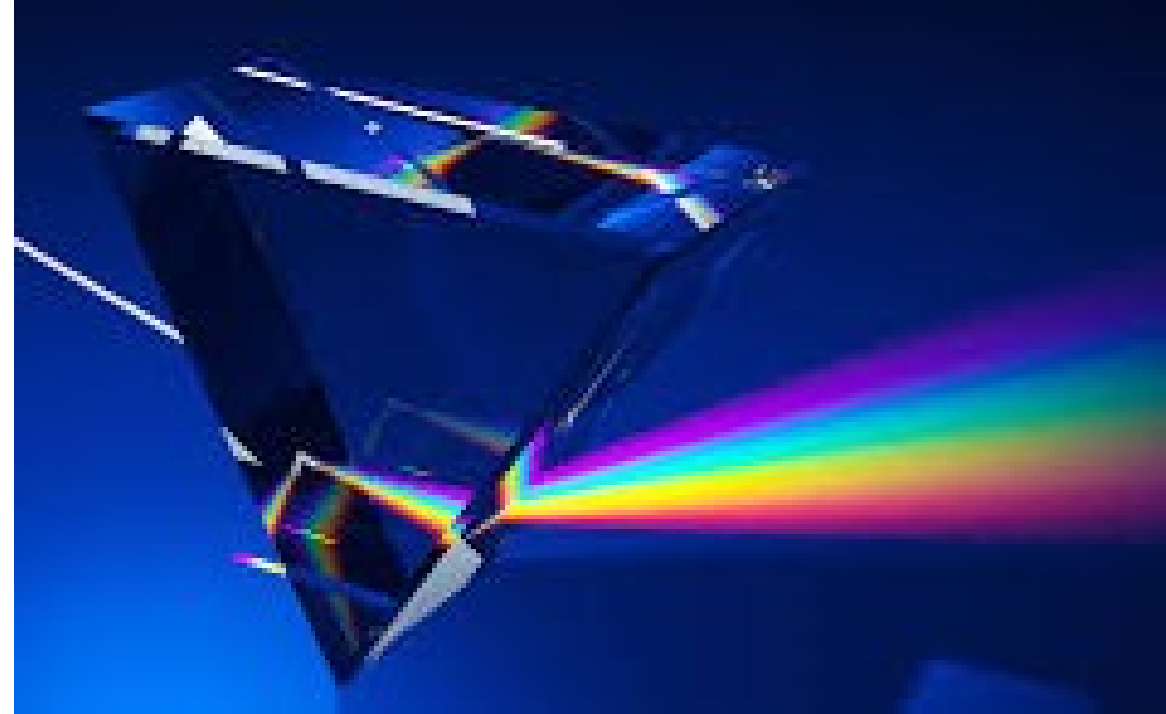


2026年度機器セミナー—分光分析の 基礎

2026 Instrumentation Seminar Basics of Spectrometric Analysis

統合生理学 大河内善史

Yoshifumi Okochi, Department of
Integrative Physiology

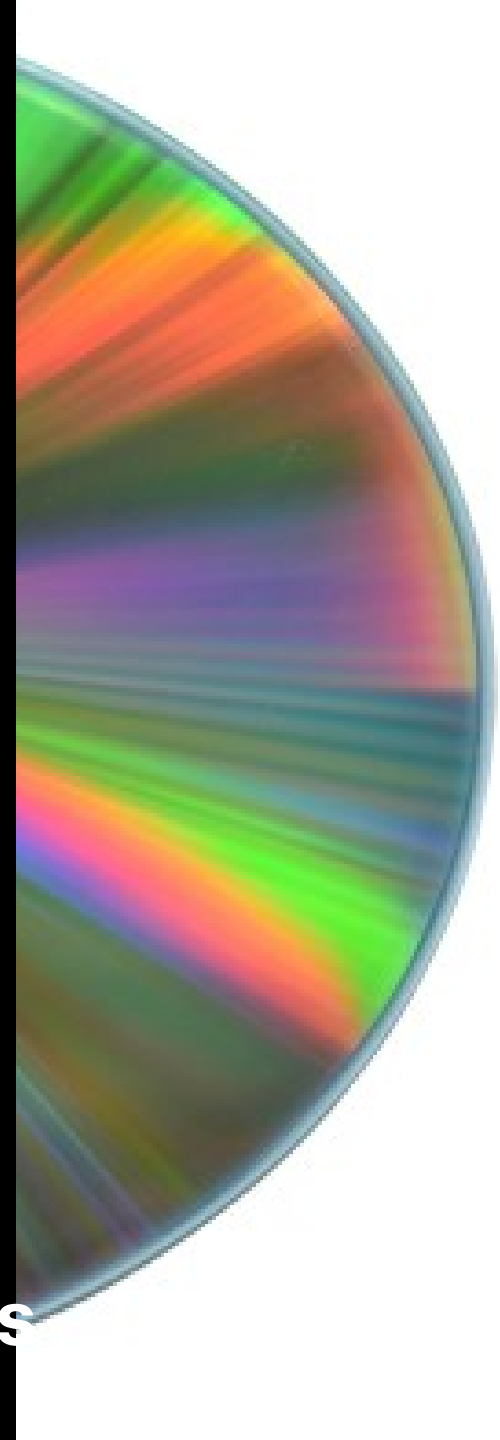


分光分析とは？

**What is
spectrometric
analysis?**

共同研が所有する機器と実践例の紹介

**Introduction to the instruments owned by the
Joint Research Center and practical examples**



分光分析装置（UV-Vis/NIR、FL他）

分光光度計（UV-Vis/NIR）



分光光度計基礎講座



アプリケーション

Much of the information in this seminar uses figures from Hitachi's website
本セミナーの情報は日立のサイトの図を多く用いています。

分光蛍光光度計（FL）



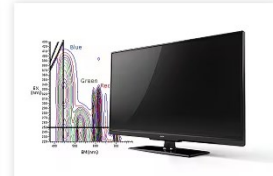
分光蛍光光度計基礎講座



アプリケーション



正確なスペクトルを測定するために



固体試料の蛍光スペクトルの測定例

マイクロプレート光度計



コロナ電気のご紹介



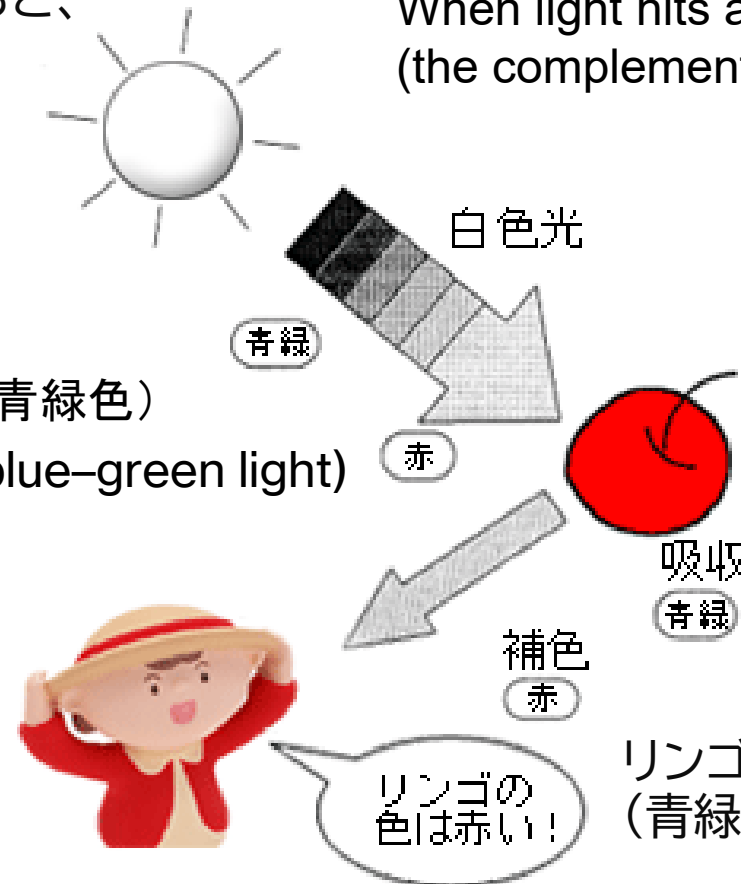
マイクロプレート光度計 標準ソフトウェア SF6

■ Why are apples red? (What is color?)

