

第3部 分ける

第1章 分析法

第1節 比色定量

比色定量（分光学的測定法・吸光分析法）とは、物質が電子転移によって可視部もしくは紫外部の光を吸収することに基づく分析法である。吸収される光の波長はその物質の化学構造と関連するので、物質の構造を推定し確認する（定性）ことができる。また、特定の標準化した条件においては、吸収された光の強さを比較することにより物質の量を決定する（定量）することもできる。本節ではその原理を学ぶ。

1.1 分光学的測定法

【器具】 分光光度計, キュベット.

【分光光度計の構造】 分光光度計 (spectrophotometer) の簡略化した構造を図に示す。特定の波長における透過光を検出して記録できる機器であり、化合物の定性・定量に威力を発揮する。本実験では340nm以上の波長（可視部）を測定するので、タングステンランプ (W lamp) を光源としプラスチックキュベットを用いる。なお、それ以下の波長（紫外部, UV）における測定には重水素ランプ (D₂ lamp) を用い、石英ガラスキュベットが必要である。

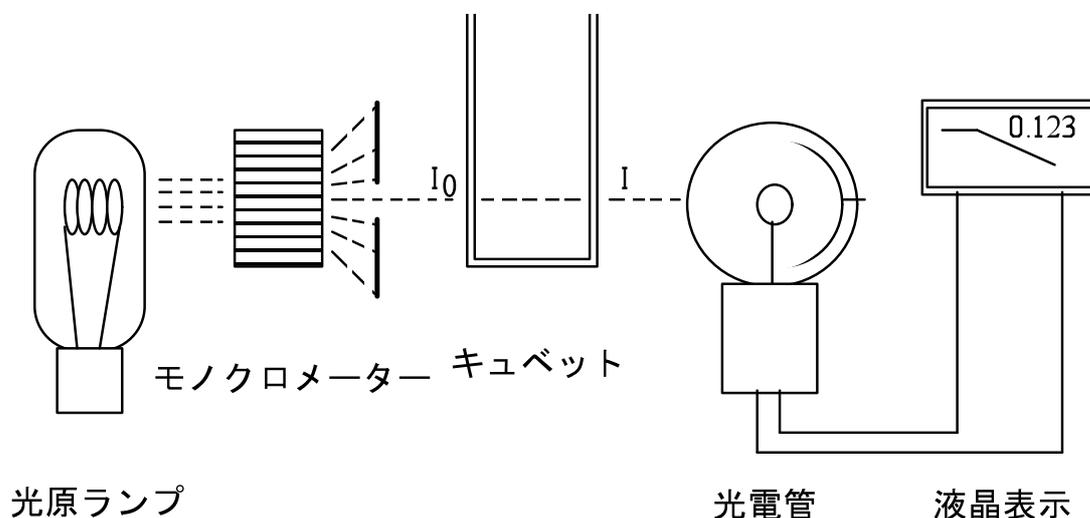


図 分光光度計の略図

【分光学的測定】 特定の波長における入射光を I_0 、透過光を I とすると、

$$\text{透過率 } T = I/I_0 \times 100 (\%)$$

$$\text{吸光度 } A = -\log I/I_0 = \epsilon cl \quad \text{--- (a)}$$

ここで c は溶質の濃度 [M], l は溶液の光路長 [cm] を表す。比例定数 ϵ は分子吸光係数と呼ばれ、試料の溶質および単色光の波長に依存して固有の値をとる。 ϵ の単位としては、通常 $[M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

が用いられる。(a)式が成り立つことをランベルト-ベール(Lambert-Beer)の法則という。
 一例として、生体内に比較的多く存在する酸化還元補酵素 NAD^+ と NADH の化学構造を図に示し、それらの吸収スペクトルをもうひとつの図に示す。分光光度計は、これらのわずかな化学構造の違いを 340nm における吸収の差として検知する。

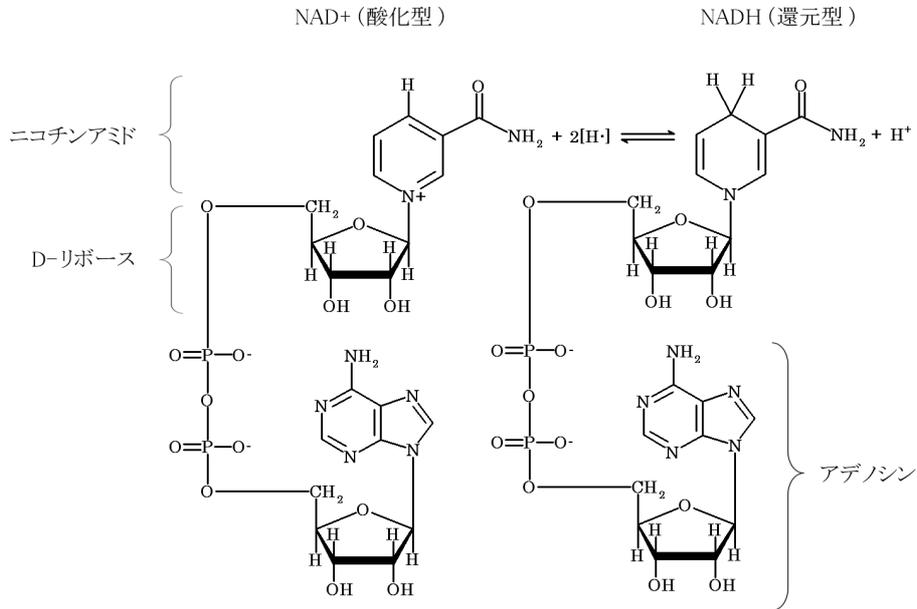


図 NAD^+ と NADH の化学構造

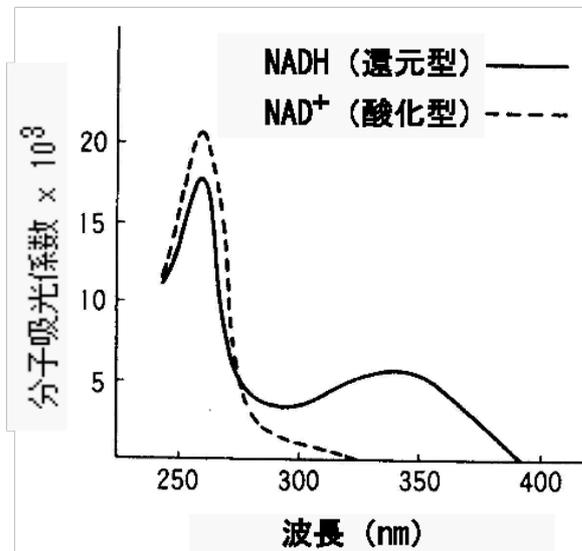


図 NAD^+ と NADH の吸収スペクトル

なお、 NADH の 340nm における分子吸光係数の文献値は $\epsilon = 6.22 \times 10^3 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] = 6.22 [\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$ である。すなわち、仮に NADH 水溶液の $A_{340} = 6.22$ ならば、濃度は 1mM である。