

UV-Vis および ATR による不透明な液体の測定

Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計と ATR 光ファイバープローブを組み合わせた測定



著者

Alex Clarke
Hellma UK Ltd
Rob Wills
Agilent Technologies
LDA UK Ltd

概要

減衰全反射 (ATR) プローブと Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を組み合わせることで、不透明な液体を希釈せずに迅速かつ容易に測定できることを実証しました。

はじめに

現在、ATR は、FTIR 分光分析の代名詞的存在とみなされており、最も広く使用されているサンプリング技術です。しかし、ATR は、UV-Vis 分光分析にも応用することができ、光ファイバープローブを用いた不透明な液体の測定に特に有益です。

塗料、インク、食品着色料、日焼け止め、液体医薬品などのサンプルは、多くの場合、色素が多く、光学的に不透明です。標準の 10 mm 光路長キュベットを用いて、このようなサンプルを測定することは、場合によっては可能ですが、数百倍の希釈により、大量の溶媒を消費する必要があり、大きな希釈誤差が発生する可能性があります。塗料や日焼け止めなどのエマルジョンサンプルの場合、サンプルが「分離」して構成成分に分解してしまうため、希釈ができないことがあります。

ATR 分光分析は、このような課題を克服する革新的なサンプリング技術です。ATR では、分光光度計からの入射光が、測定結晶に対して斜めに入射します。結晶内部での反射により、結晶表面でエバネッセント波が発生して、結晶と直接接触しているサンプルが定在波と相互作用し、光エネルギーの一部を吸収します。

UV-Vis 光ファイバ ATR プローブでは、一般的に使用されている結晶はサファイアであり、入射光は、結晶表面で 60° の角度を形成するように結晶に入射します。この結晶は、表面で 3 回の反射が発生するように設計されています (図 1)。表面より上での波の「有効高さ」は、結晶とサンプル媒体の相対屈折率、入射角、波長の関数です。複数の反射により、有効光路長が延長されます。このプローブの場合、250 nm における有効光路長は約 $3\ \mu\text{m}$ であり、1,000 nm では約 $13\ \mu\text{m}$ まで増加します。

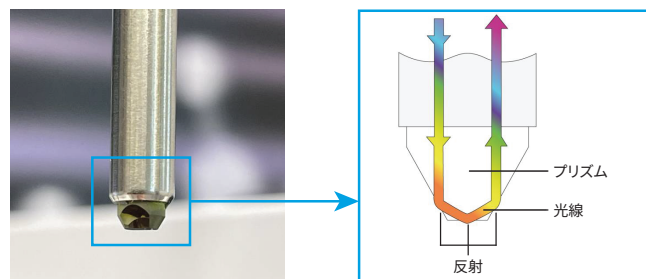


図 1. 減衰全反射プローブのサファイア結晶内への入射光の経路の概略図

光ファイバープローブが、正確かつ信頼性の高い結果を提供するためには、分光光度計から光ファイバサンプリングヘッドまで、そして再度機器へと、光が効果的に導かれることが重要です。Cary 60 UV-Vis 分光光度計 (図 2) は、ファイバーへの効率的な光カップリングを可能にする集束度の高いビームを備えています。Cary 60 UV-Vis の強力なキセノンフラッシュランプは、光ファイバー測定において十分な光強度を保証する、明るい光パルスを生成します。信頼性の高いキセノンフラッシュランプには、10 年間の保証も付いています。さらに、Cary 60 の独自の光学設計により、室内光による歪みや干渉の影響を受けることはなく、これは、サンプルコンパートメントの外側での光ファイバーを用いたリモート測定においてきわめて重要です。



図 2. Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計

実験方法

例示するデータは、光ファイバーインタフェースと Hellma Katana XP 6、3 回反射 ATR プローブ (Hellma 部品番号 PK1KSSZUEASM210N) を搭載した Cary 60 UV-Vis 分光光度計を使用して収集しました。スペクトルは、最初にクリーンな結晶を用いてベースラインを測定した後、結晶をサンプル内に浸漬してサンプルを測定することにより収集しました。スペクトルの収集および測定スペクトルの処理には、Agilent Cary WinUV ソフトウェアを使用しました。スペクトルはすべて、表 1 に示す測定条件を用いて収集しました。

