混濁試料の分光測定装置とその応用について*

真 壁 英 樹

(昭和41年5月18日受理)

A Spectrophotometer for Turbid Materials and its Application

Hideki MAKABE

Shimadzu Seisakusho Ltd.
(18, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto)

1. 序 言

半透明および不透明の一般に光を散乱する物質の吸収スペクトルを明確に測定する装置として著者らは先に大きな平面状光電面を表面ガラスの内面に有するエンドオン型光電子増倍管を試料セルに密着あるいは近接せしめた2検出器型自記分光光度計を試作し、得られた結果について報告した¹⁾。本装置は 1) 半透明および不透明試料については、従来不可能視されていた明瞭な吸収帯を測定することができる。2) 透明試料については、吸光度がより高精度で測定でき、比例性の範囲が大で、試料の屈折率の変動に影響されず安定な測定ができる。3) 2検出器方式であるので試料と光電面の距離を密着から任意の値にまでとることができ、また電氣的コンペンセーターで I_0 線を補正できることなどから、いろいろの応用が考えられ、種々の新しい分光測定ができることを目的として作られたものである。1) および 2) についてはすでに報告したので、ここでは主として装置に関する補足と、3) の各種の応用について説明する。

2. 混濁試料をエンドオン型光電子増倍管の光電面に密着させる方法について

2.1 半透明混濁液の測定

Fig. 1 に示すように、平行光束が混濁試料に入射すると、透過した光については、粒子に当たらず溶媒だけを通過して平行に透過した光 I_p と、粒子に当たって光電面側に散乱された光 I_d の2種に分けて考えることができる。 I_0/I_d は光吸収物質の吸収によつて波長が変

Fig. 1. 従来の分光光度計による混濁試料の測定方法 (f は光電面に捕そくされる散乱光の分量をあらわす)

ると変化するが、 I_0/I_p は波長にはほとんど無関係であるはずである。従来の分光光度計により混濁試料を測定すれば、試料と光電子増倍管の受光面との間に相当距離があるため、前方に散乱された重要な光 I_d は、光電子増倍管に達するまでに減衰してしまい、不必要な平行透過光 I_p はほとんど減衰しないで測定される。したがって、試料中の色素や光吸収物質がはつきりした吸収帯をもっているにもかかわらず、得られたスペクトルにおける吸収帯は Fig. 2 の B 曲線のように平たんで、しかも高い吸光度レベルに現われる。このようにして測定された測光量は疑似減光度 quasi-attenuance²⁾ すなわち $E_f = \log I_0/(I_p + fI_d)$ である。ここで f は光電子増倍管に捕そくされた I_d の分量をあらわす。したがって f はそれぞれの分光器の光学系の幾何学的寸法や、受光器の光電面の大きさに関係し、通常 1 より非常に小さい値である。Fig. 3 は、受光面の大きさが、直径 44 mm のエンドオン型光電子増倍管と、受光面の大きさが 8 mm×24 mm の従来の RCA 1P28 型サイドオン形光電子増倍管について、混濁試料と光電子増倍管の距離 L

* 昭和41年2月5日大阪大学における日本分光学会、「混濁試料の分光測定」シンポジウムで発表。

** 株式会社島津製作所(京都市中京区西ノ京桑原町18)。

1) 真壁・福田・栗田・小沢・柴田：“分光研究” Vol. 15, No. 1 (1966)。

2) 黒住・稲田・柴田：“生体物理化学シンポジウム”第5集 (1960)。

Fig. 2. クロレラ生細胞懸濁液のスペクトル
A: 試料を光電面に密着した場合
B: 従来の自記分光光度計による測定

Fig. 3. 光散乱体と光電子増倍管の距離に対する f (または α) 値
光電面の大きさ
A: 8×24 mm. B: 44ϕ mm

Fig. 4. 混濁試料が光電面から離れるにしたがつて吸収スペクトルが変形することを示す図
1: $L=0$. 2: $L=50$ mm.
3: $L=200$ mm.

