

UV

TALK LETTER

Vol. 21
March 2021



測定パラメータが紫外可視吸収スペクトルに与える影響 …… P. 2

Applications 極微量測定セルによる分析事例のご紹介 …… P. 6

Q&A 吸光度 (Absorbance) と光学密度 (Optical density: O.D.) の違いはなんですか? …… P. 13

光反応評価装置 Lightway …… P. 14

測定パラメータが紫外可視吸収スペクトルに与える影響

分析計測事業部 スペクトロビジネスユニット

西井 啓起

1. はじめに

紫外可視分光光度計は対象物質の吸収スペクトルを測定する時に使用しますが、測定時に設定するスリット幅・スキャン速度・データ間隔などの測定パラメータを変更すると、得られる吸収スペクトルのピーク幅やノイズ量が変化します。したがって、スペクトル測定時には、目的とするデータ取得

のための最適なパラメータを設定する必要があります。

今回は、測定パラメータであるスリット幅・スキャン速度・データ間隔が紫外可視吸収スペクトルに与える影響について説明します。

2. 測定パラメータ -スリット幅（分解）-

測定パラメータの1つである「スリット幅」とは、紫外可視分光光度計に使用される分光器出入口の光の幅を設定するパラメータです。分光器により分散された光は虹状に広がるため、スリット幅が狭いほど特定波長の光に関する情報を取り出せることになります。例えば、スリット幅1 nmで540 nmの光を測定する場合、得られるデータには539.5 nm～540.5 nmの情報が混ざったものになります。この波長幅のことを分解と呼び、高分解になるほど各波長について正確な測定が可能となります。ただし、高分解にすることで生じるデメリット

もあります。スリット幅を狭く設定した場合、スリットを通過する光量が少なくなるため、検出器に届く光量も減少します。この結果、取得する測定データに乘るノイズ量が大きくなります。このように、スリット幅とノイズ量は裏表の関係にあり、どのようなデータを取得したいのかにより最適なスリット幅は異なります。

なお、分解の最適値は取得したいデータによって異なります。図1はベンゼンのエタノール溶液のスペクトルを異なる分解で測定した結果です。

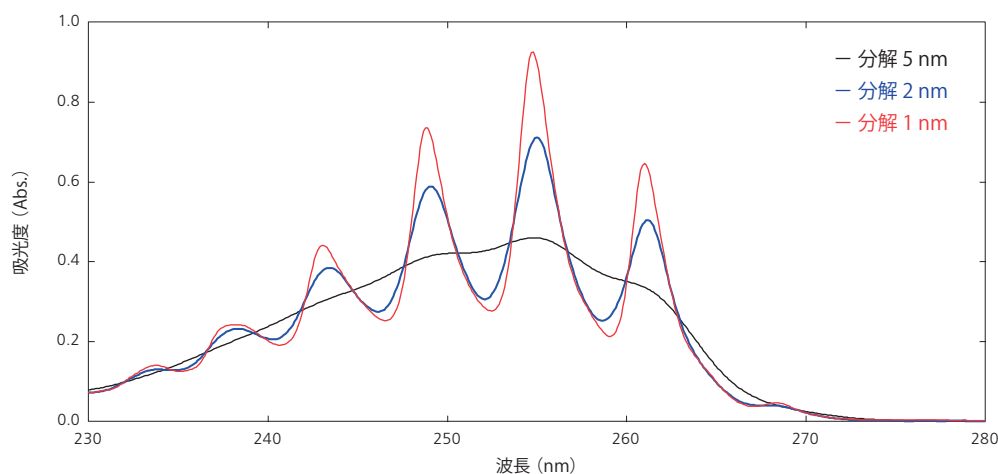


図1 ベンゼンのエタノール溶液のスペクトル

ベンゼンは230～270 nm付近にシャープな7本のピークが得られますが、分解を下げると徐々にピーク形状が鈍り、分解5 nmではピークはほとんど検出できないことがわかります。一般的に、取得したいピークの半値幅より分解が大きい場合は、このようにピークの検出が難しくなることが知られ

ています。測定対象物のピークがブロードである場合やノイズが気になる場合はスリット幅を広く、シャープであるピークの場合にはスリット幅を狭く設定し、最適なスリット幅を設定してください。

3. 測定パラメータ - スキャン速度 -

「スキャン速度」とは、波長を走査する速度です。スペクトル測定では、スキャン速度に応じてデータの積算時間（検出器が光を検出する時間）を自動で設定します。積算時間はスキャン速度が速いほど短く、遅いほど長くなります。積算時間が長い方がノイズを低減することができますが、スキャン速度が遅くなるので測定時間がより長くなります。

