

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その7）〉

比色分析装置の基礎

小川 善資

I. 基礎知識

分析装置の限界と特性を十分に知って、正しく活用する必要があります。まず、分光光度計が使用できなくなる4つについて説明します。

1. 濁度がある場合
2. 吸光度が高すぎる場合
3. 測定光で分析物質が分解する場合
4. 蛍光を発する場合

1. 濁度

1-1. 濁度は吸光度測定の大敵

近年、抗原抗体反応で生ずる「濁度を分光光度計で測定し、抗原量を定量する方法が一般的に使用されています。具体的にはIgG、IgM、IgA、IgD、CRP等の測定法として用いられている比濁法です。同じ分析装置を吸光度測定にも濁度測定にも用いることができます。このことは吸光度を測定する場合、濁度の発生している試料を正しく測定できない、吸光度のある溶液中の濁度を測定する場合、濁度を正しく測定できないことを意味しています。

試料中に難溶性薬物が混入していたり、各種試薬と混和させることによって濁度が出現する薬物が存在する場合や特殊な濁度を発生させる蛋白が存在する場合、反応液に濁度が発生します。このような時、正しく吸光度を測定することができなくなります。測定できなくなる理由を図1に示しました。

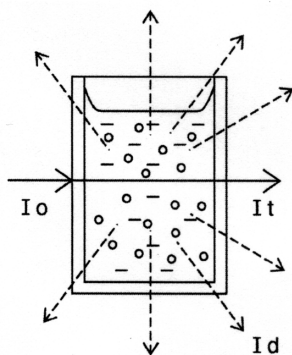


図1 混濁試料で正しい吸光度が測定できなくなる原因
入射光 I_0 は溶液内で光の吸収を受け I_t となる。混濁のある場合には測定光が濁度粒子とぶつかり、散乱光 I_d が発生し、あたかも吸収があった様に誤差を与える。

1-2. 発見する方法と回避法は？

実際問題として、濁度による測定誤差を発見された方に伺うと、デルタチェック法（前回値チェック法）で、気付くことが一番多いようで、原因が解らず悩んでいる時、ふと反応液を見ると、「そんなに発色していないではないか。」何か変だな、と思うと濁度であった、という具合です。尿酸測定で多いようです。

では、回避法はあるのでしょうか。影響を低減させる方法としては2波長測光があります。濁度による吸光度変化は波長依存性が少なく、ほぼ全波長域で影響があるため、2波長測光でおおよその回避はできます（後述の2波長測光の項参照）。しかし、濁度が強すぎる場合はこの限りではありません。濁度を発生させないようにするためには反応液の環境を変える必要があるため、測定原理の違う測定方法の選択しかありません。

2. 吸光度が高すぎると測定できないの？

2-1. どのような現象が起こるの？

とても高名な先生の講演で、「この測定方法には大きな欠点がある。濃度の高い標準液を測定すると吸収曲線が長波長側にずれ、検量線の直線性がなくなる。」と発表されていました。測定方法の問題ではなく、使用されている分光光度計の問題だと感付きました。後述の図4、5に掲載した現象のことです。原因は迷光です。

吸光度が高すぎると、正しい吸光度が測定できなくなります。この原因は迷光です。迷光とは測定に用いる光以外にセルに入り込んだ光の総和で、分析光に由来する正規分布状の光は迷光とは呼びません（図2）。

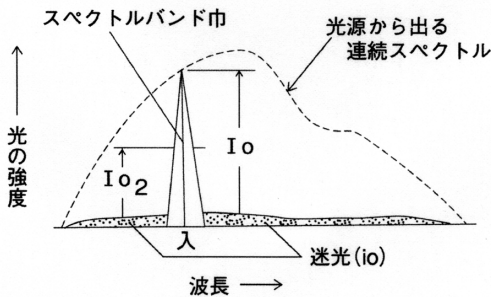


図2 測定光と迷光の関係
測定光の裾野が広がっていても、迷光とは呼びません。この測定光のシャープさと測定正確度に関しては後述します。

入射光の総量 (I₀) と迷光の量 (i₀) の比が比迷光です。セルで吸収された後、透過光 (I) とします。セルに入る光の量は I₀ + i₀ で、セルから出てくる光量は I + i₀ (迷光は波長が相違しますから、セル内で吸収を受けません) となります、見かけの透過率 (T') を求めると次の様になります。

$$T' = \frac{I + i_0}{I_0 + i_0} \dots\dots\dots \text{式 1}$$

この式から見かけの吸光度 A' を計算すると、次の様になります。

$$A' = A - \{ \log_{10}(1 + 10^A P) - \log_{10}(1 + P) \} = A - \Delta A \dots\dots\dots \text{式 2}$$