リンゴに光が当たると、

When light hits an apple, the colors that are *not* absorbed (the complementary colors) are what we see

リンゴが色を吸収する (青緑色)
Apples absorb certain colors (blue-green light)



リンゴが吸収しなかった色(補色)が見える
(青緑色の補色は赤色)

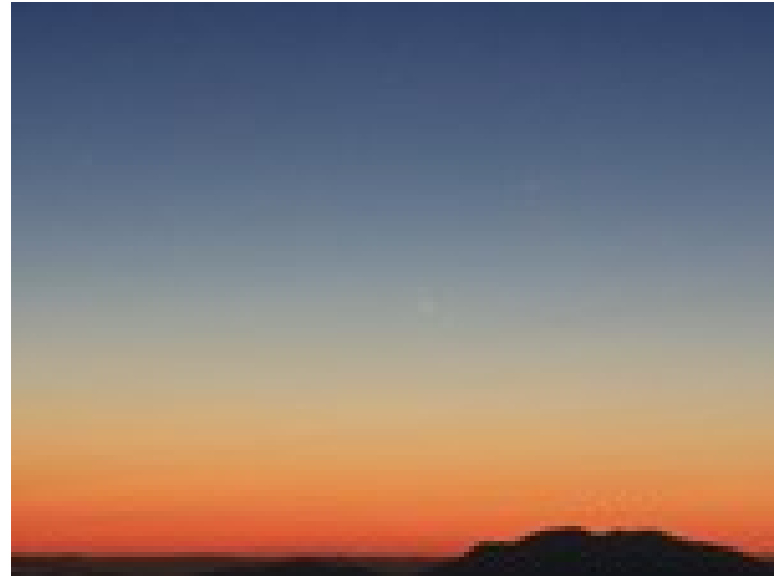
The complementary color of blue-green is red

■ 色:虹色、空の色

Colors: rainbow colors, the color of the sky

Quiz:

Which of these is related to spectroscopy?



https://ryutao.main.jp/photolibrary_free_sky_18.html

■ 色:虹色、空の色

Colors: rainbow colors, the color of the sky

プリズム Prism



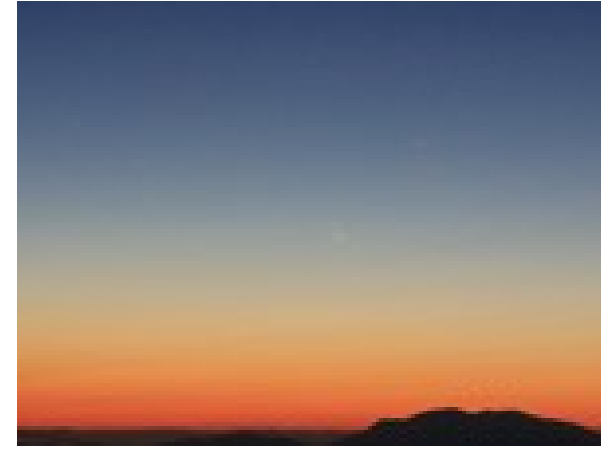
- ・屈折・分散(光が媒質を通過する)
Refraction & dispersion (light passing through a medium)
- ・波長が短い(青)ほど屈折角が大きい
Shorter wavelengths have larger refraction angles



グレーティング Diffraction grating

- ・分散(光の回折)
Dispersion through diffraction
- ・表面の凹凸が光を分光
Surface grooves separate light into wavelengths

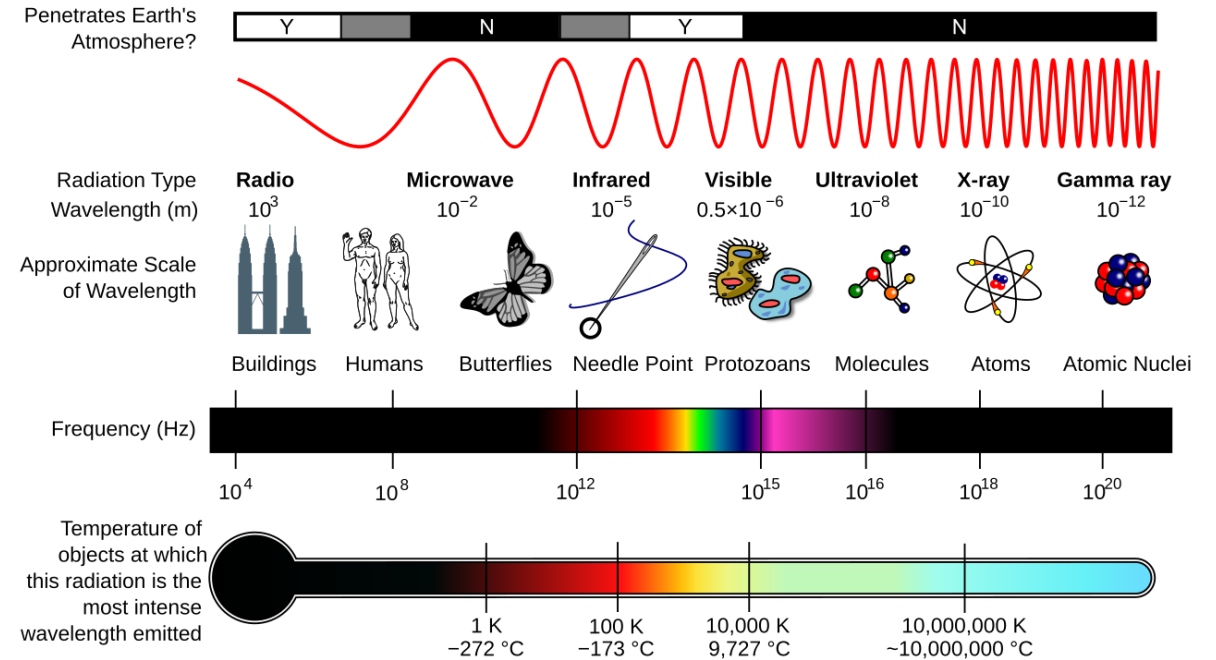
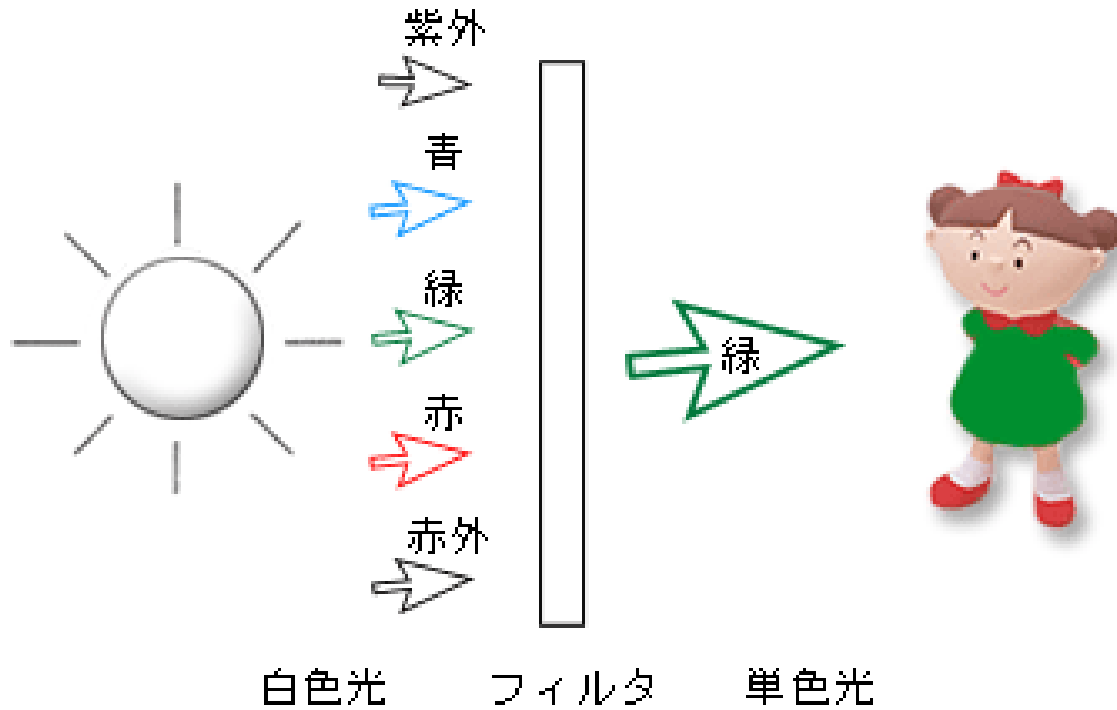
レイリー散乱 Rayleigh scattering



- ・散乱(光が小さな粒子に当たる)
Scattering (light hitting small particles)
- ・波長が短い(青)ほど散乱しやすい
Shorter wavelengths (blue) scatter more easily

https://ryutao.main.jp/photolibrary_free_sky_18.html

光とは What is light?