(mm) を変えた場合の f の値を実測し、プロットしたものである。従来の手動の分光光度計では、 L が 30mm 程度であるが、このくらいの L 値でも f は 0.07 に減少しており、散乱透過光 I_d の 93% が失われていることがわかる。自記式分光光度計では L が 200 mm 以上離れているのが普通であり、したがって f は 0.005 以下となり、ごく一部の散乱透過光を捕そくしてスペクトルを測定していることになる。この状態では quasi-attenuance の値は $f=1$ の場合にくらべかなり高くなり、吸収帯が不明瞭になるばかりでなく、選択散乱の影響を強く受け、吸収極大の波長が見掛けの移動をおこしたり、吸収帯の高さの相対値までが大きく変化する。その一例を Fig. 4 に示す。この図はクロレラ生細胞懸濁液の吸収スペクトルを、試料セルと光電面の距離を変えて測定し、quasi-attenuance レベルを下げて平行移動して重ね合わせ、 f が小さくなればスペクトルが変形してくる状態を示したものである。試料セルを光電面から離すと、散乱透過光をレンズで光電面上に集光しているにもかかわらず吸収帯は変形をおこし、吸収極大位置は長波長へ移動している。

Fig. 5 に示すオパールガラス法では、平行透過光 I_p も散乱透過光 I_d もともにオパールガラスによつて完全に拡散されるから、 I_p も I_d もその同一分量が光電子増倍管で捕そくされるので、試料側光量は $\alpha(I_p + I_d)$ とな

Fig. 5. オパールガラス法の原理を示す図

り、対照側も αI_0 となり、したがって **attenuance** 単位で測定している量は $\log I_0/(I_p + I_d)$ となり、 $f=1$ の場合の測定となる。この結果半透明体の吸収帯が明瞭に観察される。しかしながら、係数 α は Fig. 3 のグラフからわかるように、 f と同様従来の手動の分光光度計では約 0.07、自記式では 0.005 以下の小さな値で、したがって感度がそれだけ低下し、広いスリット巾で測定しなければならない。このため分解能を悪くし、迷光を増大させ、また測定波長域をせまくしてしまう。また紫外域では、オパールガラスのような材料を見出すことは困難で、また近赤外部ではオパールガラスの散乱能が低下する。結局、紫外から近赤外にわたって共通に使用できる光散乱板を見出すことは不可能である。

透過散乱光を測定する他の方法に積分球を用いる方法^{3,4,6)}があるが、感度の低下はオパールガラスと同様である。その上多重反射の影響や、窓や試料の存在に基づく誤差が生ずる^{6,7)}。また積分球内面の白色塗料のあるものは紫外部で蛍光を出すので紫外域では、スペクトルの変形や吸収極大位置の見掛けの移動がおこる。

そこで著者らは Fig. 6 に示すように、半透明体を透過したすべての散乱透過光と平行透過光を捕そくすることができるよう、試料セルをエンドオン型光電子増倍管の平面状前面光電面に密着させる方法を採用した。光電面の大きさは直径 44 mm の円形で、試料セルは光路長 10 mm で 20 mm×20 mm の矩形セルを用いた。セルに入射する光束は、シリンドリカルレンズにより、長

Fig. 6. エンドオン型光電子増倍管に試料を密着する混濁試料の測定原理を示す図。

さ 12 mm、巾はスリット巾の 2 倍の細長い断面になっており、セルや光束の大きさに比し、光電面が十分大きくなっている。このように試料とエンドオン形光電子増倍管を密着させる方式によれば、光電子増倍管にかかる

Fig. 7. 生酵母菌の懸濁液の差スペクトル

..... 還元形の吸収スペクトル
 — — — 酸化形の吸収スペクトル
 ————— 差スペクトル

- 3) Seybold, A. and A. Wissweiler: *Botan. Arch.*, **43**, 252 (1942).
- 4) Rabideau, G.S., C.S. French and A.S. Holt: *Am. J. Botan.*, **33**, 769 (1946).
- 5) Haxo, F.T. and L.R. Blinks: *J. Gen. Physiol.*, **33**, 389 (1950).
- 6) O'brien, P.F.: *J. Opt. Soc. Am.*, **46**, 343 (1956).
- 7) Jacquez, J.A. and H.F. Kuppenheim: *J. Opt. Soc. Am.*, **45**, 460 (1955).