なお、当社の紫外可視分光光度計では、「超低速」

「中速」「高速」の4段階にくわえて、UV-1900iでは「高速」よりさらに速い「サーベイ（29,000 nm/min）」をご用意しております。

UV-1900iを使用し、3つの異なったスキャン速度（サーベイ、高速、超低速）で400～900 nmの波長範囲を測定したベースラインデータを図2に、測定に要した時間を表1に示します。

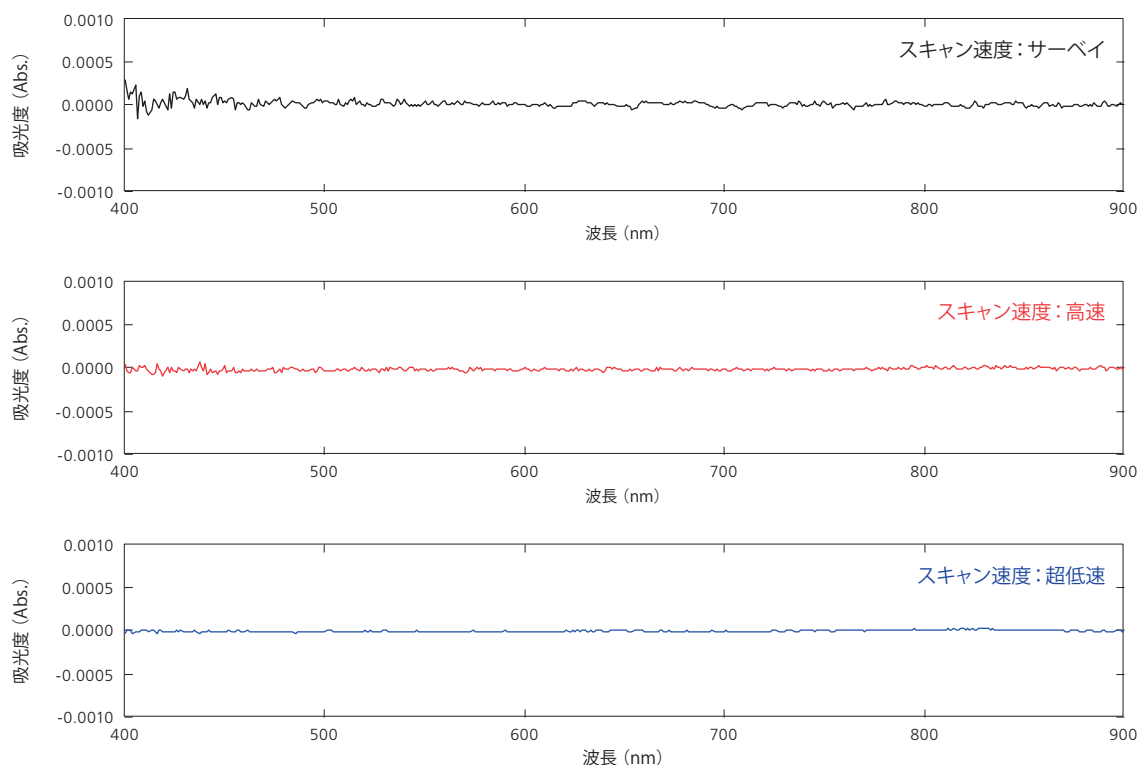


図2 様々なスキャン速度におけるベースラインデータ

表1 様々なスキャン速度における測定に必要な時間（データ間隔は1 nmに設定）

スキャン速度	測定時間
サーベイ	約15秒
高速	約45秒
中速	約107秒
低速	約235秒
超低速	約870秒

図2を見ると、スキャン速度が遅いほどベースライン上のノイズは少なくなることがわかります。またここには示しませんが、スキャン速度を速く設定した場合には測定時間は短くなりますが、本来のピーク位置がわずかに短波長側にシフトする場合もあるため、注意が必要です。

広い波長範囲で測定する場合や、おおまかなピーク位置を確認するような場合には、スキャン速度を速く設定することで効率よくデータ取得が可能となります。一方で、より正確なデータ取得を希望される場合には、スキャン速度を遅くすることをお勧めします。