From Wikipedia

■ 分光とは **What is spectroscopy?**

光を分けること
Separating light into its components

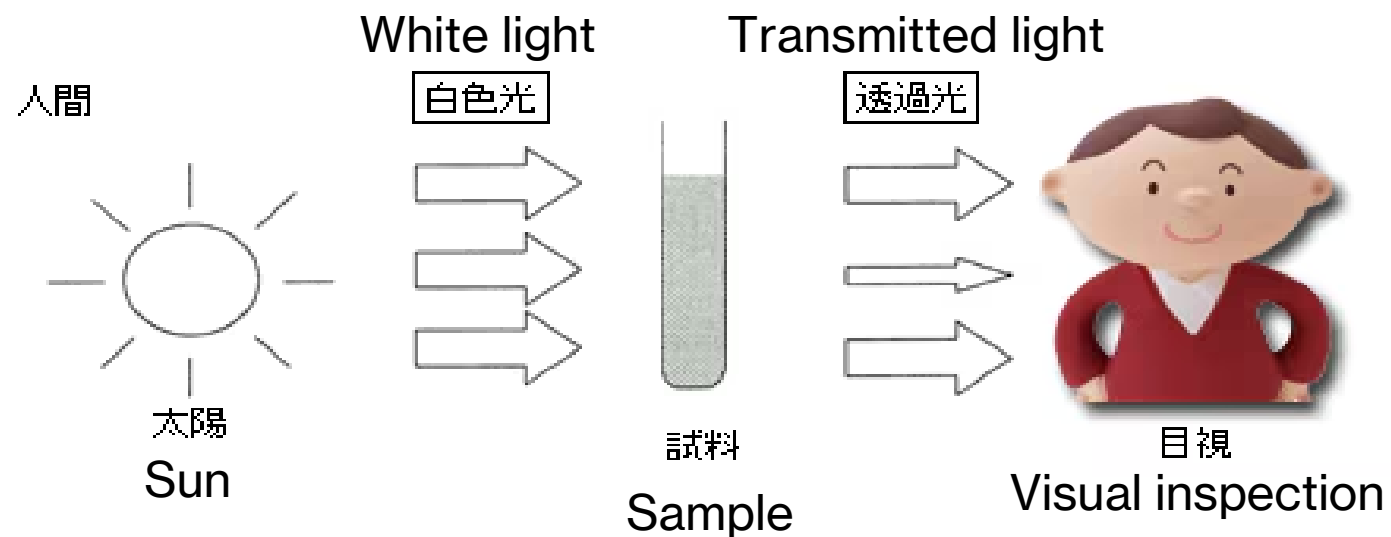


ニュートンの分光の実験は有名

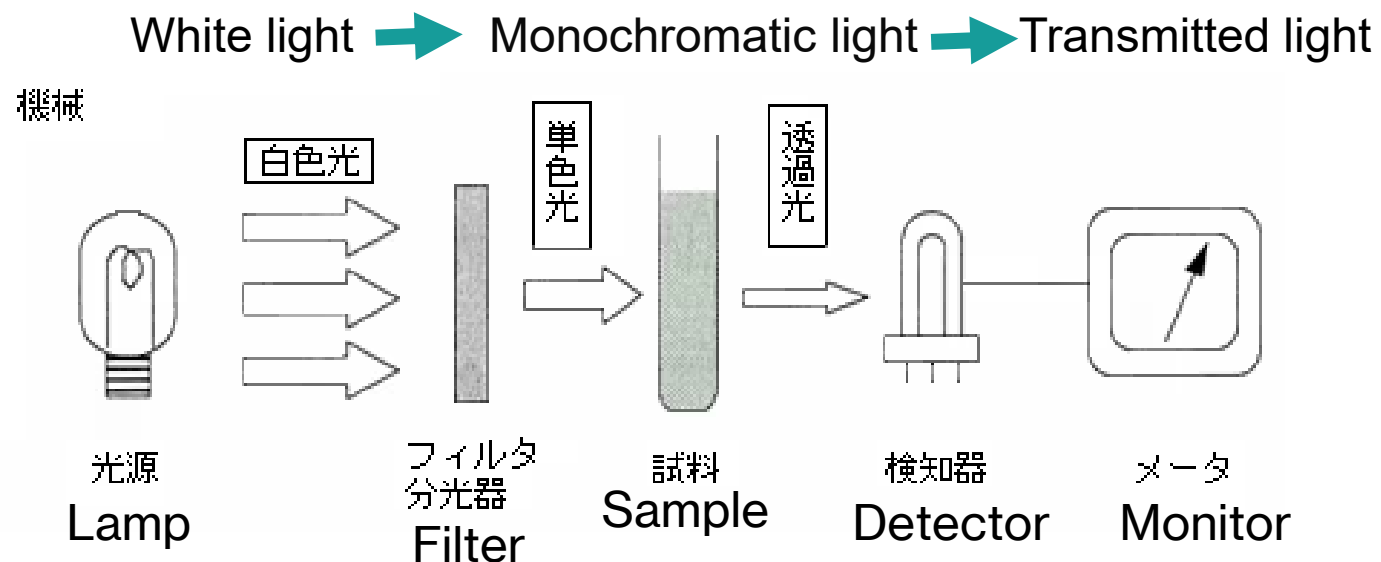
Newton's spectroscopic experiment is famous.

■ 分光分析とは What is spectrometric analysis?

