

Application News

No. A500

光吸収分析
Spectrophotometric Analysis

同期蛍光法による分離分析

Separation Analysis by Synchronous Fluorescence Spectroscopy

多成分系試料を分離分析する手法として、分光蛍光光度計を使用した同期蛍光法があります。通常、励起スペクトル測定では蛍光波長を固定して励起側分光器の波長を走査し、また蛍光スペクトル測定では励起波長を固定して蛍光側分光器の波長を走査します。これに対して、同期蛍光スペクトル測定では励起側分光器と蛍光側分光器の走査開始波長をずらし、その差 ($\Delta\lambda$) を一定に保った状態で、同じスキャン速度で同時に両方の分光器を走査してスペクトルを測定します。検出器で受光する光は、励起側分光器の波長で励起され、それから $\Delta\lambda$ だけシフトした波長で放出される蛍光で、 $\Delta\lambda$ を適切に選択することで目的成分の分離分析が行えます。

ここでは、同期蛍光法について解説すると共に、Fig. 1 に示す分光蛍光光度計 RF-6000 を使用して同期蛍光法で多環芳香族系化合物の混合試料の分離分析を行いましたので、その測定例についてご紹介します。

A. Hashimoto T. Tajima



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

同期蛍光法とは

Introduction to Synchronous Fluorescence Spectroscopy

同期蛍光法は理論的に以下のように取り扱われます¹⁾。

蛍光物質に照射されている励起光の波長を λ' とし、 $E_M(\lambda)$ を蛍光の強度分布パターン（蛍光スペクトル）として定義します。蛍光波長 λ における蛍光の測光値 $I(\lambda)$ は $E_M(\lambda)$ に依存し、また λ' で励起された蛍光物質が発する光の分光放射輝度 $R_{\lambda'}$ に比例します。

$$I(\lambda) = k_1 R_{\lambda'} E_M(\lambda) \quad (1)$$

ここで、 k_1 は係数。蛍光物質の濃度が十分に薄い時、 $R_{\lambda'}$ は (2) 式のように表されます。

$$R_{\lambda'} = k_2 \varepsilon(\lambda') c d I_0(\lambda') \phi(\lambda') \quad (2)$$

ここで、 k_2 は係数、 $\varepsilon(\lambda')$ は吸光係数、 c は蛍光物質の濃度、 d は光路長、 $I_0(\lambda')$ は励起光の強度、 $\phi(\lambda')$ は蛍光物質の量子収率です。

積 $\varepsilon(\lambda') I_0(\lambda') \phi(\lambda')$ は励起関数として関係付けられ、励起スペクトルを $E_x(\lambda')$ とすると、(3) 式で表されます。

$$E_x(\lambda') = k_3 \varepsilon(\lambda') I_0(\lambda') \phi(\lambda') \quad (3)$$

ここで、 k_3 は係数。

(1), (2), (3) 式より、同期蛍光スペクトルの強度 $I_S(\lambda', \lambda)$ は (4) 式で表されます。

$$I_S(\lambda', \lambda) = K c d E_x(\lambda') E_M(\lambda) \quad (4)$$

ここで、 $K = k_1 k_2 k_3^{-1}$ 。

同期蛍光スペクトル測定では、励起波長と蛍光波長の波長差 ($\Delta\lambda$) が一定なので

$$\lambda - \lambda' = \Delta\lambda \quad (\text{一定}) \quad (5)$$

(4), (5) 式より、

$$I_S(\lambda', \lambda) = K c d E_x(\lambda') E_M(\lambda' + \Delta\lambda) \quad (6)$$

または、

$$I_S(\lambda', \lambda) = K c d E_x(\lambda - \Delta\lambda) E_M(\lambda) \quad (7)$$

