

吸光光度法

釜谷 美 則

1 はじめに

吸光光度計は高価な分析機器がある中で、比較的安価な装置であり、そのメンテナンス及び取り扱いが容易で、さらに故障が少ないなどの利点がある。また、ある特定の波長のみを利用する場合は、分光の必要がなく、光学フィルターや発光ダイオードを光源としたコンパクト、且つ安価な装置で定量でき、環境教育でのフィールド測定などに用いられている。吸光光度計は分析機器の中で最も普及しており、分析機関にはほとんど備えられている。

物質の紫外・可視スペクトルは色々な情報を提供する。例えば、純粋な物質のスペクトルと比較することでおおよその同定や不純物の存在を知ることができる。また、そのスペクトルから分子の電子状態や立体構造も推論できる。一方、特定の波長を使用すると、その吸光度は濃度に比例することから、試料中目的成分の濃度を知ることができる。

吸光光度法では、紫外部から可視部までにわたる波長範囲を取り扱っている。しかし、紫外部は、目的成分以外の夾雑物質の吸収による妨害が多いため、通常可視部で測定することが多い。可視部での測定では、呈色液を直接目視することで、検量線が上手くできたか、さらに目的成分濃度の概略値が分かるなどの利点がある。一般に、試料中の目的成分には、有色成分がほとんどないため、試薬を用いて呈色させ、その吸光度を求めて定量することになる。従って、目的成分の呈色化学反応機構を理解しておかないと呈色が不十分となり、満足な結果を得ることができない場合がある。

このように吸光光度法は、機器分析の中で最も化学的知識を必要とする方法である。そこで、本入門講座では、吸光光度法における基礎的な用語を取り上げ、それらについて解説する。さらに JIS K 0102 (1998) で採用されている吸光光度法を例にとり、吸光光度法における Fundamental Knowledge of Chemical Analysis—Spectrophotometry.

る呈色反応の種類について述べ、さらに、個々の試験法から呈色条件における注意点などについて解説する。

2 吸光光度法でよく用いられる用語

吸光光度法で用いられる用語の定義は、書籍によって幾分異なるところも見られる。そこで、この講座では吸光光度分析通則 JIS K 0115 (2004) を参考にして幾つか解説する。

(1) 透過率 T : ある波長の光が溶液層を通過したとき、入射光の強度と透過光の強度の比で表したものである。ここで、透過前の強度を 1 とした場合の透過後の強度を透過率 T と呼ぶ。この透過率に 100 をかけた値が透過率パーセント $\%T$ である。

(2) 吸光度 E : 試料を透過した光の強度 (T) と、透過前の光の強度 (T_0) との比を常用対数で表した数値であり、吸光度 $E = -\log(T/T_0)$ で表すことができる。

(3) ランバート・ベールの法則 : 吸光度 E は溶液の厚さ l (セルの光路長) と溶液の濃度 c に比例する。すなわち、吸光度が光路長に比例することを Lambert の法則と言い、濃度に比例することを Beer の法則という。このことは、 $E = kcl$ として示すことができる。実際の測定では、光路長 l が一定であるため、検量線の作成における吸光度は濃度の一次関数になる。このことから、検量線が直線性を示すことをベールの法則に従うと言う。ベールの法則が成立するためには、表 1 の要件を満たす必要がある。

(4) モル吸光係数 ϵ : $E = kcl$ が成立するとき、光路長 1 cm, 目的成分の濃度が 1 M 溶液における吸光度がモ

表 1 ベールの法則が成立する要件

- | |
|------------------------------|
| (1) 入射光が単色光であること |
| (2) 吸収セルと機器内部での散乱・迷光がないこと |
| (3) 溶液中に懸濁物による乱反射がないこと |
| (4) 呈色成分の濃度が変化しても化学種が変化しないこと |
| (5) 入射光の波長幅が目的の成分の吸収波長より狭いこと |

表 2 感度表示例 (光路長 1 cm)

名 称	条件 (濃度, 吸光度)	表示法
(1) モル吸光係数	1 mol/L	吸光度
(2) 比感度	1 mg/L	吸光度
(3) 1%感度 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$)	濃度 1%	吸光度
(4) 感度指標 (サンデル感度)	吸光度 0.001	濃度 (mg/L)

ル吸光係数 ϵ で示される。モル吸光係数は、分子吸光係数とも言う。このモル吸光係数は、純粋な物質のモル濃度から求めることができ、逆にモル吸光係数が既知ならば吸光度を求めることで物質の濃度を求めることができる。