4. 測定パラメータ - データ間隔 -

「データ間隔」とは、測光値を取り出すための波長間隔です。測光値情報を細かく取得したい場合にはデータ間隔を細かく設定しますが、測定時間が長くなります。

図3には、データ間隔を変えて同じピークを測定しようとした場合のイメージ図を示します。

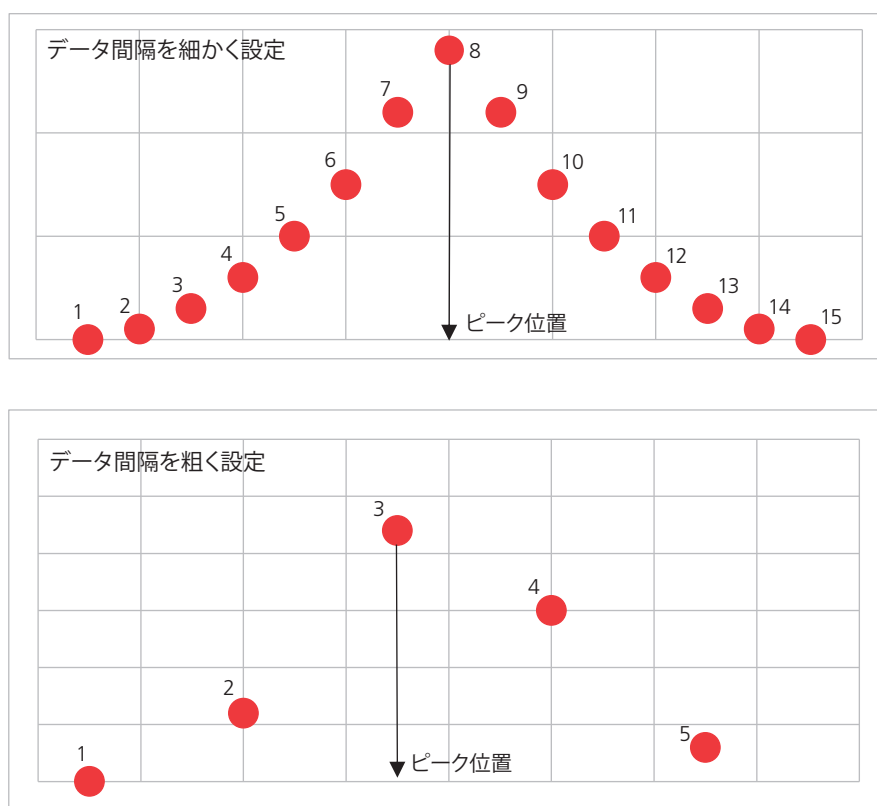


図3 データ間隔を変えた時の測定のイメージ (点は取り出された測光値)

図3において、データ間隔を細かく設定した場合にはピーク位置は上図の赤点8となりますが、粗く設定した場合のピーク位置は下図の赤点3となり、ピーク位置が異なりますので、ご注意ください。

なお、当社の紫外可視分光光度計では装置のグレードに

よっても変わりますが、0.05 nm、0.1 nm、0.2 nm、0.5 nm、1.0 nm、2.0 nm、5.0 nmで設定が可能です。(UV-1900iの超高速スキャンであるサーベイの場合には1.0 nm、2.0 nmからの選択)。

5. 測定パラメータ -まとめ-

今回で説明した各パラメータが、スペクトルに与える影響をまとめたものを表2に示します。

表2 各パラメータがスペクトルに与える影響

パラメータ	設定	分解	ノイズ量	測定時間
スリット幅	広い	大	少	—
	狭い	小	多	—
スキャン速度	速い	—	多	速い
	遅い	—	少	遅い
データ間隔	粗い	—	—	速い
	細かい	—	—	遅い

6. さいごに

今回は、スペクトル測定における各種パラメータの説明と、測定データに与える影響を説明しました。これらのパラメータを最適に設定することで、効率よく、正確な測定が

可能となります。

今回の内容が、測定でお困りのお客様にとって有益な情報になれば幸いです。

Applications

極微量測定セルによる分析事例のご紹介

分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター
丹下 祥之

1. はじめに

試料（溶液）の吸光度測定を行う際にはセルを用いますが、材質、容量、形状により様々なセルがあります。最も一般的に使用されるセルは光路長 10 mm の石英セルですが、特に DNA/RNA やプロテインなどの定量を行うライフサイエンス分野では、十分な試料量を確保することが困難である場合が多く、極微量での測定が求められています。

今回は、上記のニーズに対応可能な2種類のセル（Nano

Stick-SとTrayCell™）の特長と分析事例をご紹介します。

なお、ここでご紹介する2種類のセルに共通する特長は、光路長が短いため少量の試料で測定できるだけでなく、場合によっては希釈せずに吸光度の高い試料の測定も可能となります。さらに使用する試料量が少量であるため、測定後の洗浄は窓板上に滴下した試料を拭くだけで済み、洗浄作業が非常に簡便です。