電圧を上げなくとも、スリット巾がせまいままで、紫外より近赤外までの広い波長域にわたって Fig. 2 の曲線 A のような半透明混濁液のシャープな吸収帯が低い基線上に得られる。この方法によれば、オパールガラスより $1/\alpha$ 、すなわち 200 倍以上の感度が得られ、強い吸収帯をもつ混濁液の差スペクトルでも Fig. 7 に示すような十分な感度と分解能をもって測定することができる。

試料セルと光電面の間に内面を Al 蒸着したガラスパイプを挿入したとき、ガラスパイプの長さに対する捕そくされる散乱光の分量を Fig. 8 に示す。Fig. 9 に著者らの装置の光学系を示す。

Fig. 8. 光散乱体と光電子増倍管の光電面との間をガラス製ライトパイプで連結した場合の f 値

Fig. 9. 著者らの2検出器形自記分光光度計の光学系

2.2 不透明体の測定

不透明体の測定の場合は、Fig. 1 に示す後方に散乱された反射光 I_{dr} を測定しなければならないが、この場

合は、粒子の密度が大である場合以外は半透明体の測定の場合と条件は同じである。不透明体に当たった光の大部分は、試料の表面から反射される鏡面反射光 I_s と、試料の中で散乱された散乱反射光 I_{dr} の2種類の形で反射される。散乱反射光 I_{dr} は試料の中に含まれている光吸収物質の吸収特性をもっているが、鏡面反射光 I_s は、おもに表面の滑らかさや、屈折率など表面の性質に関係するものである。したがって I_s は波長によるめだつた変化をせず、 I_{dr} は試料特有の吸収によって変化する。Fig. 10 に示すような普通の反射測定に使用される積分球方式では、これら2つの光の和 ($I_s + I_{dr}$) を測光する。

Fig. 10. 積分球による反射測定の原理を示す図

Fig. 11. 赤色ブラチック板の Reflex attenuation
A: 著者らの方法
B: 積分球法

タイルのように表面が滑らかな試料や、生物体のように水分を多く含む試料などでは I_s が大きい。そのため、かかる測定でこのような光沢試料を測定すると、波長に対する I_0/I_{dr} の変化は I_s 項の存在によりマスクされ、たとえば Fig. 11 の曲線 B や Fig. 13 の下の曲線群のように平坦化されてしまう。また積分球方式の他の欠点は、半透明体の散乱透過光の測定の場合と同様、積分球内面に塗布された MgO や $BaSO_4$ が可視域でしか高い反射率をもたず、紫外部では感度が著しく低下し、さらに反射率が急激に低下する波長域では多重反射の影響により吸収極大位置が見掛けの移動をおこすことがある。また積分球内面の白色塗料のあるものは紫外域で蛍光を発するため紫外域では積分球の蛍光によってもスペクトルの形状が変化する。

Fig. 12. 不透明試料の測定原理

Fig. 13. 市販牛乳の稀釈液の反射と透過スペクトル

著者らの考案した不透明体の測定装置では、Fig. 12 に示すように反射鏡と光トラップによつて、できるだけ鏡面反射光 I_s をとり除き、エンドオン型光電子増倍管の大きな受光面を試料に近づけることにより、できるだけ多くの散乱反射光を捕そくできるようになっている。このようにすれば Fig. 11 の曲線 A のように 190 $m\mu$ の遠紫外から 800 $m\mu$ までの広い波長範囲にわたり、不透明体のシャープな吸収帯を得ることが可能であつて、吸収極大位置の見掛けの移動や変形をうけることがない。かくして測定された試料中の物質の吸収による I_{dr}/I_0 単位であらわされる反射率のスペクトル、あるいは $\rho E_{dr} = \log I_0/I_{dr}$ のスペクトルを求めることが可能である。Fig. 13 に市販牛乳の紫外における semi-integral attenuation ρE_t と、種々の濃度における ρE_{dr} の比較を示す。両者の形状は 200 $m\mu$ の紫外域までよく相似し、280 $m\mu$ におけるたん白カゼインの吸収極大位置の移動もみられない。また Fig. 13 には同時に積分球による測定結果を示した。紫外では I_s が非常に大となり、吸収帯が不明瞭になることを示している。

