

Application News

No. A591

光吸収分析

フルオレセインおよびローダミン B 溶液における蛍光異方性の評価

蛍光異方性を評価することで、物理的及び化学的分子の特性を研究できます。例えば、小さな分子の場合、電子構造や溶媒-溶質相互作用を調べることができます。また、天然及び合成物などの大きな分子の場合、立体配座やダイナミクスを調べることができます¹⁾。

今回は、フルオレセイン溶液とローダミン B 溶液について、温度を変えたときの蛍光異方性の変化を調べましたので結果をご紹介します。

K. Maruyama, K. Sobue

■ 蛍光異方性

溶液中の蛍光異方性の測定に関しては IUPAC からテクニカルレポート¹⁾ が発行されており、このレポートに記載されている基本計算式を以下に示します。

蛍光異方性 (r) は、一般に以下の式で定義されます。

$$r = \frac{(I_{VV} - I_{VH})}{(I_{VV} + 2I_{VH})} \quad (1)$$

ここで I_{VV} は励起側偏光子と蛍光側偏光子を垂直 (V) に設定して測定した強度を、 I_{VH} は励起側偏光子を垂直 (V)、蛍光側偏光子を水平 (H) にして測定した強度を示しています。分母は全強度を示し、分子は偏光の度合いを示しています。

また、蛍光偏光度 (p) は、一般に以下の式で定義されます。

$$p = \frac{(I_{VV} - I_{VH})}{(I_{VV} + I_{VH})} \quad (2)$$

なお、蛍光異方性と蛍光偏光度には以下の関係式が成り立ちます。

$$r = \frac{2p}{(3-p)} \quad (3)$$

分子が励起される際の吸収遷移モーメントと、蛍光を発する際の放出遷移モーメントのなす角度 α から、蛍光異方性は一般に以下のように表せます。

$$r = 0.2(3\cos^2\alpha - 1) \quad (4)$$

式(4)から蛍光異方性は $-0.2 \leq r \leq 0.4$ の範囲にあることがわかります (さらに吸収と放出の間の時間で、分子が回転することにより、蛍光異方性はより小さくなります)。

なお実際の測定では、装置から出射される光の偏光成分 (垂直方向と水平方向) に対する感度の違いを補正する必要があります。補正するためには以下の式で定義される G 因子を利用します。

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (5)$$

実際の測定では、式 (1) に G 因子を利用した以下の式を用いて蛍光異方性 (r_{exp}) を計算します。

$$r_{exp} = \frac{(I_{VV} - GI_{VH})}{(I_{VV} + 2GI_{VH})} \quad (6)$$

■ 温度変化と蛍光異方性

フルオレセインをグリセリン溶液 (グリセリンと純水を 95 : 5 で調製した溶媒) に溶かし、濃度を 0.2 mg/L に調製しました。3次元スペクトルを計測することにより最適な励起波長を確認した後、表 1 の条件で溶液温度を変化させながら測定を行いました。測定結果を図 1、2 及び表 2 に示します。

一般に温度が上がると、分子の衝突によるエネルギーの消失、内部転換、系間交差が起こりやすくなり、蛍光強度は減少します (温度消光)²⁾。図 1 から蛍光強度が温度の上昇と共に低下している様子が確認できます。

表 1 測定条件

使用装置	: RF-6000、偏光測定付属装置、単一恒温セルホルダ
励起波長	: 497 nm (フルオレセイン溶液) 555 nm (ローダミン B 溶液)
蛍光波長範囲	: 505 nm~650 nm (フルオレセイン溶液) 565 nm~700 nm (ローダミン B 溶液)
スキャン速度	: 600 nm/min
サンプリングピッチ	: 1.0 nm
バンド幅	: Ex 3.0 nm/Em 5.0 nm
感度	: Low