以上より、同期蛍光スペクトルは λ と λ' の関数として表され、 $\Delta\lambda$ の選択により強度のパターンが変化することが分かります。

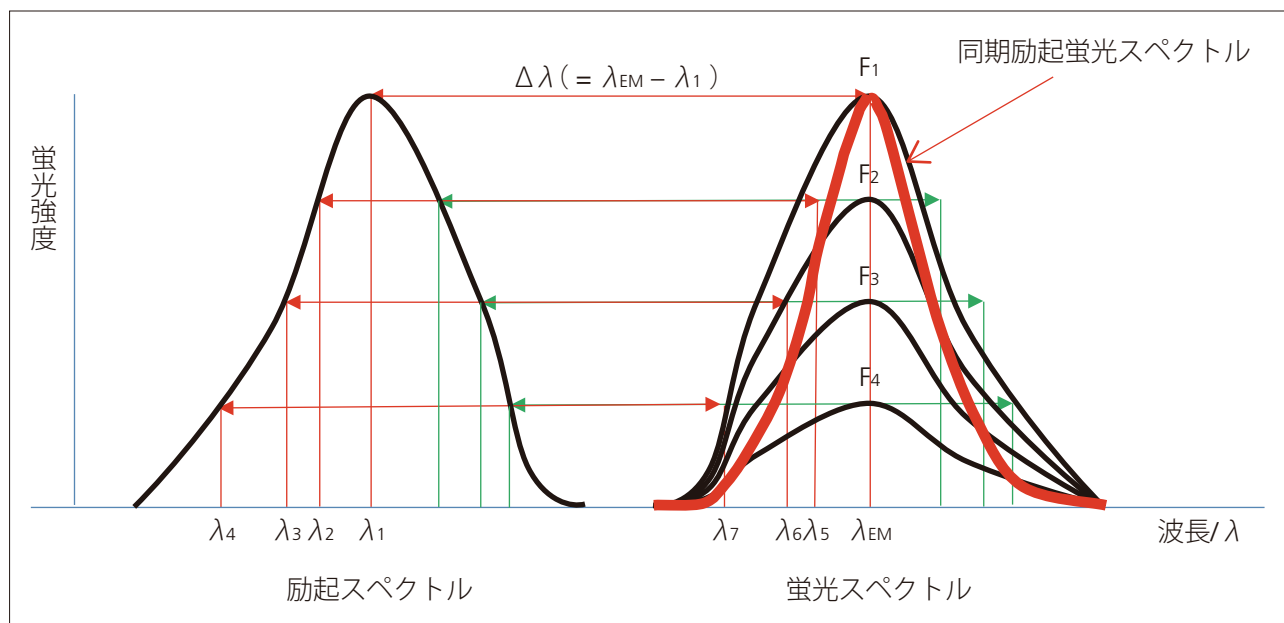


Fig. 2 同期蛍光スペクトルの説明図
Schematic Diagram of Synchronous Fluorescence Spectrum

次に、同期蛍光法を視覚的に理解するために、Fig. 2 に示す仮想的な励起スペクトルと蛍光スペクトルを考えます。

波長 λ_1 で励起した時、波長 λ_{EM} で強度 F_1 の蛍光スペクトルを得たとします。励起波長を λ_2 に設定した場合には、波長 λ_{EM} で強度 F_1 の蛍光スペクトルと相似的な強度 F_2 の蛍光スペクトルを得ることになります。

この励起スペクトルと蛍光スペクトルに対して、両スペクトルのピーク波長の差 $\Delta\lambda (= \lambda_{EM} - \lambda_1)$ で励起波長と蛍光波長を同時に走査し同期蛍光スペクトルを測定したとします。励起波長が λ_4 の時、波長 λ_{EM} での蛍光強度は F_4 ですが、同期蛍光スペクトル測定時には、蛍光波長は $\Delta\lambda$ シフトした $\lambda_7 (= \lambda_4 + \Delta\lambda)$ なので、強度 F_4 の蛍光スペクトルの λ_7 における蛍光強度が同期蛍光スペクトルの強度となります。同様に、励起波長が λ_3 の時、波長 λ_{EM} で強度 F_3 の蛍光スペクトルの $\lambda_6 (= \lambda_3 + \Delta\lambda)$ における蛍光強度が同期蛍光スペクトルの強度となります。このようにして励起波長と蛍光波長の間隔を $\Delta\lambda$ 保った状態で走査すると赤線で示した同期蛍光スペクトルを得ることになります。

Fig. 2 から明らかなように、同期蛍光スペクトルは元の蛍光スペクトルに比べて半幅幅が狭くなり、また $\Delta\lambda$ を励起スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長の差に設定した時、同期蛍光スペクトルのピーク強度が最も大きくなります。