モル吸光係数は、最終呈色液中の目的成分濃度をモル濃度とした検量線の傾きに相当する。実際の吸光度法では、呈色成分の生成率やその構造が不明なものが多いため、純粋な目的呈色成分を測っているとさえ言えない。従って、傾きのモル吸光係数は、みかけのモル吸光係数と呼ぶのがふさわしい。モル吸光係数の大きさは、呈色試薬の感度比較に用いられている。モル吸光係数が1万を超えるものは、感度の高い試薬と言われており、最もモル吸光係数の大きいものには50万近いものがあり、その呈色試薬は、重金属イオン測定でのポルフィリン化合物である。

(5) 空試験値：検量線の作成において目的成分のみを含まない操作で得られる吸光度が空試験値(ブランク値)である。検量線の作成では、このブランク値を差し引く場合もあるが、この空試験値がいくつなのか知っておきたい。通常、空試験値は小さいほど良く、大きい場合でも0.2以下の吸光度になるのが望ましい。

(6) 迷光：モノクロメーターで取り出された光の中で、目的とする波長以外の光のことを言う。

(7) 感度表示：吸光度法で感度比較するには、モル吸光係数の大きさで表現する機会が多い。しかし、目的成分の原子量または分子量がはっきりしていない場合は、比感度や1%感度で表示している。感度表示例を表2に示す。ここでの感度表示例は、光路長が1 cmの場合での特定の濃度や吸光度における吸光度または濃度を意味している。

3 セルと装置の取り扱い

3.1 セルの取り扱い

吸光度を測定するには、セルが必要である。セルには、試験管型と角型があり、通常角型が用いられている。角型には、光路長が1 mm~100 mm が市販されているが、光路長10 mm が一般的である。濁った試料を測定する場合は、光路長が長いほど散乱光の影響が大き

くなり再現性が悪くなる。また、材質はガラス製、石英製、プラスチック製がある。可視部の測定では、通常ガラス製が使用されている。ガラス製のセルは、光路長が一定のはずであるが、そのばらつきがあることに注意してもらいたい。このため、幾つかのセルを用いて実験する場合は、セル補正を行ってから使用すべきである。セル補正とは、最も透過率の良いセルを基準にして他のセルの透過率を測定する。その中で透過率が近いセルをより分けて使用すると良い。また、透過率の近いセルはマッチングセルとして市販されている。吸光度測定において良好な精度を得るには、同じセルを共洗いし、さらにいつもセルの向きが同じ方向になるようにセットして測るようにすると良い。試料が少ない場合は、ブラックマイクロセルを用いると便利である。

セルは透過面を手で触ると汚れるので、触ってはいけない。セルに溶液を入れる場合は、こぼれないように注意が必要で、もしこぼれた場合は、洗ったガーゼやキムワイプなどでふき取る。セルの洗浄は、透過面を傷つけないように、セル洗浄用器具や楊枝に脱脂綿を巻いたものを用い、中性洗剤で洗浄する。

3.2 装置の取り扱い

アナログ型の吸光度計では、測定前に純水または空試験溶液を吸収セルに入れ、シャッターを閉じて透過率を0%に合わせ、次にシャッターを開いて透過率を100%に合わせる。この操作を0-100調整という。この調整は、他の波長に変えるごとに繰り返さなければならない。デジタルタイプの吸光度計では、装置の電源を入れて起動させると自動的に透過率の0合わせが行われており、次にオートゼロを行うと透過率の場合の100合わせが行われる。

4 検出下限と定量下限

透過率の読みによる誤差については、Twyman-Lothianの誤差曲線が知られている。この誤差曲線で誤差が最も小さい吸光度は0.434である。一方、吸光度を直接測定できる装置では、実用的な吸光度の測定範囲は0.05から1.5である。吸光度が1.5以上になると、迷光の影響が強くなって誤差の要因となる。

検量線を作成して実試料の分析を行うことになるが、その場合、検出下限と定量下限は一般に以下のようにして求めることができる。

検出下限は、ブランクでの吸光度の標準偏差を3倍にした吸光度に相当する濃度になる。一方、定量下限はブランクの標準偏差を10倍した吸光度に相当する濃度になる。

$$\sigma_B = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

σ_B : ブランクの標準偏差

X_i : 各吸光度

\bar{X} : 各吸光度の平均値

n : 吸光度の測定回数

ただし、検量線は定量下限付近では、濃度に対して直線性が得られないケースが多く見られる。このような場合は、目的成分を一定量加え、下駄をはかせるようにすると定量しやすくなる。

