誤 差
20	0.1	0.017	0.11mg/dℓ	+10%	0.012	0.1 mg/dℓ	0 %
"	0.2	0.025	0.23	+15	0.024	0.2	0
"	0.3	0.040	0.265	-12	0.0368	0.302	+0.5
"	0.4	0.065	0.43	+7.5	0.0492	0.402	+0.5

註1) 重量は検量線から逆算し、誤差は調整試料を真値として計算した。

2) 設定波長 $\lambda_1=277\text{m}\mu$, $\lambda_2=262.5\text{m}\mu$

3) 吸光度は $\Delta A_{277-262.5}$ 値を示した。

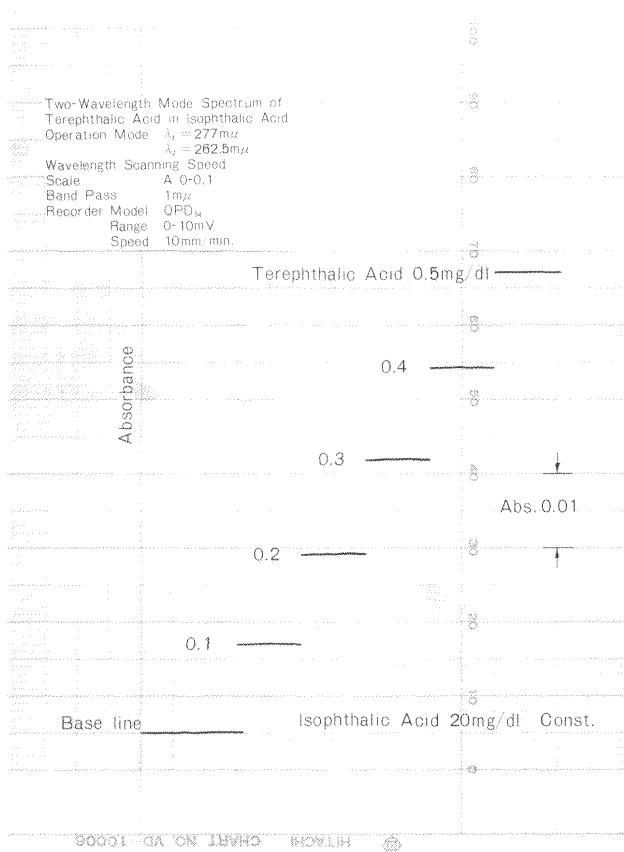


図8 イソフタル酸中のテレフタル酸濃度と吸光度の測定

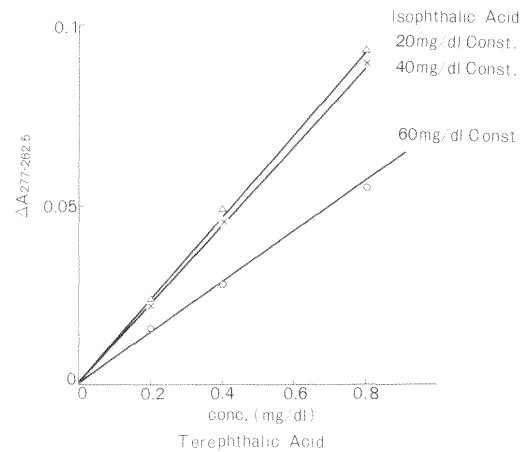


図10 イソフタル酸濃度変化に対するテレフタル酸の直線

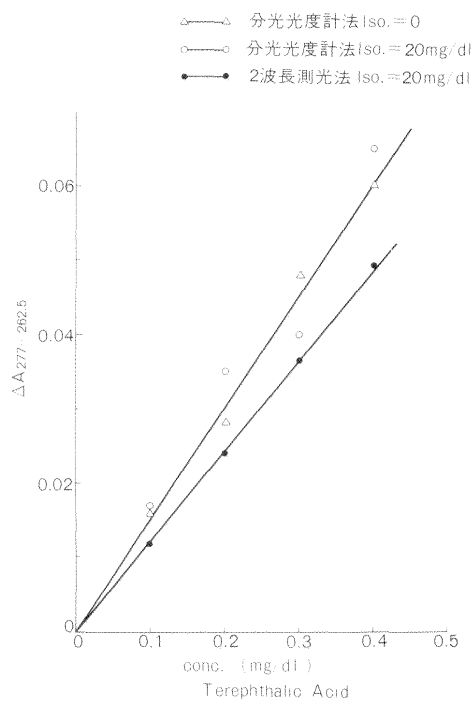


図9 分光光度法と二波長測定法による検量線の比較

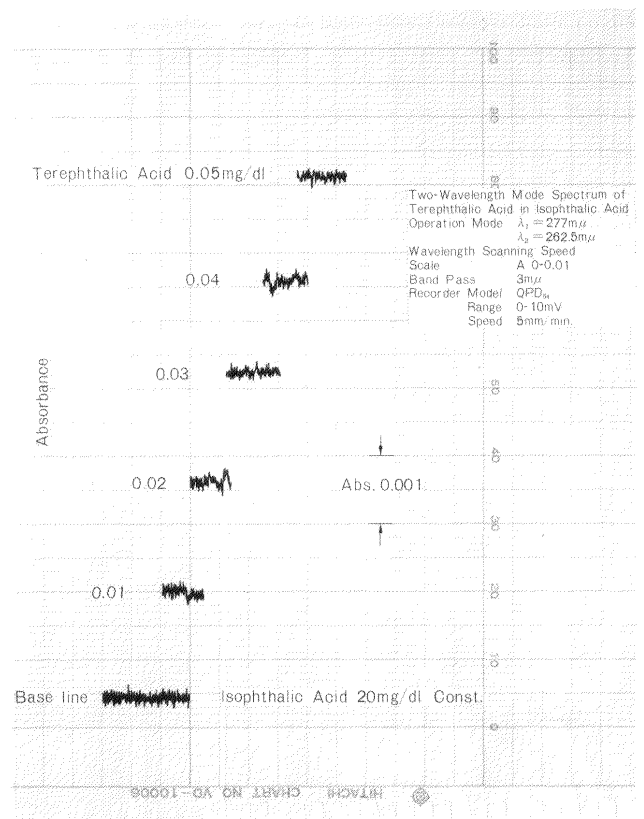


図11 吸光度0.01スケールによる……

た。これから、 $60\text{mg/d}\ell$ 程度までは、直線性があることがわかった。

これにより混在比検出能力は、前述の値より約2.5倍ほど、増加するといえる。