2. Nano Stick

Nano StickはSCINCO社製の極微量測定セルです。試料を入れるサンプリングポートが1つのNano Stick-Sと2つのNano Stick-Dがあります（Nano Stick-Dはリファレンス用とサンプル用のポートがあり、上下逆さにすることによって1つ

のセルでリファレンス測定とサンプル測定が可能です）。ここでは、Nano Stick-Sについてご説明します。セル外観を図1に、仕様を表1に示します。



図1 Nano Stick-Sの外観

光路長は0.5 mmで、測定に必要な試料量は2 μ Lと極微量です。またサンプリングポートの材質には石英が使われているため、紫外から近赤外まで広い波長域に使用可能です。

なお、セル内に気泡や塵などが混入した場合には乱反射

表1 Nano Stick-Sの仕様

光路長	0.5 mm
サイズ (W×D×H)	12.5×12.5×60.0 mm
光軸高さ	15.0 mm
最小試料量	2 μ L
窓（サンプリングポート）材質	石英
使用可能波長範囲	190 – 1,100 nm

の原因となり、得られるデータに影響を与えます。Nano Stick-Sには、これらの気泡や塵などの混入を確認するためのバブルチェッカー（図2参照）が付属していますので、測定前に混入物の有無を確認することができます。

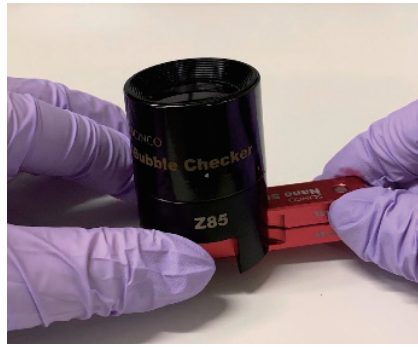


図2 バブルチェッカーによる混入物の確認

図3にはNano Stick-Sの使用方法を示します。



図3 Nano Stick-Sの使用方法

使用方法は以下の通りです。

- ① セル部を2つに分け、サンプリングポートに試料を滴下します。
- ② もう一方のセル部で挟んで試料を保持します。
- ③ セルホルダにNano Stick-Sを挿入し測定します。
- ④ 測定後、セル部を2つに分け、サンプリングポートに付着した試料を拭き取ります。

3. TrayCell

TrayCellはHellma社製の極微量測定セルです。セル外観を図4、セル内部の光学系を図5に示します。



図4 TrayCellの外観

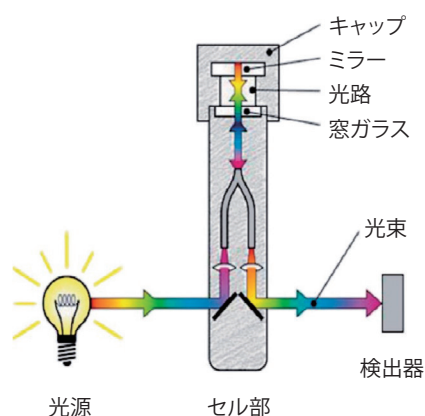


図5 TrayCell内部の光学系

TrayCellはセル部とキャップから構成されており、光路長は、図5に示した窓ガラスとキャップ内部のミラーとの距離によって決定されます。

次に、TrayCellの仕様を表2に示します。

表2 TrayCellの仕様

光路長	0.1、0.2、1.0、2.0 mm
サイズ (W×D×H)	12.5×12.5×59.5 mm
光軸高さ	15.0 mm
最小試料量	0.7 – 3.0 μL (光路長0.1 mm) 0.7 – 4.0 μL (光路長0.2 mm) 3.0 – 5.0 μL (光路長1.0 mm) 6.0 – 10.0 μL (光路長2.0 mm)
窓材質	石英
使用可能波長範囲	190 – 1,100 nm

標準のキャップを用いることにより、光路長を0.2 mmもしくは1.0 mmに設定可能です。オプションのキャップをご購入されれば、光路長0.1 mmもしくは2.0 mmにも対応可能です。光路長によって測定に必要な試料量は変わりますが、最小