2.3 透明試料の測定

分光光度計において、試料セルは光束を通す一つの光学素子であるため、従来の自記式分光光度計のように、試料セルと検出器との間に相当の距離がある場合には、試料の屈折率の変化は、光電子増倍管の光電面上の結像の状態に強い影響を与える。したがって、試料と対照の間に屈折率の差がおこった場合は、光電面上の感度のむ

Fig. 14. 重クロム酸カリ（アルカリ性溶液）と N.B.S. 標準フィルターによる測光精度の検定の 1 例

() 内の数字は標準値、外は測定値、番号は表 1 参照

A: 紫色 N.B.S. 標準フィルター

B: 黄色 N.B.S. 標準フィルター

C: 重クロム酸カリ・アルカリ性標準溶液

Table 1. 重クロム酸カリアルカリ性溶液による
測光精度検定の1例

	Fig. 14 中の番号	濃度 gr/l	パーセント透 過 度 標準値	実測値の1例
275 m μ	1	0.0050	80.4	80.4
	2	0.0100	64.7	64.7
	3	0.0150	52.0	51.9
	4	0.0200	41.8	41.6
	5	0.0250	33.7	33.7
	6	0.0300	27.1	27.0
	7	0.0350	21.8	21.6
	8	0.0400	17.5	17.4
375 m μ	9	0.0050	75.2	75.2
	10	0.0100	56.5	56.3
	11	0.0150	42.5	42.3
	12	0.0200	32.0	31.9
	13	0.0250	24.0	23.9
	14	0.0300	18.1	18.0
	15	0.0350	13.6	13.6
	16	0.0400	10.2	10.3

Fig. 15. 重クロム酸カリ（アルカリ溶液）の
検量線

らの影響によつて測光値に誤差をあたえる。この誤差は試料セルと光電面の距離が大であるほど大となる。吸収帯における異常分散や、温度や濃度変化による屈折率の変化は当然誤差を与える原因となる。著者らの試料セルを光電面に密着させる方法では、このような誤差が極めて小さい。Fig. 14 および Table 1 に本装置により

重クロム酸カリ標準溶液および N.B.S. 標準フィルターにより測定した結果⁸⁾を示し、Fig. 15 に重クロム酸カリ溶液の検量線の比例性を示す。

3. 2 検出器形自記分光光度計の I_0 線と その補正

本装置の光学系や電気系などの構造については詳細にすでに報告¹⁾がなされているので省略し、ここではエンドオン型光電子増倍管の特性の I_0 線に及ぼす影響について述べる。

本装置に使用されているエンドオン型光電子増倍管としては、測定可能な最低波長を 185 m μ までのばそうとしたため、感度特性が S 13 型の EMI 6255 B を最初使用した。6255 B のダイノードは 13 段である。この波長感度特性の一例を Fig. 16 の曲線 A および B に示す。この 2 個の光電子増倍管を対照側と試料側の検出器に用いたときの波長に対する感度差曲線は曲線 C で、この感度差スペクトル C は、電気的コンペンセーターで直線に補正しないときの I_0 線である。この曲線 C をコンペンセーターで直線に補正した I_0 線が曲線 D で、その上の縦の細線はコンペンセーターの可変抵抗挿入位置を示している。6255 B を使用したときの分光光度計の最高感度位置（タングステンランプを光源に使用している場合）

Fig. 16. 本装置の分光感度曲線（タングステン
ランプ使用のとき）

- A, B: EMI 6255 B を使用したときの1例
C: A, B の感度差スペクトル
D: C をコンペンセーターで補正したときの I_0 線
E: R 236 を使用したときの分光感度曲線
F: 2 個の R 236 の感度差スペクトル

8) Keegan, H.J., Schleter J.C. and Dean B. Judd: J. Research N.B.S. 66A, 3, 203 (1962).