表 1. 測定条件

パラメータ	値
測定モード	吸光度
波長範囲	800~250 nm
スペクトルバンド幅	1.5 nm
信号平均化時間	0.4 秒
データ間隔	2 nm
スキャンスピード	150 nm/min

塗料

ボトル入り赤色、黄色、青色塗料は、図 3 に示すように、ATR プローブの先端部を各サンプルに直接挿入して測定しました。サンプル間では、プローブ先端部をペーパータオルと水で洗浄し、新たに洗浄した結晶により、新たなベースラインを記録しました。



図 3. 黄色塗料を、Hellma Katana XP 6 ATR 光ファイバープローブを備えた Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を使用して測定している様子

黄色塗料サンプルの例では、スペクトルは、440 nm において吸光強度が約 0.15 Abs のピークを示しています。この波長における有効光路長は約 6 μm です。標準の 10 mm キュベットでサンプルを測定した場合、吸光度は約 250 Abs に相当しており、これは分光光度計の測定範囲を大幅に超える値でした。したがって、このサンプルを 10 mm キュベットで測定するには、約 200 倍の希釈が必要になります。

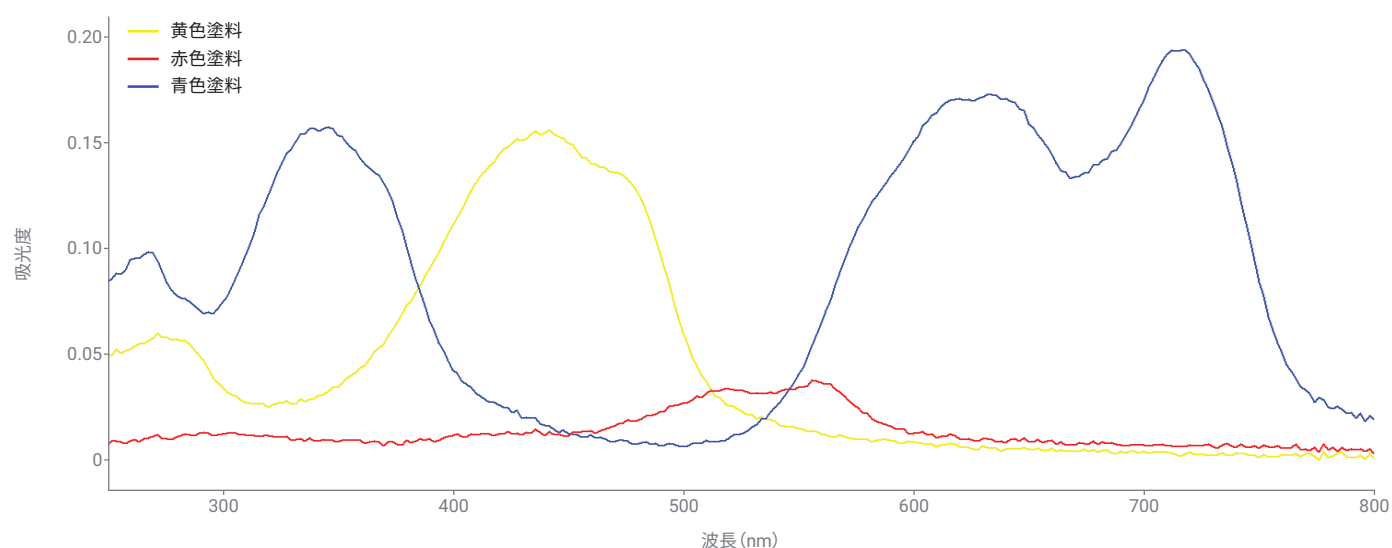


図 4. 分析した塗料の吸光度スペクトル。各トレースの色は、分析した塗料の色に対応しています。

食品着色料

ロイヤルブルーの食品着色料（図 5）の測定スペクトルを図 6 に示します。このサンプルは、650 nm において測定値 1.27 Abs の強い吸収バンドを示しています。この波長における有効光路長は、約 8.5 μm と計算されます。これは、標準の 10 mm キュベットで測定した場合の理論上の吸光度 1,500 Abs に相当しており、市販のほとんどの UV-Vis 分光光度計の測定範囲内にサンプルを収めるには、最低 1,000 倍の希釈が必要になります。