0.7 μL と極微量です。また窓板の材質には石英が使われているため、紫外から近赤外まで広い波長域に使用可能です。

図6にはTrayCellの使用方法を示します。

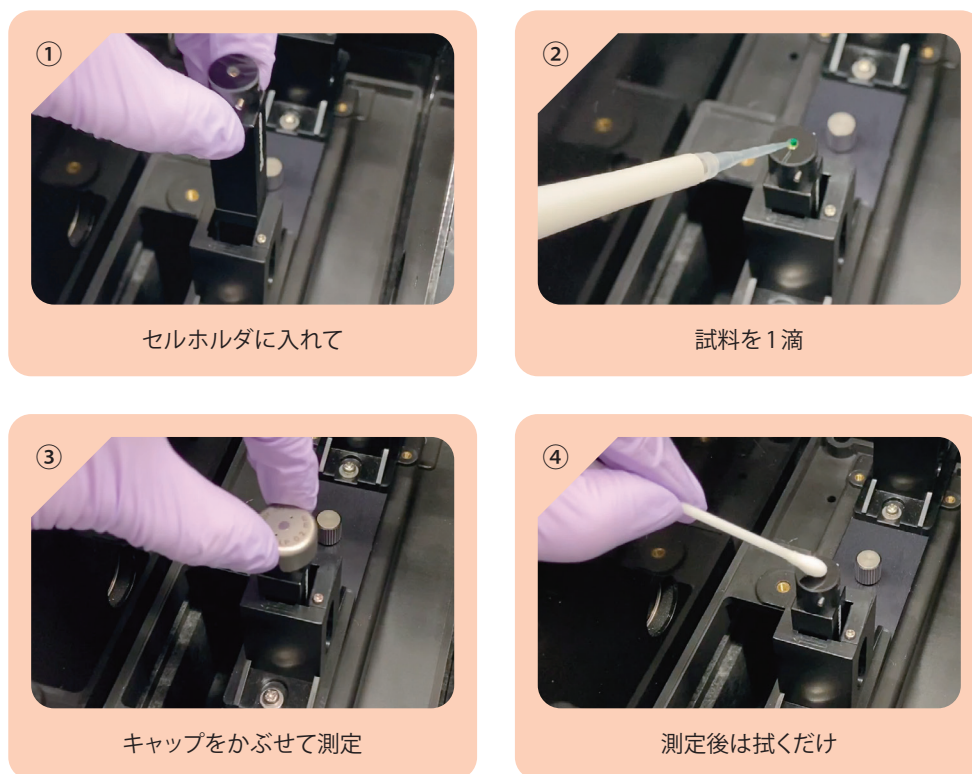


図6 TrayCellの使用方法

使用方法是以下の通りです。

- ① セルホルダにTrayCellを挿入します。
- ② キャップを外し、必要試料量を滴下します。
- ③ キャップを取り付け測定します。
- ④ 測定後、キャップを外し、綿棒などで試料を拭き取ります。

4. 2種類の極微量測定セルにおける定量性の評価

Nano Stick-SとTrayCellについて検量線の直線性と繰り返し精度について評価しました。測定試料には二本鎖DNAの一種であるLambda-DNA用い、27.5 ~ 440 ng/μLの範囲で濃度の異なる標準試料5点を測定しました。測定条

件を表3に、各々の極微量測定セルで得られた各濃度のスペクトル重ね書きを図7に、得られた検量線を図8に示します。

表3 測定条件

装置	紫外可視分光光度計 UV-1900i
測定波長範囲	220 – 330 nm
データ間隔	1.0 nm
スキャン速度	低速
スリット幅	1.0 nm
セルの光路長	0.5 mm (Nano Stick-S) 1.0 mm (TrayCell)