は $550\text{ m}\mu$ 付近にあり、 $500\text{ m}\mu$ より長波長では感度が大きく変動するため、その差として極大や極小が現われる。したがってこの領域では、コンペンセーターの可変抵抗を密に挿入しなければならない。このことは I_0 線の調節を複雑にする。そこで著者らは、本装置に最も適した感度特性をもつエンドオン型光電子増倍管の開発につとめ、S 20 型に近い感度特性をもち、しかも紫外域で 6255 B とほぼ同じ感度特性を有するエンドオン型光電子増倍管 R 236 形を開発した。この感度特性は Fig. 16 の曲線 E に示すように感度極大の位置が $650\text{ m}\mu$ の長波長にある。その感度差スペクトルは曲線 F に示すように屈曲が単調で、コンペンセーターの挿入位置が疎でよく、調節が容易で、時間的にも非常に安定である。また長波長における感度が高く、 $800\text{ m}\mu$ で 6255 B よりも約 20 倍の感度を有し、迷光を非常に小さくするに役立っている。

一般に、2 検出器形自記分光光度計ではコンペンセーターの補正が面倒であると考えられているが、1 検出器形でも試料光束と対照光束とを光学的調整のみによつて厳密に合わせ、 I_0 線を直線にすることは困難で、やはり Fig. 16 の F 曲線程度の曲りはある。またミラーの曇りなどによつても変化するので、これを光学的に調節するのはかえつて面倒で、むしろ電氣的に調節する方が容易である。したがって、コンペンセーターをもつ 2 検出器の場合は、感度差スペクトルができるだけ平坦であるような検出器を用いれば I_0 線は時間的にも安定であり、 I_0 線の調整には面倒さはない。また顕微分光測定や、微分スペクトル測定の場合のように、どうしても試料光束と対照光束の間のアンバランスが避けられない場合には、このような電氣的コンペンセーターが有用である。

4. 各種の応用

エンドオン型光電子増倍管を使用した 2 検出器形自記分光光度計の本装置では、さらに次のような同装置の特長を生かして、種々のユニークな応用測定ができる。

- 1) 試料を光電面に密着することが可能であり、さらに必要とあらば、試料と光電面の間の距離を自由に選択することもできる。
- 2) 対照側および試料側の光学系を、それぞれ独立に変形できること。
- 3) 試料光束と対照光束の間に光学的なアンバランスがあつてもコンペンセーターにより I_0 線を直線にできること。
- 4) 吸光度 0~3 にわたる広い測定レンジをもつ測光

回路をもち、さらに光学的アッテニユエーターにより、吸光度レベルを平行に移動でき、吸光度 3~5 までも測定できる感度を有していること。

- 5) 対照光束と試料光束との間隔が十分離れており、対照室および試料室が十分に広いこと。

などである。混濁試料の測定には、試料に応じて測定法を工夫しなければならないことが多く、本装置のような能力と多用性が必要である。かかる点を活用して考えられた新しい各種の付属装置を用いて得られた結果について次に述べよう。

4.1 ペーパークロマトグラムの測定

ペーパークロマトグラム、薄層クロマトグラムおよびシアノガムによる電気泳動パターンなどを、紫外や可視域の任意の一定波長でスキヤンしたり、しかもそれぞれのバンドやスポットの位置において波長を移動して吸収スペクトルを記録し得る付属装置を設計製作した。使用に当たっては、試料をエンドオン型光電子増倍管の光電面と、それに近接して試料室に新しく設けられたスリット（クロマトグラム用スリット）の間に装てんし、同期電動機で試料を光軸と直角方向にスキヤンする。分光光度計本体の記録計は、分光器を任意の波長に固定したまま、ペンブリッジを同期電動機で一定速度で送ることができるので、スタートを合わせれば、Fig. 17 に示すようなクロマトグラム・プロファイルが得られる。プロファイルの横軸とペーパーの上の距離は 1 対 1 であるが、この

ペーパー上の位置

Fig. 17. ペーパークロマトグラムのプロファイルの 1 例
クロロプラストのトルエン展開ペーパークロマト
グラフ

比を変えることも可能である。試料に当てる光束は、上記クロマトグラム用スリットを調節することによって、巾や長さおよび位置を自由に变化し得る。特に新しい応用として興味のあるのは紫外部における測定で、展開剤として紫外部に吸収のない溶媒を使用すれば、従来のように染色に依存することなく、たん白や核酸またはその分解物のクロマトグラム上の存在を検知し得るのみならず、適当な条件を選び補正を行えば、定量も可能と考えられる。今後の検討で期待される次第である。

