

UV-Vis 分光光度計の 基礎

入門書





目次

1	UV-Vis 測定の基本原理	3
1.1	電磁スペクトル	3
1.2	波長と振動数	3
1.3	紫外可視スペクトル	3
1.4	透過率と吸光度	4
1.5	まとめ	4
2	最新の UV-Vis 分光光度計について	5
2.1	機器の設計	7
3	UV-Vis 測定に最適なパラメータの選択	13
3.1	光学セルの選択	13
3.2	サンプルの温度制御	16
3.3	サンプルの攪拌	16
3.4	低温での測定	16
3.5	溶媒の透明度	17
3.6	最適なスペクトルバンド幅	18
3.7	迷光	19
3.8	UV-Vis 機器の直線性範囲	19
3.9	その他の役立つ情報	20
3.10	波長または逆センチメートル	20
4	一般的な UV-Vis アプリケーションの概要	21
4.1	同定—スペクトルと構造	21
4.2	同定の確認	22
4.3	分子の定量	22
4.4	カイネティクス	24
4.5	色測定	26
4.6	化合物の構造変化	28
4.7	タンパク質と核酸の溶解温度	28
4.8	多成分分析	30
4.9	ソフトウェア要件	32
5	用語集	34

1. UV-Vis 測定の基本原理

1.1 電磁スペクトル

紫外線 (UV) および可視光線は電磁スペクトルのごく一部であり、この他にも、ラジオ波、赤外線 (IR)、宇宙線、X線などの形態の放射線が含まれます。

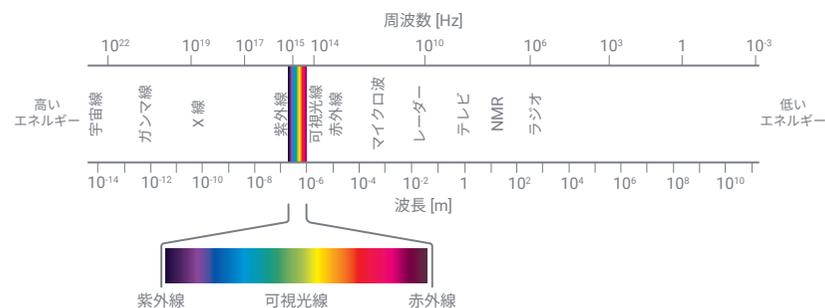


図 1. 電磁スペクトルと、可視光線の波長領域

電磁放射線が持つエネルギーは、以下の式で定義されます。

$$E = h\nu$$

ここで、Eはエネルギー (ジュール単位) hはプランク定数 (6.62×10^{-34} Js)、 ν は振動数 (秒単位) です。

分光分析では、物質がどのように電磁波と相互作用、あるいは放射しているかを研究することができます。分光分析は、測定する波長範囲によっていくつかの種類に分かれます。UV-Vis 分光分析では、電磁スペクトルの紫外領域と可視領域を使用します。赤外線分光分析では、よりエネルギーの低い、スペクトルの赤外部を使用します。

1.2 波長と振動数

電磁放射線は、波動として空間を移動する、交互に発生する電場と磁場の組み合わせと考えることができます。放射線は波として振る舞うことから波長または振動数で分類することができ、以下の式で表されます。

$$\nu = c/\lambda$$

ここで、 ν は振動数 (秒単位)、 c は光速 (3×10^8 ms⁻¹)、 λ は波長 (メートル単位) です。

UV-Vis 分光分析では、波長は一般にナノメートル単位 (1 nm = 10^{-9} m) で表されます。この式

より、波長が短いほどエネルギーが高いことが示され、UV-Vis 分光分析では、低 (短) 波長の紫外線が最も高いエネルギーを持つことになります。感光性のサンプルを測定する場合は、このエネルギーによって不要な光化学反応が引き起こされることがあります。

1.3 紫外可視スペクトル

放射線が物質と相互作用するときに、反射、散乱、吸光、蛍光や燐光 (吸光および再発光)、光化学反応 (吸光および結合破壊) など、いくつかのプロセスが起こることがあります。一般に、サンプルを分析してその紫外可視スペクトルを測定するときは、吸光度を測定します。

光は1つのエネルギー形態であるため、物質による吸光により、物質内の分子 (または原子の) エネルギー量が増加します。分子の総ポテンシャルエネルギーは、以下のように、電子エネルギー、振動エネルギー、および回転エネルギーの合計として表されます。

$$E_{\text{total}} = E_{\text{electronic}} + E_{\text{vibrational}} + E_{\text{rotational}}$$

分子が各形態で保有するエネルギー量は連続しておらず、一連の不連続な準位または状態を取ります。各状態のエネルギー量の差は、以下の順になります。

$$E_{\text{electronic}} > E_{\text{vibrational}} > E_{\text{rotational}}$$

一部の分子や原子では、紫外および可視光の入射光子が、異なる電子エネルギー準位間での遷移を引き起こすに十分なエネルギーを持ちます。つまり、吸光波長が持つエネルギーは、電子を低いエネルギー準位からより高いエネルギー準位に遷移させるために必要なエネルギーであると言えます。図 2 は、ホルムアルデヒドの電子遷移と、それを引き起こす光の波長の例を示しています。

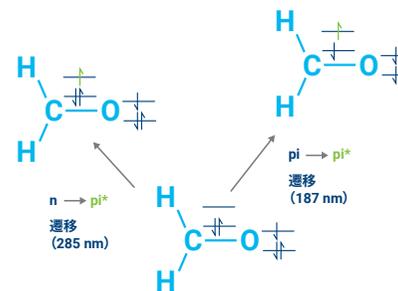


図 2. ホルムアルデヒドにおける電子遷移。波長 187 nm の紫外線により C-O 結合尾電子が励起し、波長 285 nm の光により C-O 結合の酸素原子の電子が励起して遷移します。

このような遷移により、吸光する化学種のエネルギー準位の差を特異的に表す、非常に狭い吸収バンドが現れます。図3に示すように、原子についても同じことが言えます。

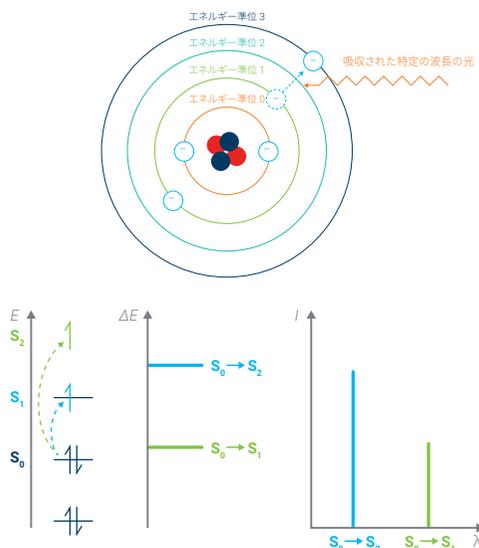


図3. 特定波長の入射光により、原子内の電子が励起します。原子またはイオンの種類（つまり、その元素）と、電子が遷移するエネルギー準位により、吸収される光の波長が決まります。電子の遷移は、2 レベル以上のエネルギー準位間で起こることもあり、電子を原子核からより離れたエネルギー準位に遷移させるには、より高いエネルギー、つまり、より低波長の光が必要になります。

ただし、分子の場合は、電子エネルギー準位に、振動エネルギー準位と回転エネルギー準位が加わります。それぞれエネルギーが異なる多くの遷移が発生する可能性があるため、吸収バンドが広がります（図4を参照）。溶液中では、溶媒と溶質の相互作用のために、さらに幅が広がります。

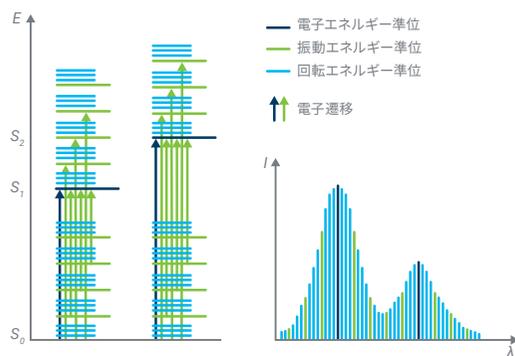


図4. 分子の電子遷移と紫外可視スペクトル（Iは強度、λは波長）

1.4 透過率と吸光度

光がサンプルを透過したり、サンプルで反射するときに、入射光 (I_0) と透過光 (I) とでは、吸収される光の量が異なります。吸収される光の量は、吸光度として表されます。透過率、すなわちサンプルを通過する光の割合は、通常、1 に対する割合またはパーセンテージとして表され、以下の式で定義されます。

$$T = I / I_0 \text{ または } \%T = I / I_0 \times 100$$

吸光度は、以下の式で定義されます。

$$A = -\log T$$

通常、吸光度と濃度および光路長が（セクション 1.9 で説明するランベルト・ベールの法則に従い）直線関係にあることから、多くのアプリケーションでは、吸光度の値が使用されます。

1.5 まとめ

- 紫外光と可視光は、電磁スペクトルの一部です。
- UV-Vis 分光分析では、波長がナノメートル (nm) で表されます。
- 光は、物質で反射、散乱、透過、または吸収されることがあり、光化学反応を引き起こす可能性があります。
- 入射光からのエネルギーにより、電子は異なるエネルギー準位に遷移します。電子遷移は、分子の振動エネルギー準位および回転エネルギー準位間でも起こります。
- 多くの UV-Vis 分光分析アプリケーションでは、吸光度が使用されます。吸光度は $A = -\log T$ として定義されます。ここで、T は透過率です。

2.最新の UV-Vis 分光光度計について

紫外可視 (UV-Vis) 分光光度計では、光源により、紫外から可視光の波長範囲 (通常は 190 ~ 900 nm) の光がサンプルに照射されます。その後、各波長でサンプルにより吸収、透過、または反射された光が測定されます。分光光度計には、近赤外 (NIR) (800 ~ 3200 nm) まで波長範囲が拡張されたものもあります。

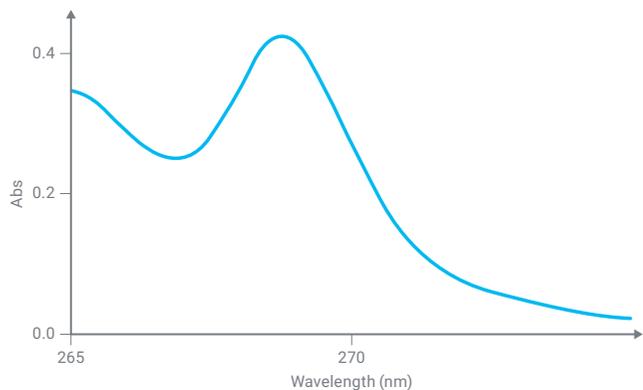


図 5. 約 269 nm における吸収ピークを示す紫外吸収スペクトル

図 5 に示すような測定により得られたスペクトルをもとに、サンプルの化学的または物理的特性を突き止めることができます。一般には、以下のことが可能です。

- 固体または液体サンプル中の分子の同定
- 溶液に含まれる特定分子の濃度の決定
- 一定の波長範囲にわたる、液体または固体を通過するときの吸光度または透過率の特性解析
- 表面の反射特性の特性解析または物質の色の測定
- 化学反応または生物化学的プロセスの調査

UV-Vis 分光光度計にさまざまなアクセサリおよびサンプルホルダを組み合わせることで、多様な測定が可能です。測定機能、固体や液体などのサンプルの種類、および測定条件に応じた各種アクセサリが用意されています (図 6 および図 7)。



図 6. 光ファイバプローブアクセサリを UV-Vis 分光光度計に装着することにより、さまざまな容器に入った液体サンプルを測定できます。

UV-Vis 分光光度計は汎用性に優れた手法であり、およそ 100 年にわたり幅広い分野で使用されてきました。物質の検査/研究、化学/石油化学、およびバイオテクノロジー /製薬ラボで一般的に使用されています。

図7. UV-Vis 分光光度計では、ここに示された多結晶太陽電池のような固体サンプル測定できます。



2.1 機器の設計

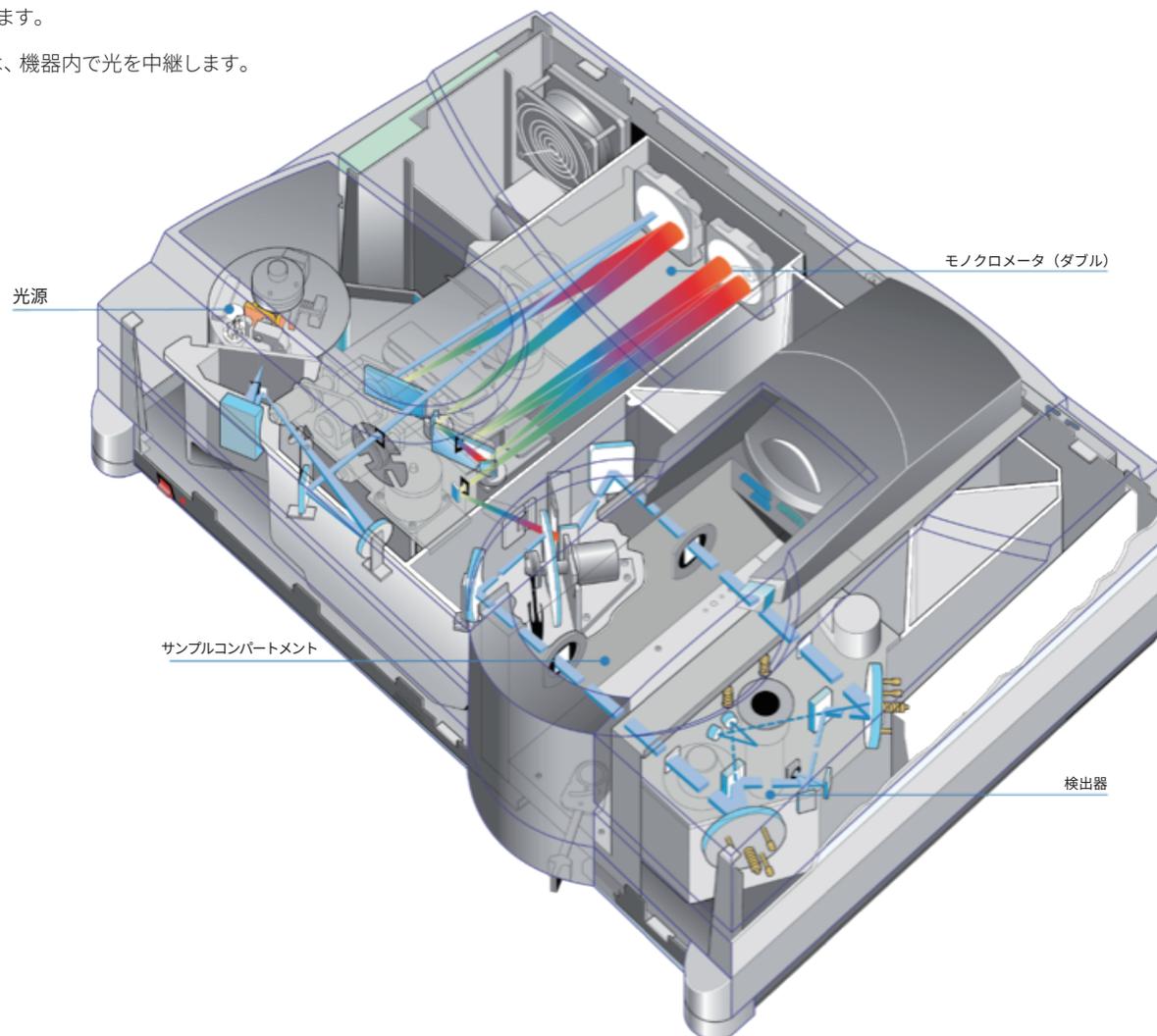
本体の構成

分光光度計の主な構成は以下のとおりです。

- 光源：紫外可視スペクトルにわたる広帯域の電磁放射線を発生します。
- 分光器：広帯域放射線を各波長に分波します。
- 試料室：ここで、光がサンプルを通過、またはサンプルから反射します。
- 1つ以上の検出器：反射光または透過光の強度を測定します。