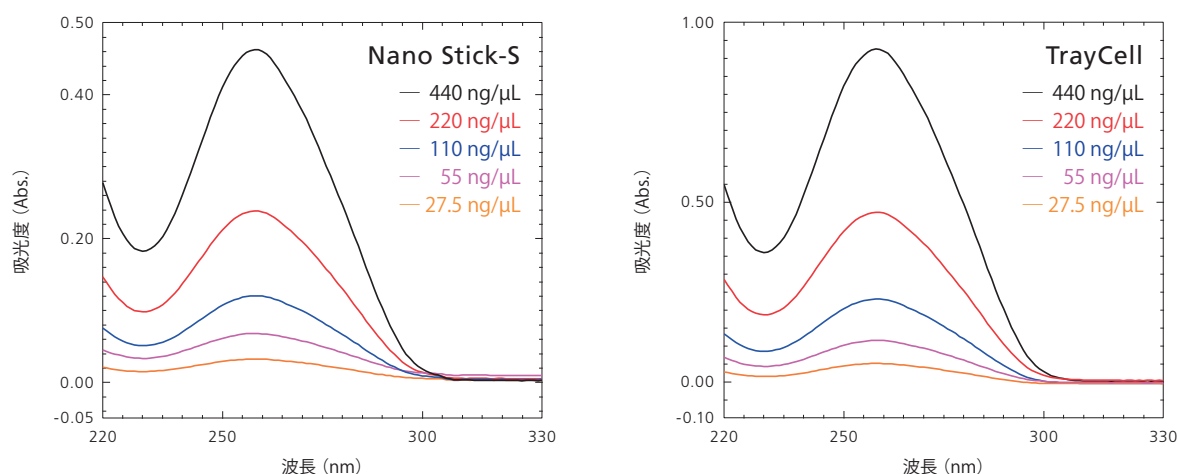


図7 各濃度におけるLambda-DNA吸収スペクトルの重ね書き

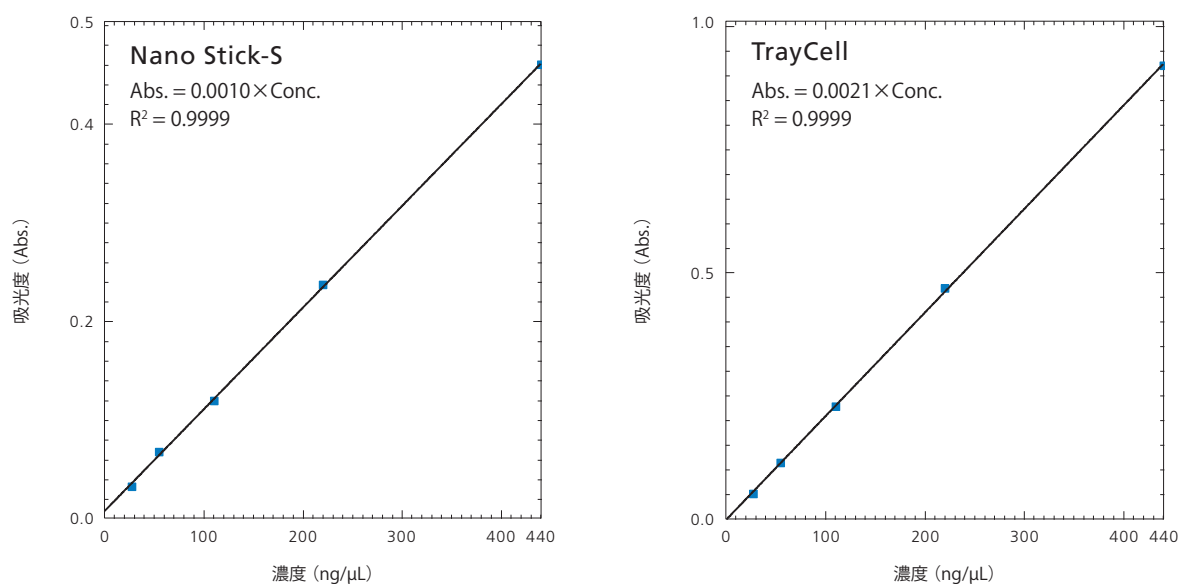


図8 検量線

2種類のセルともに、相関係数の2乗は0.9999となり、良好な直線性を示すことができました。

次に、濃度440 ng/μLの試料を繰り返し10回測定した結果を表4に示します。ここで、2種類のセル光路長が異なるた

め、標準偏差ではなく、標準偏差を平均値で割った値である変動係数(CV値)で評価を行いました。なお、吸光度値はピーク位置(260 nm)からベースライン位置(320 nm)の吸光度値を引いた値($A_{260}-A_{320}$)を用いました。

表4 繰り返し再現性の評価結果

No.	Nano Stick-S	TrayCell
	吸光度値 ($A_{260}-A_{320}$) / Abs.	
1	0.461	0.932
2	0.457	0.929
3	0.464	0.931
4	0.458	0.929
5	0.458	0.934
6	0.459	0.933
7	0.459	0.930
8	0.459	0.933
9	0.459	0.927
10	0.460	0.939
平均値	0.459	0.932
標準偏差	0.0020	0.0034
変動係数 (CV値)	0.0043	0.0036

表4に示したCV値を見ると、Nano Stick-SよりもTrayCellの方が再現性に優れていることがわかります。

5. 高吸光度試料の測定

塗料や染料、プリンタ用のインクといった試料は多量の色素を含んでいるため、高い吸光度値を示します。このような試料を一般的な光路長10 mmの石英セルで測定する場合には1回の希釈では測定可能範囲に収まらず、段階的に希釈する必要があります。段階的な希釈は手間がかかるだけでなく、誤差の要因ともなります。しかし、今回ご紹介する極微量測定セルは短光路長であるために得られるピーク強度が弱く、高吸光度試料においても複数回の希釈を必要としません。

