

UV

TALK LETTER

vol. 9
April 2012



紫外可視分光光度計におけるシングルビーム方式とダブルビーム方式の特徴 …… P. 2

アプリケーション 多変量解析を用いたミネラルウォーターの分析事例 …… P. 5

Q&A セルの洗浄はどうしたらいいのでしょうか? …… P. 11

新製品 UV-2600/2700 …… P. 12

UV TALK LETTER

紫外可視分光光度計における シングルビーム方式とダブルビーム方式の特徴

紫外可視分光光度計には、シングルビーム方式とダブルビーム方式の2種類の装置があります。シングルビーム方式の装置では試料室内を通過する光は1本のみですが、ダブルビーム方式の装置では2本となります。分光光度計の世界では、なぜこのような方式の違う装置が存在するのでしょうか。本稿ではその理由を解説し、それぞれの装置の特徴について説明いたします。

1. シングルビーム方式とダブルビーム方式

シングルビーム方式の装置では、分光器から出た単色光を、そのまま試料室・検出器へ入射させます(試料光のみ)。これに対し、ダブルビーム方式の装置では、分光器から出た単色光を、試料光(S)と対照

光(R)に分割し¹⁾、試料室・検出器へ入射させます。各方式の装置構成を図1に示します。なお、試料光、対照光は、それぞれサンプル光、リファレンス光と呼ばれる場合があります。

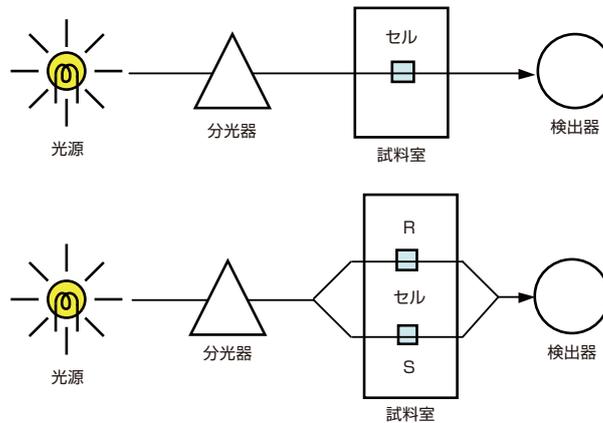


図1 シングルビーム (上) とダブルビーム (下)

シングルビーム方式では、試料光と対照光に分ける機構が不要となり、装置の構成が簡単になります。このため、低価格帯の装置で採用されています。

2. 各方式の測光値処理の違い

いずれの方式の装置においても、ブランク補正を行った後、サンプル(試料)測定を行います。測定データの内部での扱いから、それぞれの方式の違いを見ていきます。

① シングルビーム方式の分光光度計

シングルビーム方式の分光光度計では、試料光のみを使用してブランク補正、サンプル測定を行います。ブランク補正時には、その時点の試料光の光量 (S_{Blank} とおきます) を装置で記録します。その後サンプル測定では、サンプル測定時の試料光の光量 (S_{Meas} とおきます) を装置で記録します。

測定結果は S_{Blank} 、 S_{Meas} を用いて算出します。例えば、透過率 (%T) は次式から求められます。

$$\%T = \frac{S_{Meas}}{S_{Blank}} \times 100 \quad \dots(A)$$

ここで、もしブランク補正時とサンプル測定時において、光源の光量に変動があると、その影響が S_{Blank} と S_{Meas} の値の変動として現れてしまいます。具体的に、サンプル測定時の光源の光量がブランク補正時の 90% となったときに、透過率 40% のサンプルを測定した場合を考えます。このとき、測定時の光量はサンプルに入射する前の段階で $S_{Meas} = 0.9 \times S_{Blank}$ となります。サンプルを透過した後の光は $0.4 \times S_{Meas}$ となることより、透過率 (%T) は式 (A) より

$$\begin{aligned} \%T &= \frac{0.4 \times S_{Meas}}{S_{Blank}} \times 100 \\ &= \frac{0.4 \times (0.9 \times S_{Blank})}{S_{Blank}} \times 100 \\ &= 36 \end{aligned}$$

となり、測定値として本来 40% となるべきところが、36% という結果になります。つまり、ブランク補正時とサンプル測定時で光源の光量が変動すれば、取得したデータは不正確なものになってしまいます。

このようにシングルビーム方式の装置では光源の光量の変動の影響が測定結果に大きく表れます。そのため、シングルビーム方式の装置では光源が安定してから測定を開始する必要があります。目安として電源を投入してから 1 時間～2 時間は待つ必要があります。

② ダブルビーム方式の分光光度計

ダブルビーム方式の分光光度計では、試料光、対照光の両方を使用してブランク補正、サンプル測定を行います。ブランク補正時には、ブランク補正時点の試料光の光量 (S_{Blank}) と対照光の光量 (R_{Blank}) から、 S_{Blank} / R_{Blank} の値 (S_{Blank} と R_{Blank} の比) を装置で記録します。

