

Application News

No. A496

光吸収分析
Spectrophotometric Analysis

溶液試料の蛍光量子効率測定

Measurement of Fluorescence Quantum Efficiency for Liquid Solution

蛍光物質はその物質固有の波長の光を吸収し、それよりも長い波長の光を蛍光として放出します。蛍光物質が吸収した光子数と蛍光として放出した光子数の比は、蛍光量子収率あるいは蛍光量子効率と呼ばれ、蛍光物質の蛍光強度に関連付けられます。

この比を求める方法として、相対法と絶対法の二つの方法があります。相対法は試料の蛍光強度をこの比が既知の標準蛍光物質と比較して相対的に計算する方法で、本稿ではこの方法で求めた比を蛍光量子収率と呼びます。また、絶対法は積分球を用いて測定した蛍光物質の蛍光スペクトルから直接計算する方法で、本稿ではこの方法で求めた比を蛍光量子効率と呼びます。絶対法は測定対象の蛍光物質のみで求められるので、相対法よりも容易な方法です。

ここでは、分光蛍光光度計 RF-6000 と付属装置の積分球を用いて蛍光量子効率を求める方法と硫酸キニーネの測定例についてご紹介します。

M. Sugioka

■ 蛍光量子効率の求め方

Method to Calculate Fluorescence Quantum Efficiency

測定に使用した RF-6000 を Fig. 1 に示します。また、Fig. 2 は蛍光量子効率の求め方を示した模式図です。蛍光量子効率を求める場合、まずブランク（溶液試料であれば溶媒）、続いて試料の蛍光スペクトルを測定しますが、それらは装置関数を除去した蛍光スペクトルでなければなりません。従来の装置では、このような補正された蛍光スペクトルを簡便に得ることが困難でしたが、RF-6000 では測定時に自動で補正された蛍光スペクトルを得ることができるので、蛍光量子効率を求める際に効力を発揮します。

蛍光量子効率に関連する量として、吸収率、内部量子効率、外部量子効率があります。それらの定義を Table 1 に示します。吸収率は、試料に照射された光子数のうちどれだけの割合が吸収されたかを示します。内部量子効率は、吸収された光子数のうち蛍光として放出された光子数の割合を示します。外部量子効率は、照射された光子数のうち蛍光として放出された光子数の割合を示します。これらは、Fig. 2 の 2 組の 2 本の縦線で囲まれた①、②、③、④の範囲の面積値を使って計算されます。この定義より、蛍光量子効率は内部量子効率に対応することがわかります。

RF-6000 の標準ソフトウェア LabSolutions RF では、吸収率、内部量子効率（蛍光量子効率）、外部量子効率の全ての量を算出することができます。



Fig. 1 分光蛍光光度計 RF-6000
RF-6000 Spectrofluorophotometer

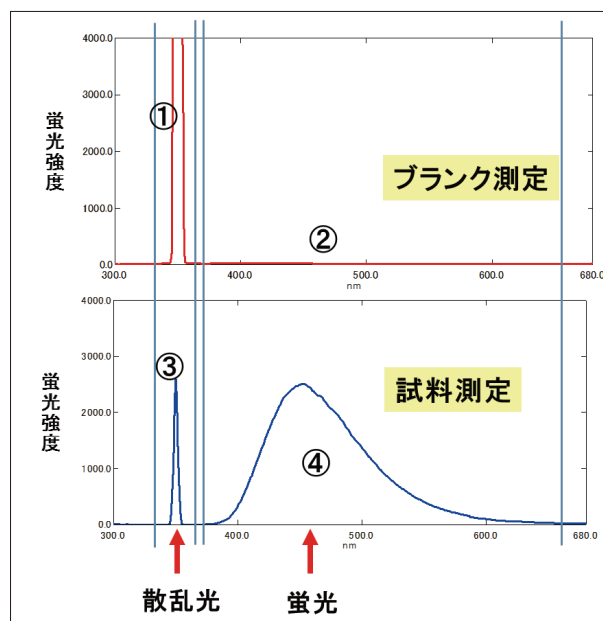


Fig. 2 蛍光量子効率の測定方法
Method to Obtain Fluorescence Quantum Efficiency

Table 1 蛍光量子効率に関連する式
Formulas Related to Fluorescence Quantum Efficiency

$$\begin{aligned} \text{吸収率} &= \text{吸収} / \text{照射} = (\text{①} - \text{③}) / \text{①} \\ \text{内部量子効率} &= \text{放出} / \text{吸収} = (\text{④} - \text{②}) / (\text{①} - \text{③}) \\ \text{外部量子効率} &= \text{放出} / \text{照射} = (\text{④} - \text{②}) / \text{①} \\ \text{外部量子効率} &= \text{内部量子効率} \times \text{吸収率} \end{aligned}$$

①：照射した光子数
②：ベースラインに含まれる光子数
③：吸収されなかった光子数
④：[蛍光+ベースライン]光子数
①-③：吸収された光子数
④-②：蛍光として放出された光子数