図 5. ロイヤルブルーの食品着色料

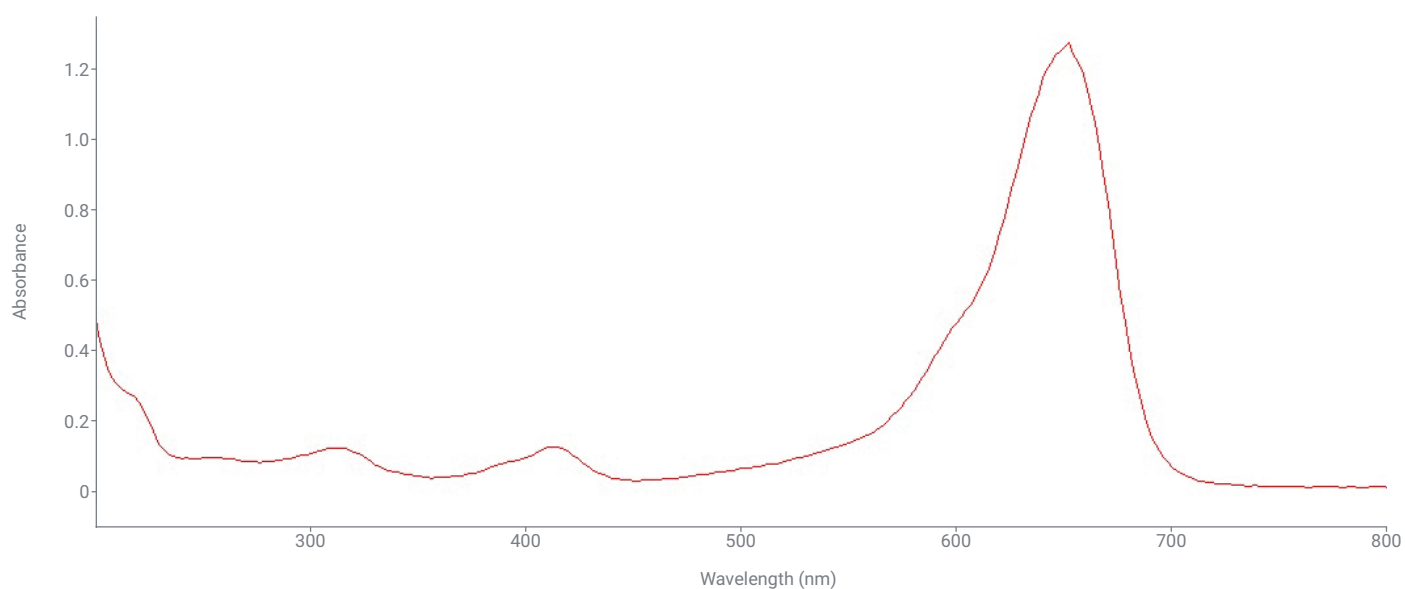


図 6. ロイヤルブルーの食品着色料に対して測定した吸光度スペクトル

日焼け止め

日焼け止めには、鉱物系の原材料が含まれており、これらはUVA（有害）およびUVB（非常に有害）光線を皮膚から反射させることにより、皮膚を保護します。図 7 のスペクトルは、それぞれ防御指数が異なる、同一ブランドの 3 種類のボトル入り日焼け止めを実施した測定結果を示しています。

防御指数が高くなるにつれて吸光度が低下していますが、これは、防御指数が高い製品が多く光線を反射するように設計されているためであり、予想どおりです。

吸光度スペクトルを反射率スペクトルに数学的に変換することにより、この傾向が視覚的に把握しやすくなります。図 8 は、防御指数が高くなるにつれて反射率が増加していることを明確に示しています。UVA、UVB、UVC 領域は、参考情報として表示しています。