ここでは、10 mm石英セルとTrayCell（光路長0.2 mm）を用いて高吸光度試料である水溶性赤色染料を測定した事例をご紹介します。なお、希釈液として超純水（Milli-Q水）を用い、10 mm石英セルでは5,000倍希釈（2段階希釈）、TrayCellでは100倍希釈したのちに測定を行いました。測定条件を表5、得られたスペクトルを図9に示します。

表5 測定条件

装置	紫外可視分光光度計 UV-1900i
測定波長範囲	300 – 800 nm
データ間隔	1.0 nm
スキャン速度	中速
スリット幅	1.0 nm
セルの光路長	10 mm (石英セル) 0.2 mm (TrayCell)

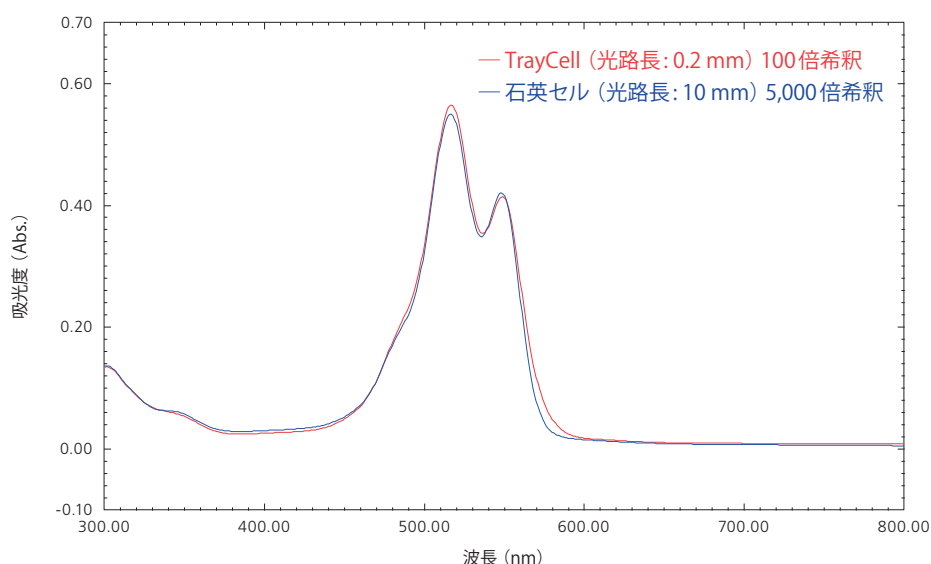


図9 水溶性赤色染料の吸収スペクトル

それぞれのスペクトルを比較すると、希釈誤差やセル差による影響は見られるものの、おおむね一致したスペクトルが得られました。

今回測定に用いた赤色染料について、10 mm石英セルでは2段階希釈が必要でしたが、TrayCellでは1回の希釈で10

mm石英セルと同等のデータ取得が可能であることがわかりました。ただし、試料希釈時にコロイド状に成分が分散するような試料では、光散乱の影響を受けてベースラインが浮き上がることも考えられるため、注意が必要です。

6. まとめ

今回ご紹介した極微量測定セルであるNano Stick-SとTrayCellについて、各々の利点を表6にまとめます。

表6 Nano Stick-SとTrayCellの利点

セル	利点
Nano Stick-S	・極微量測定が可能 ・高吸光度試料の測定が容易 ・バブルチェッカーによるセル内の気泡や塵などの確認が可能
TrayCell	・極微量測定が可能 ・高吸光度試料の測定が容易 ・光路長の選択が可能 ・再現性に優れている

Nano Stick-SやTrayCellを活用すると、ライフサイエンス分野におけるDNA/RNAやプロテインなどの定量分析を精度よく実施できることや、高吸光度試料の測定も容易に行え

ることがわかりました。

本稿が、皆様のより適切なセル選定の一助になることを願います。

Q&A

吸光度 (Absorbance) と光学密度 (Optical density: O.D.) の違いはなんですか？

吸光度と光学密度の算出方法は同じですが、概念が異なります。

【吸光度 (Absorbance)】

吸光度は物質による光吸収の大きさを示す指標です。物質は光が照射されると、いくらかの光エネルギーを吸収し、その他の光は透過します (図1)。紫外可視分光光度計では、入射光 (I_0) と試料からの透過光 (I) から、吸光度を算出します (式1)。

$$\text{吸光度 (Absorbance)} = \log_{10} (I_0/I) = \log_{10} 10^{\epsilon c L} = \epsilon c L \quad \cdots \text{式1}$$