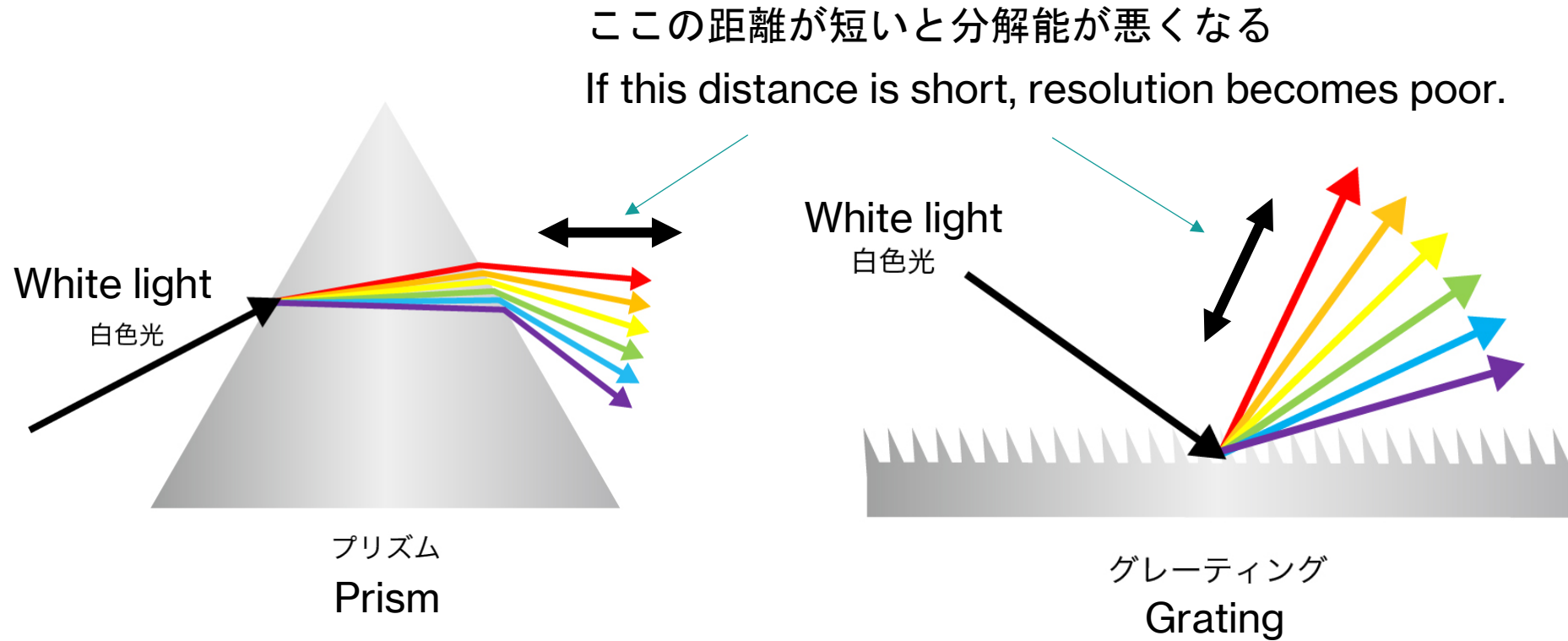
Human



Machine



■ プリズムとグレーティング Prism and Grating

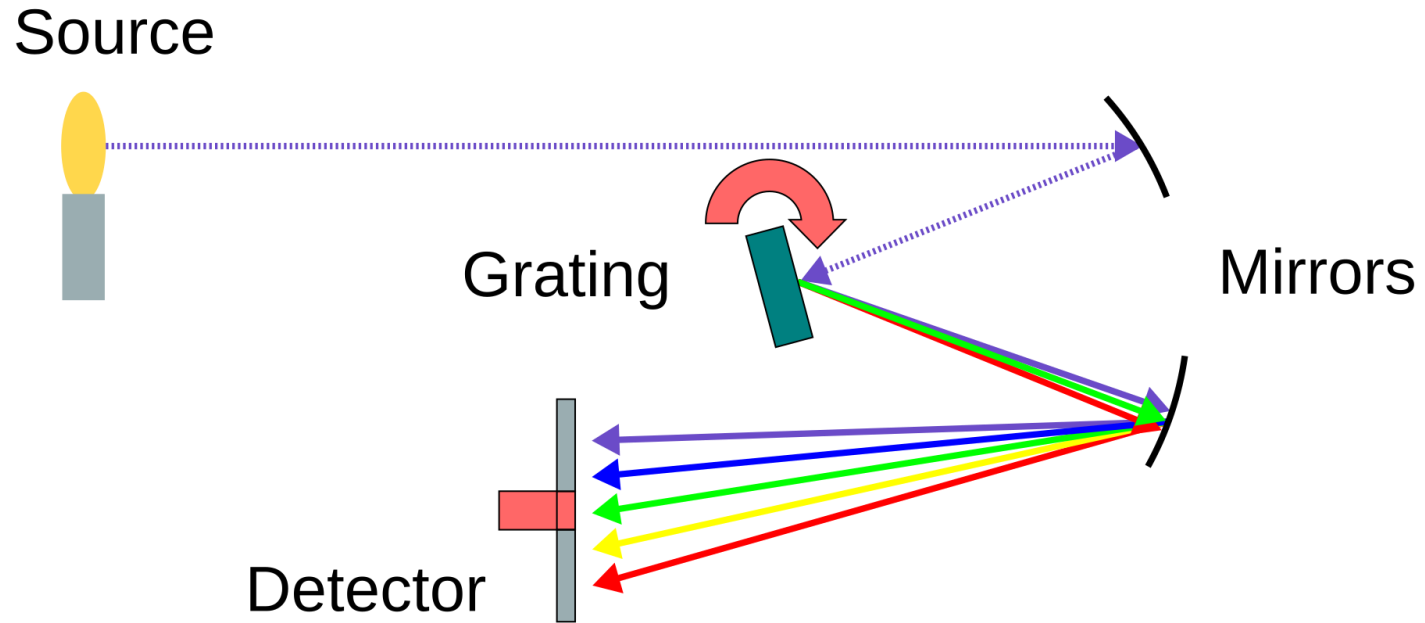


<https://www.hamamatsu.com/jp/ja/product/photometry-systems/spectrometer/what-is-spectrometer.html>

(Reference: Hamamatsu Photonics)

■ グレーティングによる分光の仕組み

Mechanism of Spectral Dispersion by a Diffraction Grating



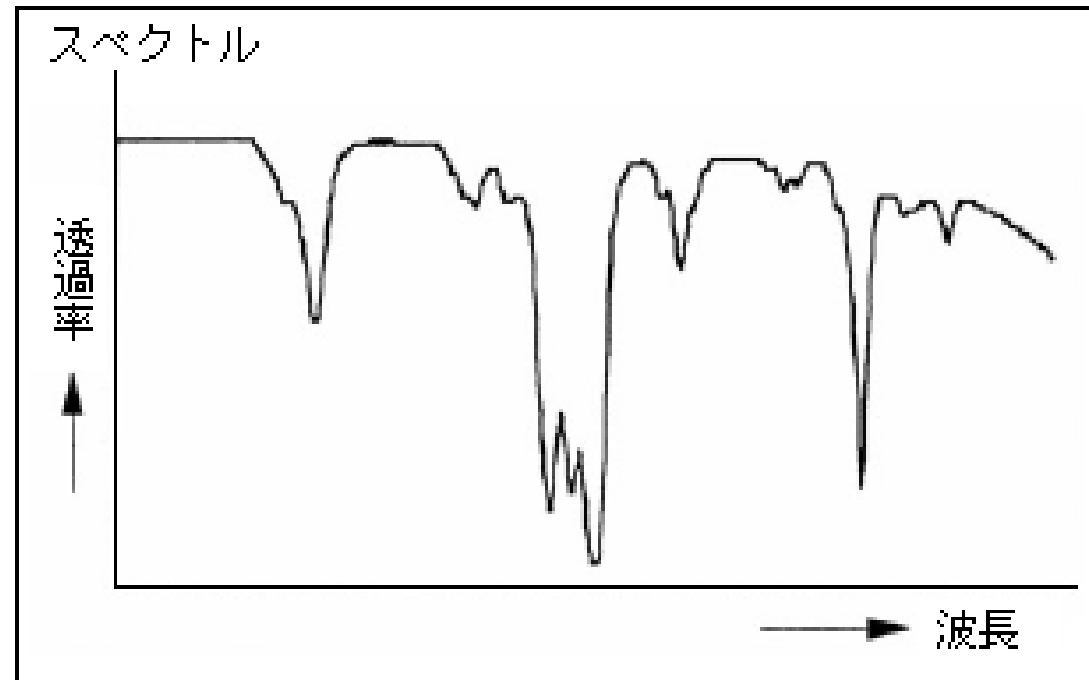
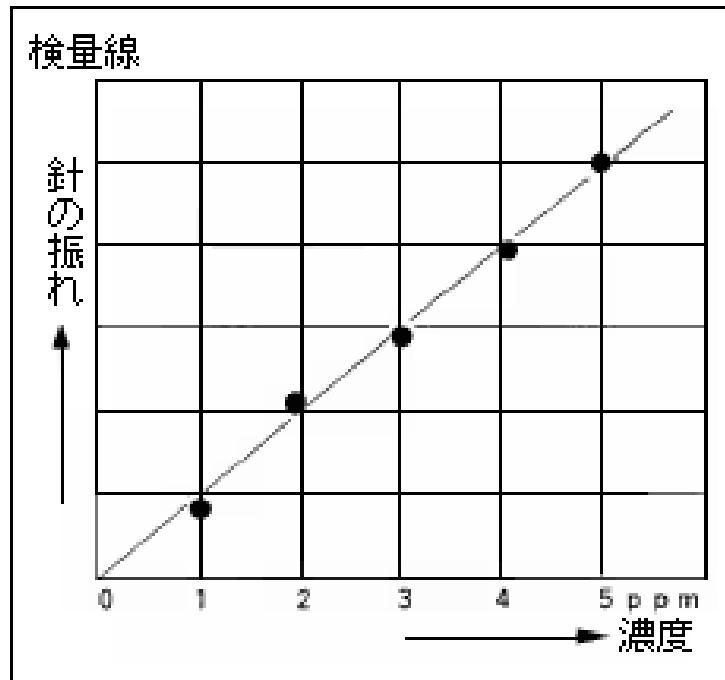
From Wikipedia

■ 定量分析 Quantitative Analysis

最もポピュラーな方法で、濃度がわからない試料を、あらかじめ濃度のわかっている溶液と比べて濃度を決定する方法

The most common method:

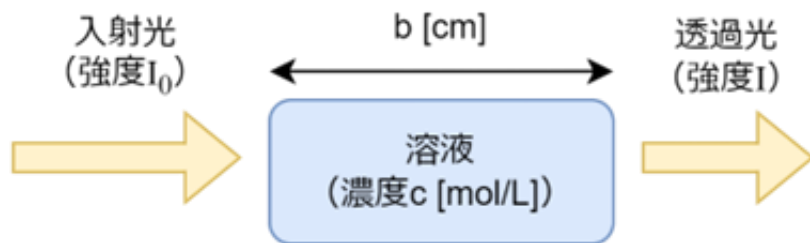
A sample with unknown concentration is compared with solutions of known concentration to determine its concentration.



■ Bouguer-Beerの法則:吸光度から濃度を求める基本の法則

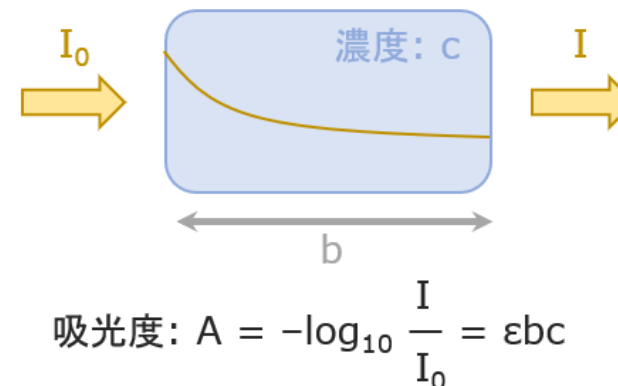
Bouguer-Lambert-Beer Law:

The fundamental law for determining concentration from absorbance.



Bouguer-Lambert-Beer's Law

ブーゲ-ランベルト-ベールの法則



%T:透過率 %T:Transmittance
Abs: Absorbance(吸光度)

光路長Optical path length: ℓ
濃度Concentration: c

モル吸光係数Molar absorptivity: ϵ 物質固有の定数
a constant specific to each substance

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon c \ell} \dots \dots \dots \text{Formula (1)}$$

$$\%T = T \times 100 \dots \dots \dots \text{Formula (2)}$$

$$\text{Abs} = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c \ell \dots \dots \dots \text{Formula (3)}$$

Conditions required for the law to hold:

- Monochromatic light
- No reflection at solution interfaces or cuvette surfaces; no stray light inside the instrument
- No fluorescence or scattering from solute, solvent molecules, or suspended particles
- Solute remains constant in solution regardless of concentration; no dissociation or association equilibria

この法則にしたがう条件

1. 単色光
2. 溶液界面、セル表面での反射、装置内での迷光がない
3. 溶質、溶媒分子、懸濁物からの蛍光や散乱がない
4. 溶質が溶媒中で濃度変化に関わらず一定であり、解離や会合の平衡移動がない