レンズ、ミラー、光ファイバなどその他の光学コンポーネントは、機器内で光を中継します。

図 8. Agilent Cary 5000 UV-Vis-NIR 分光光度計内部の構成概略図。本図は、高性能機器の構成であり、ルーチン測定用の UV-Vis 分光光度計は、よりシンプルな光学設計となっています。



光源

すべての波長にわたり、少ないノイズで長期間安定して一貫した強度の光を出力できる光源が理想的です。しかし残念ながら、このような光源は存在しません。従来、紫外可視分光光度計では、以下の2種類の光源が使用されてきました。

- 重水素アークランプは、紫外領域で良好な連続的強度を、また可視領域で有効な強度の光を得るために使用されてきました。
- タングステンハロゲンランプは、可視領域全体および紫外域の一部にわたり良好な強度の光を発生します。

近年は、単一のキセノンフラッシュランプが広く使用されるようになってきました。キセノンフラッシュランプを単一光源として使用することにより、従来のランプを2つ使用した場合には得られない大きな利点があります。

重水素 (D₂) アークランプ

重水素アークランプは、重水素ガスからのアーク放電を利用し、紫外領域で良好な連続的強度の光を、また 185 ~ 400 nm の可視領域で有効な強度の光を発生します (図 9 を参照)。近年の重水素アークランプは信号ノイズが低く抑えられていますが、ランプからのノイズが機器の全体的なノイズ性能の制限要因となることが多くあります。重水素アークランプから発生する光の強度は、時間とともに低下します。通常、この種のランプの半減期 (光の強度が最初の値の半分に低下するまでに要する時間) は約 1,000 時間です。このように半減期が短いため、D₂ ランプは比較的頻繁に交換する必要があります。

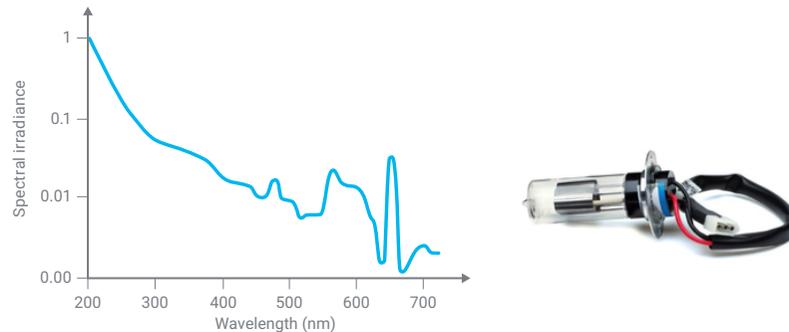


図 9. 重水素アークランプの強度スペクトル

タングステンハロゲンランプ

タングステンハロゲンランプでは、フィラメントが使用されます。フィラメントに電流を流すと、フィラメントが発熱して発光します (図 10 を参照)。このランプは、紫外域の一部と、可視および近赤外 (350 ~ 3000 nm) の全範囲にわたって良好な強度の光を発生します。この種類のランプは非常に低ノイズ、低ドリフトで、通常の機能寿命は 10,000 時間です。

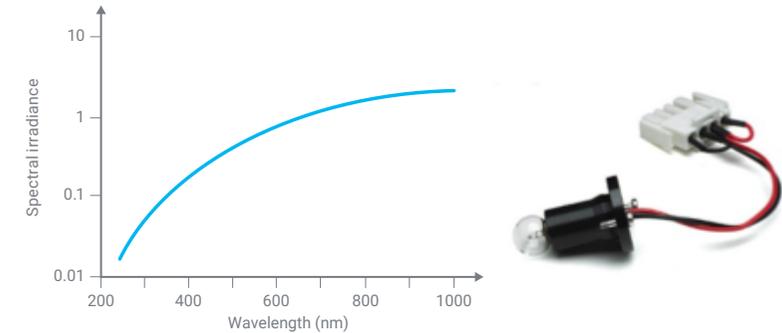


図 10. タングステンハロゲンランプの強度スペクトル

D₂ ランプとタングステンハロゲンランプを両方搭載した紫外可視分光光度計では、光源セレクトによってランプを適宜切り替えるか、2つの光源からの光を混合して単一の広帯域光源を生成します。

キセノンフラッシュランプ

一定の光源を提供する D₂ ランプやタングステンハロゲンランプとは異なり、キセノンフラッシュランプは、フラッシュとして非常に短い時間発光します。サンプルの測定時のみ短時間発光するため、長寿命です。サンプルに照射されるのは測定時のみです。このように照射時間が短いことから、キセノンフラッシュランプは、光退色しやすいサンプルの測定に適しています。不安定なサンプルでは、連続光源に長時間曝露され続けると、光退色が観察されることがあります。キセノンフラッシュランプは、185 ~ 2500 nm の高強度の光を発光するため、二次光源は必要ありません (図 11 を参照)。また、交換が必要になるまで何年も使い続けることができるため、D₂ ランプやタングステンハロゲンランプを使用するシステムよりも好まれています。この他、D₂ ランプやタングステンハロゲンランプのようにウォームアップ時間が必要ないという利点もあります。

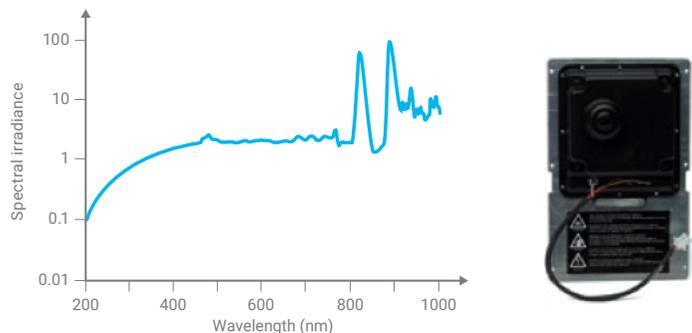


図 11. キセノンランプの強度スペクトル

モノクロメータ

どの光源も、広域スペクトルの白色光を発生します。この光を選択された波長帯に狭めるために、モノクロメータに通します。モノクロメータは、以下のような構成になっています。

- 入射スリット。
- 分光器: 光を（虹のように）各波長に分散させ、指定された波長帯を選択できるようにします。
- 出射スリット: 指定された波長の光がここを通過し、サンプルに照射されます。

モノクロメータの仕組みを簡単に理解するには、窓から日光が差し込む部屋を思い浮かべるといいでしょう。日光がプリズムに当たると、白色光が分散して虹になり、虹は部屋の反対側にある窓に当たります。プリズムの角度を変えると、異なる色、つまり異なる波長の光が、窓を通過して部屋から出ていきます。

モノクロメータからの出力は、単一波長の光であることが理想的ですが、実際には常に波長帯になります。

現在市販されている多くの分光光度計には、分光器としてホログラフィック回折格子が採用されています。これらの光学部品はガラス製で、その表面には非常に微細な溝が精密に刻まれています。この溝の寸法は、分散する光の波長と同レベルです。また、反射面を作るために、アルミニウムコーティングが施されています。

回折格子に当たった光の干渉光および回折光は、波長に応じてさまざまな角度で反射します。ホログラフィック回折格子は、波長に応じて光を線形的に角度分散させ、温度の影響は受けません。ただし、相互に重なる複数の回数で光を反射します（図 12 を参照）。その結果、目的とする反射回数の光のみを検出器に到達させるために、フィルタが必要になります。凹面格子は、光の分散と集光を同時に行います。

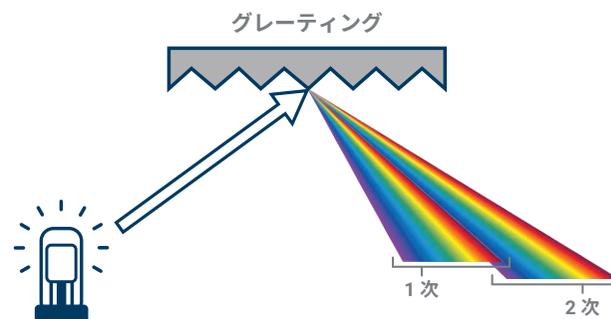


図 12. ホログラフィック回折格子が白色光を異なる波長の光に分散させる様子

シングルモノクロメータ方式の分光光度計

シングルモノクロメータ方式の分光光度計は、幅広い目的の分光分析に用いられ、コンパクトな光学システムに組み込むことができます。図 13 に、シングルモノクロメータの光学システムの概略図を示します。シングルモノクロメータ方式の分光光度計では、ダブルモノクロメータシステムほど狭い波長帯の光を選択できませんが、この機能は、吸収ピークの広いサンプルを測定する場合など、多くのアプリケーションには必要ありません。

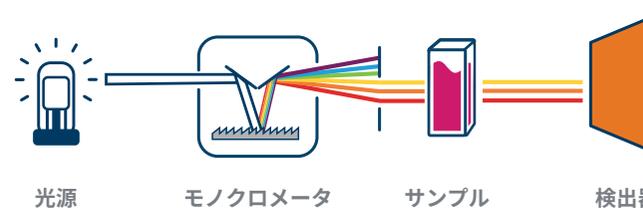


図 13. シングルモノクロメータ方式の分光光度計



ダブルモノクロメータ方式の分光光度計

ダブルモノクロメータは一般に高性能機器で見られ、2つのモノクロメータが直列に配置されています。光源の光は、最初のモノクロメータで分光された後に、2番目のモノクロメータでさらに分光されます。これにより、迷光（システム内に漏れる光）が低減し、スペクトル精度（特定の波長を正確に選択する能力）が向上します。図14に、ダブルモノクロメータの光学システムの概略図を示します。

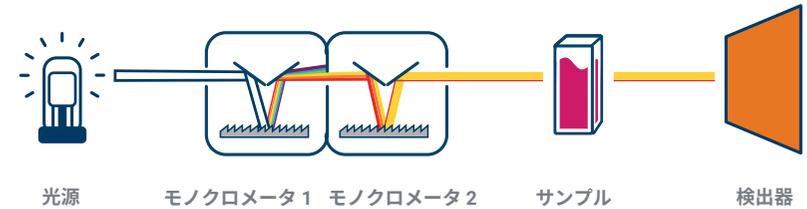


図14. ダブルモノクロメータ方式の分光光度計の概略図

サンプルコンパートメント

サンプルコンパートメントにはサンプルがセットされ、モノクロメータからのビームがサンプルを通過します。吸光度を測定するために、通常、液体サンプルは、既知の固定光路長のキュベットに保持されます。キュベットとは、図15に示すような角型の液体ホルダであり、紫外光または可視光を透過させるガラス、石英、プラスチック、またはその他の材料でできています。標準的なキュベットは、光路長が10mmで、紫外波長を良好に透過させることのできる石英製です。より安価なプラスチック製キュベットもありますが、一般に紫外光を透過させないため、可視波長領域の測定が必要な場合にのみ有用です。特殊なアプリケーション用に、少容量の液体を保持するキュベットから、非常に低濃度のサンプル用の長い光路長を持つものまで、多様なキュベットが提供されています。



図15. 液体サンプル測定用のキュベット左から右へ：標準の光路長10mmの3mLキュベット、超低容量サンプル測定用のウルトラマイクロセル、希釈溶液用の光路長の長いキュベット。

固体サンプルは、所定の位置にセットして、単純な透過率測定を行います。さまざまな入射角での測定も可能です。拡散反射や拡散放射など、より複雑な測定を行う場合は、サンプルコンパートメントにその他のアクセサリを取り付けることができます。

シングルビーム分光光度計

最も単純な UV-Vis 分光光度計には、シングルビームの光学システムが搭載されています。シングルビームシステムでは、モノクロメータからの光は、サンプルを通過した後、検出器に送られます。この単純な設計は、使用されている光学コンポーネントが少ないことを意味し、機器を小型化、つまりコストを低減することができます。

ただし、サンプルの測定前に、ベースラインまたはブランクサンプルを測定する必要があります。液体を測定する場合、ベースラインの測定は、使用するキュベットや溶媒によるあらゆる吸収を考慮することが目的です。シングルビームシステムでは、サンプルとは別にベースラインを測定する必要があります。別々に測定したベースラインとサンプルにおいて、光の強度またはシステムの光学性能に何らかの変動が認められる場合、正確な測定値が得られない可能性があります。不正確さから、サンプルの測定に長い時間がかかっていること、またはブランクが時間とともに変化している可能性があることが懸念されます。実際には、これは、シングルビームシステムを使用する場合は、測定セッションを通して、ベースライン/ブランクの測定を頻繁かつ定期的に行う必要があるということです。

ダブルビーム分光光度計

多くの UV-Vis システムには、ダブルビーム光学システムが採用されています。ダブルビーム型では、モノクロメータから放射された光が、リファレンスビームとサンプルビームの 2 本のビームに分光されます。一般に、ミラー部、すなわちビームスプリッタと呼ばれるハーフミラーを備えた回転ホイールなどの光学コンポーネントにより、光が分光されます。各ビームは、別々の光路を通して試料室に入ります。同じ波長の 2 本のビームを使用できるため、リファレンス/ブランクとサンプルを同時に測定することができます。つまり、機器の変動に応じて、サンプルの測定値をリアルタイムに補正することが可能です。このリアルタイムの補正により、高精度の測定が実現します。