5 吸光度法に用いられる呈色反応と反応分類

吸光度法では、試料中の分析対象物の吸光度を直接測定して決定するのはまれである。このため、なんらかの化学反応を駆使して分析対象物を呈色する必要がある。呈色反応には、一段階によるものや多段階によるものなど多岐にわたっている。

吸光度法における呈色反応は、表3の要件を満たすことが好ましい。

しかし、これをすべて満足させる呈色反応は少ないため、目的成分の呈色反応についてあらかじめ下調べを行ってから実験することが必要になってくる。

呈色反応には、様々なものがある。そこで、JIS K 0102に採用されている吸光度法の例から呈色反応を分類し、表4にまとめてみた。

表3 吸光度法における好ましい要件

(1) 分析対象成分と選択的な反応であること
(2) 目的の測定濃度を満たす感度であること
(3) 呈色の繰り返し精度が良いこと
(4) 呈色がすみやかに起こること
(5) 呈色体の経時変化が少ないこと
(6) 温度、pH、試薬濃度などのパラメーターに影響されないこと
(7) 呈色体の吸光度が濃度に比例すること
(8) 空試験の吸光度が小さいこと

表4 JIS K 0102に採用されている吸光度法の例

呈色の分類	測定成分	呈色試薬
イオン会合生成	陰イオン界面活性剤	エチルバイオレット
イオン会合生成	アンチモン	ローダミンB
キレート生成	銅イオン	ジエチルジチオカルバミン酸
キレート生成	鉄イオン	1,10-フェナントロリン
色素生成法	硫化物イオン	N,N-ジメチル-p-フェニレンジアミン
色素生成法	アンモニア	ナトリウムフェノキンド
無機錯体生成	リン酸イオン	モリブデン酸とアスコルビン酸
無機錯体生成	モリブデン	チオンアン酸

硫化物イオンはメチレンブルー、アンモニアはインドフェノール青を生成し、適当な言葉が見当たらなかったため、ここでは色素生成法として分類した。

次に、これらの呈色反応の分類について説明する。

(A) イオン会合生成

分析対象物は、無色またはわずかに色のついたものもあるが、これに反対電荷を持つ有色イオンを加えるとイオン会合体を生成するので、これを抽出すると分析対象成分に比例して有機相が呈色する。すなわち、イオン会合とは配位結合によらない陽イオンと陰イオンの結合であり、生成物はイオン会合体と呼ばれる。また、イオン会合体はイオン対と同義に用いられることもある。イオン会合体の抽出率は、イオン会合体生成にかかわる陽イオンおよび陰イオンが、それぞれ抽出溶媒に溶けやすく、さらにイオンの電荷が低く、分子半径が大きいほど高い。

金属イオンと試薬との錯体が電荷を帯びている場合、そのままでは抽出できないが、この反対電荷を持つイオンを加えてイオン会合体を生成させることで抽出されやすくなる。特に金属イオンの抽出定量においては、金属のハロゲン錯体と陽イオン染料とのイオン会合による抽出例が多い。また、陽イオンの対イオンとしてキサンテン系染料、トリフェニルメタン系染料などが多く用いられている。これに対しての陰イオン染料を対イオンとして用いる例は少ない。

例えば、陰イオン界面活性剤は陽イオン色素であるエチルバイオレットとイオン会合体を生成し、トルエンの溶媒に抽出される。また、アンチモンの定量では、アンチモンをクロロ錯体の陰イオンとしてから、これと陽イオン色素であるローダミンBとのイオン会合体をジソプロピルエーテルで溶媒抽出する(図1参照)。

このようなイオン会合体の抽出吸光度法では、対イオンである色素の種類によって抽出溶媒が決定される場合が多い。一般にイオン会合体の生成によって激的に抽出挙動が変化する場合が少ない。このため、対イオンのみでもわずかに溶媒に抽出される必要がある。有機溶媒による抽出吸光度法では、目的の有機相を水相から分離する際、水滴が有機相に混入する場合があるので、分