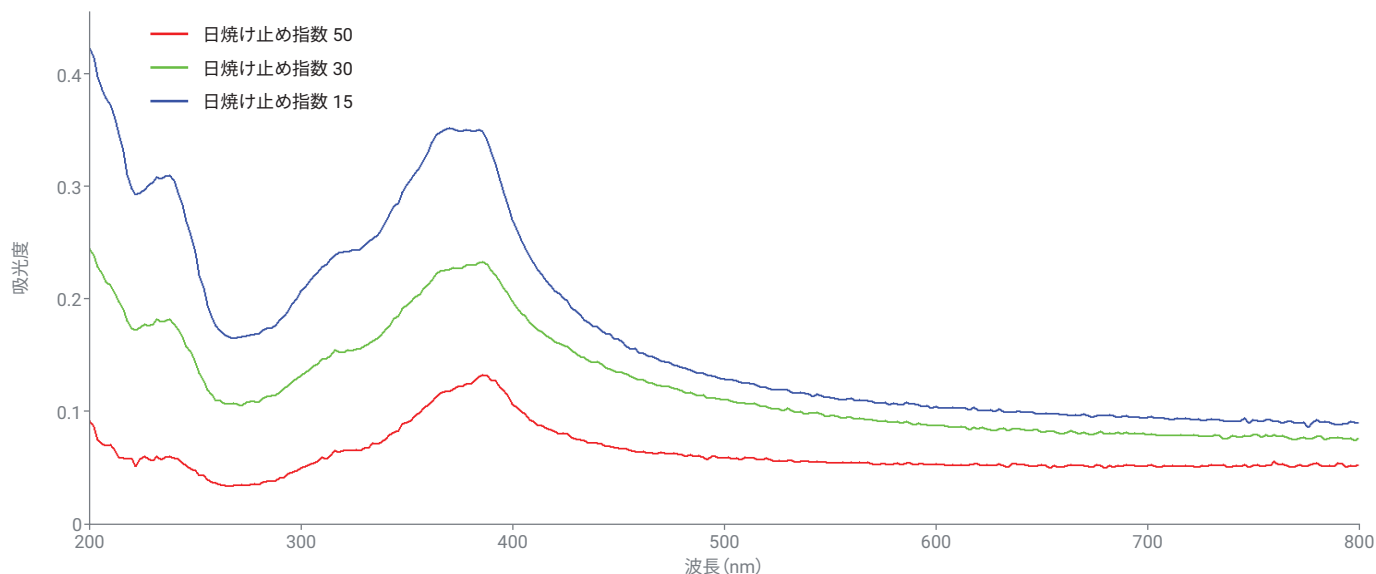


図 7. それぞれ防御指数が異なる、同一ブランドの 3 種類のボトル入り日焼け止めの吸光度スペクトル

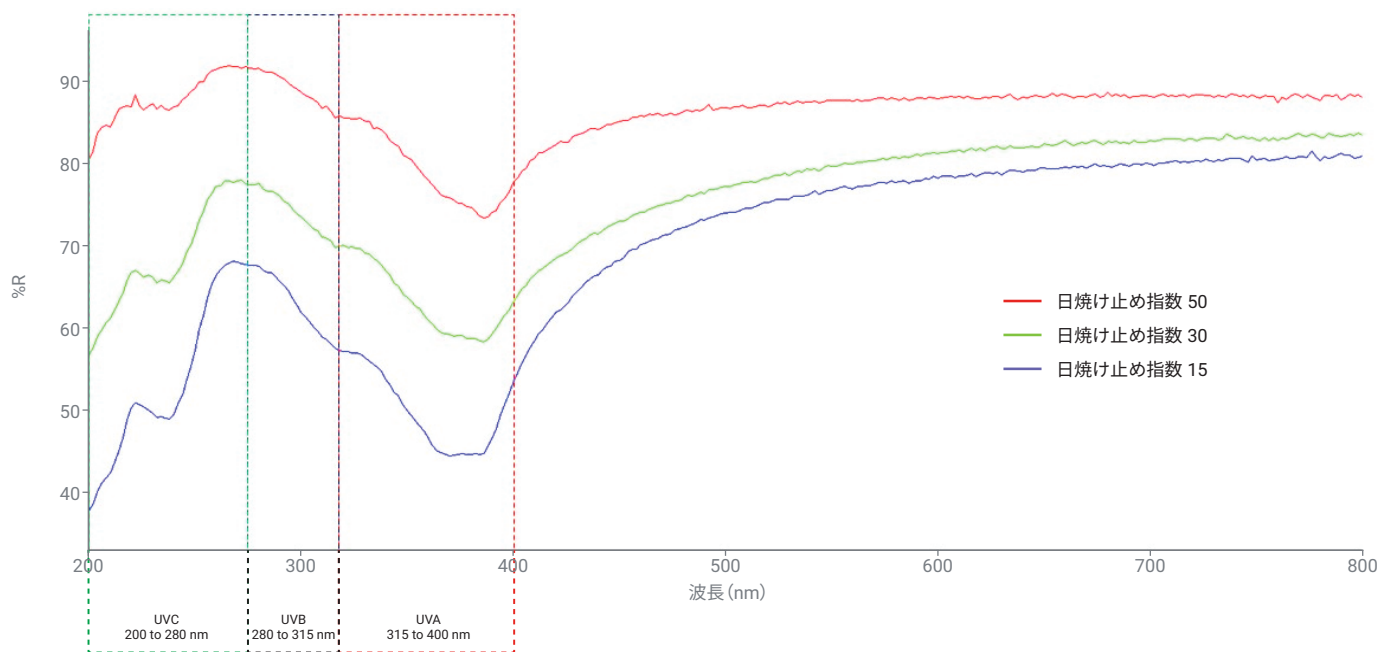


図 8. 防御指数が異なる 3 種類の日焼け止め製品に対して測定した反射率スペクトル。防御指数が高くなるにつれて反射率が増加するという相関関係を示しています。

反応キネティクス

ATR プローブを備えた Cary 60 UV-Vis は、吸光度の大幅な変化を伴う反応の経時変化を追跡する有用なツールにもなり得ます。フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) は、固相ペプチド合成で広く使用される塩基不安定性保護基です。ピペリジンを添加すると、迅速に除去することができますが、これは、Fmoc と反応して副生成物であるジベンゾフルベンを生成し、この多環芳香族炭化水素が、非常に強力な UV 吸収剤となります (図 9)。