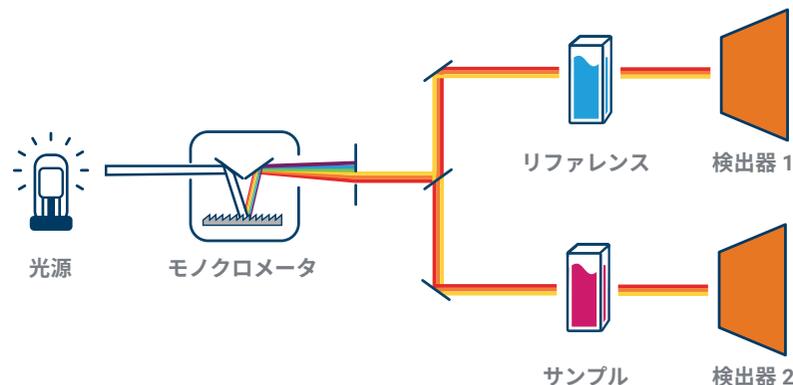


図 16. ダブルビーム光学システムとデュアル検出器の概念図

デュアルビーム分光光度計

もう 1 つの、より新しい設計の分光光度計では、サンプル兼リファレンス検出器を備えたデュアルビーム光学系のレイアウトが採用されています。リファレンス検出器は、測定ごとにランプ輝度の変動を補正するために使用されます。また、サンプル位置で溶媒またはブランク（固体サンプルの場合）が測定され、収集後にサンプルスペクトルから差し引かれます。この設計では、エレクトロニクスとソフトウェアの改良により、シンプルな測定プロセスはそのまま、キュベットのアライメント不備やセットするサンプルの間違いによる操作ミスを減らすことができます。デュアルビーム設計は、ルーチン測定用のダブルビーム機器と同じ性能を備えています。一方、ダブルビーム設計は、現在、研究グレードの機器として用いられています。

サンプルコンパートメント

UV-Vis 分光光度計の一般的なサンプルコンパートメントは、密閉蓋付きの黒色ボックスです。コンパートメント内側のつや消しの黒色塗装が、コンパートメントへの迷光の侵入を防ぎます。

サンプルコンパートメントにはサンプルがセットされ、モノクロメータからのビームがサンプルを通過します。前述のとおり、液体サンプルには、ガラス製、プラスチック製、または石英製のキュベット（図 15）を使用します。固体サンプルは、サンプルコンパートメントの底部に取り付けたホルダにより所定の位置に保持します。光ファイバを使用して、サンプルコンパートメント外で測光することも可能です。光ファイバは、非常に大きなサンプルや、高温、低温、放射性、またはその他の危険なサンプルを測定する場合に有効です。図 6 に示すように、光ファイバで分光光度計から光を取り出し、光ファイバプローブを使用してサンプルコンパートメント外で溶液を測定できます。または、固体サンプルでの光の反射、蛍光、または透過を測定可能な光ファイバデバイスも使用できます。

検出器

検出器は、サンプルからの光を電気信号に変換します。光源と同様に、検出器も、広い波長範囲にわたって線形応答が得られ、ノイズが低く、高感度でなければなりません。通常、分光光度計には、光電子増倍管検出器またはフォトダイオード検出器が搭載されています。高性能システムには、波長範囲や感度を向上するために、その他の特殊検出器が搭載されていることもあります。

検出器によって、感度や波長範囲は異なります。マルチ検出器システムでは、測定に必要な波長範囲に応じて検出器が切り替わります。

光電子増倍管 (PMT)

光電子増倍管 (図 17) では、その本体内で、信号変換と数段階の増幅が行われます。採用されているカソード材料の性質によって、スペクトル感度が決まります。1 本の PMT で、紫外可視範囲 200 ~ 900 nm 全体にわたる良好な感度が提供されます。PMT 検出器は、低い光レベルで高い感度が得られます。希釈サンプルの場合は、サンプルに照射された光の大部分が検出器に届きます。ブランク測定値とサンプル測定値のわずかな差を正確に検出するためには、このような高い光強度レベルでの検出器の信号ノイズが低くなければなりません。

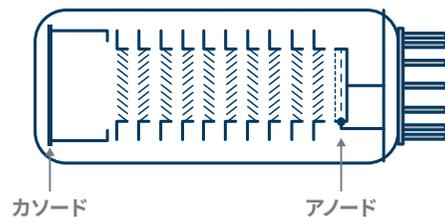


図 17. 光電子増倍管検出器

シリコンダイオード (Si)

シリコンフォトダイオード検出器 (図 18) は、最近の分光光度計で広く使用されている検出器です。広いダイナミックレンジと、PMT 検出器よりも優れた堅牢性を備えています。フォトダイオードの半導体材料に光が当たると、その箇所電子が流れ、半導体材料に接続されているコンデンサの電荷が減ります。コンデンサを定期的に充電するために必要な電荷量は、光の強度に比例します。シリコンベースの検出器の検出下限は、約 170 ~ 1100 nm です。

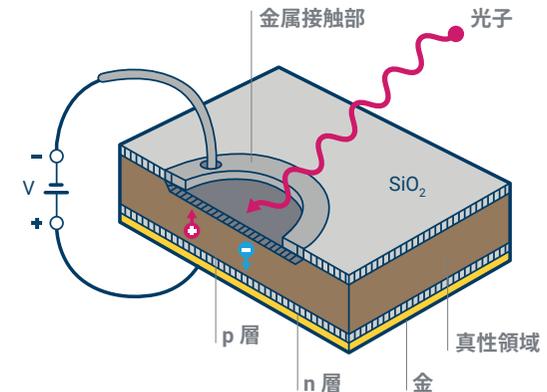


図 18. シリコンフォトダイオード検出器

インジウムガリウムヒ素 (InGaAs) フォトダイオード

InGaAs 検出器は、可視および近赤外波長領域で優れた性能を発揮する特殊な検出器です。InGaAs 検出器には、狭帯域 (800 ~ 1700 nm) オプションと広帯域 (800 ~ 2500 nm) オプションがあります。これらの検出器は、近赤外領域で直線的レスポンスと感度を実現します。

硫化鉛 (PbS) 検出器

分光光度計で使用されている最も一般的な近赤外用の検出器が、PbS 検出器です。この検出器は、1000 ~ 3500 nm 波長範囲における感度に優れています。広い波長範囲に対応した高性能の分光光度計には、一般に、PbS 検出器と、紫外可視範囲の検出用に PMT 検出器が組み合わされています。低近赤外域で高感度が求められる場合は、PbS 検出器と、狭帯域用の InGaAs 検出器を組み合わせることもできます。

3. UV-Vis 測定に最適なパラメータの選択

測定を成功させるためには、最適なサンプルホルダ、溶媒、および機器パラメータを選択することが不可欠です。

3.1 光学セルの選択

通常、液体サンプルはキュベット（光学セル、または単に「セル」とも言います）に入れます。キュベットには、以下のように多様な設計のものがあり、アプリケーションに応じて選べます。

- 「標準」の光路長 10 mm 光学セル（図 15 を参照）。このセルは容量約 3.5 mL で、2 つの光学窓が平行に配置されています。一般に、他の面は、セルの取り扱い時に使用する面であることを示すために、つや消しまたは溝付きになっています。光学窓は、できる限り清潔な状態に保つ必要があります。決して触れてはなりません。不使用時に光学窓を傷つけないように注意してください。使い捨て、特定用途向けのセルも用意されています。これらのセルは、ポリスチレン製またはポリメタクリル酸メチル（PMMA）製で、高温では使用できません。ポリスチレンは紫外光を透過しないため、波長範囲 340 ~ 800 nm の測定にのみ使用できます。PMMA 製セルは、300 nm まで使用できます。
- 最大約 0.5 mL の少量サンプルには、セミマイクロフローセルを使用できます。これらのセルの外寸は標準セルとほぼ同じですが、必要サンプル量を減らすために内側のチャンネルが狭くなっています。0.5 μ L までの少容量に対応できるウルトラマイクロセルもあります。光学窓の両側が黒色マスキングされているため（図 19 および図 20 を参照）、キュベット内で内反射しません。セルを UV-Vis 機器内の光学ビームの高さに合わせるように注意する必要があります。これは光軸高さと呼ばれ、キュベット底面から光路長中心までの距離を表します。

セミマイクロフローセルとウルトラマイクロフローセルは、サンプル量が限られている場合に役立ちます。

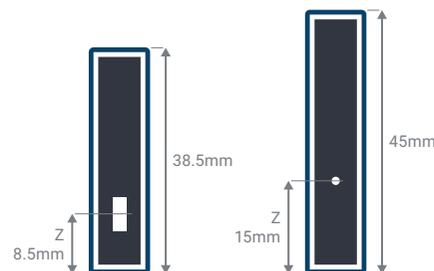


図 19. 「マスキング」されたキュベットにより、光学ビームが確実にサンプルを通過します。ご使用の UV-Vis 分光光度計に対応した光軸高さのキュベットを使用することが不可欠です。



図 20. 光路長 10 mm、容量 1.4 mL のセミマイクロフローセル

1 つのフローセルで複数の液体サンプルを測定できます。フロースルーセルも、多様な内部容量と光路長のもので用意されています。通常、セルはペリスタルティックポンプに接続します。また、オートサンプラに接続することもできます。ポンプにより、セルに接続されたチューブを通してサンプルが送液されてセルが満たされ、測定が行われます。その後、洗浄液が送液され、セルがクリーニングされてから、次のサンプルがセルに送液されます。



図 21. 4 x 11 mm の長方形開口部を持つ光路長 10 mm のフローセルと、コネクタおよびチューブ

多くの光学セルはキャップまたは蓋付きです。キャップは、サンプルの漏れや蒸発を低減するように設計されています。揮発性サンプルや危険なサンプルを測定する場合は、キャップを使用することを強くおすすめします。

セルの光路長

光路長とは、入射光がサンプルを通過する距離です。キュベットは、さまざまな光路長のものが用意されています。使用するべき光路長は、サンプルの吸光度によって異なります。

- 吸光度の高い (> 3 Abs) 高濃度サンプルには、光路長が短いキュベット (5 mm 以下) を使用するが、サンプルを希釈する必要があります。光路長が短いキュベットは、吸光度の高い溶媒を補正するためにも使用できます。
- 吸光度が低い (< 0.2 Abs) 希釈サンプルには、吸光度の測定値を増加させる、光路長が長いセル (最大 100 mm) が必要です。このようなセルは、誤差レベルを低減するうえでも役立ちます。

多くの UV-Vis 分光光度計システムには、光路長 10 mm の標準キュベットに適したキュベットホルダが付属しています。光路長がこれより長いキュベットを使用する場合は、光路長の長い適切なセルホルダが必要になります。

光路長がこれより短いセルの寸法は、光路長 10 mm の標準キュベットと同じため、機器に付属の標準セルホルダにセットできます。光路長が短いキュベットを標準キュベットホルダにしっかりセットするためのセルスペーサも用意されています。

材質

キュベットの窓に使用されている材質の光学特性を考慮する必要があります。波長範囲を最大限に広げる場合は、石英ガラスが適しています。石英ガラスは比較的高価なため、340 nm 未満および 350 nm 未満の測定が必要ない場合は、それぞれプラスチック (ポリスチレン) 製および光学ガラス製のキュベットを使用できます。ポリスチレン製セルは、高温での使用には適していません。また、ポリスチレン製セルを使用する場合は、サンプル/溶媒によってセルが損傷しないように注意する必要があります。ポリスチレン製セルは、一般に、使い捨てセルまたはプラスチック製セルとも呼ばれます。傷つきやすいことから、シングルユース用として設計されています。表 1 に、紫外から近赤外の波長領域における一般的な材質の透過率を示します。

表 1. キュベットの一般的な材質の透過率範囲

材質	適している波長 (nm)
石英	170 ~ 2700
Infrasil 石英 (NIR)	220 ~ 3800
光学ガラス	334 ~ 2500
ポリスチレン (使い捨て)	340 ~ 800

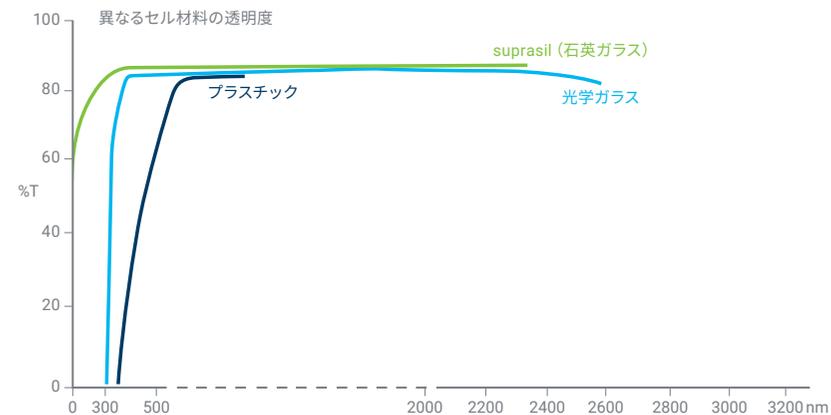


図 22. 一般的な光学セル材料の透明度

キュベットのマッチング

一部のキュベットはマッチドペアで販売されており、大半の UV-Vis および UV-Vis-NIR ルーチン分析に使用できます。マッチドペアでは、両方のキュベットにより、空の状態または水を満たした状態で、ほぼ同等の吸光度または透過率の測定値が得られます。マッチコードはバッチ番号のようなもので、キュベットの製造に用いられた原料のバッチ (融解状態) の透過特性を反映しています。

マッチングされるキュベットのペアは、特定の波長における透過率が許容範囲内にある必要があります。例えば、200 nm におけるペアの透過率は、相互の 1.5 % 以内でなければなりません。キュベットメーカーは、提供する各材質について、測定波長における透過率のマッチング許容範囲を定めています。

マッチングコードは、新品のセルを比較したときの実際の値を限定的に表すものです。キュベットは、使用中にクリーニングプロセスや誤った取り扱いによって表面に汚染や摩耗が生じ、透過特性が変化していきます。そのため、同じマッチコードでも、新品のセルと中古のセルは一致するとは限りません。

最新の製造と溶解技術により、平坦度、平行度、構造強度が向上しました。さらに、原料の品質保証への配慮が重視されるようになったことで、一般的な標準の高品質石英セルの透過率のマッチングが実質的に不要になっています。

クリーン性

指紋に含まれる油脂は、紫外領域で高い吸光度を示します。指紋が光学面に残っていると、正確な結果が得られない可能性があります。セルを使用する前に、きれいな柔らかい布で指紋や汚染物質をすべて拭き取ってください。布に洗浄剤や潤滑油が付着していないことを確認してください。眼鏡やその他の用途用の一般的なレンズティッシュには、洗浄剤や潤滑油が含まれているため、測定に影響を及ぼす可能性があります。

超音波洗浄器でガラス製または石英製キュベットをクリーニングしないでください。超音波洗浄器では、それぞれ周波数の異なる超音波が発生します。超音波洗浄器がセルの共振周波数で動作する場合、セルが破損します。

フッ化水素酸 (HF) などのフッ酸は、その濃度を問わず、使用しないでください。石英およびガラスが腐食します。強塩基溶液 (pH 9.0 以上) も、窓表面を劣化させ、キュベットの寿命を縮めます。