次に混在比が $1000=1$ （イソフタル酸 $20\text{mg/d}\ell$ /テレフタル酸 $0.02\text{mg/d}\ell$ ）の前後でフルスケールAbs.0.01を用いて測定した結果を図11, 12に示した。直線性のよい検量線が得られ、ノイズレベルはAbs.0.0002程度であり、 $S/N=2$ を検出能力の目安とすれば、Abs.0.0015/0.01 $\text{mg/d}\ell$ であるから、大体0.02%含有まで検出できることになる。この場合の測定には先に述べたように、吸収セルを動かさないことや、試料液交換時の取扱に注意すると共に、溶液の交換に伴う諸現象、即ち浮游物および気泡などによる影響のため安定時間（5分程度）を要する。また、前述したように、共存物質のマスキングは、その濃度付近で慎重に行なう必要がある。

表2に比較を示したが、分光光度計法では読みとり精度から不可能である。二波長測光法では、5%以下の高

精度で測定できることがわかる。なお、図15に、テレフタル酸（特級）の微分スペクトルを示した。これから吸収スペクトルにショルダーがあることがわかる。

また図13には標準添加法による定量法を示した。この方法は、フルスケールAbs.0.01を用いるときには特に簡便、効果的である。即ち供試試料（テレフタル酸 $0.02\text{mg/d}\ell$ をこの場合未知試料として扱った）を記録しておき、これに高濃度の指標物質（ $p=2\text{mg/d}\ell$ を使用）をマイクロシリンジではかり取り $20\mu\ell$ ずつ添加して攪拌棒でよく混合し濃度を高くしていく。このようにして、逐次添加して記録すれば、添加量と濃度の関係から図14のような検量線が得られるから、外挿法により供試試料の濃度が算定できる。この場合、供試試料量を 3ml とし、 $20\mu\ell$ 添加すれば、増加濃度は $2 \times 20/3,020 \div 0.013\text{mg/d}\ell$ であることは明らかである。