■ 透過率と吸光度の関係

Relationship between Transmittance and Absorbance

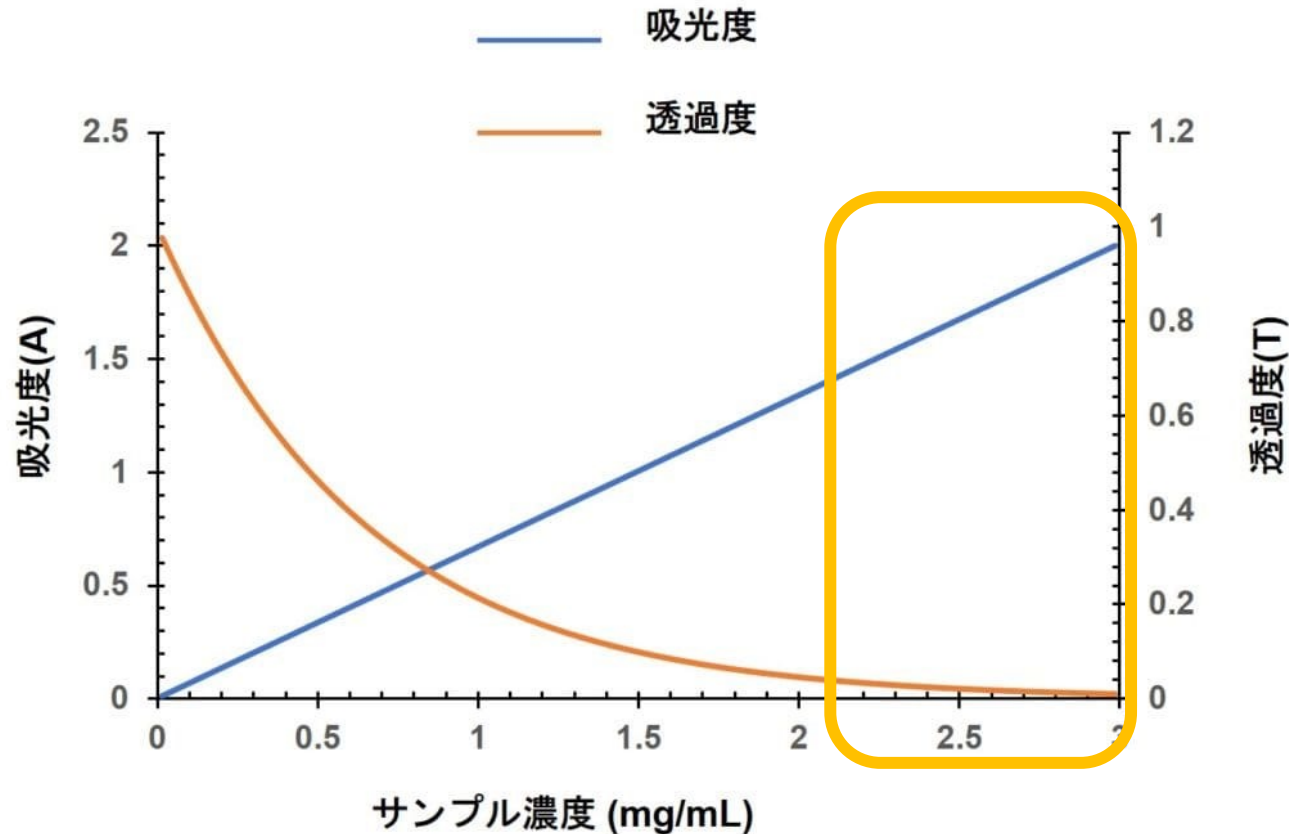


図 2 : 吸光度と透過度の関係

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon c l} \dots \dots \dots \text{Formula (1)}$$

$$\%T = T \times 100 \dots \dots \dots \text{Formula (2)}$$

$$\text{Abs} = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l \dots \dots \dots \text{Formula (3)}$$

サンプル濃度が高くなると透過率の変化率が低くなる。
つまり、正確性がなくなる。サンプルは適度に薄い方がいい。

As sample concentration increases, the rate of change in transmittance decreases.
→ **Accuracy decreases.**
→ **Samples should be appropriately diluted.**

■ 吸光と蛍光の測定の比較

Comparison of Absorbance and Fluorescence Measurements

クイズ:

低濃度のサンプルに対して有効な測定法は、吸光度
と蛍光のどちらでしょうか？

Quiz:

**For low-concentration samples, which method is more
effective – absorbance or fluorescence**

■ 吸光と蛍光の測定と比較

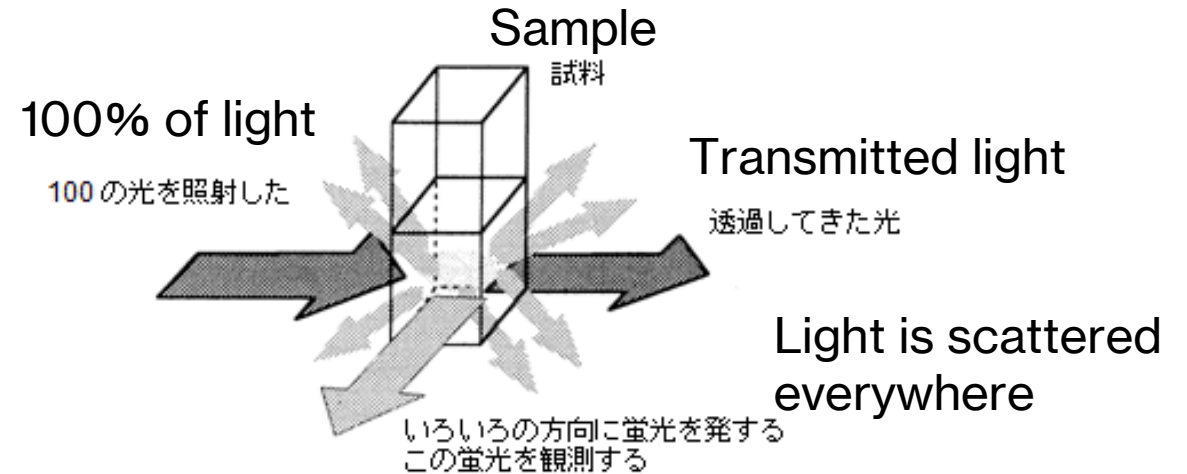
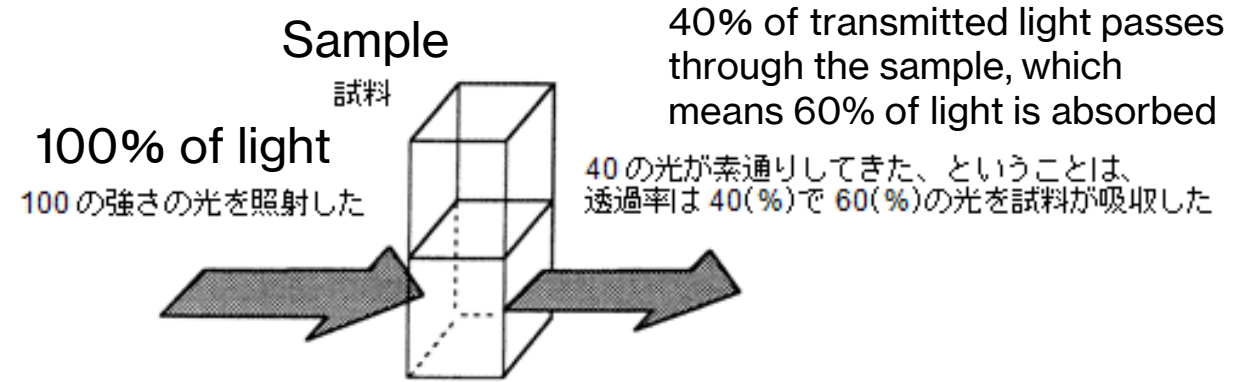
Comparison of Absorbance and Fluorescence Measurements

吸光光度法は、照射した光がどのくらい試料に吸収されているかを測定している

Absorbance spectrophotometry measures **how much of the incident light is absorbed** by the sample.

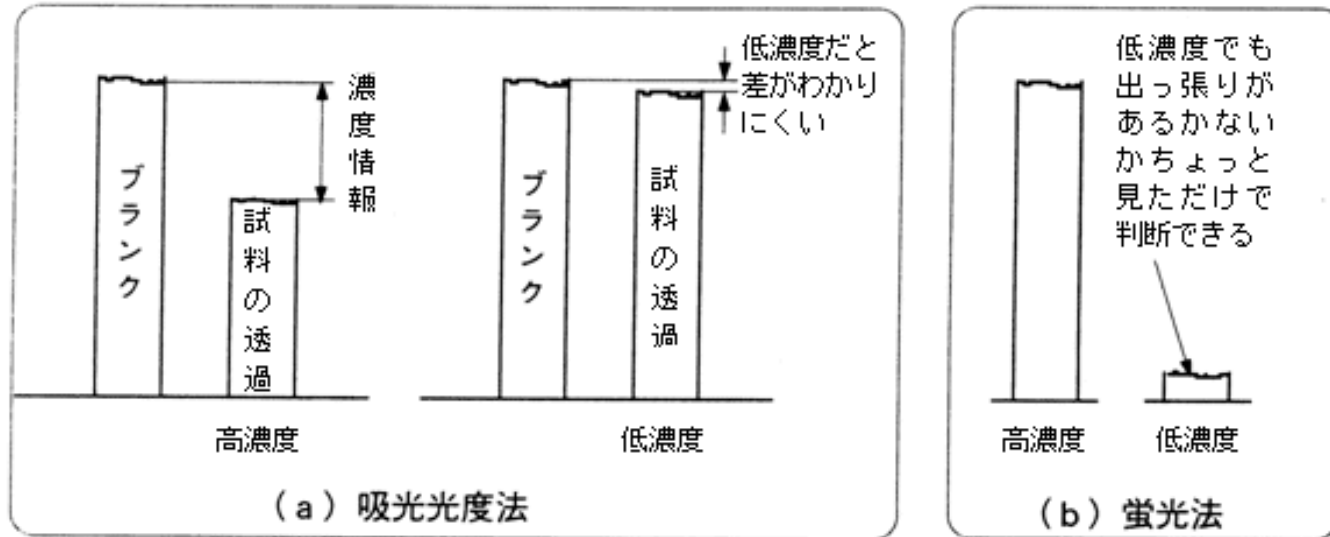
蛍光測定は、発光を観測している

Fluorescence measurement observes **emitted light**, which is different from the excitation light.