ブランクの測定後に、セルの光学窓をクリーニングすることは避けてください。クリーニングが必要な場合は、新しいブランクを測定してから、引き続きサンプルの測定を行ってください。

キュベットの取り扱いに関するその他のヒント

以下に示す簡単なステップを実施することで、キュベットの寿命を延ばすことができます。

- 測定後、すぐにキュベットからサンプルを取り出してください。これにより、サンプルが乾燥してキュベットに固着するのを防ぐことができます。タンパク質や強力な染料は、キュベット内面に付着することがわかっているため、細心の注意を払ってください。これらのサンプルは、テスト後に直ちにセルから取り出し、サンプル間に使用する溶媒で十分に洗浄してください。
- 同じサンプルを長時間にわたって測定する場合、蒸発を最小限に抑えるため、サンプルが入ったキュベットに蓋をし、適切な温度に保ってください。サンプルによっては、連続的な攪拌が必要です。
- 1 日の測定が終了したら、すべてのキュベットを十分にクリーニングし、以下のいずれかを行ってください。
 - 乾燥後、適切な容器に入れて保管します。
 - 耐酸性のピーカーに入れた緩酸性溶液 (1 % 硝酸または塩酸) に浸した状態で保管します。キュベットの欠けを防ぐため、必ず、各キュベットを別々のピーカーで保管してください。再度使用する直前に、必ず、大量の水ですすいでください。



携帯電話ディスプレイの測定

携帯電話、タブレット、ノート PC、テレビに使用されているスクリーンの設計者は、それらをできるだけ薄くすることに尽力しています。たとえ 10 ミクロンであっても厚さを減らすことで、デバイスの全体的なサイズに大きな違いをもたらすことが可能です。これらのスクリーンでは、ディスプレイの色を制御するために、照射を行うバックライトリフレクタとともに、発光ダイオード (LED) と液晶ディスプレイ (LCD) が使用されています。多くの場合、バックライトリフレクタは透明なポリマー材料でできており、片方の表面に反射膜が配されています。リフレクタはプラスチックミラーのシートに似ています。バックライトリフレクタの反射と透過を測定することは、新しい設計の開発において不可欠です。また、製造中の重要な品質管理測定でもあります。バックライトリフレクタの反射と透過は UV-Vis 分光光度計で測定されます。バックライトリフレクタはサンプルコンパートメントに垂直に設置され、中心軸を中心に回転し、さまざまな入射角で反射と透過を測定できます。

[測定の詳細情報はこちら](#)

3.2 サンプルの温度制御

多くのサンプルは室温で測定できますが、サンプルを加熱または冷却することが必要になる状況もあります。これには、以下のような場合があります。

- 蒸発を抑えるために、揮発性サンプルを冷却する場合
- サンプルの取り扱いを容易にするため、またはサンプルの均質性を高めるために、粘性の高いサンプルを加熱する場合
- 熱により化学変化を起こしやすいサンプルを測定する場合
- 加熱または冷却時のサンプルの変化を観察する場合

UV-Vis 分光光度計には、サンプルの温度を制御するためのアクセサリを装着できます。最も単純な温度制御システムは、一定温度での測定に適しています。一般に、これらのシステムでは、サンプルキュベットが保持されたマニホールドに温水を流すサーモスタット付き水循環装置が使用されます。さらに高精度の温度制御では、ペルチェヒーター/クーラーがサンプルマニホールドに組み込まれています。ペルチェ装置では、より高度な温度制御により昇温測定を実施できます。空冷式ペルチェシステムは、水冷式ペルチェシステムや水循環システムよりも少ないメンテナンスで済みます。水循環システムには、ウォーターホースの漏れチェックやクーラント溶液の補充など、定期的なメンテナンスが必要です。ペルチェシステムには、クーラント溶液のポンピングが不要なため、動作音が静かであるという利点もあります。

どの温度管理オプションを使用する場合も、システムに温度モニタリング機能が必要です。少なくとも、システムは、サンプルマニホールドの温度をレポートする必要があります。これは、外部の水加熱システムを使用する場合に特に重要になります。循環装置からサンプルマニホールドまでの間で、ウォーターバスで設定された温度から熱損失が生じる可能性があるからです。一方、ペルチェコントロール型システムでは、サンプルマニホールドの温度がモニタリングされ、フィードバックされるため、温度が一定に保たれます。

温度制御が重要な場合は、サンプルの温度を直接測定することで、より正確な測定値が得られます。そのためには、小型の温度プローブを、キュベットに入ったサンプルに挿入します。その際、光路を遮らないようにプローブを慎重に配置します。サンプルで温度を直接モニタリングする場合は、UV-Vis コントロールソフトウェアで、測定ごとに各キュベットの温度を記録できなければなりません。

3.3 サンプルの攪拌

温度制御されたサンプルの攪拌は重要です。これにより、溶液と温度の均質性を常に維持することができます。粘性の高いサンプルを扱う場合、またはキュベット内で起こる化学反応を調査する場合に溶液を絶えず混合するために、攪拌が特に重要になります。

熱的（および化学的）均質性を得るための攪拌の有効性は、サンプル、溶媒、および溶液の粘性に強く依存します。粘性は温度によって変化します。これは攪拌効率に、また経時的に温度を上昇させる場合は測定に影響する可能性があることに留意してください。

溶液を攪拌するには、ビーズ型または星型のマグネティックスターラーをサンプルキュベットの底に入れます。底部にくぼみのある特殊設計のキュベットもあります。この円形のくぼみ部にビーズ型スターラーが保持され、攪拌効率が高まります。

分析メソッドの開発時には、溶液に適した攪拌速度を使用するように注意する必要があります。攪拌速度が遅すぎると、サンプルが十分に混合されません。また、速すぎると、サンプルに気泡が閉じ込められ、正確な結果が得られない可能性があります。

すべてのサンプルでテスト実験を実施し、最適な攪拌速度を見つけることをお勧めします。水と同等の粘性を持つ液体を測定する場合は、一般に、800～900 rpm の攪拌速度により、標準キュベットで最善の温度均質性が得られます。粘性の高いサンプルには、攪拌速度を低くし、粘性の低いサンプルの場合は、より高速にします。

3.4 低温での測定

室温より低い温度でサンプルを測定する場合、キュベットの外壁に結露が形成され、測定を妨げる可能性があります。結露は、UV-Vis 分光光度計のサンプルコンパートメントをクリーンな乾燥ガスでパージすることで防止できます。一部のシステムには、光を侵入させることなく、サンプルコンパートメントにガスを送ることができる特殊なパージポートが装備されています。この他、低温サンプルの測定に、光ファイバディッププローブを使用することもできます。この場合、サンプルコンパートメントに光ファイバカップラを差し込み、このカップラにより、光ファイバケーブル、さらにサンプルに直接挿入されたディッププローブを通して、システムからの光を照射します（図 6 を参照）。その後、光は、戻り光ファイバケーブルを通して検出器に戻されます。ハイスループットでサンプリングを行い、複数のサンプルを一定の温度で測定する場合は、この手法が適しています。

3.5 溶媒の透明度

液体サンプルを測定する場合、または UV 分析用に固体サンプルを溶解する場合は、溶媒の透明度を考慮する必要があります。溶媒は、サンプルの溶解性、安定性、pH 要件、および紫外可視カットオフ波長に基づいて選択します。水溶性化合物の場合は、紫外波長全域での測定が可能である水が最適です。有機溶媒を使用すると、測定可能な紫外波長範囲が限定されます。溶媒を選択するときは、溶媒へのサンプルの溶解性と、対象の波長範囲における溶媒の透明度を考慮します（図 23 を参照）。

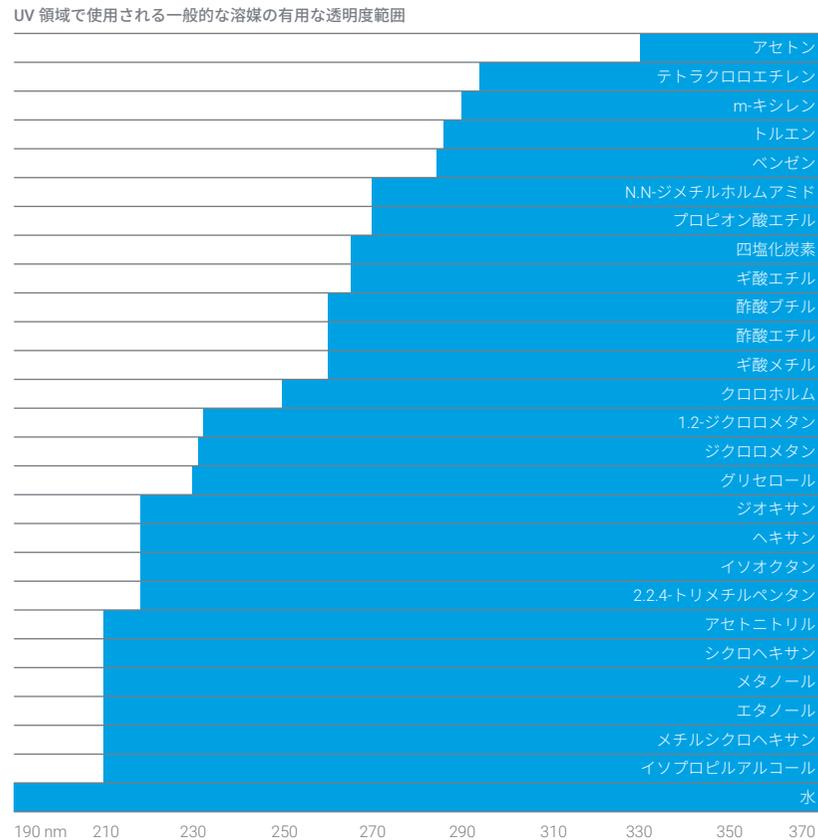


図 23. 紫外領域で使用される一般的な溶媒の透明度範囲。UV 分析には水が適していますが、サンプルが溶解しない場合は、別の溶媒が必要になることがあります。



非常に重要な役割をもつ 1 つの分子

プロトポルフィリン分子は、多数の植物や動物の生命の基礎を形成しています。身体は、亜鉛原子を未熟な赤血球の環構造に挿入することにより（網状赤血球）、プロトポルフィリン分子を安定化させます。網状赤血球が成熟するにつれ、亜鉛が鉄に置き換えられます。成熟した赤血球は次に、多数の動物や人間の血液の中で酸素を運ぶ分子である、グロビンを形成するヘモグロビンと結合します。

植物においてマグネシウムはプロトポルフィリン環に挿入され、光合成に必要な主要な化合物であるクロロフィルを形成します。

プロトポルフィリンは紫外線を吸収します。光合成における重要性からして、これは当然のことです。またこの分子は蛍光を發します。これらの特性により、プロトポルフィリンは分光分析に最適な分子といえます。実際、プロトポルフィリンは、小児の鉛中毒の主要なスクリーニング試験のベースとなっています（1）。

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Erythrocyte Protoporphyrin Testing; Approved Guideline, Volume 16, No. 8, 1996

3.6 最適なスペクトルバンド幅

サンプルを測定する際には、必要な分離能を検討する必要があります。UV-Vis 分光光度計で分析される大半の固体または液体サンプルは、左右約 20 nm 以上で、自然に広いピークになります。分析物の自然な波長幅の約 10 分の 1 のスペクトルバンド幅 (SBW) 設定の機器を使用することが推奨されます。機器の SBW は、ピーク最大値の半分における光のバンド幅 (図 24 を参照) として定義され、半値全幅 (FWHM) と呼ばれることもあります。UV-Vis 分光光度計の SBW は、モノクロメータ設計の物理的なスリット幅に関連しています。

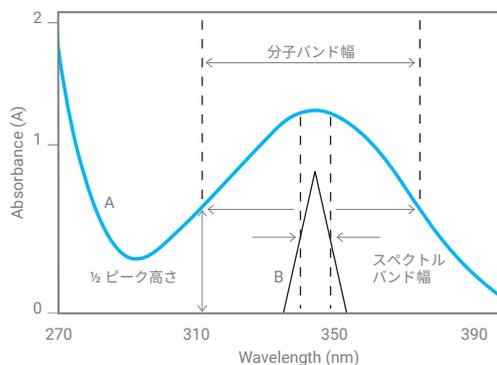


図 24. スペクトル A は 345 nm に近いピーク最大値を示しています。スペクトルバンド幅が示されています。UV-Vis 分光光度計のスペクトルスリット幅は常に必要なスペクトルバンド幅よりも狭くなります。

分光光度計設計に応じて、物理的なスリット幅は、固定または可変のいずれかになります。多くのミッドレンジ UV-Vis 分光光度計の場合、1.5 nm の固定スペクトルバンド幅が一般的であり、大半の液体および固体サンプルのピークを分離するのに十分です。より大きな SBW を使用することで、より多くの光がサンプルを通過することが可能となり、高品質でノイズが少ないデータが得られます。ただし、狭い、または近接したサンプルピークが分離されなくなります。より小さな SBW を使用すると分離能が向上しますが、サンプルに達する光が少なくなるため、同じデータ品質を得るためのデータ取得時間が長くなる可能性があります。

高性能または研究グレードの分光光度計システムの多くは、ユーザーがスリット幅を選択し、システムの分離能を調整できるように設計されています。これは、分析困難なサンプルを測定する際に有効です。スリット幅を最大にすることで、高いピーク分離能を必要としない高吸収性サンプルで、光のスループットを向上させることができます。検出器への光のスループットが高くなるほど、メソッドの再現性、精度、結果の正確性が向上します。高い分離能が必要な場合は、スリット幅を小さくできます (図 25 および 26 を参照)。

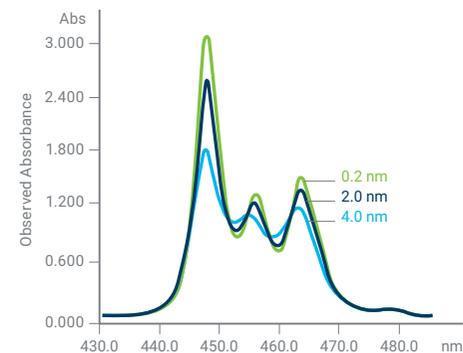


図 25. 重ね表示スキャン。それぞれ、異なる機器スリットを使用して測定されました。スリットが広くなるほど S/N 比が向上しますが、分離能は低下します。

ガイドラインとして、SBW は、サンプルの分子バンド幅の 10 分の 1 に設定します (表 2 の例)。

表 2. 一般的な UV-Vis 測定タイプのための推奨のスペクトルバンド幅設定

代表的な化合物	ピーク nm	バンド幅 nm	最適な (SBW) nm
アミノ酸			
トリプトファン	279	45	4.5
チロシン	275, 195	40, 10	4.0, 1.0
フェニルアラニン	258	2.2	0.2
ヌクレオチド			
アデノシン	260	28	2.8
チミン	265	30	3
タンパク質			
シトクローム c、酸化	410	25	2.5
ロドプシン	500, 278	約 90, 25	9, 2.5
リボヌクレアーゼ	278	20	2
色素および染料			
β-カロチン	480	35	3.5
クロロフィル a	660	20	2
コエンザイム			
ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド	260	35	3.5
NADH	340, 260	50, 25	5, 2.5
単純な有機化合物			
ベンゼン、蒸気	253	<< 0.1	<< 0.01
ベンゼン、溶液	253	2	0.2
アントラセン	375	3	0.3

