

島津分光蛍光光度計RF-5000形による 補正励起および補正蛍光スペクトルの測定

Measurement of Corrected Excitation and Emission

Spectra by Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-5000

蛍光光度法は感度が著しく高いことや選択性がすぐれているなどの特長があり、広い分野で活用されています。ところで、通常の分光蛍光光度計は励起および蛍光スペクトルを測定するために、励起用分光器と蛍光用分光器を有していますが、このような装置によって測定される励起および蛍光スペクトルは、装置の分光特性によって左右される見かけのスペクトルで、未補正の励起および蛍光スペクトルです。定量分析の場合にはスペクトルの全体の形状に依存しないのでこのような状態で問題はありませんが、真のスペクトルの形状やピークの位置を得るためには、装置の分光特性を補正しなければなりません。このような補正処

理を施して得られるスペクトルは補正励起および補正蛍光スペクトルと呼ばれ、この場合装置間のスペクトルの比較が容易になるばかりでなく、さらに多くの知見が得られます。補正励起スペクトルは吸光係数に比例するので、吸収スペクトルでは測定できないような非常に低濃度の蛍光物質の吸収スペクトルが得られ、また、補正蛍光スペクトルから蛍光の発光機構についてより多くの知見を与える量子収率の測定が可能となり、蛍光光度法の応用性が広がります。

ここでは、島津分光蛍光光度計RF-5000を使用して測定した補正励起および補正蛍光スペクトルの測定例を紹介します。

励起スペクトルの補正

Correction of Excitation Spectrum

励起スペクトルを補正する場合には、励起光強度の波長特性を補正しなければなりません。この補正を行うために励起光の光量子数を測定できる光量子計を使用します。光量子計としては220nmから600nmで量子収率が一定である3g/LのローダミンBのエチレングリコール溶液を使用します。高濃度のローダミンB溶液は励起光をすべて吸収し、入射した光の単位時間当りの光量子数に比例した強さの蛍光を発します。

補正励起スペクトルの測定手順は、ローダミンBのエチレングリコール溶液を固体試料ホルダにセットし、蛍光波長を630nmに固定してFig.1に示すような励起スペクトルを測定します。同時にこの励起スペクトルをメモリファイルに記憶します。つぎに試料の未補正励起スペクトルを測定し、メモリファイルに記憶します。補正励起スペクトルは、蛍光の出力を励起波長に対してプロットした未補正励起スペクトルを、そのときの励起光の光量子数に比例する値で割ったものですから（試料の未補正励起スペクトル）/（ローダミンBの励起スペ

クトル）の演算処理を行うと補正励起スペクトルが得られます。

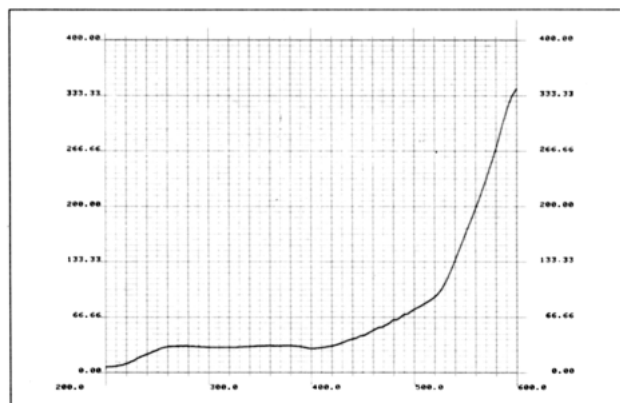


Fig. 1 ローダミンBの励起スペクトル
Excitation Spectrum of Rhodamine B

■ Analytical Conditions

Emission Wavelength : 630nm

Slit Ex : 5 nm

Em : 20nm

蛍光スペクトルの補正

Correction of Emission Spectrum

蛍光スペクトルを補正する場合には、蛍光用分光器と検出器の分光特性を補正しなければなりません。この補正を行う方法として光量子計を使用する方法や標準光源を使用する方法などがありますが、島津分光蛍光光度計RF-5000の場合には、光量子計を使用する方法で行います。

補正蛍光スペクトルの測定手順は、ローダミンBのエチレングリコール溶液を固体試料ホルダにセッ

トして励起スペクトルを測定し、メモリファイルに記憶します。この操作により励起光の分光特性を求めます。つぎに、分光反射特性がほぼ平坦と考えられる硫酸バリウムの粉末をセットし、シンクロナススキャン機構を利用して、励起用分光器と蛍光用分光器を同時に走査し反射スペクトルを求めます。

（次ページにつづく）

この反射スペクトルは励起光の分光特性および蛍光用分光器と検出器の分光特性を含んでいますので(硫酸バリウムの反射スペクトル)/(ローダミンBの励起スペクトル)の演算処理を行い、蛍光用分光器と検出器の分光特性を求めます。これはFig.2に示すような曲線で、この曲線を蛍光スペクトル補正関数といいます。補正蛍光スペクトルはこの蛍光スペクトル補正関数を利用して(未補正蛍光スペクトル)/(蛍光スペクトル補正関数)の演算処理を行うことにより求められます。