次にサンプル測定時には、サンプル測定時の試料光の光量 (S_{Meas}) と対照光の光量 (R_{Meas}) から、 S_{Meas} / R_{Meas} の値 (S_{Meas} と R_{Meas} の比) を記録します。

測定結果は、 S_{Blank} / R_{Blank} と S_{Meas} / R_{Meas} を用いて計算します。例えば、透過率 (%T) は、次式より求められます。

$$\%T = \frac{\frac{S_{Meas}}{R_{Meas}}}{\frac{S_{Blank}}{R_{Blank}}} \times 100 \quad \dots(B)$$

シングルビーム方式と違い、ダブルビーム方式では測定値を [サンプル測定時の試料光と対照光の比] と [ブランク補正時の試料光と対照光の比] を使って求めます。先ほどと同様、サンプル測定時の光源の光量がブランク補正時の 90% となったときに、透過率 40% のサンプルを測定した場合を考えます。このとき、サンプル測定時の試料光、対照光の光量は、サンプルに入射する前の段階でそれぞれ $S_{Meas} = 0.9 \times S_{Blank}$ 、 $R_{Meas} = 0.9 \times R_{Blank}$ となります。サンプルを透過した後の光は $0.4 \times S_{Meas}$ となることより、透過率 (%T) は式 (B) から、

$$\begin{aligned} \%T &= \frac{\frac{0.4 \times S_{Meas}}{R_{Meas}}}{\frac{S_{Blank}}{R_{Blank}}} \times 100 \\ &= \frac{0.4 \times (0.9 \times S_{Blank})}{0.9 \times R_{Blank}} \times 100 \\ &= \frac{0.4 \times \frac{S_{Blank}}{R_{Blank}}}{\frac{S_{Blank}}{R_{Blank}}} \times 100 \\ &= 40 \end{aligned}$$

となり、光量の変動の影響が測定結果に表れません。このようにダブルビーム方式では、試料光、対照光の比を用いることで光源の光量の変動がキャンセルされるため、測定値はその影響を受けにくくなります。

上記で述べたことを言葉を変えて表現すれば、「対照光が光源の光量の変動をリアルタイムに補正し続けているため、データは光源の変動の影響を受けない²⁾」と言うこととなります。すなわち、**ダブルビーム方式の分光光度計を使用すれば、あたかも光源の光量が常に一定であるかのように測定することができる**、ということであり、これはダブルビーム方式の方が時間安定性がよいことを意味します。

シングルビーム方式とダブルビーム方式の分光光度計における時間安定性を調べてみました。シングルビーム方式のUVmini-1240とダブルビーム方式のUV-1800において、時間経過による測定値の変動（ドリフト）の影響を比較しました。図2は、UVmini-1240とUV-1800を同じ部屋に設置し、タイムコース測定で1時間、5秒間隔で測定したときの結果です。

ダブルビーム方式のUV-1800では、シングルビーム方式のUVmini-1240と比べて測定値の時間変動が小さいことがわかります。

このように、シングルビーム方式に比べ、ダブルビーム方式では測定値が安定していることがわかります。シングルビーム方式の装置では、光源や検出器が安定するまで待ち、頻繁にブランク補正を行うなどして、変動の影響を抑える必要があります。

シングルビーム方式とダブルビーム方式の特徴をまとめたものを表1に示します。

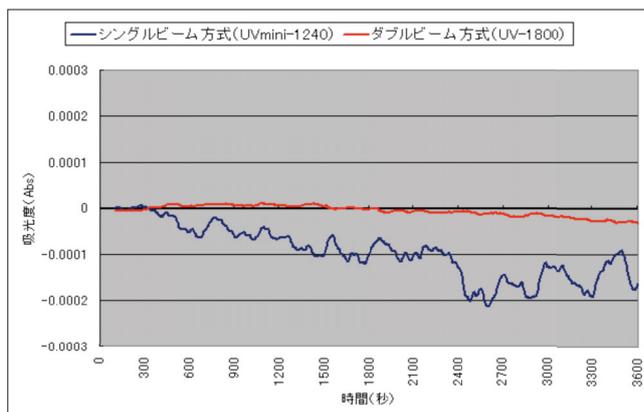


図2 測定値の変動の比較

表1 シングルビーム方式とダブルビーム方式の比較

	シングルビーム方式	ダブルビーム方式
価格	安価	高価
機構	単純	複雑
測定精度	時間安定性に劣る	時間安定性がよい

3.各方式での測定手順

シングルビーム方式とダブルビーム方式における測定手順を紹介いたします。ここでは溶液測定を例に挙げます。

①シングルビーム方式での溶液測定

- 1：セルに溶媒を入れ、セルホルダに設置します。
- 2：ブランク補正³⁾を行います。
- 3：セルを取り出し溶媒を捨て、次に測定する溶液を入れて、セルをセルホルダに設置します。
(試料溶液で共洗いを2回行い、3回目の液を測定に用います)
- 4：測定を行います。