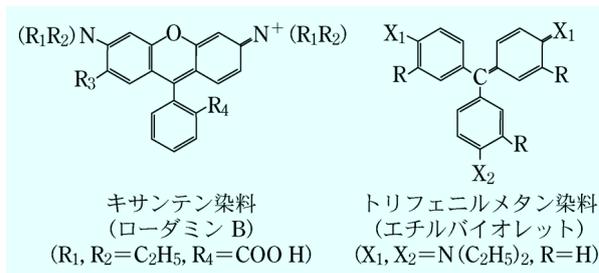


図1 イオン会合に使用する色素

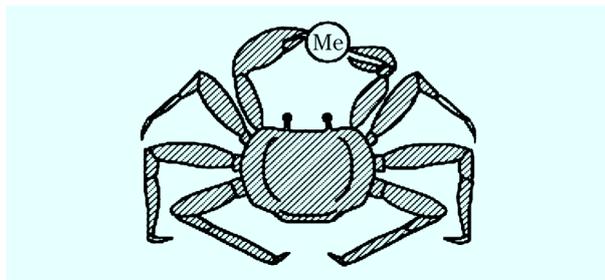


図2 キレートイメージ図

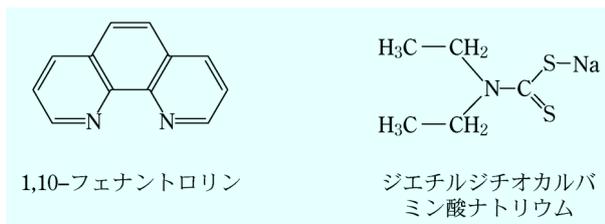


図3 鉄(II)と銅(II)の呈色試薬

液漏斗の分相操作を慎重に行う必要がある。もし有機相に水滴が少しある場合は、無水硫酸ナトリウムで脱水すると良い。また、分相操作において乾燥した濾紙を切り取り、これを伝わせてセルに移すか、分液漏斗の脚部に脱脂綿を詰めたものを用いて水滴を取っても良い。

(B) キレート生成

金属イオンの吸光光度法では、キレート試薬を反応させる方法がよく用いられている。キレート (chelate) とは、ギリシャ語でカニのはさみを意味する言葉で、配位子のドナー原子が中心金属イオンをはさみこむ形がカニの餌をつかむ形に類似することに由来している (図2参照)。

キレート試薬には多くの試薬が知られており、カニのはさみの部分、すなわち配位子のドナー部分が O,O 型、O,N 型、N,N 型、S,S 型に分類できる。代表的な例として、鉄と銅の呈色反応について次に述べる。

鉄の 1,10-フェナントロリンによる定量では、結合のタイプが N,N 型になっている。鉄イオンの定量では、2価イオンに還元してから 1,10-フェナントロリンとキレートを生成させる。この呈色反応では、試薬の添加順序によって呈色に時間がかかるとか、呈色が不完全になる場合があるので注意する必要がある。すなわち、試薬の添加順序としては、酸性条件で塩化ヒドロキシルアミンと 1,10-フェナントロリンを加えてから、最後に緩衝溶液 (pH 7) を加える必要がある。この理由は、鉄(III)のクロロ錯体として還元すると、1,10-フェナントロリンとのキレート生成が迅速になる。もし、鉄(III)溶液に緩衝溶液 (pH 7) を加えると水酸化物ができ、これが塩化ヒドロキシルアミンで還元されにくくなる。

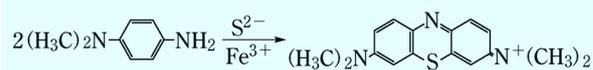


図4 硫化物イオンのメチレンブルー生成反応

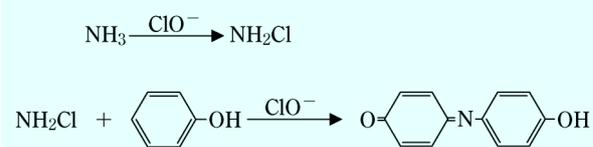


図5 アンモニアのインドフェノール生成反応

一方、銅の定量に用いられるジエチルジチオカルバミン酸 (DDTC) は酸によって分解しやすい。このため、この試薬は2週間以上経過したものをを用いないようにすると良い。また、この試薬は多くの金属元素と反応するが、鉄、ニッケル、コバルト錯体のように DDTC で有色となる金属イオンは、EDTA 溶液の添加でマスキングする必要がある (図3参照)。

(C) 色素生成法

金属イオンの吸光光度法は、キレート試薬を始め、多くの呈色試薬が知られている。これに対して、陰イオンの呈色試薬の種類は少ない。硫化物イオンの定量では、図4で示したように、N,N-ジメチル-p-フェニレンジアミンが鉄(III)イオン存在下で、メチレンブルーを生成する。また、メチル基をエチル基にかえると感度が1.5倍以上増加する。一方、アンモニアは、図5で示したように、次亜塩素酸イオンの共存下でフェノールと反応してインドフェノール青を生成する。これら両者の呈色反応においては、メスフラスコをあまり激しく振らないようにすることが必要である。この理由は、前者の硫化物イオンの定量では、硫化水素が、後者のアンモニアの定量ではアンモニアやクロラミンが気相中へ逃げてしまうおそれがあるためである。