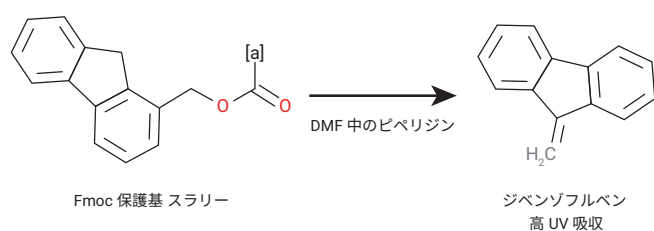


図 9. フルオレニルメトキシカルボニルとピペリジンの反応によるジベンゾフルベンの生成

図 10 は、ATR プローブを備えた Cary 60 UV-Vis を使用して、脱共役反応を追跡する方法を示しています。プローブは、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶媒中のポリスチレン樹脂ビーズに結合した、Fmoc 末端ペプチドの混濁したスラリー溶液を収容したベッセルに挿入されます。Cary 60 UV-Vis を、280 nm において 1 秒ごとに吸光度測定値を取り込むように設定して、データ取得を開始します。この例では、DMF 溶液に 20 % ピペリジンを添加することにより、約 2.8 分後に、反応が開始されます。6 分後、反応曲線は横ばいとなり、Fmoc が完全に脱共役されたことを示しています。