②ダブルビーム方式での溶液測定

- 1：二つのセルに溶媒を入れ、試料光側および対照光側のセルホルダに設置します。
- 2：ブランク補正³⁾を行います。
- 3：試料光側のセルを取り出し溶媒を捨て、次に測定する溶液を入れて、試料光側のセルホルダに設置します。対照光側は1の状態のままにしておきます。
(試料溶液で共洗いを2回行い、3回目の液を測定に用います)
- 4：測定を行います。

このようにダブルビーム方式においては対照光側にも溶媒を設置して測定します。**対照光側に溶媒を置くのは試料光側との光量バランスをとるためであり、ブランク(基準)の意味で置くわけではありませんのでご注意ください⁴⁾。**

4.最後に

今回は、シングルビーム方式とダブルビーム方式の特徴について解説しました。ダブルビーム方式の分光光度計を使用すれば、シングルビーム方式に比べてより安定した測定が可能となります。また測定手順にも違いがありますが、その違いに関しては本文で示した測定手順を参考にして頂ければ幸いです。

なお、より精度よく測定を行うために、シングルビーム方式、ダブルビーム方式に関わらず、室温等の周囲環境の変化が少ない環境にて分光光度計の電源投入後1時間以上経過後に測定を行うことをお勧めします。(電源投入後に安定するまでの推奨時間は、分光光度計の取扱説明書の記述を参照ください。)

1) ハーフミラーやチョッパーミラー等を使用して光を分割します。
 2) 光源の変動のみならず、検出器の感度の時間変動等にもダブルビーム方式は同様の性質を発揮します。
 3) スペクトル測定の場合は“ベースライン補正”と表現される場合があります。
 4) 対照光側に溶媒を置かずに測定を行うと試料光側との光量バランスが崩れ、測定データがふらつき易くなります。また、フィルムホルダ等を用いてフィルム等の固体試料を測定する場合は、対照光側には基本的に何も置く必要はありません。

多変量解析を用いたミネラルウォーターの分析事例

近年、化学計測分野では混合成分の定量や多数試料の分類を目的として多変量解析が多く用いられるようになってきました。多変量解析を用いることで、混合試料中の目的成分の量を簡便に求めたり、また多くの試料を分類したりすることができます。今回、ミネラルウォーターが紫外領域で特有の吸収スペクトルを与えることを利用し、多変量解析を用いた各種分析を行いましたので紹介いたします。

1. 多変量解析の全体像

多変量解析とは多数のデータからなる分析データを統計的に解析する手法のことであり、旧来の解析手法では得られなかった情報を得ようとするものです。とくに化学計測分野で用いられる場合は、“ケモメトリックス”と呼ばれる場合もあります。

多変量解析は様々な手法から成りますが、大きく定量手法と分類手法に分かれます。

定量手法には重回帰法(MLR または ILS)、PCR、PLS 等があります⁽¹⁾。これらを用いると多成分混合試料における各成分(あるいは目的成分)の量を求めることができます。重回帰法では分析者が特定のデータ(説明変数)を選択する必要がありますが、PCR、PLS ではそ

の必要はなく全データを利用することができます。また PCR、PLS は重回帰法に比べてノイズ(データのふらつき)の影響を受けやすいという一面を持っています。

分類手法には主成分分析(PCA)、クラスター分析、判別分析、因子分析等があります⁽²⁾。これらを用いることで多数試料を類似度に基づいて分類しその特徴を把握したり、産地の判別に役立てたりすることが可能となります。多変量解析の全体像をまとめると図1のようになります。

今回は、定量手法の中から重回帰法を、分類手法の中から主成分分析(PCA)とクラスター分析を選び、それらを用いて解析しました。



図1 多変量解析の全体像

2. 重回帰法を用いたミネラルウォーター混合試料の同時定量

重回帰法を用いることで多成分混合試料における各成分(あるいは目的成分)の量を求めることができます。今回、市販のミネラルウォーター3種A、B、Cが様々な割合で混合された試料に対し、重回帰法を用いて各試料における混合比を求めました。

はじめに混合比を変えた標準試料を用意し検量モデルを作成した後、混合比既知の検証用試料を用意して検量モデルの検証を行いました。

標準試料9点と検証用試料3点に対し紫外可視近赤外分光光度計UV-3600を使用して紫外領域の吸収スペクトルを測定しました。光路長10mmの石英セルを用い、イオン交換水を基準として測定したミネラルウォーターA、B、Cの各吸収スペクトルを図2に示します。標準試料と検証用試料の混合比をそれぞれ表1、表2に、それらの測定結果を図3(標準試料①~⑤)、図4(標準試料⑥~⑨)、

図5(検証用試料①~③)に示します。4波長200nm、205nm、210nm、215nmの吸光度を用いて各ミネラルウォーターの検量モデル(重回帰式)を作成しました⁽³⁾。各モデルの重回帰式を表3に示します。実測値と予測値(重回帰式から算出される値)との相関を示す重相関係数はA、B、C各ミネラルウォーターのモデルでそれぞれ0.999921、0.999986、0.999973となりました。