スペクトル分離能を最適化する場合、データ取得の間隔も検討する必要があります。最低でも、ピーク全体で3つのデータポイントを取得する必要があります。データ間隔が小さくなるほど分離能が高くなりますが、データを採取するための時間と、データ間隔の間にはトレードオフがあります。

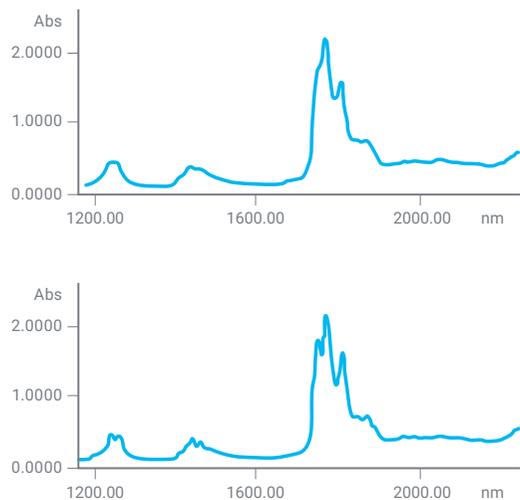


図 26. これら2つのスキャンは、SBWの変化による分離能への影響を示しています。15 nmのSBW（上のグラフ）では、スペクトルに詳細構造がほぼ観察されません。3 nmのSBW（下のグラフ）では、ピークがはるかに明確に定義されています。

3.7 迷光

迷光または迷光放射エネルギー（SRE）とは、波長が選択されたスペクトルバンドの外側にある、検出器に達する放射線の比率として定義されます。これは、不良な機器設計（ラボの光、窓からの日光、またはモノクロメータによって良好に分離されていない光の機器内部への漏れ）または機器の損傷を原因とします。大半のシステムには、迷光の問題を確認する機器性能チェックがあります。これはテスト溶液を使用して行います。迷光レベルを調べるための溶液は、指定された波長において非透過性であるため（他の波長では透過する）、観察される透過率は迷光のみに起因します。

迷光により吸光度の測定値が低下し、観察されるピーク形状が変化します（図 27 を参照）。結果として、迷光によりランベルト・ベールの法則（図 28 を参照）からの逸脱が発生し、濃度の測定値の信頼性が損なわれます。UV-Vis 機器の迷光の性能によって、機器が測定可能な最大吸光度も決まります。

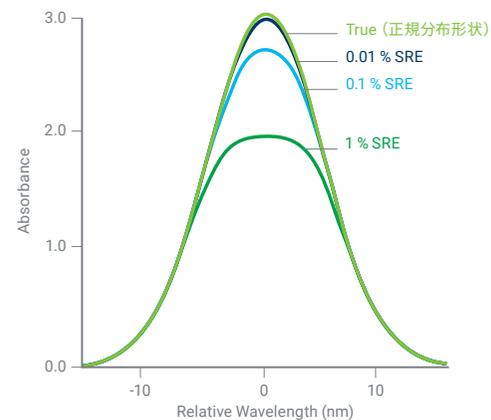


図 27. 機器の迷光が増加すると、ピークの最大吸光度が低くなり、曲線が平坦になります。

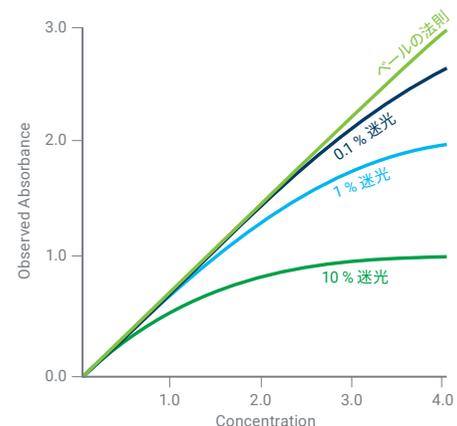


図 28. 迷光の性能が低い UV-Vis システムではベールの法則からの逸脱が観察されます。これにより、濃度の計算が不正確になります。

3.8 UV-Vis 機器の直線性範囲

使用される機器設計と測定パラメータの両方により、特定の波長で機器が測定可能な最大吸光度が決定されます。高い吸光度では、検出器に達する光が非常に少なく、そのために S/N 比が低くなります（図 29 のスペクトルの特徴的な「端電場」を参照）。システムの限度を理解することにより、機器の機能の範囲外の、サンプルの測定やキャリブレーションの実施を回避できます。液体サンプルの場合、サンプルを希釈することが、測定を機器の直線性範囲に収める手段となります。また、短い光路長のキュベットを使用することも可能です。

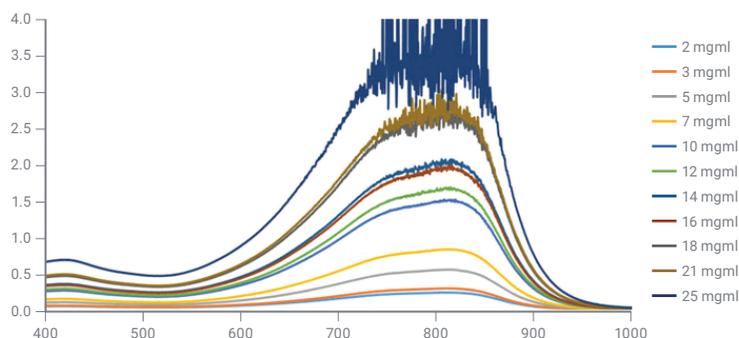


図 29. サンプルの吸光度が上がるにつれて、検出器に達する光が減少します。これにより結果でノイズが増加し、スキャンモードで明らかにスパイク状の信号が観察されます。

3.9 その他の役立つ情報

ランベルト・ベールの法則のとおり、濃度と吸光度との間の直線相関性により、吸光度 (A または Abs) はよく UV-Vis 分光光度計で測定されています。その他のアプリケーションでは、透過する、または吸収される光の比率が、より重要である場合もあります。例のために材料の光学特性を比較する場合は、透過率と吸光度の差異を比較するのが、より有用かもしれません。

大半の UV-Vis 分光光度計システムでは、取得したデータを、一般的に使用されるパラメータに変換できます。これらのパラメータ間の関係を表 3 に示します。

表 3. 透過率と吸光度との間の相関は視覚化するのが難しい場合があります。表は、7 Abs を測定したサンプルでは、光が 0.00001 % だけサンプルを透過することを示しています。

%T	T	Abs	%A	LogA
100	1.0	0	0	-
50	0.5	0.3	50	-0.52
10	0.1	1	90	0
1	0.01	2	99	0.3
0.1	0.001	3	99.9	0.48
0.01	0.0001	4	99.99	0.60
0.001	0.00001	5	99.999	0.70
0.0001	0.000001	6	99.9999	0.78
0.00001	0.0000001	7	99.99999	0.85

3.10 波長または逆センチメートル

多くの UV-Vis 測定は、ナノメートルで測定された波長 (1×10^{-9} m) に対してレポートされます。いくつかの古い文献では、長さの逆数または波数 (cm^{-1}) が使用されています。波数は赤外 (IR) 分光測定でよく使用されます。波数は入射光のエネルギー準位の変化を伝えるため、波数スケールを使用することは有用です。波長が低いほど波数が大きくなり、エネルギーが上昇します (表 4 を参照)。

波長が徐々に短くなるため、赤外線分光分析に波数を使用することにより、スペクトルの差異を簡単に視覚化することが可能です。

UV-Vis 分光光度計の場合、一般的に波長が、スペクトル範囲に表示されたスペクトルを視覚化するための便利な方法として推奨されます。

多くの UV-Vis 分光光度計システムでは、波長または波数のいずれかでスペクトルを取得できます。

表 4. 波長 (nm) と波数 (cm^{-1}) 間の変換

λ nm	cm^{-1}
3300	3030
3000	3300
2500	4000
2000	5000
1500	6666
1000	10000
800	12500
600	16667
400	25000
200	50000
175	57143

4.一般的な UV-Vis アプリケーションの概要

4.1 同一スペクトルと構造

紫外可視スペクトルでは通常、数個の広い吸収ピークのみが示されます。多数のナローピークを生成する赤外線分光分析などの手法と比較し、紫外可視分光分析で提供される定性情報の量は限定的です。少数の広いピークのみで、特徴的なスペクトルに基づき化合物を同定するのは困難です。

有機化合物による吸収は多くの場合、 π (不飽和) 結合の存在によるものです。発色団とは、通常 π 結合が含まれる分子のことです。(紫外可視吸収スペクトルがない) 飽和炭化水素に発色団を挿入すると、185 ~ 1,000 nm に吸収をもつ化合物が生成されます。表 5 にいくつかの発色団と、それらの最大吸光度の波長を示します。

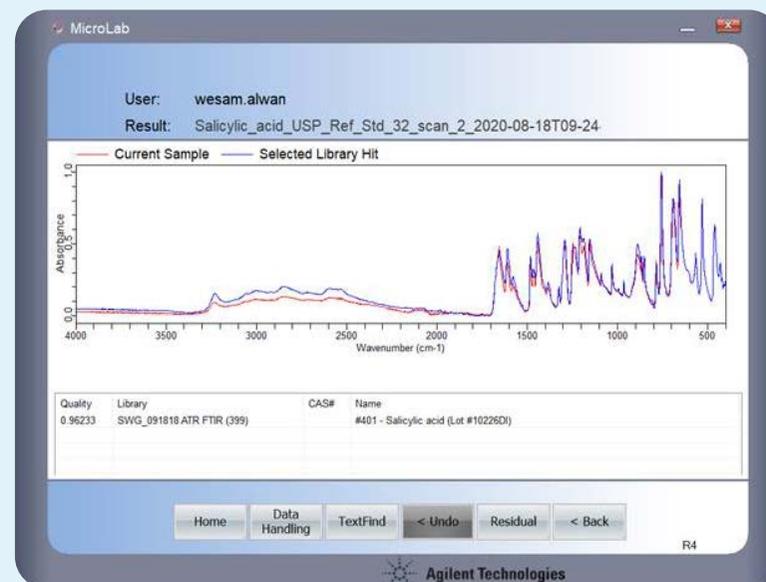
表 5. 代表的な発色団と、それらの最大吸光度の波長

発色団	分子式	例	λ_{max} (nm)
カルボニル (ケトン)	RR' C=O	アセトン	271
カルボニル (アルデヒド)	RHC=O	アセトアルデヒド	293
カルボキシル	RCOOH	酢酸	204
アミド	RCONH ₂	アセトアミド	208
エチレン	RCH=CHR	エチレン	193
アセチレン	RC≡CR	アセチレン	173
ニトリル	RC≡N	アセトニトリル	< 160
ニトロ	RNO ₂	ニトロメタン	271

特定の波長における吸収バンドの存在は、発色団があることを示す優れた指標になります。ただし、最大吸光度の波長の位置は固定されておらず、発色団の分子環境と、サンプルが溶解される溶媒にある程度依存します。また、pH や温度など、その他のパラメータによっても、最大吸光度の強度と波長の両方が変化する可能性があります。

化合物の同定に使用可能な FTIR スペクトル

フーリエ変換赤外 (FTIR) スペクトルには、紫外可視スペクトル以外にも、さらに詳しい情報が含まれています。ここに示されたようなスペクトル (赤) を FTIR スペクトルのライブラリと照合し、化合物を同定できます。これは医薬品のサリチル酸の例です (青色で示されたライブラリスペクトル)。



二重結合を追加の二重結合で複合化すると、吸収バンドの強度と波長の両方が増加します。共役炭化水素またはカロテノイドなど、一部の分子システムについては、強度と波長との関係が体系的に研究されています。遷移金属イオンも、可視領域で 400 ~ 700 nm の吸収を生成する電子エネルギー準位を持っています。

4.2 同定の確認

紫外可視スペクトルでは未知の成分を確実に同定できませんが、実測スペクトルを参照スペクトルと比較することにより、物質の同定を確認するために使用できます。スペクトルが非常に似ている場合は、微分スペクトルを使用できます。図 30 に示されているように、より高い微分次数ではバンドの数が増加します。このように複雑な微分スペクトルは、金属の特定解析や同定目的のための定性分析において役立つ可能性があります。例えば、ステロイドテストステロンの吸光スペクトルは 330 nm を中心とした、ブロードで特徴のない単一のバンドを示しますが、二次微分では 6 つの明確なピークが示されています。この分離能の向上効果は、未知化合物の同定でも有効である可能性があります。図 30 にコンピュータシミュレーションを示します。30 nm で分離された、40 nm の自然なスペクトルバンド幅 (NBW) をもつ 2 つのガウス型バンドを吸光モードで追加すると、2 つの成分のバンドの間に、最大の中間点をもつ単一のバンドが得られます。2 つの成分は分離されていません。スペクトルの四次微分を使用し、2 つの成分のバンドの λ_{\max} の近くを最高点とする、これら 2 つのバンドが明確に示されます。

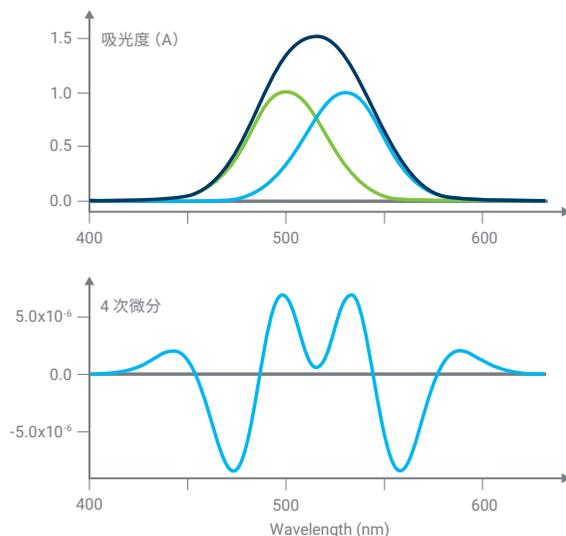


図 30. 微分解析を使用した分離能の向上。最初のオーバーラップしたピークが、単一の広いピークになりました。スペクトルの四次微分により、より良好にピークが分離されたスペクトルが得られました。

4.3 分子の定量

ベールの法則

100 個の光子がキュベットに入り、反対側から出てきたのが 50 個だけであれば、透過率は 0.5 または 50 % です。次にこれらの 50 個の光子が同じキュベットを通過し、25 個だけ出てきたら、その後も同様です。図 31 に、キュベットの光路長に対する透過率のプロットを示します。