4.2 微分スペクトルの測定^{9,10)}

二つあるいはそれ以上の吸収帯が、全くあるいはわずかの波長差で重なり合った際に、それらの吸収帯の数を正確に知りたい場合や、吸光度が波長に対して急激に変化する部分に重なった弱い吸収帯を確認したい場合、または単一の吸収帯の吸収極大位置をより厳密に定めたい場合などには Absorbance (E) の波長 (λ) に対する 1 次微分、すなわち $dE/d\lambda$ を波長に対して自記したすなわち微分スペクトルを求めれば有効である。本付属装置では、光学的方法により簡単に微分スペクトルを得るようにしてある。その原理を Fig. 18 に示す。分光器の出口スリットから出た中心波長 λ の単色光を、試料室と対照室にそれぞれとりつけられた微分スペクトル用スリットによって、スリットの像のそれぞれ一部分だけを通してしめることにより、試料側光束 λ_s と、対照側光束 λ_R との間にごくわずかの波長差 $\delta\lambda$ を生ぜしめる。次に試料セルと対照セルをともにブランクにし、吸光度レンジにして波長走査をすれば、微分スペクトルのベースラインが得られ、これが屈曲しているときは、コンペンセーターにより直線に補正する。測定に際しては両光束に同一試料を入れ、光電面に密着波長走査をすれば、Fig. 19 に示すような混濁液の微分スペクトルが得られる。

Fig. 18. 微分スペクトル測定原理図

- 9) French, C.S. and H.S. Huang: Year Book, Carnegie Inst., 56, 266 (1956~1957).
- 10) French, C.S.: "Symposium on Instrumentation and Control," Berkeley, California U. S. A. (1957).

Fig. 19. クロロプラストの微分スペクトル
A: 微分スペクトル
B: 吸収スペクトル

微分スペクトル測定の際には、分光器のスリット巾を一定にして波長走査を行わなければならないので、通常のスリット巾自動制御方式の波長走査を、光電子増倍管にかかる負高圧を自動的に制御する方式の波長走査にしなければならない。本装置はスイッチにより、両方式の波長走査を簡単に選択することができる。

4.3 ダブルビーム顕微分光の測定

試料側測光チャンネルを通常の試料側光電子増倍管より別の光電子増倍管に切りかえても、コンペンセーターを調節すれば I_0 線を水平直線にすることが可能であるから、たとえば Fig. 20 に示すような光学系を用いれば、微小部分の吸収スペクトルを自動記録することが可能である。かかる目的で試作した顕微分光付属装置の外

Fig. 20. ダブルビーム顕微分光光度計の光学系

Fig. 21. ダブルビーム自記顕微分光測光装置の外観

Fig. 22. 赤血球中のヘモグロビンの自記顕微分光スペクトル
測定視野の大きさ 2μ

観を Fig. 21 に示す。コンデンサーと顕微鏡の光学系には 50 倍の Schwarz-shield 型反射対物鏡を用いた。本付属装置によつて直径 2μ の測定視野で得られた赤血球中のヘモグロビンの吸収スペクトルを Fig. 22 に示す。また同図中の $420\text{ m}\mu$ の Soret 帯に波長を固定し、ステージを自動送り装置により移動し、 2μ の直径の視野で血球を截断したプロファイルが Fig. 23 に示されている。この記録では、試料のすぐ下に光拡散板を挿入して照射光を拡散させ、血球によるいわゆる edge effect による像を消去した。かくして平たんなベースラインの上に、

Fig. 23. 赤血球の截断プロファイル
波長 $420\text{ m}\mu$
測定視野の大きさ 2μ

Fig. 24. たまねぎ表皮細胞の核酸の自記顕微分光スペクトル
測定視野の大きさ: 2μ
光源: 500 W キセノンランプ

血球の存在とその厚さの変化をヘモグロビンの分布により記録できた。Fig. 24 にたまねぎ表皮細胞中の核酸のスペクトルを 2μ の測定視野で測定した記録を示す。この場合、光源には 500 W のキセノンランプを使用した。