■ 硫酸キニーネの蛍光量子効率の測定

Measurement of Fluorescence Quantum Efficiency for Quinine Sulfate

硫酸キニーネ二水和物（和光純薬（株）製，特級試薬）を用いて，200 mg/L の硫酸キニーネ溶液（溶媒：1.0N 硫酸）を調製しました。

硫酸キニーネの蛍光量子効率を求める手順を以下に示します。

- RF-6000 の試料室に積分球を設置します。
- Fig. 3 に示したように，石英製四面研磨セルに入れたブランク（溶媒：1.0N 硫酸）を積分球内部のセルホルダに設置した後，積分球の蓋を閉じます。
- LabSolutions RF 「量子効率測定」プログラムで，ブランクの蛍光スペクトルを測定します。次に硫酸キニーネ溶液の入ったセルに置き換えてその蛍光スペクトルを測定します。励起分光器から積分球入口窓を通して入射した励起光は Fig. 3 のように試料に照射され，放出された蛍光と励起散乱光は積分球内部で一様に散乱します。その一部は積分球出口窓から蛍光分光器へと導かれ，蛍光スペクトルが取得されます。
- 設定した波長範囲でブランクと硫酸キニーネ溶液のデータに対する面積が計算され，Table 1 の式を使って Fig. 4 のように AF（吸収率），QEIn（内部量子効率），QEex（外部量子効率）が算出されます。計算に使用する波長範囲は，Fig. 5 に示した2つの縦ラインを移動させることで自由に設定することができます。

今回，Fig. 2 の①，③に相当する面積値は Fig. 5 の青矢印で示した 320 nm ～ 370 nm の範囲，また②，④に相当する面積値は緑矢印で示した 370 nm ～ 680 nm の範囲で求めました。これらから算出した硫酸キニーネの蛍光量子効率は 0.5336 で，文献値¹⁾の 0.50 ～ 0.57 とよく一致しました。

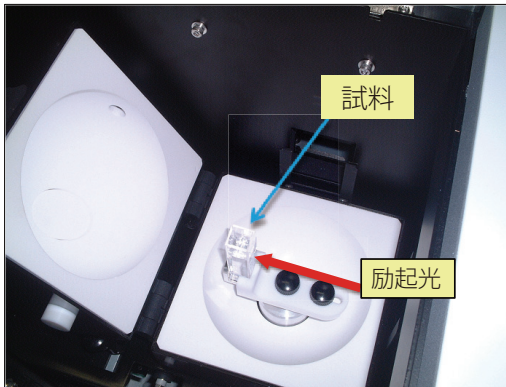


Fig. 3 試料を積分球に設置した状況
Sample Set in Integrating Sphere

Table 2 測定条件
Analytical Conditions

測定装置	: 分光蛍光光度計 RF-6000
スペクトルの種類	: 蛍光スペクトル
励起波長	: 350 nm
測定波長範囲	: 300 nm ～ 680 nm
データ間隔	: 1.0 nm
スキャン速度	: 200 nm/min
バンド幅	: Ex 3 nm, Em 3 nm
感度	: Auto

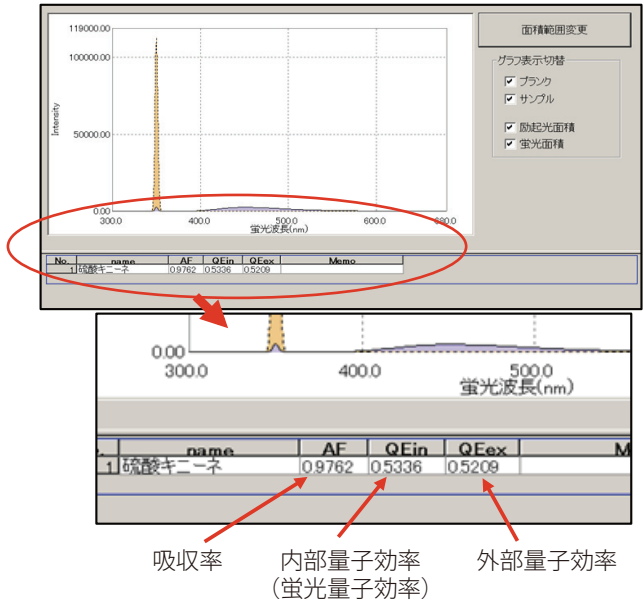


Fig. 4 「量子効率測定」モードでの蛍光量子効率計算
Fluorescence Quantum Efficiency Calculated with Quantum Efficiency Mode

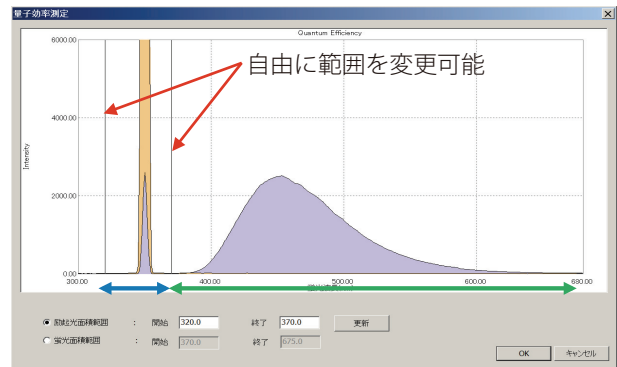


Fig. 5 計算範囲の設定
Setting for Calculation Range

■ まとめ

Conclusion

RF-6000 は自動スペクトル補正機能を有しているため，蛍光量子効率測定に必要な補正された蛍光スペクトルを容易に取得できます。付属装置の積分球と標準ソフトウェア LabSolutions RF を用いることで目的物質の蛍光量子効率を簡便に得ることが可能です。

- 1) 日本分光学会 測定法シリーズ 3 蛍光測定 生物学への応用 (学会出版センター)