この ΔA を演算し、比迷光の大きさによって測定できる吸光度の関係を図3に示しました。比迷光が大きければ、低い吸光度から直線性を逸脱し、正しい吸光度測定ができなくなります。一般的に比迷光の小さな分析装置の方が高い吸光度まで測定可能で、比迷光の大きな装置では低い吸光度ま

表1 迷光のある装置で測定される吸光度

正しい吸光度	比迷光				
	1.0%	0.1%	0.01%	0.001%	0.0001%
1.0	0.963	0.9963	0.99962	0.99961	1.0000
2.0	1.704	1.9591	1.9957	1.99957	1.99996
3.0	1.963	2.700	2.9587	2.9957	2.99957
4.0	2.0	2.96	3.700	3.957	3.9957
5.0	2.0	3.00	3.96	4.699	4.959
6.0				4.96	5.699

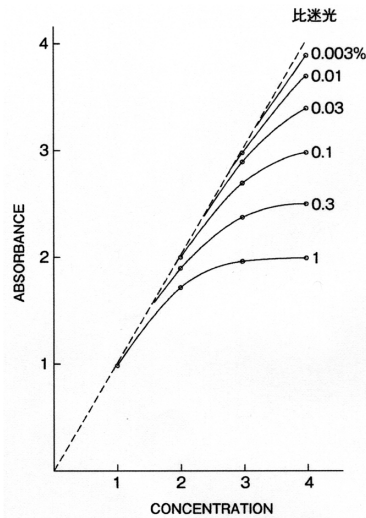


図3 迷光と吸光度測定との直線性²⁾

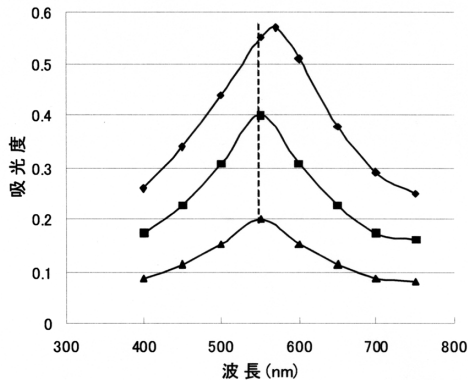


図4 迷光の多い分光光度計で各種濃度の吸収曲線を書かせた時の歪み

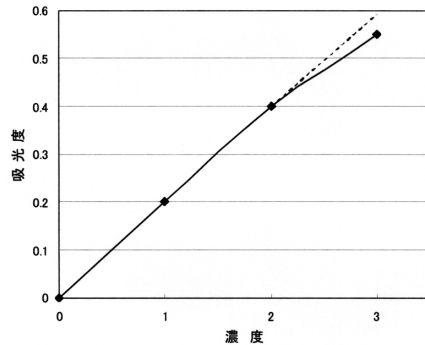


図5 迷光の多い分光光度計での各種濃度の吸光度測定との直線性

でしか測定できなくなります。表1に比迷光の大きさと測定される吸光度の関係を示しました。迷光は吸光度測定との直線性がなくなるだけでなく、吸収曲線を歪めさせます(図4)。例えば、550 nmに吸収ピークがある物質の吸収曲線を取ると、吸収極大波長が長波長側にズレてきます。このた

め、所定の波長で測定した場合、直線性がなくなります（図5）。

2-2. 回避法はあるの？

迷光のない分光器を用いると良いわけですが、一般的に分光器の価格と迷光量は相関します。しかし、大切なことは使用する分析装置の限界を知り、使用することにあります。希釈して測定すれば問題が生じません。なお、この現象を軽減するため、現在市販されている自動分析装置の多くはセル長を短くし、高い吸光度まで測定できるように工夫されています。しかし、セル長を短くすることは、測定感度が低下し、再現性を低下させることにもつながりますので要注意です。