得られた重回帰式に検証用試料における4波長の吸光度を代入すると、各試料におけるミネラルウォーターの混合比が算出されます。定量結果を表4に示します。表2の値と比較すると良好な結果が得られていることがわかります。

多波長の吸光度を利用できる重回帰法は、今回の例のように多成分同時定量に威力を発揮します。

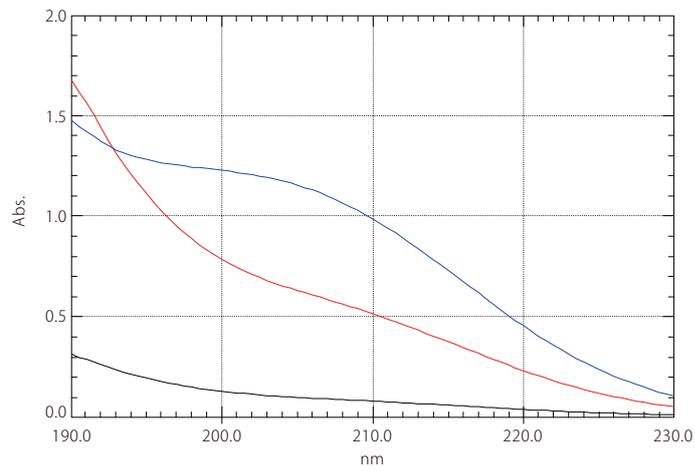


図2 ミネラルウォーターA、B、Cの吸収スペクトル
(赤：A、青：B、黒：C)

表1 標準試料の混合比

	A(%)	B(%)	C(%)
標準試料①	20	30	50
標準試料②	50	20	30
標準試料③	30	50	20
標準試料④	0	50	50
標準試料⑤	50	0	50
標準試料⑥	50	50	0
標準試料⑦	100	0	0
標準試料⑧	0	100	0
標準試料⑨	0	0	100

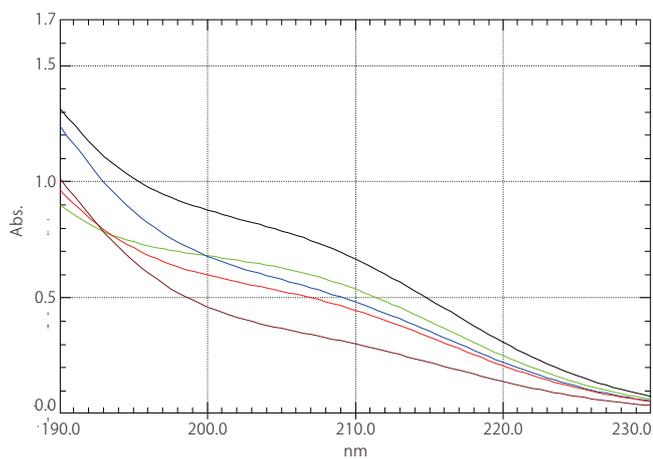


図3 標準試料①～⑤の吸収スペクトル
(赤：①、青：②、黒：③、緑：④、茶：⑤)

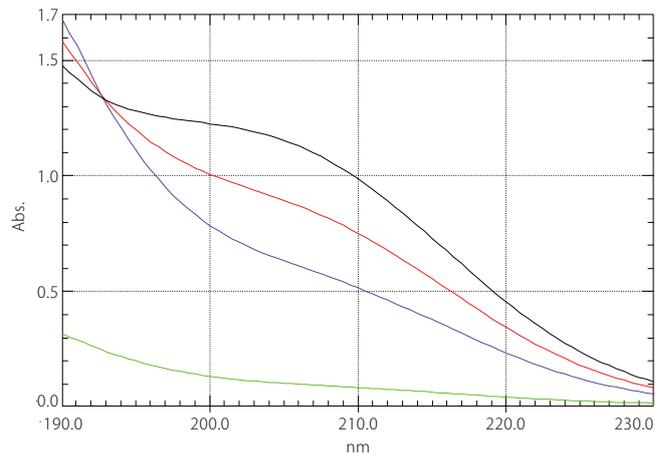


図4 標準試料⑥～⑨の吸収スペクトル
(赤：⑥、青：⑦、黒：⑧、緑：⑨)

表2 検証用試料の混合比

	A (%)	B (%)	C (%)
検証用試料①	10	80	10
検証用試料②	30	30	40
検証用試料③	20	60	20

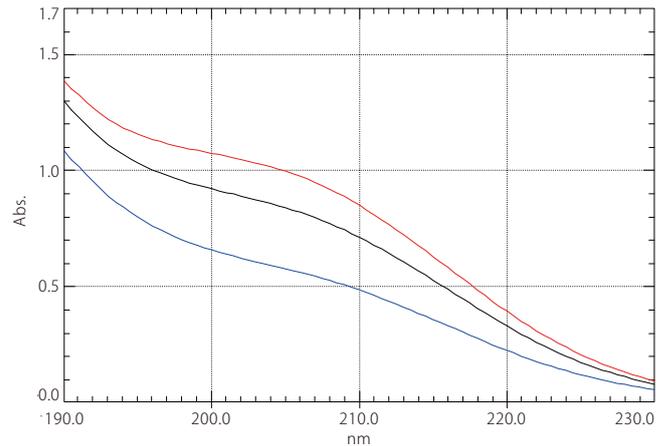


図5 検証用試料①～③の吸収スペクトル
(赤：①、青：②、黒：③)