■多環芳香族化合物の同期蛍光スペクトル測定

Synchronous Fluorescence Spectra of Polycyclic Aromatic Compounds

ピレン（濃度 2.9 $\mu\text{g/mL}$ ）、ベンゾ（a）ピレン（同 1.6 $\mu\text{g/mL}$ ）、ベンゾ（k）フルオランテン（同 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ）のシクロヘキサン溶液を調製し、これらの溶液を分光蛍光光度計 RF-6000 を使用して蛍光スペクトルを測定しました。測定条件を Table 1 に、測定結果を Fig. 3 に示します。ピレン、ベンゾ（a）ピレン、ベンゾ（k）フルオランテンの励起波長は、それぞれ 335 nm、385 nm、308 nm です。上述の濃度で測定した時、ベンゾ（k）フルオランテンの蛍光強度が最も大きく、蛍光強度が最も小さいピレンの約 40 倍となりました。ピレンとベンゾ（a）ピレンの蛍光スペクトルを明瞭に示すために、Fig. 3 の縦軸を拡大したスペクトルを Fig. 4 に示します。

次に、同期蛍光法でピレンのピーク強度を最も大きくするために、ピレンの蛍光スペクトルでピーク強度が最大となる波長（382 nm）とピレンの励起波長（335 nm）との差（47 nm）を励起側と蛍光側分光器の波長差として選択しました。その波長差で測定したピレン、ベンゾ（a）ピレン、ベンゾ（k）フルオランテンの同期蛍光スペクトルを Fig. 5 に、また測定条件を Table 2 に示します。同期蛍光スペクトルでは、ベンゾ（k）フルオランテンとピレンの最大ピークの強度比が約 8 倍まで減少して相対的にピレンのピーク強度が高められ、またピレンのピークが十分に分離されているのが分かります。

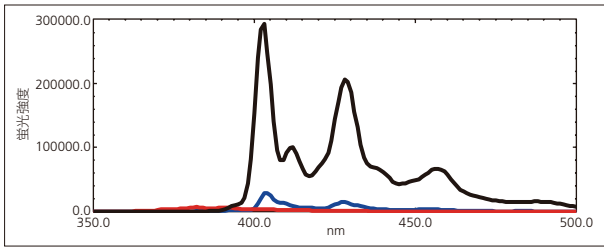


Fig. 3 ピレン (赤), ベンゾ (a) ピレン (青), ベンゾ (k) フルオランテン (黒) の蛍光スペクトル
Fluorescence Spectra of Pyrene (Red), Benzo (a) pyren (Blue) and Benzo (k) fluoranthene (Black)

Table 1 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
データ間隔	: 1.0 nm
スキャン速度	: 600 nm/min
バンド幅	: Ex 3 nm, Em 3 nm
感度	: Low

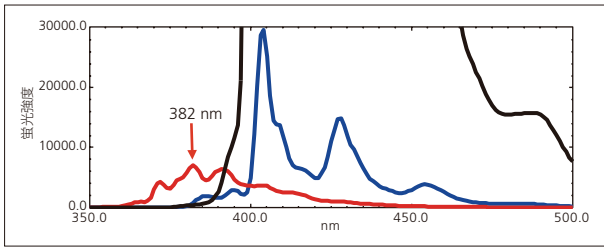


Fig. 4 Fig. 3 の縦軸を拡大したスペクトル
Expanded Fluorescence Spectra of Fig. 3

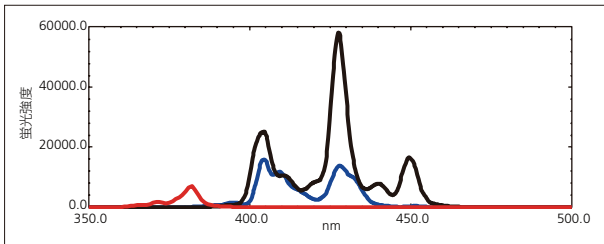


Fig. 5 ピレン (赤), ベンゾ (a) ピレン (青), ベンゾ (k) フルオランテン (黒) の同期蛍光スペクトル
Synchronous Fluorescence Spectra of Pyrene (Red), Benzo (a) pyren (Blue) and Benzo (k) fluoranthene (Black)

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	: 同期蛍光スペクトル
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	: Low
励起と蛍光の波長差	: 47 nm

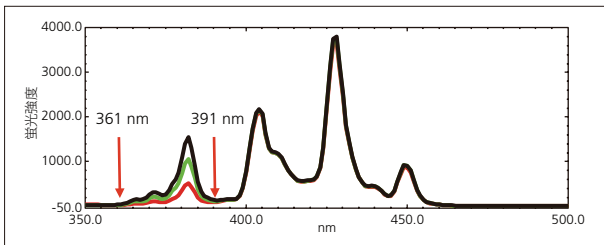


Fig. 6 ピレンの濃度を変化させた同期蛍光スペクトル
ピレンの濃度 赤: 0.145 $\mu\text{g/mL}$, 緑: 0.29 $\mu\text{g/mL}$, 黒: 0.435 $\mu\text{g/mL}$
Synchronous Fluorescence Spectra of Pyrene Measured for Three Concentrations Red: 0.145 $\mu\text{g/mL}$, Green: 0.29 $\mu\text{g/mL}$, Black: 0.435 $\mu\text{g/mL}$