(D) 無機錯体生成

リン酸イオンの定量は、ヘテロポリ酸の生成後、これを還元してモリブデン青にして測定する。この方法は、硫酸濃度とモリブデン酸濃度に応じて呈色領域が存在することが知られている。混合試薬は、調製後5時間以内に使用することが望ましく、モリブデン酸アンモニウム溶液の保存は、ガラス容器でなくポリ容器が適している。また、還元剤によってモリブデン青の吸収極大波長が異なることが知られている。還元剤としてアスコルビン酸あるいはスズ(II)を用いると、モリブデン青の波長はそれぞれ、880 nm, 700 nm となっており、この違いは還元時でスズが呈色体の中に混入するためと言われ



図6 リン酸イオンのモリブデン青生成反応



図7 モリブデン(V)の呈色反応

ている。

一方、モリブデンの定量では、Mo(V)に還元されたモリブデンとチオシアン酸イオンの錯体が生成する。この錯体は、酸、試薬濃度、温度などの条件で大きく影響されるので、反応条件を厳密に一定にする必要がある。

以上の分類以外にも、呈色反応には、酸化還元反応系、置換反応系、三元錯体生成法、接触反応法などがある。

6 おわりに

誰でも気軽に利用できる吸光光度法は、化学を専攻した人にとって非常に親しみやすい分析法である。本講では、吸光光度法の用語、さらに呈色反応例をJISから抜き出し、それらの呈色反応を分類しながら呈色操作での注意点についても述べてみた。最後に、本講が吸光光度

法に携わる初心者に対し、いくらかでもお役に立つことができれば幸いである。

参考資料

洋書では、キレート試薬に関するものとして、K. Uenoらによる“Handbook of Organic Analytical Reagents 2nd Edition”, CRC Press (1992)が詳しい。陽イオンの吸光光度法は、Z. Marczenkoらの“Spectrophotometric determination of elements”, John Wiley & Sons, Inc (1976)がある。無機陰イオンの吸光光度法には、W. J. Williamsらによる“Handbook of anion determination”, Butterworths (1979)がある。

国内では、JISの解説書として並木による“詳細工場排水試験方法 [改定3版]”, 日本規格協会 (1999)がある。また、各種金属イオンの比色分析では、6巻からなる“無機応用比色分析”, 無機応用比色分析編集委員会編, 共立出版 (1973-1979)などがある。



釜谷美則 (Minori KAMAYA)

工学院大学工学部 (〒192-0015 東京都八王子市中野町 2665-1)。工学院大学大学院工学研究科修士課程修了。博士(工学)。
 《現在の研究テーマ》簡易分析法の開発、バイオアッセイ。《趣味》散策。
 E-mail: bt74290@ns.kogakuin.ac.jp

新刊紹介

環境

—ここがポイント—

齋藤勝裕 著

これまでも多くの入門書を執筆している著者により、「環境」について初心者、一般読者に分かりやすく、簡明に書かれた啓蒙書である。本書は生活と環境の関係を示そうとするのが目的であり、環境を知るために必要な、「地球とは、水圏とは、気圏とはどのようなものか?」、「そこにある物質はどのような性質を持っているのか?」、「そして新しく作られた物質の性質はどのようなものなのか?」の問いに答えている。全体で、「環境」と1. 公害, 2. 化学物質, 3. エネルギー, 4. 水, 5. 大気,

6. 大地, 7. 地球, 8. 食物, 9. 室内, 10. 健康, 11. 免疫, 12. リサイクルの12の章から成っている。各章をほぼ5~7の項目に分け、一つの項目を二つか三つのキーワードで10行以内で説明している。これらの解説は、偶数ページ1ページにまとめられており、見開きの奇数ページはすべて、大きく簡明なイラスト、図などに用いられている。文章は見やすい大きな文字でイラストの補助説明程度に抑えられているため、理科、化学に知識、興味を持たない読者でも抵抗なく、全文を読み通すことができる。環境を理解するために最低限必要な化学物質、化学式なども示されているが、読み通すための抵抗にはならない。生活に密着した項目も含め、非常に広い領域を限られた紙面で解説しているため、取り上げたキーワードの数、またその解説の深さは十分とは言えない部分もあるかと思うが、環境問題に興味を覚えた人、環境をこれから理解して行こうとする人にとっては、格好の入門書として奨められる。

(ISBN 978-4-7827-0551-3・B5判・192ページ・2,300円+税・2007年刊・三共出版)