■ 吸光と蛍光の測定の比較

Comparison of Absorbance and Fluorescence Measurements



吸光度法、蛍光法の定量測定を比較すると、一般的に蛍光法の方が1/1000程度薄い試料まで定量することができる

When comparing quantitative measurements using absorbance and fluorescence:
Fluorescence can quantify samples **approximately 1/1000 the concentration** measurable by absorbance.

蛍光法は低濃度のサンプルの解析が可能

Fluorescence methods allow analysis of **very low-concentration samples**

蛍光法にも弱点がある

1. 世の中の物質は、実はいろいろ波長を変えて励起光を照射してみても、蛍光を発しない物質がほとんど
2. 吸光法での測定結果は万国共通の値。どのメーカーのどの装置で測定しても、原則的に同じ値が得られる。しかし、蛍光法では、蛍光強度の値は相対的強度。単位もない。検出器の固体差などによって、同じメーカーの同じ型の装置で測定しても、結果の数値が違ってしまふことがしばしばある。同じ試料を測定しても、その発光強度は、100であったり50であったりまちまち(そのスペクトルの形は変わらないが)。



Weaknesses of Fluorescence Methods

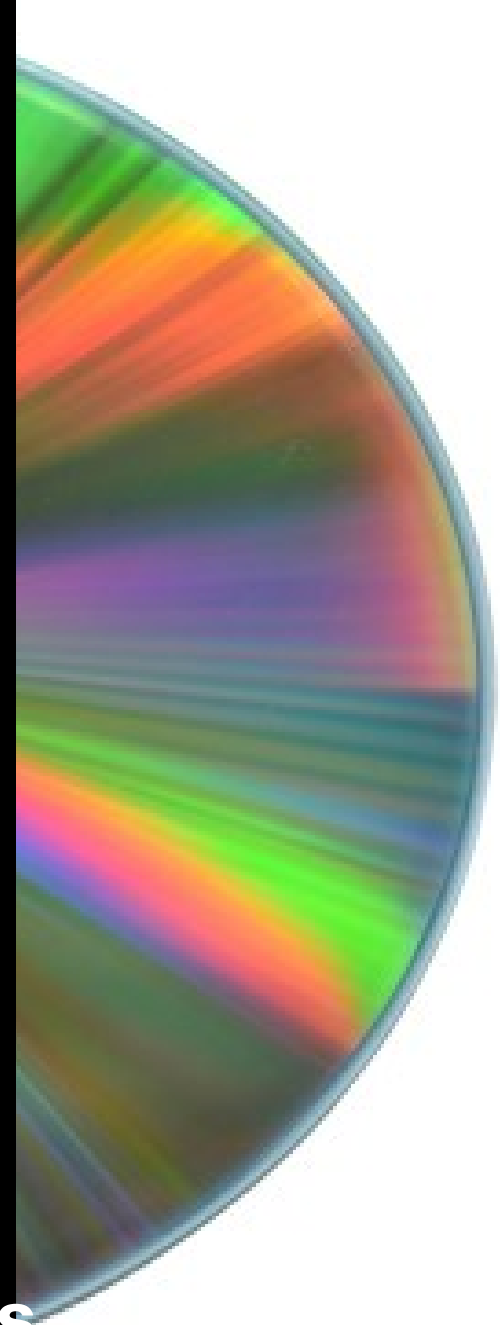
1. Most substances do not emit fluorescence, even when excited at various wavelengths.
2.
 - ❑ Absorbance measurements are universal – values are consistent across instruments and manufacturers.
 - ❑ Fluorescence intensity is relative, with no absolute units.
 - ❑ Detector variability means that even identical models may give different numerical values.
 - ❑ The spectral *shape* remains the same, but intensity may vary (e.g., 100 vs. 50).

分光分析とは？

**What is
spectrometric
analysis?**

共同研が所有する機器と実践例の紹介

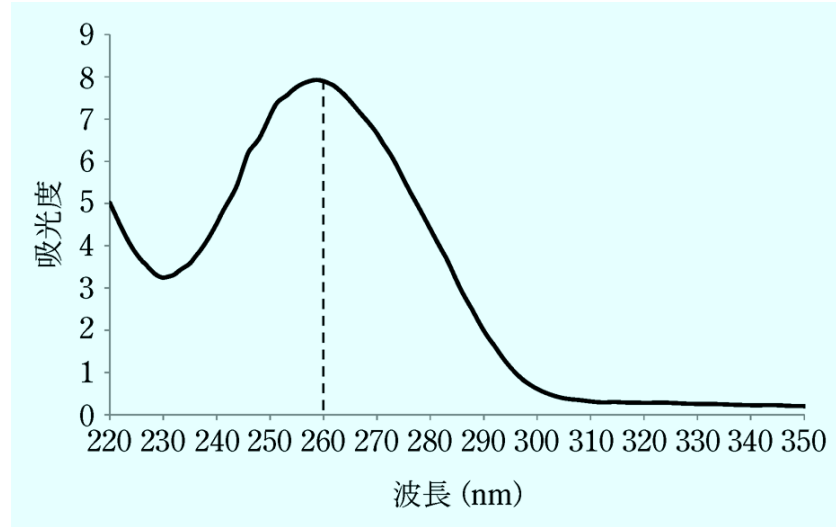
**Introduction to the instruments owned by the
Joint Research Center and practical examples**



■ 吸光度計を用いた核酸の測定

Absorption Spectrum of Nucleic Acids in the UV Region

紫外領域における核酸の吸収スペクトル



柴山祥枝、日本分析化学会 分析2018
(Shibayama, Analytical Chemistry Society of Japan, 2018)

濃度測定に用いる核酸の長さは様々なことから、吸光係数は一定でない。検量線による定量はほぼ不可能。

吸光係数 a の代わりに260 nmにおける吸光度 A_{260} が1.0となる核酸濃度が用いられている

A_{260}/A_{280} ってなに？
核酸の純度を求める
 A_{280} はタンパク質を想定

What is A260/A280?

- Used to assess nucleic acid purity
- A280 reflects protein contamination

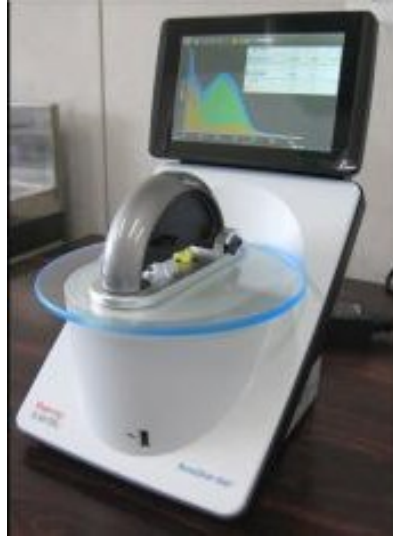
*核酸:DNAとRNA
DNAの濃度を知りたい時に、サンプル中にRNAが存在すると、 A_{260}/A_{280} の値は高くなるので、注意が必要

*If RNA is present in a DNA sample, A_{260}/A_{280} increases → caution required

- Because nucleic acids vary in length, their molar absorptivity is not constant.
→ Calibration-curve-based quantification is nearly impossible.
 - Instead of ϵ , the concentration at which **A260 = 1.0** is used.
- Measuring nucleic acids using a spectrophotometer**

■ 超微量紫外可視分光光度計 Ultra-Micro UV-Visible Spectrophotometer

サンプル量: 1 μL
 キュベットも使える
 Sample volume: 1 μL
 Cuvettes can also be used



	Left equipment	Right equipment
測定波長範囲 Measurement wavelength range	190-840nm	190~850 nm
吸光度測定範囲 Absorbance range	0~300 Abs	0~550 Abs
波長精度 Wavelength accuracy	$\pm 1\text{nm}$?
吸光度測定範囲 (キュベット部) Absorbance range (cuvette)	0~1.5 Abs	0~1.5 Abs
検出範囲 Detection range	2.0~15,000 ng/ μL (dsDNA)	2.0~27,500 ng/ μL (dsDNA)
キュベット部温度調整 Cuvette temperature control	37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$	37 $^{\circ}\text{C}$

■ フルオロメーター Fluorometer :COMIT

サンプル量: 1 μ L

Sample volume: **1 μ L**

単一サンプル中のDNA、RNA、またはタンパク質の濃度を測定
Measures DNA, RNA, or protein concentration in a single sample