以上から求めた値は、 $0.019\text{mg/d}\ell$ であり（-5%誤差）であり好結果が得られたと考える。

表2 分光光度計法と2波長測光法との比較

混合試料 ($\text{mg/d}\ell$)		分光光度計法			2波長測光法		
iso-ph.	tere-ph.	吸光度	重量	誤差	吸光度	重量	誤差
20	0.01	0.002			0.0015	0.0095	-0.5%
"	0.02	0.005			0.0032	0.0205	+2.5
"	0.03	0			0.0046	0.03	0
"	0.04	0			0.0062	0.0405	+1.3
	0.05	0.002			0.0077	0.05	0

註1) 重量は検量線から逆算し、誤差は調整試料を真値として計算した。

2) 設定波長 $\lambda_1=277\text{m}\mu$, $\lambda_2=262.5\text{m}\mu$

3) 吸光度は $\Delta A_{277-262.5}$ 値を示した。

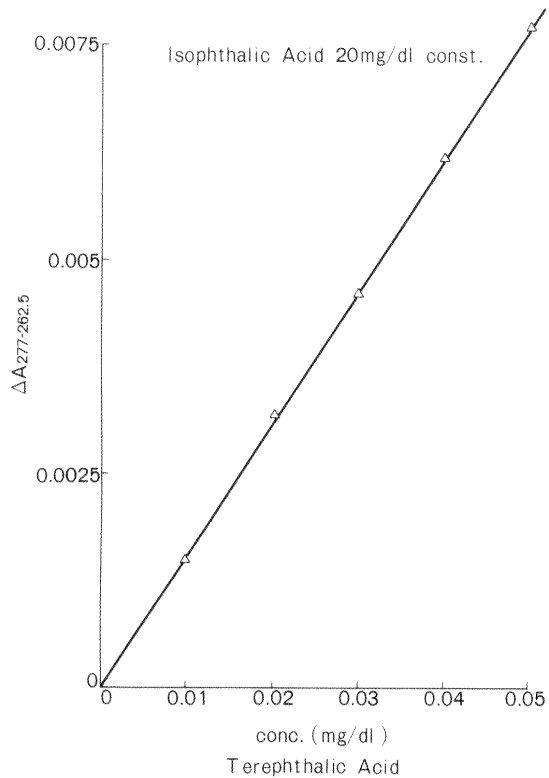


図12 吸光度0.01スケールによるイソフタル酸中のテレフタル酸濃度と吸光度の関係

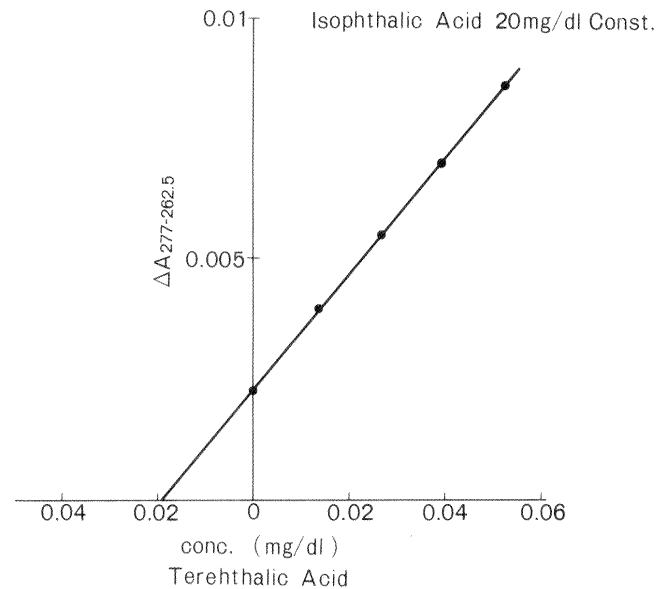


図14 標準添加法によるテレフタル酸の定量

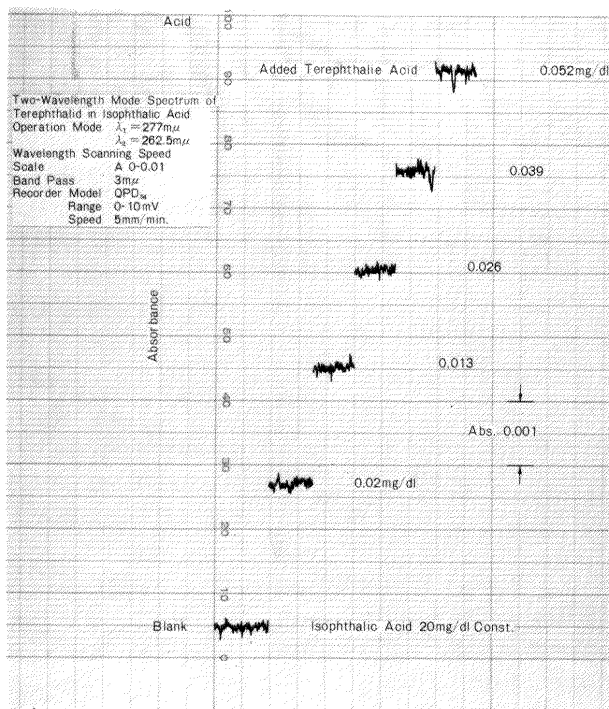