表3 各検量モデルの重回帰式

Aモデル	$R_A = 1073.318 \cdot A_{200} - 1614.381 \cdot A_{205} + 1120.181 \cdot A_{210} - 731.675 \cdot A_{215} - 24.416$
Bモデル	$R_B = -541.210 \cdot A_{200} + 822.186 \cdot A_{205} - 91.882 \cdot A_{210} - 133.158 \cdot A_{215} + 3.725$
Cモデル	$R_C = -532.109 \cdot A_{200} + 792.195 \cdot A_{205} - 1028.299 \cdot A_{210} + 864.833 \cdot A_{215} + 120.690$

(注) A_{200} 、 A_{205} 、 A_{210} 、 A_{215} は各波長の吸光度、 R_A 、 R_B 、 R_C は各ミネラルウォーターA、B、Cの混合比を表します。

表4 検証用試料の定量結果

	A (%)	B (%)	C (%)
検証用試料①	10.38	79.90	9.72
検証用試料②	30.12	29.96	39.92
検証用試料③	20.41	59.68	19.91

3.主成分分析 (PCA) を用いたミネラルウォーターの分類

次に主成分分析 (PCA) を用いた事例を紹介します。ミネラルウォーター19種と水道水1種の計20種 (A~T) の吸収スペクトルを図6~図8に分けて示します。

取得した20本のスペクトルに対して主成分分析を行いました⁽⁴⁾。測定範囲190 nm~230 nmの全データを使用して解析しました。得られたスコアプロットを図9に表示します。スコアプロットは第一主成分、第二主成分に対応するスコア (主成分得点) を座標表示したもので測定試料に対応する20点がグラフ上に表示されます。横軸は第一主成分に、縦軸は第二主成分に対応します。ここで“主成分”とは数学的に割り出されたなんらかの“特徴”を表します。近い点の試料は上記二つの主成分において、よく似た試料と言えます。図10において丸で囲ったグループ内にある試料のスペクトルを示します。グループ内のスペクトル

はよく似ていることがわかります。

横軸 (第一主成分) 方向にプロット点を選択し対応するスペクトルを表示したものを図11に、縦軸 (第二主成分) 方向にプロット点を選択したものを図12に示します。これより、横軸は“総吸収量” (スペクトル面積) に関係し、縦軸は“スペクトル形状” (スペクトル中央付近における盛り上がりの有無) に関係していると推測されます (その推測が正しいことは、ローディングプロットというグラフを見ることによって確認できますが、詳細は略します)。“総吸収量”は試料に溶けているイオン等の総量に関係し、“スペクトル形状”はイオン等の種類に関係していると考えられます。このように主成分分析を用いることで多数の試料の類似度を視覚的に把握することが可能となります。

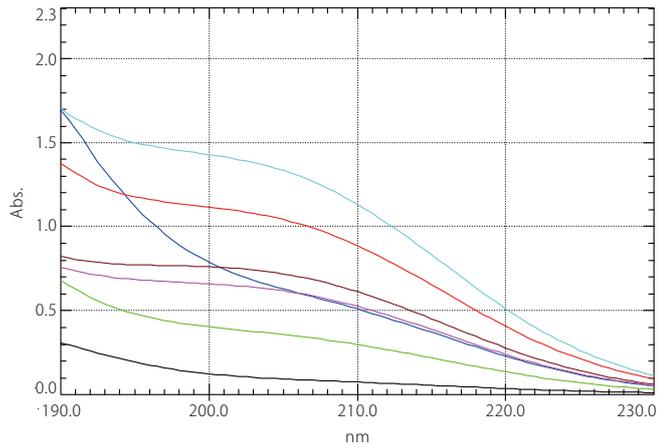


図6 ミネラルウォーターA~Gのスペクトル
(青:A、赤:B、黒:C、緑:D、茶:E、水色:F、紫:G)

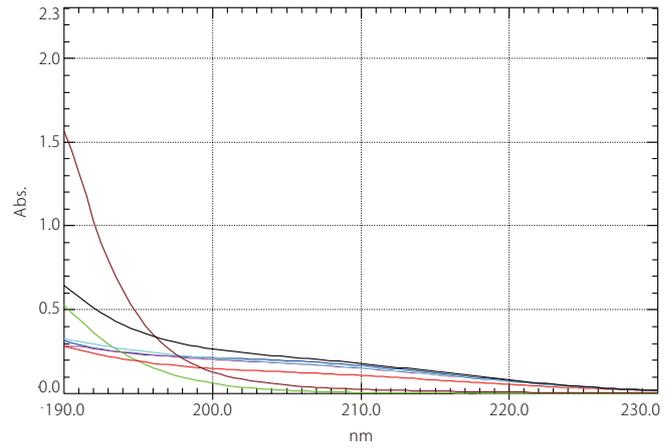


図7 ミネラルウォーターH~Nのスペクトル
(青:H、赤:I、黒:J、緑:K、茶:L、水色:M、紫:N)