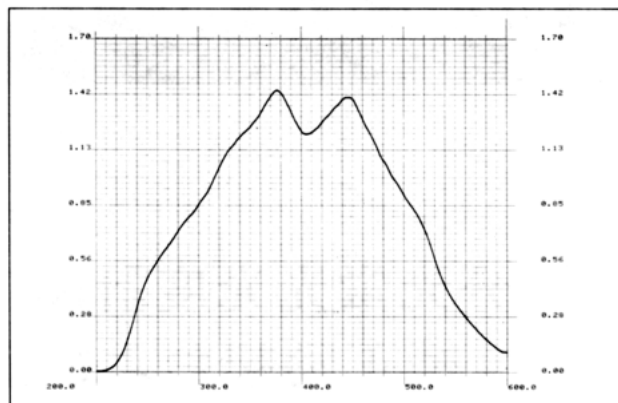


Fig.2 蛍光スペクトル補正関数
Relative Spectral Characteristic Curves
for The Correction of Emission Spectrum

ピレンの補正励起スペクトル Corrected Excitation Spectrum of Pyrene

Fig.3の実線はピレンの補正励起スペクトル、一点鎖線は未補正励起スペクトルです。また、Fig.4はピレンの吸収スペクトルです。Fig.3とFig.4のA, B, Cの3つのピークの比をとると、補正励起スペクトルでは1.00 : 0.98 : 1.47, 未補正

励起スペクトルでは1.00 : 0.74 : 0.44, 吸収スペクトルでは1.00 : 0.91 : 1.46となり、補正励起スペクトルの3つのピークの比は吸収スペクトルのそれと良く一致します。

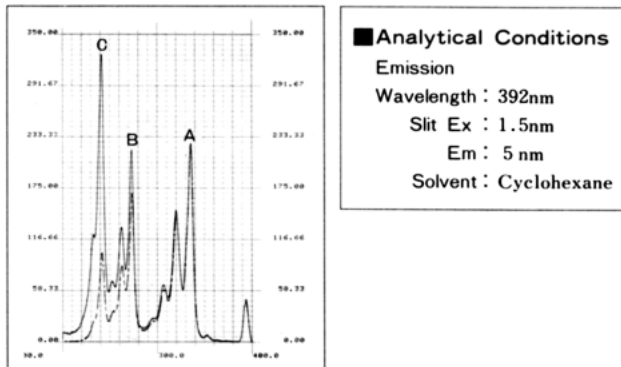


Fig.3 ピレンの補正および未補正励起スペクトル
Corrected and Uncorrected Excitation Spectrum of Pyrene

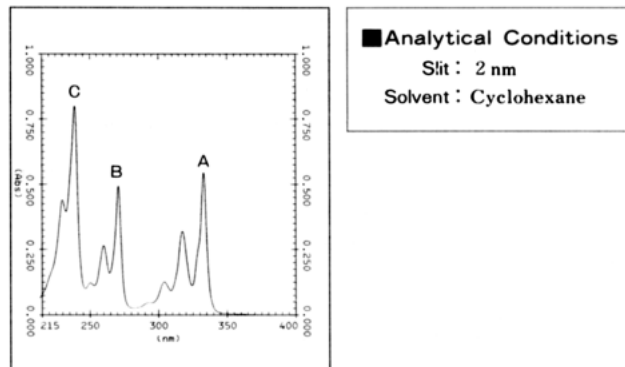


Fig.4 ピレンの吸収スペクトル
Absorption Spectrum of Pyrene

硫酸キニーネおよびアントラセンの補正蛍光スペクトル Corrected Emission Spectra of Quine Sulfate and Anthracene

Fig.5の実線は硫酸キニーネの補正蛍光スペクトル、一点鎖線は未補正蛍光スペクトルです。補正蛍光スペクトルは未補正蛍光スペクトルに比べて全体的に長波長側にシフトし、スペクトルバンド幅が広がります。

また、Fig.6の実線はアントラセンの補正蛍光スペクトル、一点鎖線は未補正蛍光スペクトルです。Fig.2の蛍光スペクトル補正関数から予想されるように、この波長域では補正蛍光スペクトルの長波長側のピーク強度が強くなります。

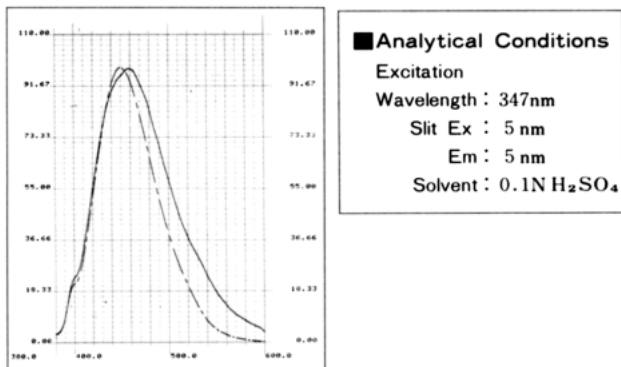


Fig.5 硫酸キニーネの補正および未補正蛍光スペクトル
Corrected and Uncorrected Emission Spectra of Quine Sulfate

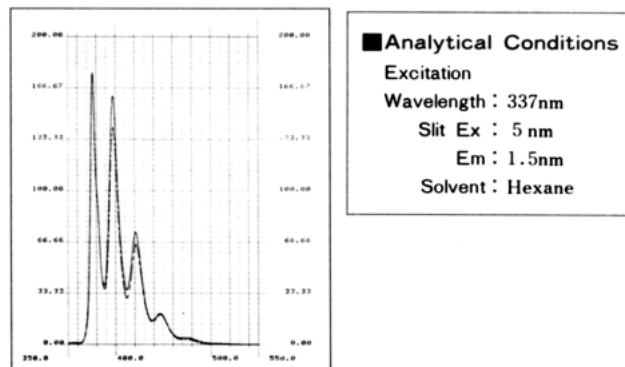


Fig.6 アントラセンの補正および未補正蛍光スペクトル
Corrected and Uncorrected Emission Spectra of Anthracene