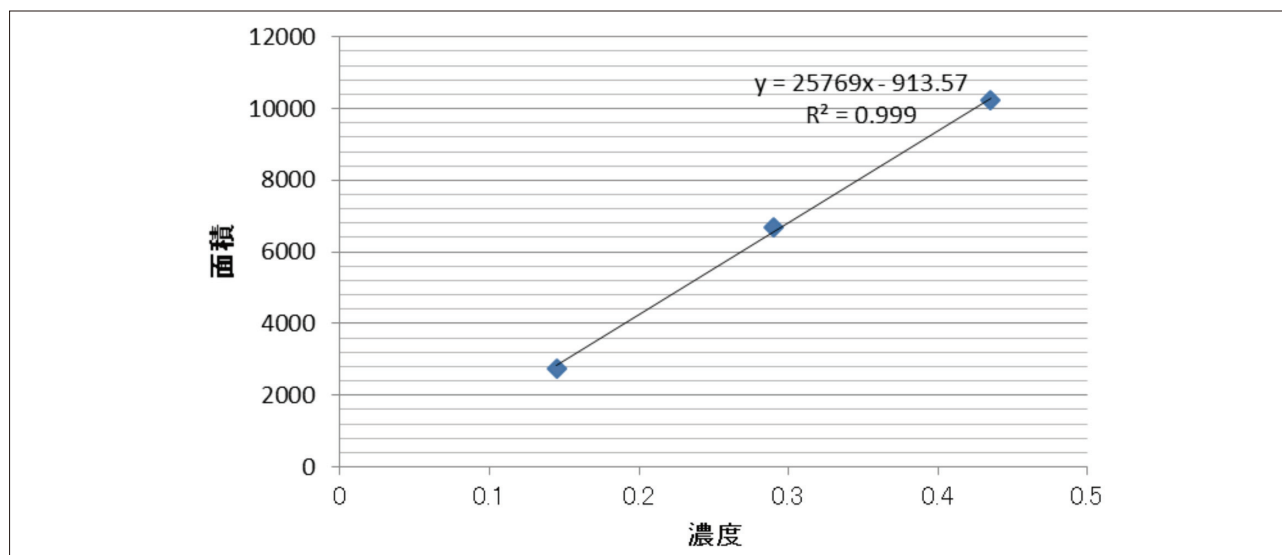


Fig. 7 ピレンのピーク面積と濃度の関係
Relation between Peak Area and Concentration

次に、Fig. 3の測定で使用したベンゾ (a) ピレンとベンゾ (k) フルオランテンのシクロヘキサン溶液各 1 mL を、同じく Fig. 3の測定で使用したピレンのシクロヘキサン溶液が 1 mL, 2 mL, 3 mL 入った容器に加え、それにシクロヘキサンを加えて全体を 20 mL としました。ベンゾ (a) ピレンとベンゾ (k) フルオランテンの濃度は一定で、それぞれ 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ です。また、ピレンの濃度は 0.145 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.435 $\mu\text{g}/\text{mL}$ です。

Fig. 5と同様に、励起側と蛍光側分光器の波長差を 47 nm に設定して、これらの溶液の同期蛍光スペクトルを測定しました。測定結果を Fig. 6 に示します。測定条件は Table 2 と同じです。

次に、Fig. 6の 361 nm と 391 nm の間でベースラインを引き、ベースラインよりも上部のピーク面積を求めました。ピーク面積とピレンの濃度の関係を Fig. 7 に示します。良好な直線性が得られ、分離定量が可能ながわかります。

■まとめ

Conclusion

RF-6000の同期蛍光スペクトル測定機能を使うことで、混合物の分離分析が行えることが確認できました。同期蛍光法では適切な波長差を選択することで混合物を分離することができるので、様々な分野での応用が期待できます。

参考文献 1) T. Vo-Dinh, Anal. Chem. 50 (1978) 396.

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2015年11月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。

3100-11501-470IK
2015.11