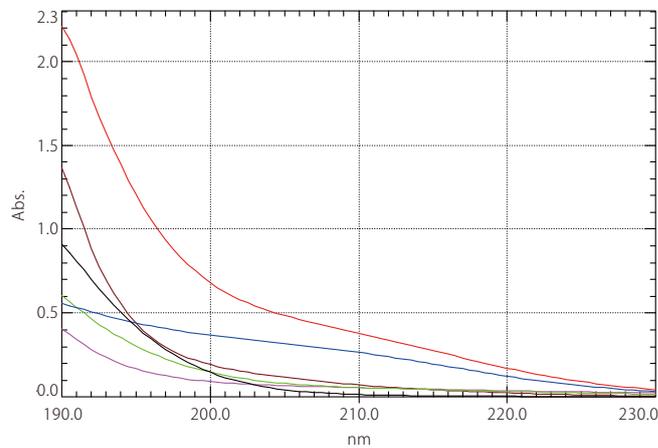


図8 ミネラルウォーターO~Sと水道水Tのスペクトル
(青:O、赤:P、黒:Q、緑:R、茶:S、紫:T[水道水])

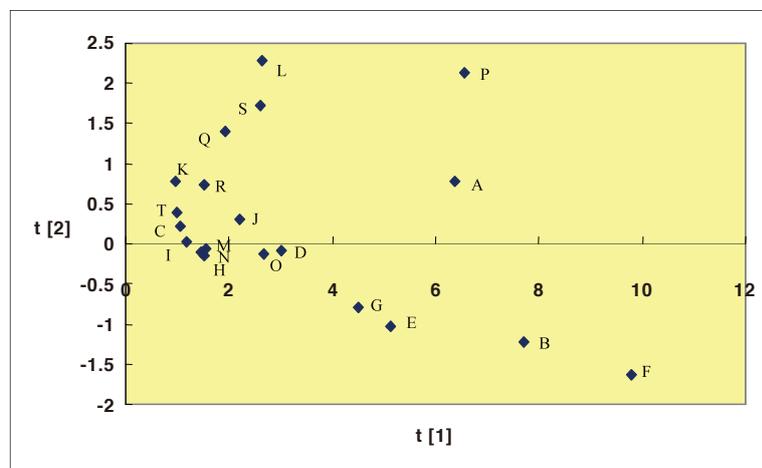


図9 スコアプロット

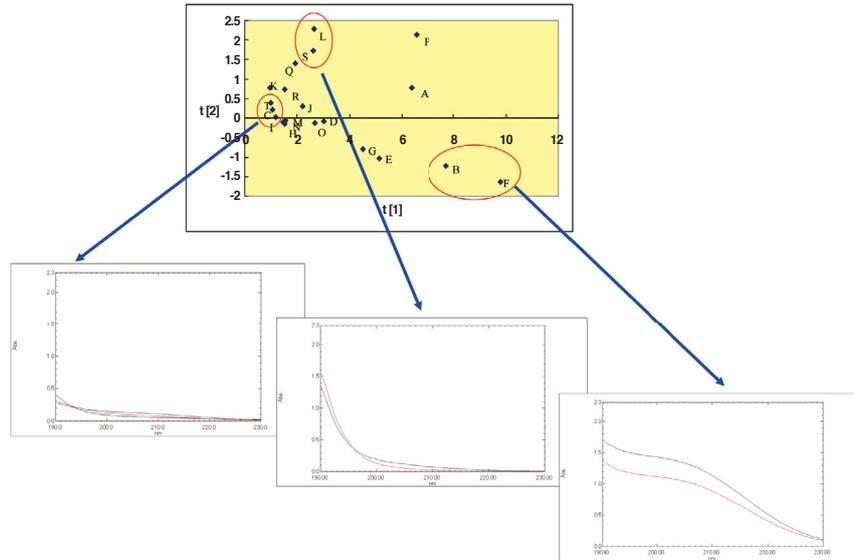


図10 スコアプロットにおける各グループの吸収スペクトル

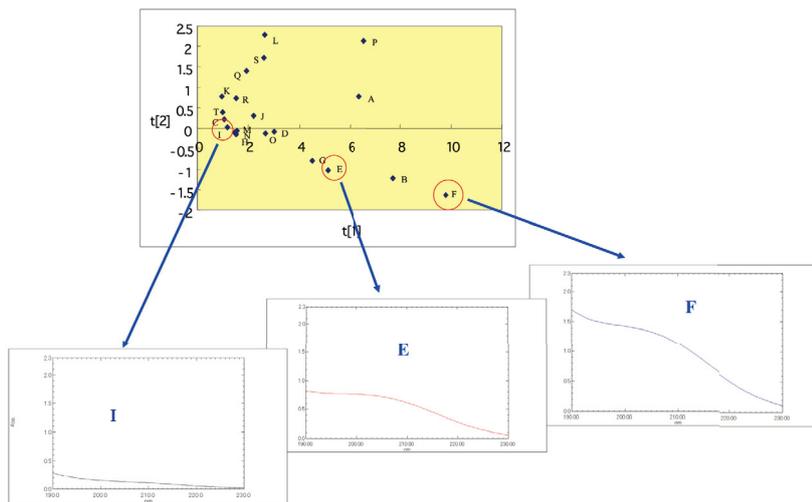


図11 スコアプロット：横軸（第一主成分）に着目

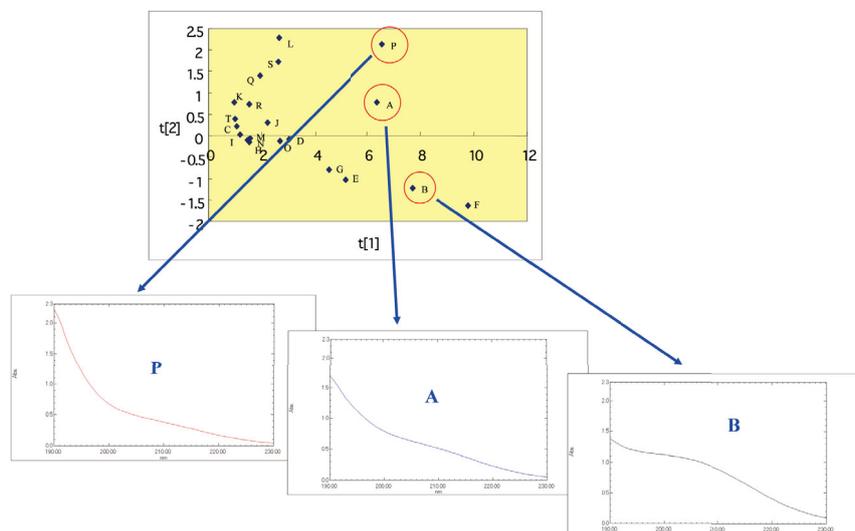


図12 スコアプロット：縦軸（第二主成分）に着目

4. クラスター分析を用いたミネラルウォーターの分類

主成分分析 (PCA) とは別の分類手法であるクラスター分析を用いると、よく似た試料同士を順にまとめていくデンドログラム (樹状図) で全試料を表示することができます。前述のミネラルウォーター 20 種に対し、クラスター分析を行った結果を図 13 に示します⁽⁵⁾。今回は Ward 法という計算方法を用いてクラスター分析を行いました。

図 13 では主成分分析 (PCA) のスコアプロットと合わせて表示しましたが、クラスター分析は主成分分析 (PCA) とよく似た結果を与えていることがわかります。デンドログラムを見ることで、データやクラスターの類似度を把握することが可能となります。