光源 Light source	Blue LED (peak ~470 nm) Red LED (peak ~635 nm)
励起フィルター Excitation filter	Blue LED (430–495 nm) Red LED (600–645 nm)
蛍光フィルター Fluorescence filter	Green (510–580 nm) Red (665–720 nm)

測定可能範囲 : 300~1,000 nm
Measurable wavelength range: 300–1,000 nm

■ 分光計 Spectrophotometers : キュベットタイプ Cuvette Type

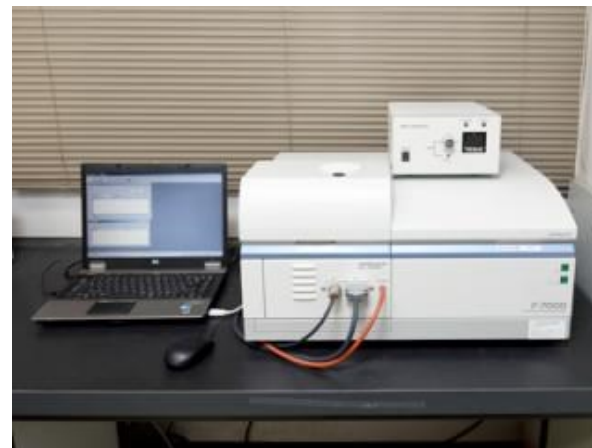
紫外可視分光光度計
UV-Visible spectrophotometer



- 定量演算
Quantitative calculations
- 波長スキャン
Wavelength scanning
- 時間変化測定
Time-course measurements
- 波長域
UV-Vis absorbance:
190nm – 1100 nm

蛍光分光光度計

Fluorescence spectrophotometer



- 波長スキャン
Wavelength scanning
- 波長域
Fluorescence spectra:
200–750 nm

パルスオキシメーター
Also includes: **Pulse oximeter**

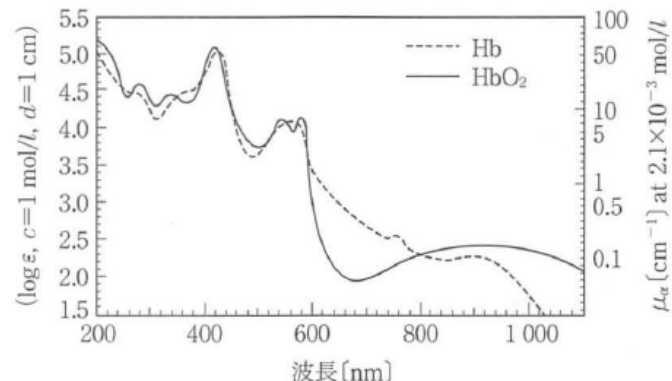
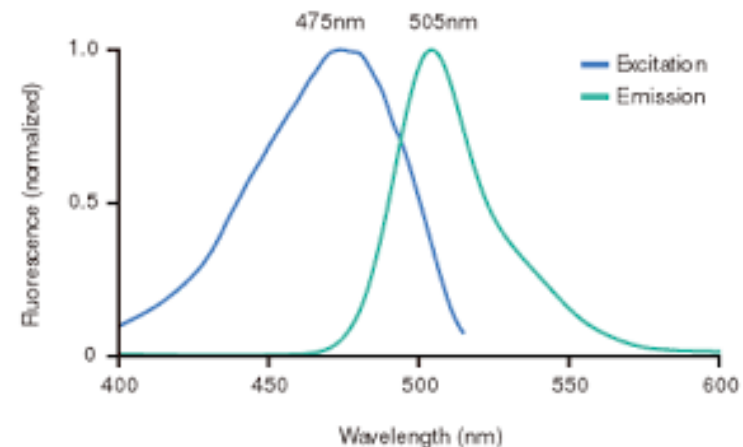


図 39・2 ヘモグロビン(酸素化・脱酸素化)の吸収スペクトル³⁾



■ 分光計Spectrophotometers: Multi-well Type

Absorbance, fluorescence, and luminescence plate reader



New equipment

Absorbance and fluorescence plate reader



Old equipment :
温度の変更に時間がかかる
Controlling temperature is very slow

■ 分光計 Spectrophotometer: Multi-well Type 1



【吸光】

波長範囲（モノクロメーター）：230-1000nm

【蛍光】（ボトムリード可）

波長範囲（モノクロメーター）：270-850nm、
フィルター(時間分解蛍光用 Ex)：350nm(BW60nm)
フィルター(時間分解蛍光用 Em)：490nm(BW10nm)、
616nm(BW10nm)

★黒プレート推奨。

【発光】（ボトムリード可）

波長範囲：300-850nm（基本的にはAll wavelengthsで使用してください）
フィルター（NanoBRET用）：410nm(BW 80nm)、
610nm(LP)

★白プレート推奨。ボトムリードで測定する場合は、ホワイトプレートのボトムクリアを使用してください。クリアプレート使用不可。

【その他】

- ・ 温度制御機能（室温+5°C～66°C）
- ・ 攪拌機能あり（リニア、オービタル（環状）、8の字状）
- ・ 解析ソフトウェア付（検量線作成機能あり）
- ・ 対応プレート：6well～384wellプレート

[Absorbance]

•Wavelength range (monochromator): 230–1000 nm

[Fluorescence] (bottom-reading available)

- Wavelength range (monochromator): 270–850 nm
- Time-resolved fluorescence filters:
 - Ex: 350 nm (BW 60 nm)
 - Em: 490 nm (BW 10 nm), 616 nm (BW 10 nm)
- Black plates recommended

[Luminescence] (bottom-reading available)

- Wavelength range: 300–850 nm
- Filters (NanoBRET): 410 nm (BW 80 nm), 610 nm (LP)
- White plates recommended
- For bottom-reading: use white plates with clear bottom.
Clear plates cannot be used

[Other features]

- Temperature control: Room temp +5°C to 66°C
- Shaking: linear, orbital, figure-8
- Analysis software included (calibration curve creation)
- Compatible plates: 6–384 wells

■ 分光計 Spectrophotometer: Multi-well Type 2



紫外・可視の吸光測定・蛍光測定が可能

①号機はボトムリードに対応

試料室恒温機能（20 - 45°C、昇温のみ）

設定波長範囲：200nm - 900nm

スペクトル測光、多点測光

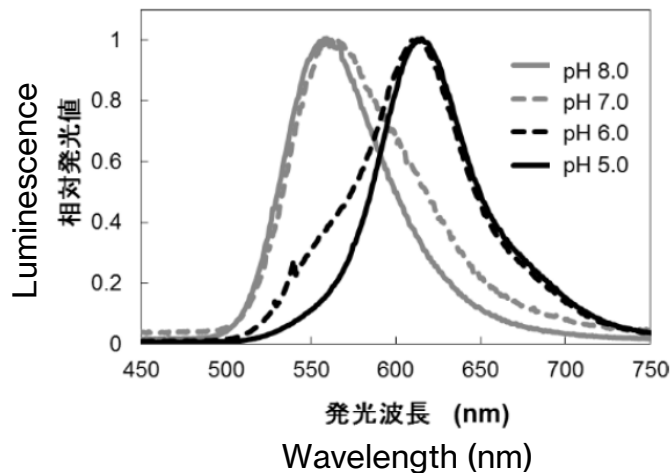
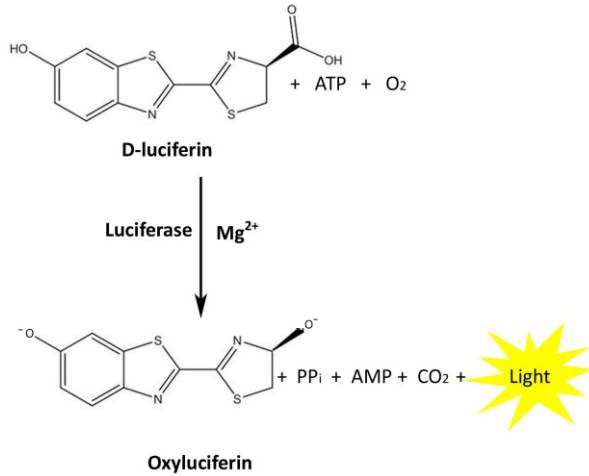
利用可能プレート：6,12,24,48,96,384 well

蛍光測定には黒プレートを推奨

Microplate Reader (UV-Vis & Fluorescence)

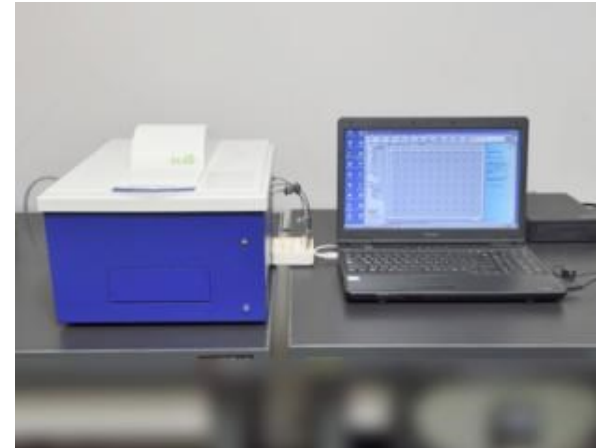
- Unit 1 supports **bottom-reading**
- Temperature control: **20–45°C (heating only)**
- Wavelength setting range: **200–900 nm**
- Spectral scanning, multi-point measurements
- Compatible plates: **6, 12, 24, 48, 96, 384 wells**
- Black plates recommended for fluorescence**