分光器を購入した時が最も小さな迷光量で、古くなるに従って迷光量は多くなります。その原因はホコリと湿気で、分光器や各種の鏡は湿気に伴いホコリが付着し、乾燥してより強固にホコリが付着し迷光の原因となるからです。しかし、分光器や分光部に付着したホコリを決して取らないで下さい。ガラス面に傷を付け、より大きな迷光源となるからです。専門家に修理を依頼して下さい。

3. 測定光によって測定物質が破壊される

測定光で測定物質が分解する場合、当然、正確な吸光度を測定でき難くなります。成書によると、分光光度計の基本はより微弱な測定光で測定することが望ましいと書かれています。当然、測定物質をなるべく破壊することなく、優しくすることです。光に弱い物質としてビリルビンが良く知られています。現在の測定法にはビリルビン自身の吸光度を測定し、これに酵素を添加し、ビリルビンを特異的に分解し、吸光度変化量から濃度を求める方法があります。酵素を添加する前の段階で、強い測定光に晒され、ビリルビンが破壊されると、正しいビリルビン測定ができなくなります。最近、分析装置によっては分光していない全波長光を照射し、セル通過後に分光し、測定する装置がありますが、この観点から考えると、とても推奨できる分析装置ではありません。更に、測定液が蛍光を発する場合、正しく吸光度を測定できなくなるのですが、蛍光は特定波長でのみ蛍光を発します。分光してから測定していれば問題の発生することも少なくなります。全波長を照射すれば蛍光の発生する確率は大きくなってしまいます。ただ、測定光を強くすることによって、分析のパラツキを低減させることができるため、強い測定光を採用することが多くなっています。しかし、強い測定光は使うが、優しく測定するために、照射時間を極端に短くする工夫なども採用されており、装置選択の一助として下さい。

4. 蛍光が発生する試料は測定できないの？

蛍光を発する溶液の吸光度測定は測定できません。測定波長外の光が大量に存在することは迷光の大きな装置を用いることと同じ意味になります。大きな蛍光が発生した方が大きな影響となることは当然です（後分光の装置では影響が軽減されます）。影響としては誤って低値に測定してしまう負の干渉となります。

検体中に蛍光剤が混入している時にこのような現象が現れます。私の経験ではグリーンピースの大好きな患者血清中にグリーンピースの発色液である緑色の蛍光剤が混入していて、大きな影響を受けたことがあります。かつては、飲料水や漬け物など多くの食品に蛍光剤が添加されていましたが、食品に対する厳しい目が光るようになった今、蛍光剤の混入は大幅に少なくなっていると思います。

なお、測定波長を選択することで蛍光による影響を軽減できます。一方、測定物質のスペクトルバンド幅が大きければ、吸収極大を少しずらし、測定すると影響を受けることなく測定が可能なこともあります。影響があった場合、吸収曲線を描かせることと、蛍光光度計で励起波長を変化させ蛍光を発生させる波長域を知り、影響の回避法を検討することは可能です。

5. 測定光のバンド幅は狭い方がよい、広い方がよいの？

「測定光の波長純度は高い（バンド幅が狭い）と良いの？」と聞かれれば、「高い方がよい」と反射的に答えると思います。純度の高い測定光を用いると「波長分解能」の高い測定ができることと、モル吸光係数に近い吸光度を測定できるからです。しかし、必ずしも純度が高い方がよいとは限らないのです。測定光が強いほど、検出光のエネルギーが大きく、ノイズの影響を受けにくく、安定した測定に繋がります。輝線を用いる時は別ですが、通常、測定光の波長分布は正規分布となります。測定光の純度を表す方法として、半値幅を用います。半値幅の小さな光程、シャープで純度の高い光となり、広い程、様々な波長の光が混入した光となります。ただし、半値幅が1/2の測定光は光のエネルギー（正規分布曲線の面積）は1/4となります。ノイズレベルは一定ですから、半値幅が1/2の測定光（2倍精度の高い光）を用いると4倍ノイズが大きくなります。このため、必要以上に高い精度の測定光を用いるべきではありません。