4.4 濁度および光沢度の測定

懸濁液中の細胞濃度や粒子数、および粒子の大きさを分光光度計で測定する場合は、懸濁液の単位体積中に含まれる粒子数を n 、液層の厚さ（セルの光路長）を d 、

粒子の実効散乱断面積を S^* 、試料への入射光量を I_0 および粒子に当らず、溶媒の部分のみを透過した平行透過光を I_p とすれば、次式が成立する。

$$\log I_0/I_p = 0.434 \cdot d \cdot n \cdot S^*$$

$\log I_0/I_p$ は rectilinear attenuation または turbidity と呼ばれる測光量で、Fig. 25 に示すような光学系を試料光束中に挿入することによって、これを測定することができる。試料からの散乱透過光 I_d をかかる付属装置によりほとんど完全に除去して上記の絶対値を測定した。上式からわかるように粒子数 n または総散乱断面積 $n \cdot S^*$ が求められる。Fig. 26 にクロレラの生細胞懸濁液の可視部における rectilinear attenuation $\log I_0/I_p$ の測定例を示す。このスペクトルは、選択散乱の影響によりわずかに長波長側で変化しているが、顕微鏡測定以上の実用的精度で S^* または n の測定ができる。光沢度の測定は、Fig. 25 中の反射鏡 M_s を試料に置き換えることによって測定される。

Fig. 25. Rectilinear attenuation 測定原理図

Fig. 26. クロロプラスト混濁液の Rectilinear attenuation スペクトル (A) と吸収スペクトル (B)

4.5 蛍光の測定

混濁液の微弱な蛍光を測定するためには、ノイズが少なく、再現性にすぐれ、かつ安定して測定ができなくて

Fig. 27. 蛍光作用スペクトル測定の光学系

Fig. 28. クロロプラスト中のクロロフィルの蛍光作用スペクトル測定例

A: エタノール抽出液の作用スペクトル
B: 懸濁液の作用スペクトル
C: 吸収スペクトル

B は A と異つたスペクトルを示すが、A とはよく合致している。

干渉フィルターは中心波長 680 mμ

Fig. 29. 蛍光エネルギー分布測定の光学系 (ダブルビーム方式)

はならない。この目的のため Fig. 27, Fig. 29 および Fig. 30 に示すようにいずれもダブルビーム方式の3種類の蛍光測定装置を試作し、好結果を得た。すなわち試料を照射する光の一部を対照測光電子増倍管に入れ、 $\log I_0/I_f$ を記録することにより、光源の変動の影響を除去し、安定な記録が得られた。Fig. 31 の曲線は、ダブルビーム方式と、シングルビーム方式で測定した場合の時間的変動の対比を示す。また Fig. 32 には、Fig. 30

Fig. 30. モノクロメーターを照射光源に用いた蛍光エネルギー分布測定の光学系 (ダブルビーム方式)

Fig. 31. ダブルビーム方式とシングルビーム方式の指示値の安定性の比較
A: ダブルビーム方式
B: シングルビーム方式

Fig. 32. 濃度 $1/1000\gamma$ の Uranin の 蛍光スペクトル (ダブルビーム方式)

の光学系で得られた Uranin の $1/1000\gamma$ 濃度のケイ光スペクトルを示す。Fig. 27 のケイ光作用スペクトル測定装置は照射光が弱くても感度が高いことが特長で、その測定の1例を Fig. 28 に示す。

このほか、濁度滴定の測定、ダブルビーム蛍光、全反射測定装置などが試作され良好な結果が得られたが、紙面の都合で省略する。以上の応用測定についての詳細な報告は別の機会に行ないたい。

本装置の研究に対し、御指導を賜った東京工業大学教授柴田和雄博士、および御援助を賜った科学器械工場長小沢七兵衛博士、ならびに著者ととも研究開発に当たった科学器械工場福田克雄、栗田昂、中川貞司、山本祐志、高田通之助の諸氏に厚く御礼を申し上げます。

Chemical Abstract に載録：分光研究に発表された化学系統の論文はすべて **Chemical Abstract** に載録されておりますから奮って御投稿下さい。