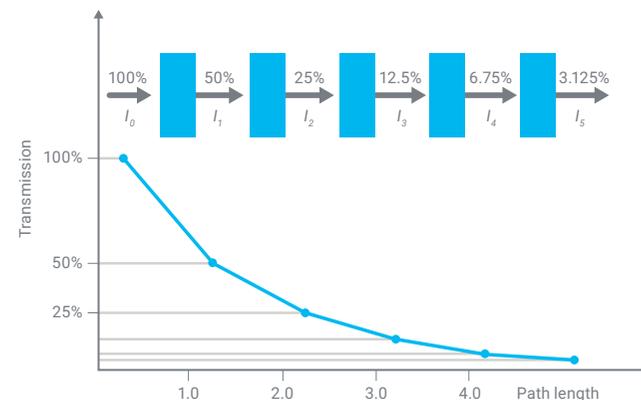


図 31. 透過率および光路長—ランベルト・ブーゲの法則

Lambert (1760) は一般的に、この効果を初めて数式に表したことで評価されていますが、1729 年に Bouguer が最初に発表しています。式は次のとおりです。

$$T = I/I_0 = e^{-kb}$$

ここで、

- I_0 は入射光強度
- I は透過強度
- e は自然対数の底
- k は定数
- b は光路長 (通常はセンチメートル)

ベールの法則は、それが濃度で説明されていること以外は、ブーゲの法則と同じです。吸収される光の量は、吸収する分子の数に比例します。分子が吸収することで、光が通過します。図 32 に濃度に対する透過率のプロットを示します。

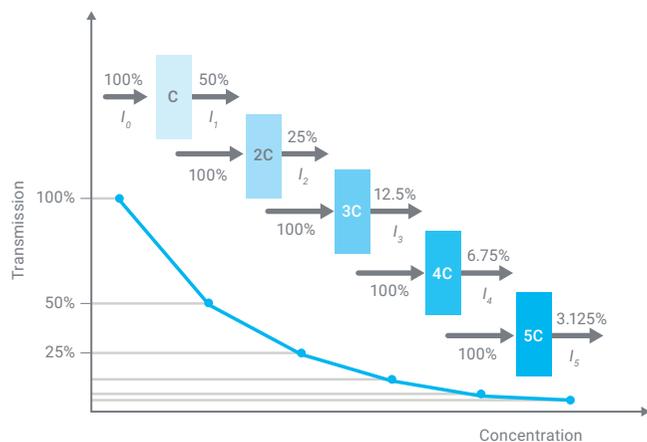


図 32. 透過率および濃度—ベールの法則

2つの法則を組み合わせると、ブーゲ・ランベルト・ベールの法則となります。

$$T = I/I_0 = e^{-kbc}$$

ここで、c は吸光種の濃度です（通常はリットルあたりのグラム、またはリットルあたりのミリグラムで表します）。この式は対数を取ることで一次式に変換でき、通常は十進法で表されます。

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \log(I_0/I) = \sum bc$$

ここで、A は吸光度、 \sum はモル吸光係数または吸光係数です。この式は一般的にベールの法則として知られています。図 33 に、濃度に対する吸光度のプロットを示します。

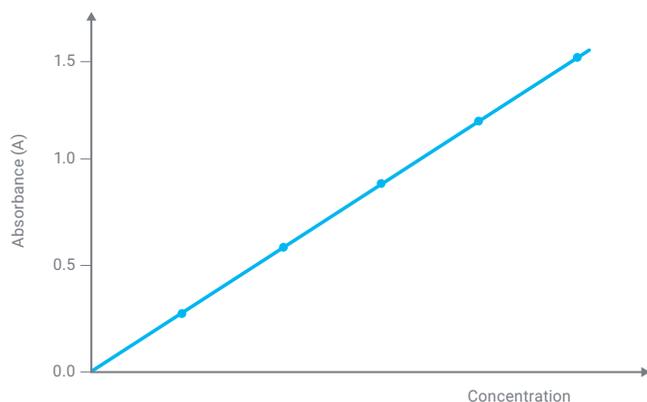


図 33. ブーゲ・ランベルト・ベールの法則は、入射光の吸光度と分子の濃度との直線相関性を説明しています。

吸光係数 (ϵ) は、波長、溶媒、温度など、正確に定義された条件セットの下での特定の物質の特徴を示します。実際には、測定された吸光係数は、ある程度、使用された機器の特徴にも依存しています。これらの理由により、通常、吸光係数に対してあらかじめ定義された値は定量分析に使用しません。代わりに、解析される物質の検量線は、既知の濃度の成分を含む 1 つ以上の標準溶液を使用して形成されます。

電子遷移の場合、基底状態と励起状態とのエネルギーの差は比較的大きいです。したがって、室温で、すべての分子は電子基底状態にある可能性が非常に高いです。吸光と基底状態への復帰は高速のプロセスで、非常に素早く平衡に達します。このように、紫外可視光の吸光は定量的に非常に正確です。紫外可視光を使用した場合、吸光度と濃度の関係はシンプルで直線的になり、測定も比較的簡単です。このため紫外可視分光光度計は、非常に多くの定量分析方法の基本となっています。ゼロ次スペクトルがベールの法則に従っていると仮定し、微分スペクトルのすべての次数に対する濃度と振幅の間には、同様の直線相関性が存在します。

ゼロ次： $A = \epsilon bc$

一次微分： $dA/d\lambda = (d\epsilon/d\lambda)bc$

n次微分： $d^n A/d\lambda^n = (d^n \epsilon/d\lambda^n)bc$

λ で、A が吸光度、 ϵ は吸光係数、b はサンプル光路長、c はサンプル濃度です。

単一成分の定量の場合、波長の選択は、正と負のピークの両方が存在するため、吸収スペクトルよりも微分スペクトルの方が困難です。偶数次微分は、吸収スペクトルと同じ λ_{max} にピーク最大値または最小値がありますが、奇数次微分の場合、この波長はゼロクロス点です。最大値と最小値の差をとることによってシグナル/ノイズ比 (S/N) は最もよくなりますが、他の成分の干渉に対する感度が上昇する可能性があります。

正確な分析結果を得るために、分析するサンプルには、キャリブレーションが実施された吸収成分のみが含まれている必要があります。サンプルが溶液である場合、溶媒の純粋サンプルをブランクとして使用する必要があります。2 番目の波長で干渉成分を修正することができる場合もあります。

濃度の測定

UV-Vis 分光光度計の最も一般的なアプリケーションの1つは、単純な濃度の定量です。UV-Vis 分光光度計に光ファイバディッププローブアクセサリを組み合わせると、キュベットに移す必要なく、サンプル容器で直接測定できます。[詳細はこちら](#)



4.4 カイネティクス

反応カイネティクスの分析は、化学および生化学においてどのように反応が発生するかを理解するための土台です。サンプルが破壊されないため、UV-Vis 分光光度計はこのアプリケーションに最適な技術です。反応物と生成物における変化により、経時的に特定の波長で吸光度が変化する場合に使用できます。高速スキャン UV-Vis システムを用いて、反応中に複数回のスキャンを実行し、反応を視覚化して、速度計算に対する波長の選択に役立てることができます。

シングルポイントカイネティクス

シングルポイントカイネティクス分析は、反応速度を判断する最も簡単な手法です。単一波長を選択します（通常は目的元素の最大吸光度）。反応が開始した後に、該当の波長で吸光度を連続的にモニタリングします。図 34 に、この結果である 4 つのサンプルの吸光度対時間プロットを示します。吸光度の経時変化をモニタリングすることで反応を調査できます。多くの場合、吸光度の変化が停止したら、反応が完了したことを示しています。図 34 に 4 つの異なるサンプルを 30 分間モニタリングした結果を示します。

シングルポイント測定のメリットは、測定中にシステムで他の波長に移行する必要がないため、高速反応でほぼ連続的なデータを取得できるという点です。機器のデータ取得速度と、信号平均化時間は、取得可能なデータ量を制限する要因となります。

カイネティクス測定に対して複数の波長もモニタリングできます。これにより、1 つの波長における反応生成物の作成と、他の波長における減少について理解を深めることができます。

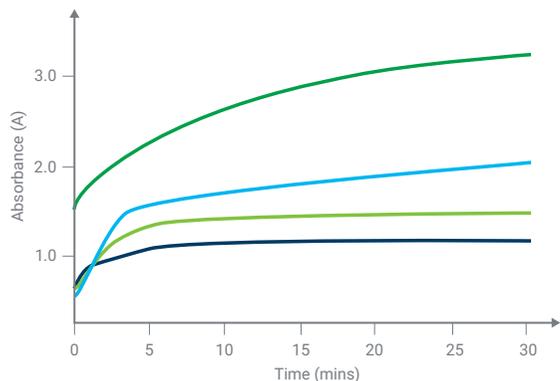


図 34. 吸光度の経時的変化をモニタリングすることで反応を調べることができます。通常は、吸光度の変化が停止したら、反応が完了したことを示しています。本グラフは 4 つの異なるサンプルを 30 分間モニタリングした結果を示します。

カイネティクスのスキャン

カイネティクス測定を行う場合、波長範囲を経時的にスキャンすることによって、追加の情報を得ることができます。反応をリアルタイムで視覚化するのは別に（図 34 を参照）、この測定では、スキャン範囲で任意の数の波長を選択し、反応速度の計算を実行できます。これには、反応が進行している間の反応物の消費、または反応物の生成の分析も含まれます。カイネティクスのスキャンをする際には、UV-Vis システムで、選択された波長範囲を高速でスキャンできることが重要です。スキャンの速度が遅くなると、反応中に任意の波長で取得されるデータ量が制限されます。

高速混合カイネティクス

反応速度、または 2 つの高速で反応する溶液をモニタリングするには、専用の高速混合またはストップフローアクセサリを使用しなければならない場合があります。これらのアクセサリを UV-Vis 分光光度計に設置すると、UV-Vis 内のフローセルに複数の溶液を正確に送液し混合できます。ストップフローアクセサリは、フローセルで溶液が混合されるとすぐに分析を開始するよう UV-Vis システムをトリガーします。溶液の混合速度を変えたり、フローセルと反応物質の温度調整を行うオプションの機能もあります。データ採取速度が重要であるため、反応時間フレーム内で一連のデータポイントを取得するのに十分なデータ採取レートを実現する UV-Vis システムを選択することが大切です。図 36 に、3 秒間でモニタリングされた反応の例を示します。

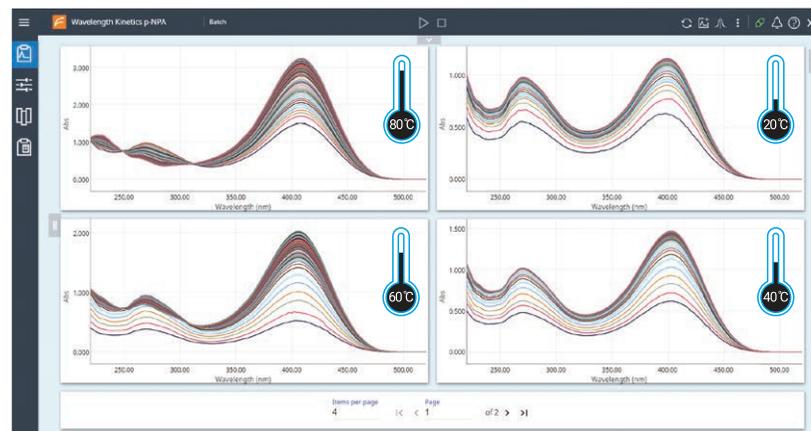


図 35. カイネティクスのスキャン: UV-Vis 分光光度計は、反応の化学的性質について有益な情報を提供します。複数の温度で高速スキャンすることにより、化学反応に対する温度の影響を素早く簡単に観察できます。
[カイネティクスのスキャン実験はこちら。](#)

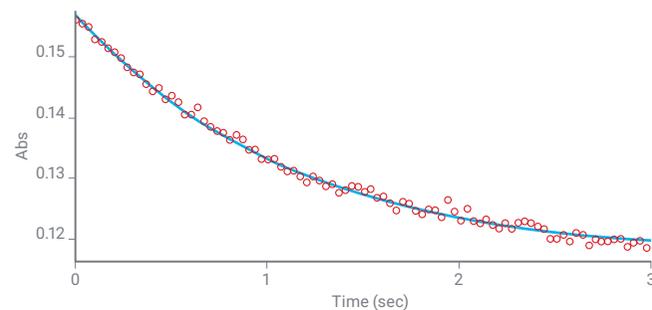


図 36. 最新の UV-Vis 分光光度計と高速混合アクセサリを使用して、わずか数秒の時間で反応を測定できます。
[実験例はこちら。](#)

カイネティクス測定の実験的考慮事項

反応の速度は温度の影響を受ける可能性があります。そのため、一定の温度でサンプルを維持することが重要です。例えば、生物反応には通常、体温（37度）が選択されます。その目的のため、UV-Vis システムでは、ペルチエ冷却/加熱キュベットまたは水冷式サーモスタットキュベットホルダが一般的に使用されています。これらのアクセサリにより、特定の温度でサンプルを維持したり、経時的に温度を変化させたり（昇温）することができます。

温度のわずかな変化や温度変化の速度は結果に大きな影響を及ぼす可能性があるため、温度の精度と再現性は慎重に検討する必要があります。システムによっては、（キュベットホルダの温度を測定するだけでなく）キュベットの内部から直接サンプルの温度を測定できます。温度管理システムへのフィードバックと組み合わせることで、より適切で優れたサンプルの温度制御が可能となります。サンプルの温度プローブは、吸光度データとともに、サンプル温度を記録するためにも使用できます。

一貫性のある、再現性の高いサンプルの攪拌も重要です。室温で反応を測定している場合、攪拌によって、反応中の反応物質が絶えず混合されるようにします。温度調整されたサンプルの場合、サンプル内に温度グラジエントがないことが攪拌により確保されます。

複雑なシステムを測定する場合は、光ファイバプローブを使用することが推奨されることもあります。光ファイバケーブルにより、分光光度計からの光を UV-Vis 分光光度計の外側のサンプルに照射することができます。これは、サンプルが極度の温度や圧力下にある製造プロセスにおける測定や、サンプルが分光光度計のサンプルコンパートメントに物理的に収まらない場合に役立つ可能性があります。

Agilent.com サイトで [カイネティクス実験のデモ](#) をご覧いただけます。

4.5 色測定

色は物質の重要な特性です。物質の色は、特定の波長の光の吸収性や反射性に関連します。図 37 および図 38 に示されているように、人の目は、物質に吸収される補色を認識しています。