測定光の半値幅と測定したい溶液の吸収曲線の関係を知る必要があります。極端な話をすると、全ての波長域に均等な吸収のある発色物質であった場合、測定光の半値幅など関係がなくなります。反対にシャープな吸収曲線の溶液を測定する場合には、測定光もシャープでなければ正しい吸光度が測定できなくなります。この関係を図にしたものが図6です。横軸に測定光の半値幅と測定物質のスペクトルバンド幅の比を取り、縦軸にモル吸光係数の何%の吸光度に測定できるかを取り、作図したものです。具体的な例で示すと、NADHの吸収曲線の半値幅は40 nmです。この1/10の半値幅の測定光を用いれば99.54%正しい吸光度が測定できます。同様に、半値幅40 nmの測定光を用いる

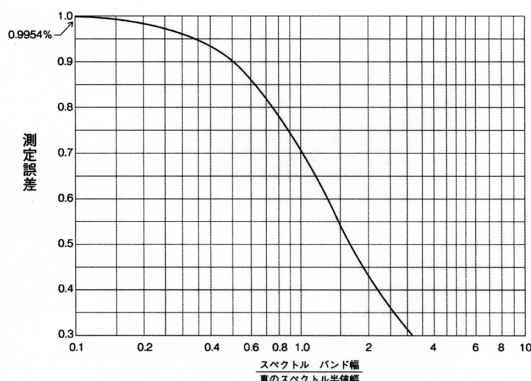


図6 測定光のバンド幅（測定に用いる光のバンド幅）/測定物質のスペクトルバンド幅（測定対象溶液の吸収曲線のバンド幅）と測定誤差の関係²⁾

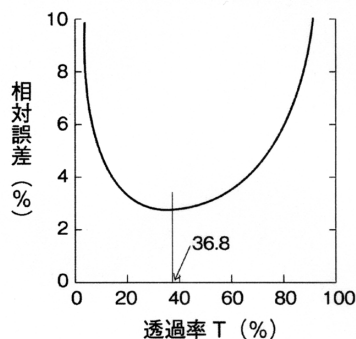


図7 透過率と相対誤差

と-30%の測定誤差が発生することを意味しています。普通に考えれば、測定溶液の半値幅の1/10の測定光を用いればよいと考えることができます。

6. 正確に測定しやすい吸光度はあるの？

低い吸光度から、高い吸光度まで、同じ精度で測定できるはずがありません。低い吸光度でも、高い吸光度では検出する測定光のエネルギーが低くなるため、相対的にノイズレベルが大きくなり、測定のパラッキが大きくなります。最も精度良く測定できる吸光度は0.4343です（図7）。ショットノイズが支配的な分光光度計では吸光度0.964付近まで、精度良く測定できますが、熱雑音が支配的な場合、0.4343付近から次第に測定精度を低下させます。

7. 吸収極大以外の波長での測定

吸光度を測定する場合、吸収極大波長で測定するのが一般的です。理由は安定した測定が可能なことと感度がよいこと、それに理論的解析がなされていることです。測定光のバンド幅とモル吸光係数の関係について記述しましたが、吸収極大で測定するから演算することができます。もし、吸収極大以外の波長で測定した場合、どのような誤差が発生するか演算できないからです。できれば、吸収極大以外の波長で吸光度を測定しないようにすべきです。

II. 2 波長測光

1. 2 波長測光のメリットは？

2 波長測光を行っている施設が多いと思います。同時に多波長を測定できるフォトダイオードアレーが開発されたことが一つの要因ですが、何の目的で2波長で測定するのでしょうか。メリットは次の2点でしょう。