■ 分光計:マルチウェルタイプ 発光マイクロプレートリーダー



Spectra of firefly luciferin

近江谷克裕 化学と教育 64 卷 8 号 (2016 年)



感度Sensitivity	< 1.8 amol / ATP 9 fM
測定波長 Measurement wavelength	340 nm – 630 nm
ダイナミックレンジ Dynamic range	6 桁 > 6 orders of magnitude
インジェクター Injectors	10 – 100 μl (1 μl ステップ) Up to 3 (10–100 μL, 1 μL steps)
測定プレート Compatible plates	96well 384well (option)
温度コントロール Temperature control	なし none

実践例: その1 吸光度測定 ～細胞内の活性酸素(ROS)変動の測定

Practical Example 1: Absorbance Measurement

Monitoring intracellular reactive oxygen species (ROS)

Instrument: SH-9000Lab



- ✓ マウス骨髄から分離された好中球:
ROSを多量に産生する細胞として有名
Neutrophils isolated from mouse bone marrow
Known for producing large amounts of ROS
- ✓ ROSをモニターする試薬:還元型シトクロムC
酸化されると吸収が変わる(色が変わる)
ROS indicator: **Reduced cytochrome c**
Oxidation changes its absorbance (color change)
- ✓ 550 nm付近の吸収を測定すると、ROSの増加をモニターできる
Measuring absorbance around **550 nm** allows monitoring of ROS levels

■ シトクロムCの酸化還元反応 Cytochrome c Redox Reaction

原理：

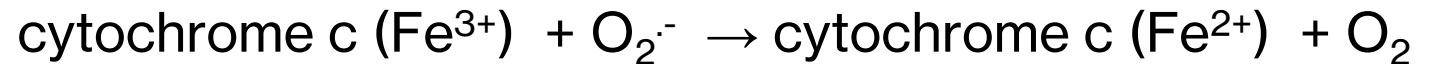
シトクロムCのヘム鉄の酸化還元反応を利用している。

酸化型の3価 Fe^{3+} が、スーパーオキシドアニオンによって還元型の Fe^{2+} に変わる反応

Principle:

- Uses the redox reaction of the heme iron in cytochrome c
- Oxidized Fe^{3+} is reduced to Fe^{2+} by superoxide anion

Reaction:

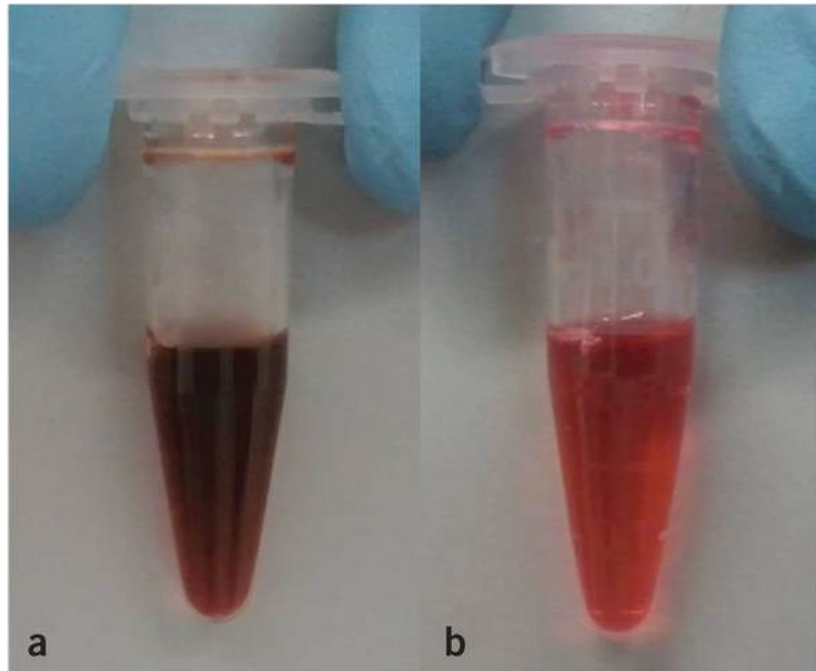


シトクロムCの色が変わる

The color of cytochrome c changes

550nmの吸収波長を見ることで、還元型シトクロムCの増減を調べることができる

Measuring absorbance at **550 nm** reveals changes in reduced cytochrome c

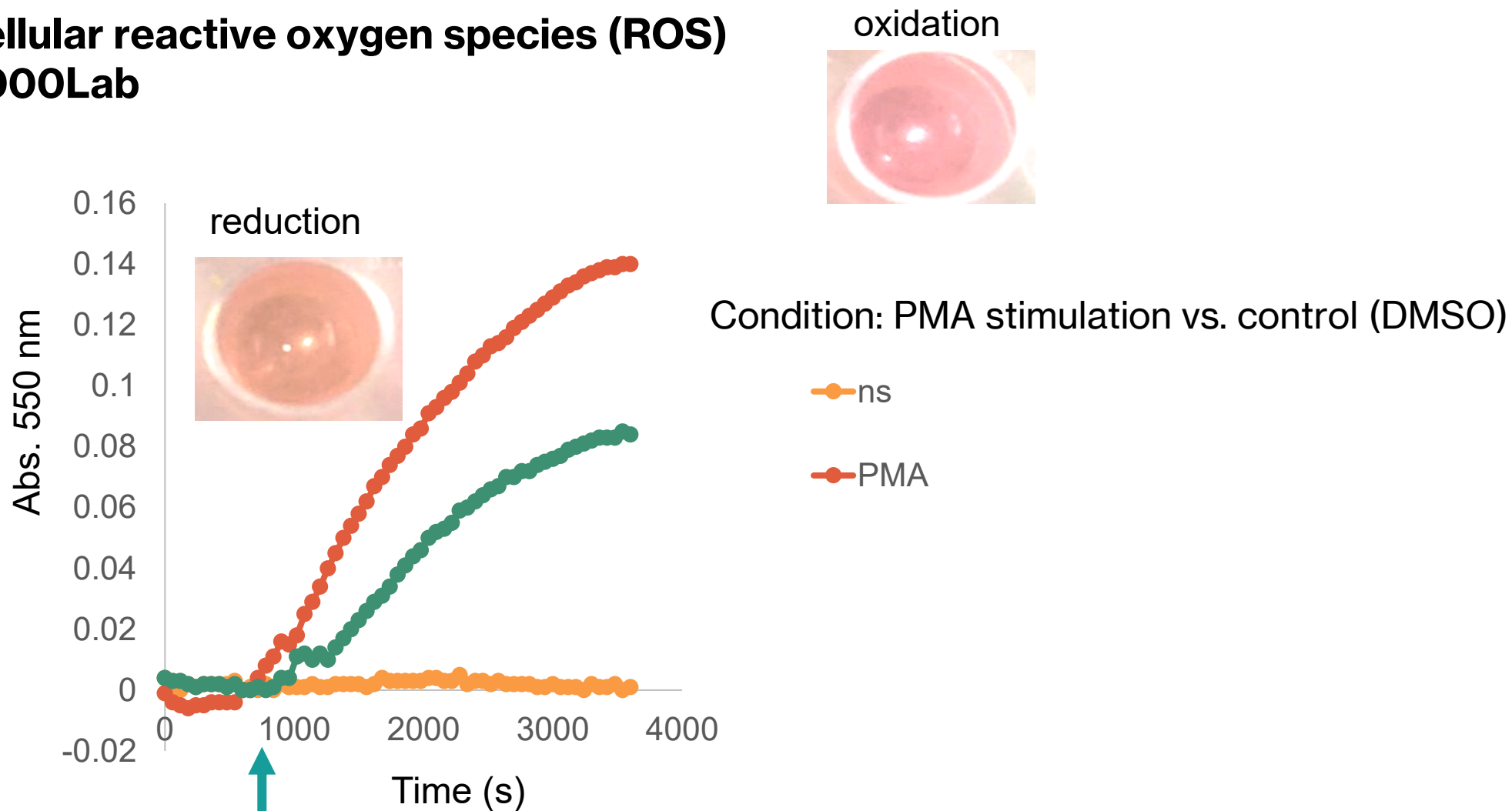


Oxidized

Reduced

実践例: その1 吸光度測定 ~細胞内の活性酸素(ROS)変動の測定

Practical Example 1: Absorbance Measurement Monitoring intracellular reactive oxygen species (ROS) Instrument: SH-9000Lab



ROS産生を刺激する試薬(PMA)添加
stimulation with PMA, activator for ROS generation

実践例: その2 蛍光測定法 ~細胞内カルシウム変動の測定~

Practical Example 2: Fluorescence Measurement Monitoring intracellular calcium levels



Fluo3 5uM