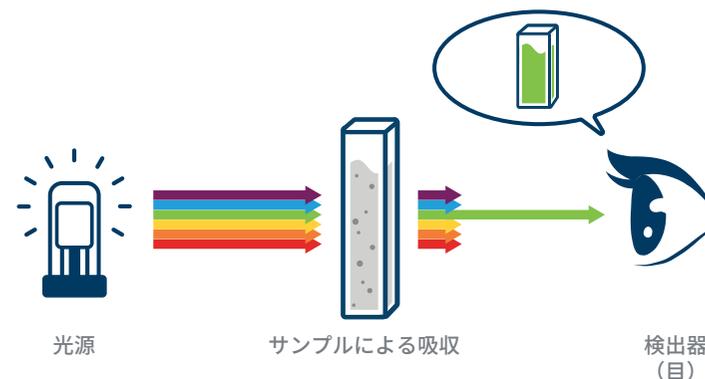


図 37. 透過と色。分光光度計の検出器と同じように、人間の目は、透過する光や、表面で跳ね返る光を知覚します。これが、対象物の色として認識されます。



図 38. さまざまな色に関連する光の波長（左）、および吸収された光の色と人間の目に映る対応の補色（右）

実際のところ、色の生成と知覚は非常に複雑で、以下のような多数の要因に依存しています。

- 対象物に注がれる光のスペクトル（夕焼けと日中での色の違い）
- 固体物質の表面構造（魚の鱗や鳥の羽は、表面の物理的構造により知覚される色が変わる2つの例）
- 視角（パール光沢の塗料など、一部の表面は、見る角度によって色が変わる）

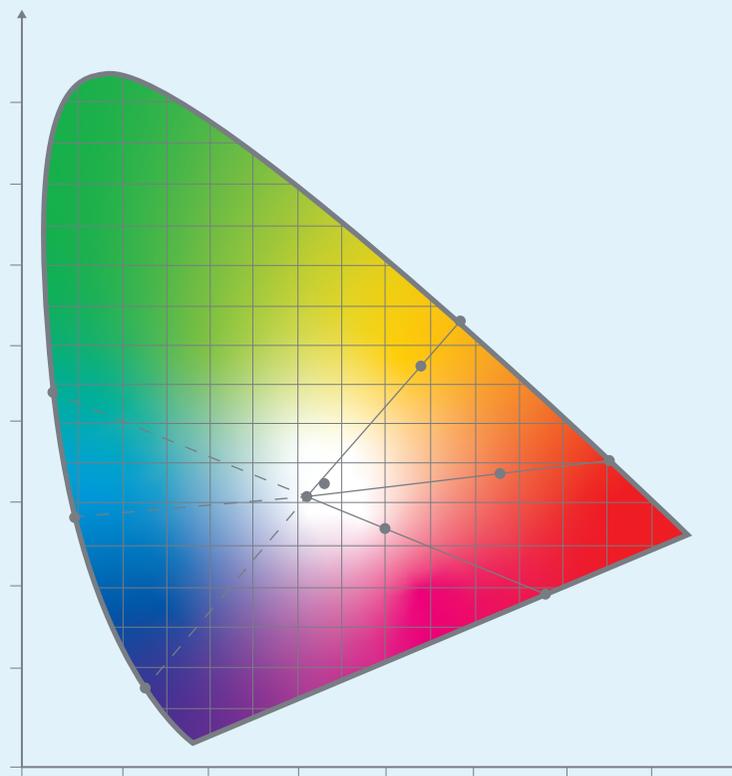
CIE L*a*b などの専用の色測定システムや、色を測定する機器が開発されています。適切なソフトウェアを搭載すると、分光光度計を色測定に使用できます。色の知覚は、表面と、正反射（鏡のような）または拡散反射（散乱）を生成する表面の機能の影響も受けます。このような要因により、色測定には、さまざまな視角で正反射と拡散反射を採取し、観察できるようにする専用のアクセサリが必要になる場合があります。

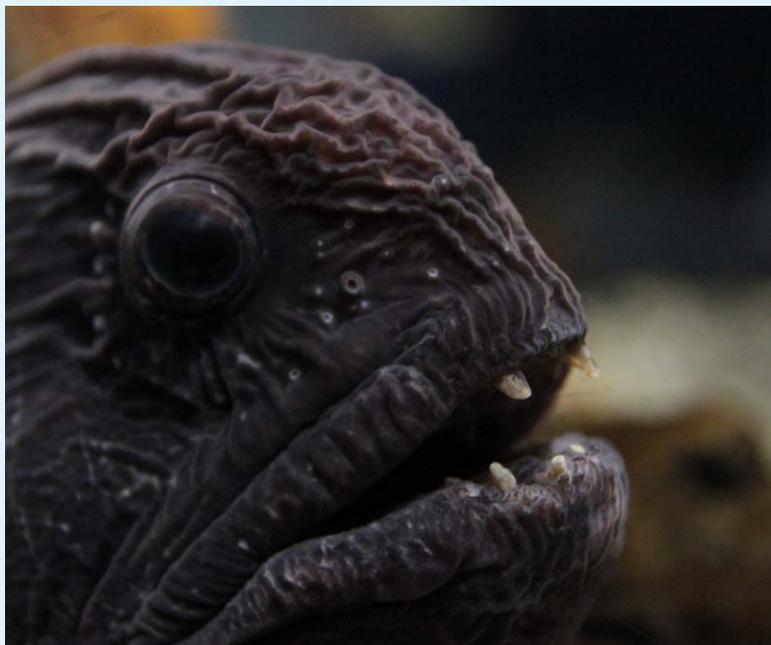
色測定機器では、サンプルの UV-Vis スペクトルを採取し、3次元の色空間に色を位置付ける、3つの色座標に変換します。この立体座標はサンプルの明度、色度、彩度を定義します。明度は色の明暗の測定値です。色度は「色純度」の測定値で、彩度は、虹に見られる色のような、主要なスペクトル色を指します。

UV-Vis 分光光度計は、製品の塗料の色測定など、カラーマッチング測定に使用する以外に、溶液中の色変化を測定するためにも使用できます。このため、UV-Vis 測定は、目視による点検なしで、反応が発生したか進行中であるかどうかを評価するためによく使用されています。色をベースとする分析は、UV-Vis 分光光度計で最も広く使用されているアプリケーションの1つです。

色の測定

UV-Vis 分光光度計を使用して、液体および固体の色を測定できます。溶液や物質を透過する可視光や、表面で反射する光を測定することで、液体や物質の色を算出することができます。一連の3つの数値により、「色空間」に、測定された色の位置を示します。[詳細はこちら](#)





黒はどのくらい暗い？深海魚がヒントに

入射光の 0.5 % 未満しか反射しない極黒の皮膚をもつ深海魚が、研究者たちにより多数発見されています。これらの深海魚は、極黒の皮膚により、見つからないようにして獲物を捕獲します。多くの場合、暗い海に生きる深海生物たちは、生物発光を使用して獲物や天敵を見つけます。極黒の皮膚は生物発光の光を吸収するため、魚の姿は見えません。

スミソニアン国立自然史博物館およびデューク大学の研究者たちが魚の皮膚の反射を測定したところ、99.5 % の光を吸収することが明らかになりました。これはカタカケフウチョウ (99.95 %)、および 99.96 % の光を吸収する、これまで開発された中で最も黒い材料であるベンタブラックに相当します。

魚がもつ光を吸収するメカニズムは、ソーラーパネル、望遠鏡、カメラ、カムフラージュシステムでのアプリケーションが可能です。

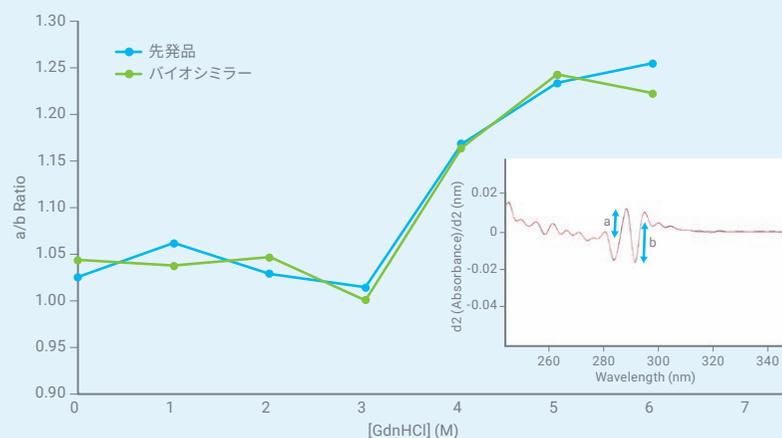
[研究結果を読む](#)

4.6 化合物の構造変化

UV-Vis 分光光度計は化合物の多くの物理化学的特性を判断するために使用できます。これらの測定により、化合物を同定したり、特性を判断したりできます。

構造研究

UV-Vis 分光光度計はタンパク質の構造について価値ある情報を提供できます。UV-Vis 分光光度計は非破壊分析であるため、貴重なサンプルが犠牲になりません。そのため UV-Vis は、LC や質量分析などの手法による分析の前に使用するのに最適です。これを、先発品とバイオシミラーのモノクローナル抗体ペアの比較で示しました。[詳細はこちら](#)



4.7 タンパク質と核酸の溶解温度

UV-Vis 分光光度計は、ライフサイエンス分野において、タンパク質や核酸などの生体分子の分析によく使用されています。タンパク質の吸収スペクトルは、芳香性アミノ酸トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンの吸光度に起因します。多成分分析は、 intact タンパク質に含まれる芳香族アミノ酸の数を同定するのに使用できます。

室温のタンパク質は、芳香族アミノ酸のための特別な電子環境をつくり出す特定の三次構造を持っています。UV-Vis 分光光度計のその他のアプリケーションでは、タンパク質を熱や化学的変性剤に曝露します。これにより、特定の温度または濃度で、タンパク質がアンフォールドまたは溶解し、構造が失われます。

この過程で、芳香族アミノ酸の電子環境が変化し、スペクトルが変化したりシフトしたりします。

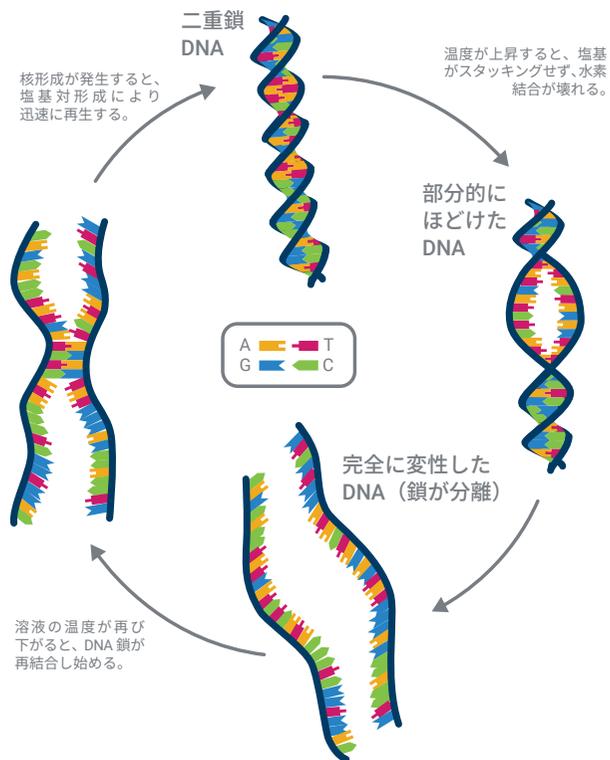


図 39. DNA を加熱すると、DNA 二重らせんの鎖がほどけます。これにより、260 nm における紫外線の吸光度が向上します。DNA が冷却されると、鎖が再結合します。

未変性状態のデオキシリボ核酸 (DNA) は、同じ軸にらせん状に巻かれた二本鎖のデオキシリボース分子を含んでいます。二本鎖は、プリンとピリミジン塩基の間の水素結合によって結合されています。アデニンはチミン (A-T)、グアニンはシトシン (G-C) に結合しています。これらの塩基は主に、260 nm のピーク最大値で、DNA やその他の種類の核酸の紫外線吸収に関与しています。多成分システムと同じように、核酸分子の観察された吸光度は、個々の吸光度の合計と等しくなります。

$$A_{\text{DNA}} = A_{\text{adenine}} + A_{\text{guanine}} + A_{\text{cytosine}} + A_{\text{thymine}}$$

ただし、塩基間の水素結合により電子環境が変化するため、観察される吸光度は必ず、予測よりも大幅に低くなります。分子を加熱すると、水素結合が切断され、二重らせんがほどけて、吸光度が上昇し、すべての塩基の合計から予測される値に近づきます (図 39 を参照)。この変性プロセスは融解または熱溶解として知られています。熱溶解実験で、二本鎖核酸ソリューションの温度を段階的に上昇させ、各温度の 260 nm における吸光度を測定し、融解曲線としてプロットしました (図 40 を参照)。溶解が発生する温度範囲の中間点は T_m 値です。特定の核酸サンプルの T_m 値は、主にサンプルに含まれる 3 本の水素結合をもつ G-C ペアの比率に依存しています (一方、各 A-T ペアに含まれる水素結合は 2 本です)。サンプル中の G-C ペアの比率が上昇するほど、観察される T_m が高くなります。

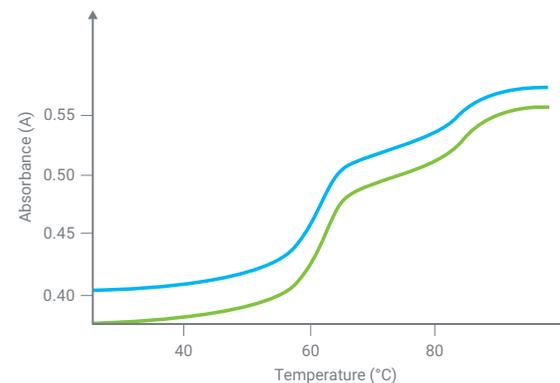


図 40. 温度上昇させながら 260 nm で吸光度を測定した結果が、DNA「溶解」のこの特徴的なグラフに示されています。吸光度の変化は、DNA がらせんがほどける際の複数の遷移を示しています。

タンパク質と DNA 溶解の分析を行うためには、UV-Vis 分光光度計に、サンプル温度を正確に再現性よく変化させる手段がなければなりません。近年の分光光度計の進歩により、熱溶解測定全体にかかる時間が大幅に短縮され、従来よりも温度精度が向上しています。UV-Vis 熱溶解分析システムは、実験中に溶液の温度を高精度で制御できる、キュベット内温度プローブが搭載されています。また、確実にサンプルを均一に加熱するための、キュベット内攪拌機能も備えています。多数のサンプルを分析する場合に備えて、マルチセルホルダが組み込まれているか、

機器に付属しています。ペルチェ式温度アクセサリの多くは、ペルチェ素子を冷却するための循環式のウォーターバスが必要です。最近の革新技術により、セルブロックで空冷式のペルチェを使用できるようになりました。必要な温度範囲は通常 0 ~ 110 °C で、温度モニタリングと攪拌機能が搭載されているため、分析中にできるだけ迅速にサンプルを昇温できます。