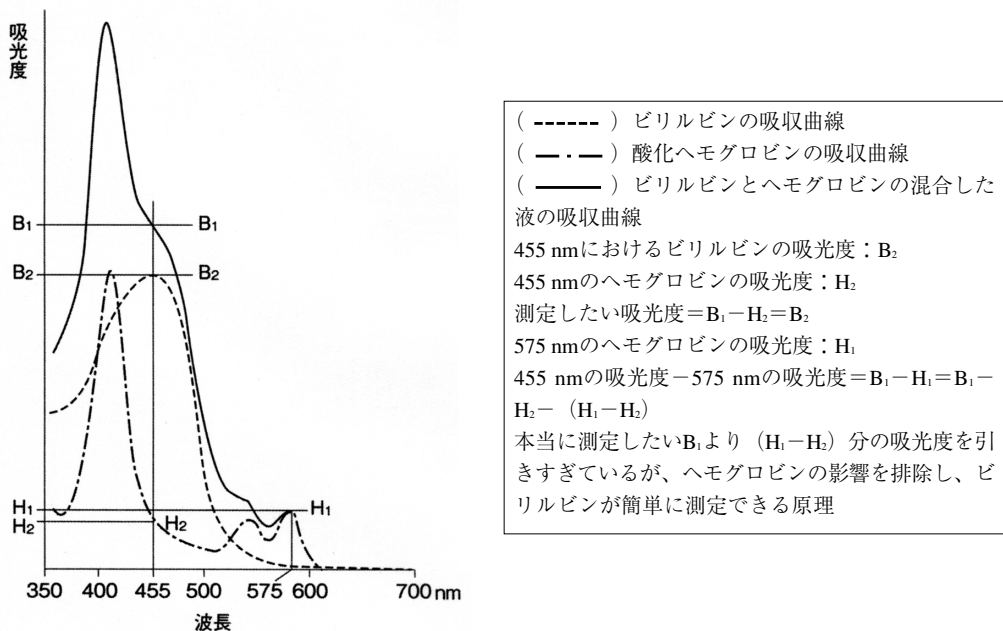


図8 ヘモグロビンによる影響を軽減してビリルビンを測定する原理 (B-Hメータの原理)

1. 2つの吸収曲線が重なり、正しい吸光度測定が妨害されている場合の回避法

2. 濁度によって生じる誤差を回避するため

2つの吸収曲線が重なっている場合の干渉回避法について説明します。ビリルビンの迅速測定法として、ビリルビンの持つ吸光度を測定する方法があります。しかし、迅速測定をしたい新生児血清の場合、採血法の問題から、溶血している検体が多く、ヘモグロビンの赤色（400 nm、575 nmに吸収極大を有する）がビリルビンの黄色（455 nmに吸収極大）の測定に正誤差を与えます（図8）。そこで、ヘモグロビンの吸光度を回避し、ビリルビンを正しく測定するため、2波長測光が用いられていました。溶血した試料の吸収曲線は（図7）図中の太線（——）となります。この吸収曲線はビリルビンとヘモグロビンの2つの吸収曲線を足した曲線です。それぞれの吸収曲線と同じ図中に描く、ビリルビンが点線（.....）、ヘモグロビンが一点破線（-.-.-）とします。単純に