吸光度の全増加量はわずか 0.05 Abs ですが、標準の 10 mm 光路長キュベットで測定した場合、これは 140 Abs を超える増加量に相当します。

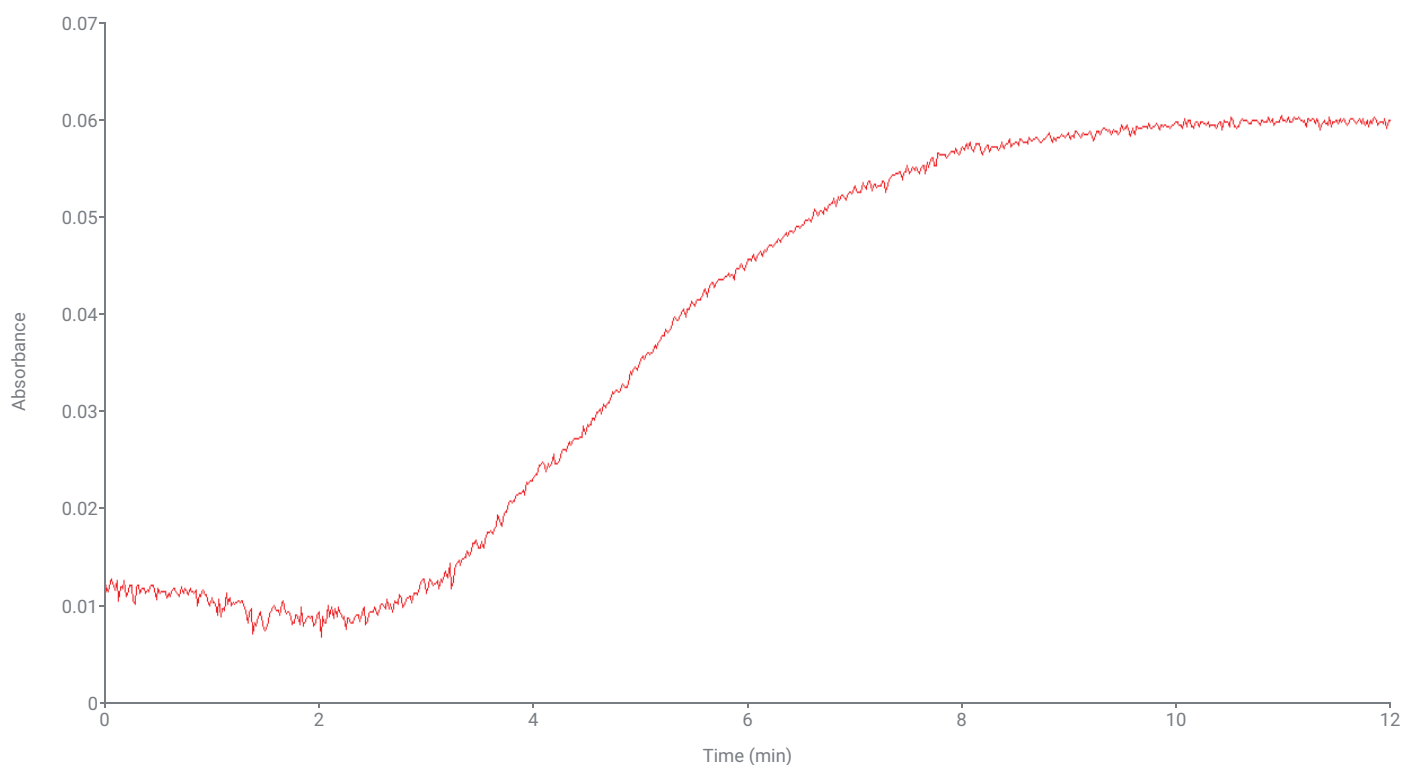


図 10. ポリスチレン樹脂ビーズからの Fmoc 末端ペプチドの脱共役反応の進行状況

ATR プローブを備えた Cary 60 UV-Vis を使用して測定した吸光度値と、標準の 10 mm キュベットで測定を実施した場合の理論上の吸光度値を比較することにより、標準の 10 mm キュベット使用の限界が明らかになります。表 2 に示すように、標準のキュベットを使用した場合、大幅な希釈を実施しないと、サンプルを測定することができませんでした。追加のユーザー操作により、以下が発生する可能性があります。

- 希釈誤差のリスクの増大
- 汚染の発生
- サンプルの変化（例えば、成分の分離など）
- 反応および反応キネティクスへの影響

表 2. 4 種類のサンプルの吸光度値の比較

サンプル/アプリケーション	黄色塗料	青色の食品着色料	日焼け止め SPF 15	Fmoc 脱保護のモニタリング
ATR による吸光度測定値	0.15 Abs	1.27 Abs	0.35 Abs	0.05 Abs
10 mm 標準キュベットの相当吸光度	250 Abs	1,500 Abs	700 Abs	140 Abs
必要な希釈	約 200 倍	約 1,000 倍	希釈不可	希釈不可

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計と Hellma Katana XP 6 ATR プローブを組み合わせることにより、従来は大幅な希釈を必要とした光学的に不透明な液体の測定や、従来のメソッドでは吸光度の変化が大きすぎる反応のモニタリングに対して、実用的で使いやすいソリューションを提供できることを実証しました。Cary 60 UV-Vis と ATR プローブの組み合わせは、日常的な品質管理、研究開発、研究および教育ラボなど、幅広いアプリケーションに対応する強力なツールです。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-010245

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, October 14, 2025

5994-8652JAJP