核酸の熱溶融分析

サンプル温度の制御は、UV-Vis 熱溶融システムにおいて重要な要件です。キュベット内温度プローブを使用することで、迅速で再現性の高い加熱が可能です。[詳細はこちら](#)



4.8 多成分分析

紫外可視スペクトルを使用した多成分分析は、単一成分分析と同じくらい長い間にわたり行われてきました。しかし、多成分分析で使用される技法では不正確な結果が出るのがよくあり、広く普及していませんでした。優れた設計の最新の UV-Vis 分光光度計ではより正確なデータを得ることが可能で、最新の曲線近似手法はより正確な結果を提供します。さらに重要なことは、結果が不正確である場合を示すという点です。

加算の原理

ベールの法則に従うと、吸光度は、特定の波長で放射線を吸収する分子の数に比例します。この原理は複数の吸光種がある場合に当てはまります。すべての多成分定量メソッドは、混合物の任意の波長における吸光度が、該当の波長における混合物の各成分の吸光度の合計と等しいという原理に基づいています。

多成分分析に対する簡単な手法は、混合物の成分数と等しい数の波長での測定をベースとします。通常、選択される波長は、各成分の最大吸光度の波長です。キャリブレーションの場合は、既知の濃度の純成分で構成された標準の吸光度を測定し、選択された各波長での各成分の吸光係数を決定します。各波長の混合物の吸光度は、該当の波長の各成分の吸光度の合計であり、

同様にそれは、各成分の吸光係数と濃度に依存しています。したがって、2つの成分 x および y の式は次のようになります。

$$A'_{(x+y)} = A'_x + A'_y = e'_x bc_x + e'_y bc_y$$

および

$$A''_{(x+y)} = A''_x + A''_y = e''_x bc_x + e''_y bc_y$$

ここで、

- A' は波長 ' における吸光度
- A'' は波長 '' における吸光度
- e' は波長 ' におけるモル吸光係数
- e'' は波長 '' におけるモル吸光係数
- c は濃度
- b は光路長

簡単にこれらの式を解いて、各成分の濃度を決定できます。測定が常に正確である場合は、非常に似たスペクトルをもつ成分の複雑な混合物であっても、正確な結果を取得できます。ただし、実際のところ、測定エラーは常に発生します。このようなエラーは、大きなスペクトルオーバーラップがある場合に、結果の精度に大きな影響を及ぼす可能性があります。図 41 に、最大吸光度でスペクトルオーバーラップがない、2成分の模擬混合物を示します。

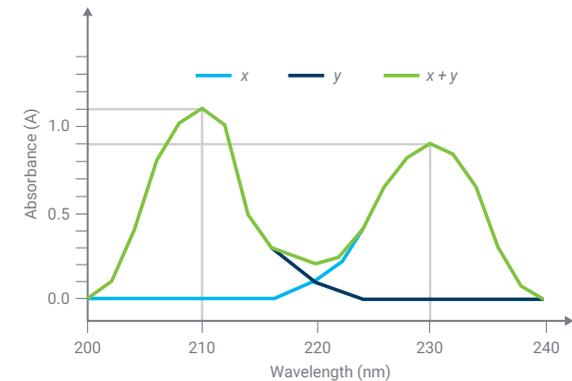


図 41. スペクトルオーバーラップがほぼない 2 成分の混合物

また、図 42 に、最大吸光度で大きなスペクトルオーバーラップがある、2 成分の模擬混合物を示します。

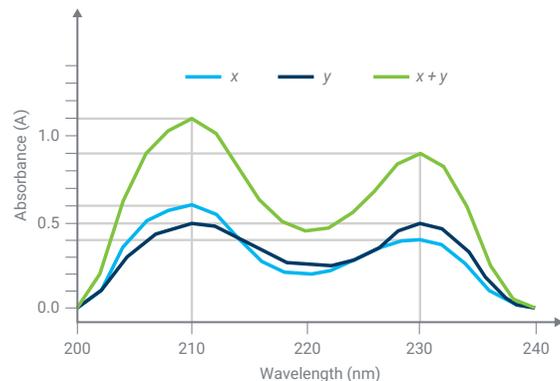


図 42. 大きなスペクトルオーバーラップがある 2 成分の混合物

スペクトルオーバーラップがほぼない	大きなスペクトルオーバーラップがある
$A'(x+y) = 1.1 + 0.0 = 1.1$	$A'(x+y) = 0.6 + 0.5 = 1.1$
$A''(x+y) = 0.0 + 0.9 = 0.9$	$A''(x+y) = 0.4 + 0.5 = 0.9$

x と y の混合物に対し、 $cx = cy = 1$ 、測定吸光度は次のようになります。

$A'(x+y)$ および $A''(x+y)$ の測定で 10% のエラーが発生した場合、 $A'(x+y) = 0.99$ (-10%) および $A''(x+y) = 0.99$ (+10%) となります。定量の計算の結果を表 6 に示します。

表 6. スペクトルオーバーラップがほぼない事例と大きなスペクトルオーバーラップがある事例の多成分分析結果の比較

成分	公称濃度	算出濃度	スペクトルオーバーラップがほとんどない		大きなスペクトルオーバーラップがある	
			誤差 %	算出濃度	算出濃度	誤差 %
x	1	0.9	-10 %	0.0	0.0	-100 %
y	1	1.1	+10 %	1.98	1.98	+98 %

最小二乗法

追加のスペクトル情報を使用することで、ランダムノイズの効果を抑制できます。つまり、2 点だけではなく、一連のデータポイントを定量に使用できるということです。このいわゆる優決定系で、測定されたサンプルのスペクトルに対する標準スペクトルの最小二乗適合により、定量結果を取得できます (1、2)。図 43 は、各測定ポイントに 10% ランダムエラーがある、図 42 に示された 2 成分混合物のスペクトルです。

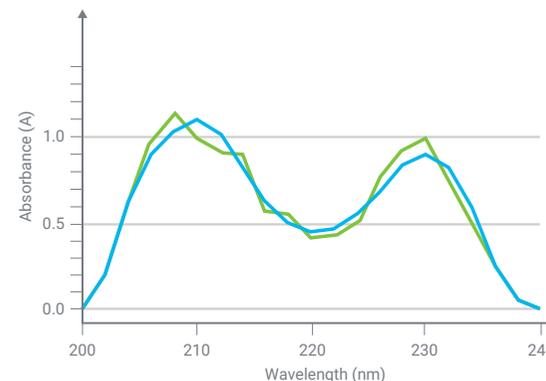


図 43. 各波長に 10% ランダムエラーがある混合物のスペクトル。

表 7 に示されているように、2 つの波長の通常の測定におけるエラーをおよそ 100% とすると、21 のデータポイントを用いた (200~240 nm で 2 nm 間隔) 最小二乗法による定量結果では、エラーが 1% 未満となりました。

表 7. シンプルな連立方程式と最小二乗法による多成分分析結果の比較

成分	公称濃度	算出濃度	210 および 230 nm のみを使用	200 ~ 240 nm を使用	
			誤差 %	算出濃度	誤差 %
x	1	0.0	-100 %	1.003	+0.3 %
y	1	1.98	+98 %	0.995	-0.5 %

この手法により、より複雑な混合物、および類似のスペクトルをもつ成分の単純な混合物の分析が可能です。最小二乗法の計算の残差は、標準スペクトルがサンプルスペクトルにどの程度適合しているかを良好に示すため、結果の推定の精度の優れた指標になります。

多成分分析の一例は、最小限のサンプル前処理による、血液中の5種のヘモグロビンの定量です(3)。図44にヘモグロビン誘導体の吸収スペクトルを示します。この分析は従来、分光分析法や滴定法など、さまざまな分析技法を用いて行われてきました。

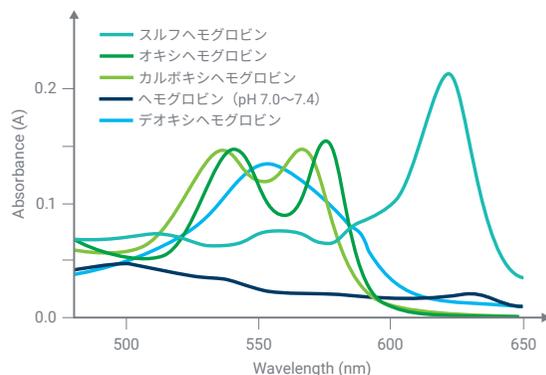


図 44. ヘモグロビン誘導体の吸収スペクトル

その他のメソッド

多成分分析に対するその他の統計的アプローチには、部分最小二乗法 (PLS)、主成分回帰 (PCR)、多重最小二乗法 (MLS) などがあります。理論上、これらの手法は、上記で説明してきた手法と比べていくつかの利点がありますが、キャリブレーションのプロセスがより複雑になる可能性があります。

サンプルの要件

シンプルな連立方程式と最小二乗法によって正確な分析結果を得られるのは、サンプル中の各成分が紫外可視スペクトルに関与するよう、純粋標準または標準混合物を使用してキャリブレーションを実施した場合に限られます。未知のサンプルに、追加の吸収性能があってはなりません。

機器の要件

通常、単一成分の定量は、同じ機器で標準または一連の標準を測定した後に、未知化合物を測定することで実施します。このキャリブレーションプロセスによって機器のバイアスを排除し、絶対波長精度と絶対測光精度の重要度を相対的に下げる必要があります。一方で、正確な結果のためには測光再現性が不可欠です。最大吸光度でのみ測定が実施されている場合は、波長による吸光度の変化率は低いため、波長再現性もあまり重要でなくなります。しかし、バンドの片側の波長が使用されている場合、波長再現性は特に重要になります。最後に、キャリブレーションプロセスは直線相関性に依存するため、機器の直線性範囲は重要です。特にシンプルな連立方程式メソッドが使用されている場合など、正確な多成分分析には、優れたシグナル/ノイズ比性能が必要です。最小二乗法では、吸収バンド両側からのデータが計算に組み込まれるので、この場合も良好な波長再現性が重要となります。また、より多くのデータが要求されるため、生産性のために高速スキャンが必要です。

4.9 ソフトウェア要件

収集されたデータを解析するためのデータモデルの作成に役立つ専用の多成分ソフトウェアがあります。これらのソフトウェアパッケージは、機器のソフトウェア制御機能やレポートソフトウェアに組み込むか、独立したパッケージとして使用できます。市販されている大半の UV-Vis システムでは、処理のために、多成分ソフトウェアパッケージにインポート可能な標準フォーマットで、データをエクスポートできます。

参考文献：

1. Kisner, H.; Brown, W.; Kavarnos, G. "Multiple analytical frequencies and standards for the least-squares analysis of serum lipids. **Anal. Chem.** **1983**, 55, 1703.
2. Maris M.; Brown, C.; Lavery, D. Nonlinear multicomponent analysis by infrared spectrophotometry. **Anal. Chem.** **1983**, 55, 1694.
3. Zwart, A.; van Kampen, E.; Zijlstra, W. Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with a reversed-optics instrument. **Clin. Chem.**, **1984**, 30, 373.



5.用語集

吸光度：1. 光を吸収する物質の特性 2. 光吸収の単位。A または Abs で表します。

アーク (ランプ)：不活性ガスを通じて電気または電流アークによって光を発します。

ベースライン：サンプルを配置せずに、サンプル測定として同じパラメータの下で収集される測定値。機器、溶媒、キュベットなどの影響が、最終的なサンプル測定値から差し引かれるため、通常ブランクはベースライン測定に使用します。

ブランク：吸光種を含まない、サンプルの溶媒または基質。液体サンプルを測定する場合、キュベット中の溶媒（大抵は水）を測定します。次にブランクの吸光度をサンプルの吸光度から差し引き、サンプルのみに起因する吸光度を求めることができます。

カロテノイド：一部の植物、藻類、細菌において光合成に関連している発色団。

発色団：光を吸収する分子の部分。

CRM：略語。認定標準物質。比較のための、一次標準に認定され供給されている標準物質

キュベット：一般的にセルと呼ばれる、液体サンプルを保持する容器。キュベットにはさまざまな容量と光路長があります。キュベットの材料により光透過性が決定されます。

拡散：光学設計において、光を構成波長に分離する光学装置の性能を指します。例えば、プリズムで白色光は拡散を通じてレインボー効果を生成します。

蛍光：発光の 1 つの形態であり、任意の周波数で光を吸収し、他の波長で短寿命の光を放つ一部の分子の特性です。

GMP：略語。医薬品適正製造基準。医薬品やその他の規制対象製造分野で一般的に使用されている規範。

ホログラフィック (光学)：ホログラフィック光学系は、光学表面に干渉パターンをエッチングすることにより作成されます。ホログラフィック光学系は、レンズ、鏡、その他の光学素子の代わりに使用できます。その設計により、正確に複製することが簡単で、小型で軽量です。

ノイズ：分光光度計の用語において、ノイズは、機器自体を起因とする、バックグラウンド電気信号を指します。ノイズが大きすぎると、測定信号に悪影響を及ぼし、2 つの信号を識別するのが難しくなる可能性があります。これは、遠隔地で星を見る場合と、市街地で見ると比べて考えると分かりやすいです。市の光による背景光（「ノイズ」）により、星が見づらくなります。遠隔地では背景光がほとんどないため、星の光がよく見えます。

ペルチェ：ペルチェは、熱電結合によって操作される加熱/冷却装置です。装置の片側からもう一方の側へ熱を伝達します。サンプルの正確な温度制御を実現します。

薬局方：医薬品に関する詳細情報と、医薬品業界を対象とした必須または推奨の試験手順が記載された規制文書。

リン光：蛍光に関連する発光の 1 つの形態。任意の周波数で光を吸収し、他の波長で遅延発光を放つ一部の分子の特性です。

光化学 (反応)：光の吸収により発生する化学反応。

感光性：光に暴露した場合に反応する物質の感度。

QA/QC：略語。品質管理または品質保証。

定性 (測定)：溶液中の分子の同定など、サンプルに関する非数値的な情報を提供する測定。

定量 (測定)：濃度など、数値の結果を提供する測定。

希土類酸化物：波長検証測定に使用するために、ホルミウム、ジジミウム、サマリウム酸化物が規制機関や薬局方によって参照されています。

反射：入射角で屈折する光の経路を指します。

分散：ランダムな角度で表面から反射する光の効果。

SOP：略語。標準操作手順書。安全に、再現可能なように測定が形成されることを確保するために作成された文書。

スペクトル：波長の範囲。電磁スペクトル。また、通常は、波長と強度（または吸光度。分光光度計での測定の場合）のグラフィックアウトプットを指します。

SST：略語。システム適合性試験。システムが目的に適していることを判断するための試験。

透過率：サンプルを透過する入射光の比率。

ゼロ化：これは、一連のスケールの「風袋引き」機能に相当します。機器の読み取り値を 0 Abs に設定します。

ホームページ

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

カスタマコンタクトセンタ

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いません。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-008895

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, August 19, 2025

5980-1397JAJP