ϵ : モル吸光係数、 c : 濃度 (mol/l)、 L : 光路長 (cm)

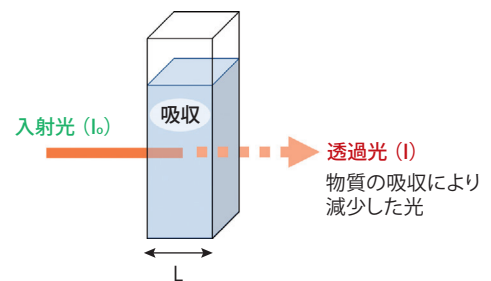


図1 吸光度測定イメージ図

式1で与えられる吸光度は物質の濃度 c と光路長 L に比例します (Lambert-Beerの法則)。透明で光散乱がほとんど起こらない試料を測定した場合には、入射光に対する透過光の光量減少は光吸収によるものと考えられますが、濁度のある試料を測定した場合には、光吸収に加えて光散乱を含んだ見かけの値となります。

【光学密度 (O.D.)】

光学密度 (以下 O.D. と表記) は物質による光吸収と散乱の双方による減衰を考慮した指標です。コロイド溶液のような濁度のある試料では、図2に示すように試料から透過した光は物質の光吸収に加えて光散乱による光量の減少を含んでいます。

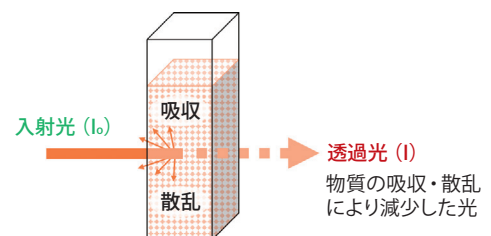


図2 光学密度測定イメージ図

一般的に検量線法を使用しない核酸・タンパク質の定量や、複数のガラス材料特性評価 (比較) によく使用される指標です。

光反応評価装置 PQY™-01

Lightway™

実験プロセスの短縮

化学光量計を用いた従来法比較で大幅な
時間短縮を実現

正確・簡単な光子数の計測

- ・化学光量計を使用せず吸収光子数を算出
- ・調整が不要のため個人差による誤差を解消
- ・長時間安定したLED光源を採用

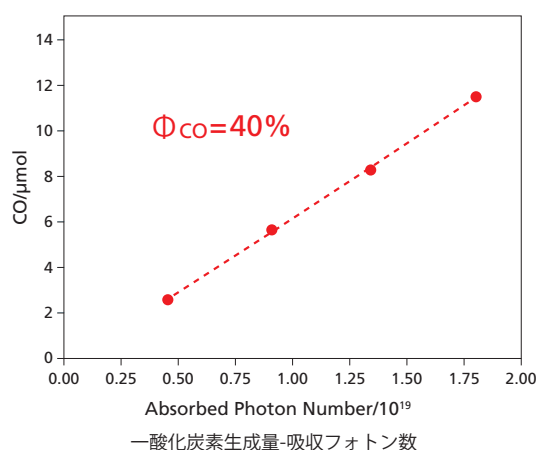
光反応量子収率の測定を
完全自動化



NEW



Ru-Ru超分子光触媒におけるCO₂還元反応の光反応量子収率測定



還元反応により生成したCOガスはガスクロマトグラフで測定(縦軸)。
またLightwayで測定された吸収光子数を横軸に取り、その傾き
から光反応量子収率を算出。

光触媒反応によるCO生成量子収率は40%であると決定された。

※生成物が液体の場合には、液体クロマトグラフによる測定が有効です。

ご提供: 国立大学法人東京工業大学 理学院化学系 教授 石谷治先生、助教 玉置悠祐先生

関連装置



ガスクロマトグラフ Nexis™ GC-2030



液体クロマトグラフ Nexera™ シリーズ

PQY、Lightway、NexisおよびNexeraは株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

TrayCellは、Hellma GmbH & Co.KGの商標です。

その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中にはTM、®マークを明記していない場合があります。

UV
TALK LETTER

Vol. 21
March 2021

発行日 ● 2021年3月30日
改訂日 ● 2022年6月10日
編集・発行 ● 株式会社島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE
連絡先 ● 分析計測事業部事業企画部“Shim-Solutions Club”事務局
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
E-mail: analytic@group.shimadzu.co.jp