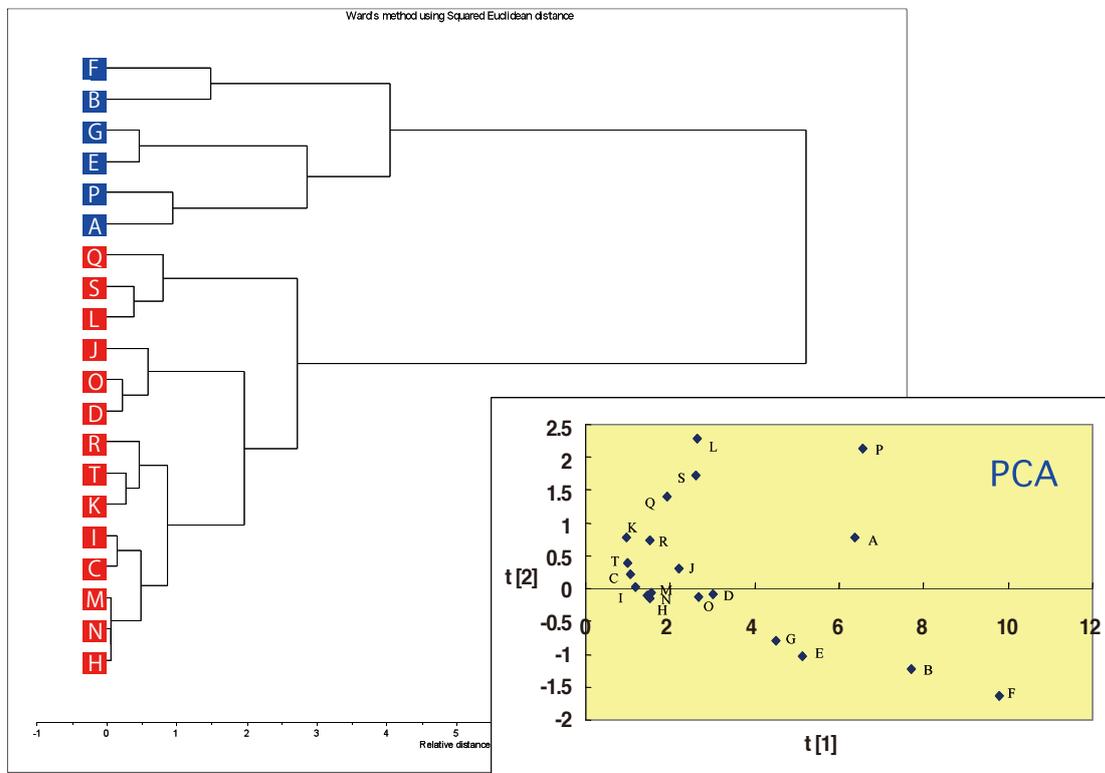


図13 クラスター分析結果とPCAスコアプロット

5. まとめ

今回、重回帰法を用いてミネラルウォーター 3 種混合試料の同時定量を行うことができました。また主成分分析を用いてミネラルウォーター 20 種をスコアプロット上で表現することができ、さらにクラスター分析を用いることによりデンドログラム (樹状図) にまとめることができました。分類手法を用いることで試料の類似度を視覚的に把握することが可能となります。

多変量解析は今回紹介した分析以外にも様々な場面で使われてい

ます。例えば、ミカン、リンゴなどの糖度や酸度を測定する簡易分光装置にも多変量解析が用いられています。その他、野菜の産地判別、においの分類、化粧品の効能評価、魚の脂肪量測定などその用途は様々です。また分野も食品、化学、ライフサイエンス、製薬、電気・半導体など多岐にわたります。分析データに対し多くの見方を提供する多変量解析は、今後も幅広く用いられていくことになると思われます。

(1) MLR: Multiple Linear Regression, ILS: Inverse Least Squares, PCR: Principal Component Regression, PLS: Partial Least Squares

(2) PCA: Principal Component Analysis

(3) 表計算ソフトウェアExcel®を用いて計算しました。Excel®はMicrosoft社の商標または登録商標です。

(4)、(5) 多変量解析ソフトウェア The Unscrambler®を用いて計算を行いました。The UnscramblerはCAMO社の商標または登録商標です。

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
杉岡幹生

Q

セルの洗浄はどうしたらいいのでしょうか？

A

よくある質問ですが、『これがベストです』といった決まった方法が無いため、具体的に表記しているものはなかなか見つからないかもしれません。
どうして決まった方法がないのでしょうか？

なぜなら、分析する試料が多岐に及んでいるからです。分析する試料が多様多様なため、それぞれに対応した多種多様な洗浄方法が必要となります。

しかし、それでは雲を掴むようなお話になってしまい、解決には至りません。そこで今回は一般的な洗浄方法を紹介します。

まず、大きく二つに分けて考えます。一つは溶媒が水の場合、もう一つは有機溶媒の場合です。

【溶媒が水の場合】

純水で洗浄後、エタノールで洗浄し、乾燥保管します。

ただし、汚れがひどいときは市販のセル専用の洗浄剤に浸漬（30～50℃、約10分）し、蒸留水で洗浄してから、希硝酸＋過酸化水素水少量に浸漬（約30分）後、再度蒸留水で洗浄し、乾燥保管します。

【有機溶媒の場合】

使用した有機溶媒で洗浄後、エタノールやアセトンで洗浄し、上記水溶媒の場合と同様の洗浄を行います。

汚れが取れにくい場合は、綿棒で軽くこすっていただいても構いません。

ガラスを溶かすアルカリ性洗剤や、セルを壊す可能性のある超音波洗浄器などを使用することは避けて下さい。
今回紹介した内容は一般的なものです。以上を参考にして、各試料に合った洗浄方法を検討してください。

紫外可視分光光度計

UV-2600/2700

UV-VIS Spectrophotometer

あらゆるシーンで、
求めていた“精度”を実感



Single monochromator UV-2600 測定波長 1400nm の可能性

広い波長範囲で低ノイズのシングルモノクロメータ搭載 近赤外(～1400nm)*の測定を可能に
*オプションの積分球 ISR-2600Plus 使用時

Double monochromator UV-2700 測光レンジ 8 桁以上の実力

吸光度 8 の測定が可能な超低迷光ダブルモノクロメータを搭載
自社製・ローレライグレード回折格子使用

さらにコンパクトに、フレンドリーに

設置面積28%*削減、450mm 幅のコンパクトサイズ
当社比10%*の省エネを実現
*従来モデル UV-2450/2550 と比較
バリデーションソフト標準付属

豊富なアプリケーションで、あらゆる現場に対応

測定対象に合わせて自由に拡張が可能
既存装置の付属品も使用可能
データ処理の自動化



UV
TALK LETTER

vol. 9
April 2012

発行日 ● 2012年4月20日
編集・発行 ● 株式会社島津製作所 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
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