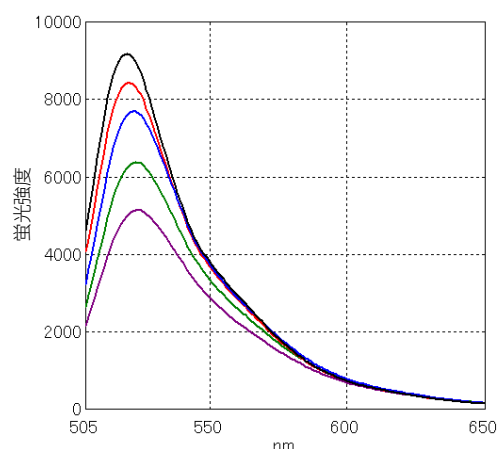


図 1 フルオレセイン溶液の蛍光スペクトル (偏光子なし)
黒: 10℃、赤: 室温、青: 40℃、緑: 60℃、紫: 78℃

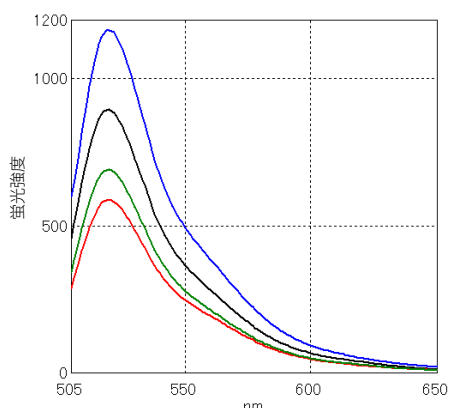


図2 フルオレセイン溶液の偏光スペクトル (10°C)
黒: I_V 、赤: I_H 、青: I_{HH} 、緑: I_V

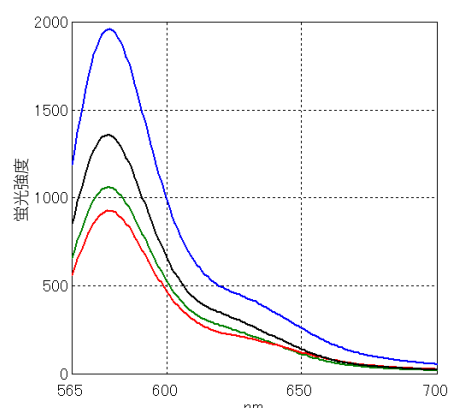


図4 ローダミン B 溶液の偏光スペクトル (10°C)
黒: I_V 、赤: I_H 、青: I_{HH} 、緑: I_V

図2のように励起／蛍光側の偏光子の組み合わせで、蛍光異方性の計算に必要な強度を測定しました。使用した装置では水平成分の感度の方が高いことがわかります。

表2 フルオレセイン溶液の温度変化による蛍光異方性と蛍光偏光度

温度	蛍光波長	I_V	I_H	G	r	p
10°C	520 nm	931.4	588.2	0.59	0.36	0.457
室温	521 nm	804.6	525.2	0.59	0.35	0.444
40°C	522 nm	644.8	501.4	0.59	0.28	0.371
60°C	523 nm	450.7	437.9	0.59	0.20	0.271
78°C	524 nm	304.1	359.3	0.59	0.13	0.178

表2から温度上昇と共に蛍光異方性が低下していることがわかります。一般に偏光解消を起こす要因は、分子内緩和、分子の回転ブラウン運動、分子間の励起エネルギー移動の3つと言われています³⁾。今回の試料では、溶液中のフルオレセインのみが蛍光分子なので、分子間の励起エネルギー移動は考慮する必要がなく、また分子内緩和は温度変化にあまり影響を受けないことから、温度の上昇と共に分子の回転ブラウン運動が活発になり蛍光異方性が低下していると推測できます。

次に、ローダミン B をグリセリン溶液（グリセリンと 0.5 mM NaOH を含む純水を 95 : 5 で調製した溶媒）に溶かし、濃度を 0.2 mg/L に調製しました。3次元スペクトルを計測することにより最適な励起波長を確認した後、表1の条件で溶液温度を変化させながら測定を行いました。測定結果を図3、4及び表3に示します。

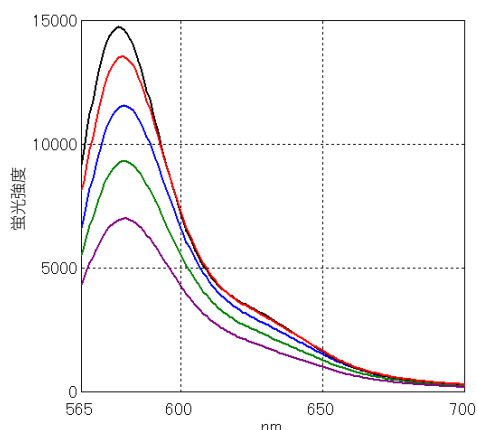


図3 ローダミン B 溶液の蛍光スペクトル (偏光子なし)
黒: 10°C、赤: 室温、青: 40°C、緑: 60°C、紫: 78°C

表3 ローダミン B 溶液の温度変化による蛍光異方性と蛍光偏光度

温度	蛍光波長	I_V	I_H	G	r	p
10°C	578 nm	1359.8	928.2	0.54	0.36	0.461
室温	579 nm	1244.3	885.4	0.54	0.35	0.445
40°C	580 nm	987.1	764.5	0.54	0.32	0.410
60°C	580 nm	710.5	627.6	0.54	0.27	0.354
78°C	580 nm	489.3	481.2	0.54	0.23	0.306

フルオレセイン溶液同様にローダミン B 溶液でも、温度の上昇と共に蛍光強度の低下と蛍光異方性の低下が確認できました。蛍光異方性の低下は、フルオレセイン溶液同様に、温度上昇による分子の回転ブラウン運動の活性に起因したものと推測できます。

まとめ

温度を変化させながらフルオレセイン溶液とローダミン B 溶液の蛍光異方性の測定を行いました。温度が上がると蛍光強度が低下するとともに、蛍光異方性も小さくなることが確認できました。蛍光異方性の低下は、温度上昇により分子の回転ブラウン運動が活発になったことに起因すると推測されます。このように、蛍光異方性を測定することで、物理的／化学的な分子特性に関する情報を調べることができます。

参考文献

- 1) Marcel Ameloot, Martin vandeVen, A. Ulises Acuna, and Bernard Valeur Fluorescence anisotropy measurements in solution: Methods and reference materials(IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 2013, vol. 85, No.3, p.589-608
- 2) 西川泰治・平木敬三「蛍光・りん光分析法」共立出版
- 3) 木下一彦・御橋廣真編「蛍光測定」学会出版