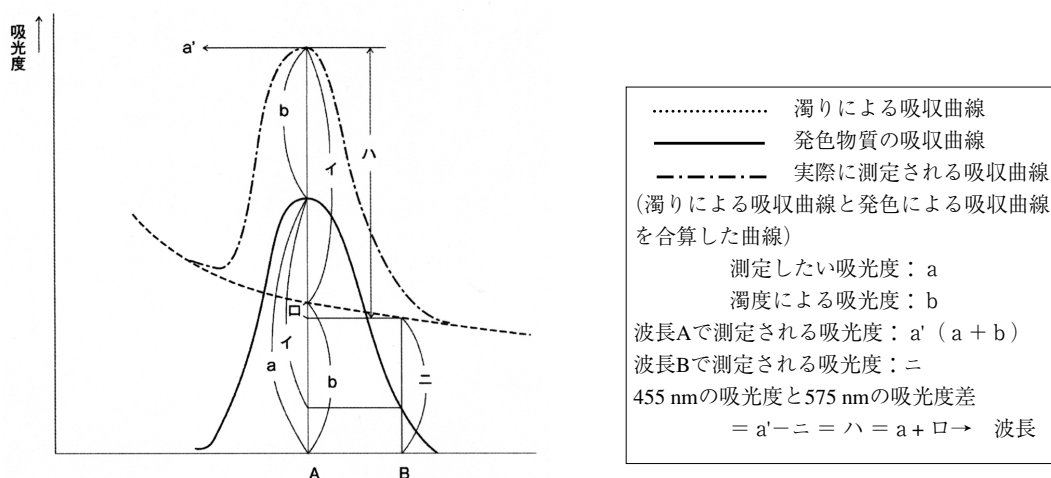


図9 2波長測光による「濁りの影響」

1波長測光（波長A）の場合、濁りが加算されたa' (a + b)の吸光度を測定。波長AとBの2波長測光の場合、波長Bで測定した吸光度を差し引くため、影響は軽減します。しかし、吸光度ロ分引き足りなく（影響が残る）なります。副波長を長波長にすればするほど、この差（ロ）が大きくなり、影響が残ります。

455 nmで吸光度を測定するとヘモグロビンに由来する吸光度を測り込んでしまうため、ヘモグロビンに由来する分の吸光度 (B₁-B₂) を差し引く必要があります。この吸光度は575 nmの吸光度を近似しています。このため575 nmと455 nmの吸光度を測定し、455 nmの吸光度から575 nmの吸光度を差し引くとほぼ正しいビリルビンのみの吸光度を測定したことになります。このように2つの波長の吸光度を測定し、干渉を受けることなくほぼ正しい吸光度測定に導くことができます³⁾ (B-Hメータの測定原理)。

同じような考え方が、濁度による影響を排除し、測定する方法です。濁度による吸収曲線は一般的に全ての波長域で吸収を有しています。このため2波長測光を実施すれば濁度による吸光度を排除できるという考え方です（図9）。

2. 副波長の設定は間違っていないですか？

2波長測光の主波長は測定物質の吸収極大を選択すべきです。副波長は主波長より長波長側の波長を選択すべきで、あまり大きく長波長側に傾けてはいけません。図9の測定に例を取りますと、副波長を波長B程度を選択すべきです。副波長として選択してはいけない波長は主波長より短波長側の波長です。長波長側に吸収帯を持つ場合、短波長側に複数の吸収ピークが存在することが多いことと、短波長側に吸収があっても、気付くことが少なく、測定誤差を起し易いからです。

もう一つは大きく離れた長波長側に設定してはいけません。大きく離れた波長を副波長に設定することは2波長測光の特徴を打ち消すことになり、1波長測光と同じことになります。図9において、濁度によって生じる測定誤差の例を示しました。濁度による吸収曲線は短波長側に行けば行く程大きくなります。2波長測光をすることで、濁度による吸収を回避し、影響を少なくしてくれます。ところが、副波長を長波長側に離せば離す程、影響差し引く吸光度が小さくなり、回避が不完全になりことを意味しています。しかし、あまりにも近い波長を設定すると、吸光度差が少なくなるため、測定のパラッキを大きくすることになり、測定誤差を招きます。実際に使用する分光光度計の性能を考えて、適切な副波長を設定すべきです。なお、他の吸収を回避する測定方法は3波長測定です。この時用いる補正式のことをアレンの補正式と呼ばれ、報告されています。

引用文献

- ¹⁾南 茂夫, 分光光度計の基礎と進歩. 生物試料分析, 1: 1-11, 1978.
- ²⁾網島義夫, 分光光度計の精度に関する諸要因と光源: 分光器の構造, 特徴について, 2: 1~16, 1980.
- ³⁾Hayashi C, Arisue K, Tanaka F, Kobayashi Y: A new instrument for bilirubin measurement. Jpn J Clin Chem, 1: 471-474, 1972.

参考文献

- 1) 武者宗一郎, 解説機器分析 第2章 光吸収分析 廣川書店、昭和35年
- 2) 岡崎雄交ら、最新機器分析 第1章 紫外、可視吸光光度法 廣川書店、昭和47年
- 3) J.W.ロビンソン著、氏家平輔訳、機器分析 基礎と応用 8 比色法、講談社、昭和55年