図13 吸光度0.01スケールによるイソフタル酸中のテレフタル酸を標準添加法で測定

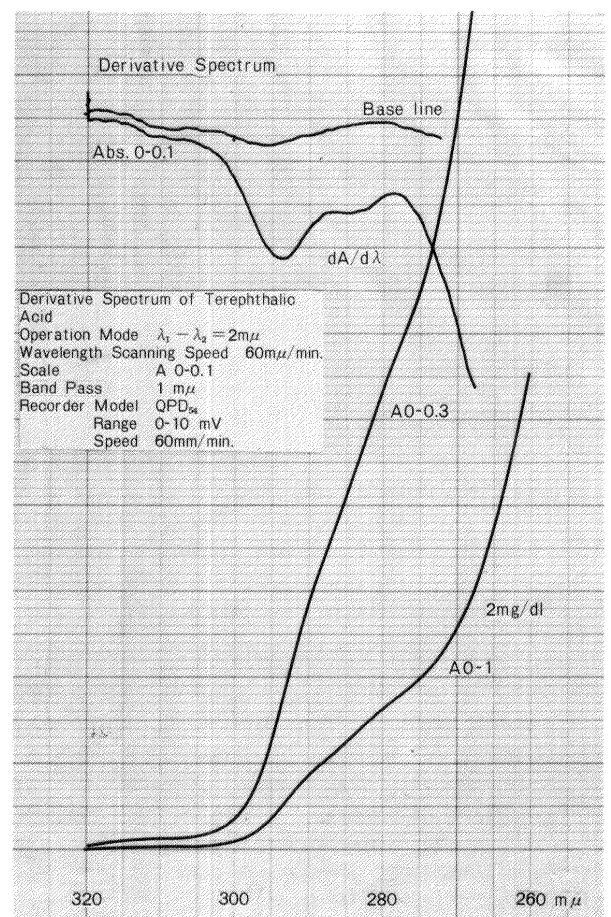


図15 テレフタル酸の微分スペクトル

結 言

2種混合系の直接定量分析に、二波長測光法はきわめて有用であることが本実験で明らかである。今回はイソフタル酸中のテレフタル酸の極微量定量法について初源的な方法を検討した。

フタル酸の異性体については、それぞれの紫外域吸収スペクトルの形から、二波長測光法の必要条件を満足する。

テレフタル酸中の微量イソフタル酸、イソフタル酸中の微量フタル酸については、次報で報告する。

また、僥倖をえてフタル酸とイソフタル酸の吸収スペクトルは同吸光度の波長選定で合致する点があり、これからテレフタル酸も加えて3種混合溶液の直接定量も可能性はある。

文 献

- 1) 42年度九州地区分析化学講習会テキスト
- 2) 柴田, 古川: THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
二波長測光法の比色分析への適用
(Vol.11-No.5 (1968))

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 12 No. 3

昭和44年5月20日印刷

非 売 品

編集人 石 川 直 成

発行所 株式会社日立製作所

昭和44年6月1日発行

年6回毎偶数月発行

発行人 白 川 義 雄

印刷所 株式会社日立印刷所
