

Application News

No. A504

光吸光分析
Spectrophotometric Analysis

溶液試料の相対量子収率測定

Relative Quantum Yield Measurement of Liquid Sample

はじめに

Introduction

蛍光物質が吸収した励起光の光子数と蛍光として発した光子数の比を量子収率と言い、照明・ディスプレイなどに利用される蛍光体やライフサイエンス分野の蛍光プローブなどの発光強度や発光効率の評価に用いられています。

量子収率を求める方法として、量子収率既知の蛍光物質を標準試料として使って未知試料の量子収率を算出する相対法と、積分球を用いて未知試料の量子収率を直接求める絶対法があります（絶対法で求めた値を絶対量子収率または量子効率と言います）。

ここでは、分光蛍光光度計 RF-6000 を使用して相対法で量子収率を求める方法と測定例をご紹介します。

H. Iwamae T. Tajima

相対量子収率の算出式

Formula to Calculate Relative Quantum Yield

相対法では、紫外可視分光光度計で測定した吸光度：A、補正蛍光スペクトルのピークの半値幅の面積：F、溶媒の屈折率：n、紫外可視スペクトル測定時の濃度に対する蛍光スペクトル測定時の試料の希釈率：D を使って、(1) 式で未知試料の量子収率 ϕ_x を求めます。

$$\phi_x = \phi_{st} \cdot \left(\frac{A_{st}}{A_x}\right) \cdot \left(\frac{F_x}{F_{st}}\right) \cdot \left(\frac{n_x^2}{n_{st}^2}\right) \cdot \left(\frac{D_x}{D_{st}}\right) \quad (1)$$

(1) 式で、添え字の st と x はそれぞれ標準試料と未知試料を表します。

相対法で量子収率を求める際の注意点

Need-to-know Things about Relative Quantum Yield Measurement

(1) 式にしたがって相対法で量子収率を求める際の注意点を以下に示します。

①標準試料および励起波長の選定

- 未知試料の励起スペクトルと重なる波長域に励起スペクトルが現れる量子収率既知の蛍光物質を標準試料として選びます。
- 標準試料と未知試料の励起スペクトルが重なる波長域で、双方を励起させる波長を選びます。標準試料と未知試料を励起させる波長は同一です。重なる波長域に、標準試料と未知試料のいずれかがピークを有する場合、そのピーク波長を励起波長とします。

②紫外可視分光光度計を用いた吸光度測定

- 標準試料、未知試料ともそれぞれの溶媒を紫外可視分光光度計の対照光束側にセットして、紫外可視スペクトルを測定します。
- 測定した標準試料と未知試料の紫外可視スペクトルから励起波長でのそれぞれの吸光度を読み取ります。

③試料の濃度

- 濃度が高い試料をそのまま蛍光スペクトル測定に用いると濃度消光が起こる場合があります。②で測定した吸光度が高い場合には、励起波長における吸光度が 0.05 以下¹⁾になるように標準試料と未知試料を希釈します。その際の希釈率を (1) 式に用います。

今回相対法で量子収率を求める際に使用した分光蛍光光度計 RF-6000 を Fig. 1 に、吸光度を求める際に使用した紫外可視分光光度計 UV-2600 を Fig. 2 に示します。

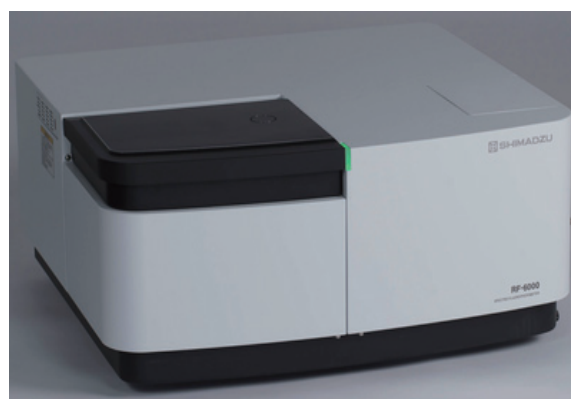


Fig. 1 分光蛍光光度計 RF-6000
RF-6000 Spectrofluorophotometer

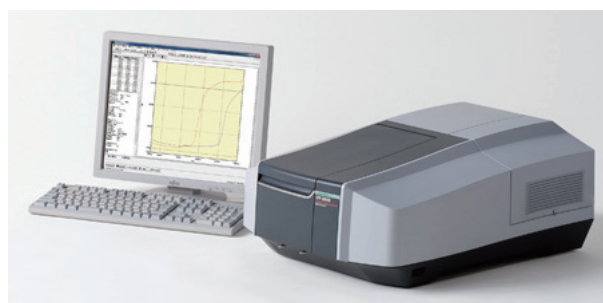


Fig. 2 紫外可視分光光度計 UV-2600
UV-2600 UV-Visible Spectrophotometer

■ローダミン B の相対量子収率測定

Relative Quantum Yield Measurement of Rhodamine B

ローダミン B は繊維の染色や紙などの着色に用いられる赤色の蛍光色素です。Fig. 3 に示すように、量子収率既知のウラニン (フルオレセインナトリウム) エタノール溶液がローダミン B エタノール溶液の励起スペクトルと重なる波長域に励起スペクトルを示すので、量子収率を算出する際の標準試料として使用しました。Fig. 3 の測定条件を Table 1 に示します。

Fig. 3 より、ウラニンはローダミン B エタノール溶液の励起スペクトルと重なる 498 nm にピーク (矢印のピーク) がありますので、このピーク波長を励起波長としました。Fig. 4 はローダミン B とウラニンのエタノール溶液の紫外可視スペクトルで、測定条件を Table 2 に示します。これより 498 nm のローダミン B とウラニンの吸光度は、それぞれ 0.0216 と 0.0243 でした。双方とも吸光度が 0.05 以下でしたので、これらの溶液を無希釈で蛍光スペクトル測定に使用しました。

RF-6000 の制御ソフトウェア LabSolutions RF に標準装備されている量子収率プログラムは、(1) 式に従って量子収率を計算します。ウラニンエタノール溶液の量子収率や吸光度など(1) 式の必要項目を入力して蛍光スペクトルを測定し、続いてローダミン B エタノール溶液の必要項目を入力して蛍光スペクトルを測定すると、Fig. 5 の (I) と (II) に示すように、測定ごとに青色で示したピーク高さの半値幅の面積が計算され、最終的に Fig. 6 に示す未知試料のローダミン B エタノール溶液の量子収率が自動的に計算されて表示されます。Table 3 は Fig. 5 の測定条件です。なお、量子収率プログラムでは、横軸が波長で蛍光スペクトルが表示されますが、実際の半値幅の面積計算では、横軸が波数、縦軸が光子数に比例した値の蛍光スペクトルが使われます。

標準試料のウラニンエタノール溶液の量子収率を 0.97¹⁾ としたとき、算出されたローダミン B エタノール溶液の量子収率は 0.7149 で、文献値¹⁾ の 0.69 ~ 0.97 の範囲内の値となりました。

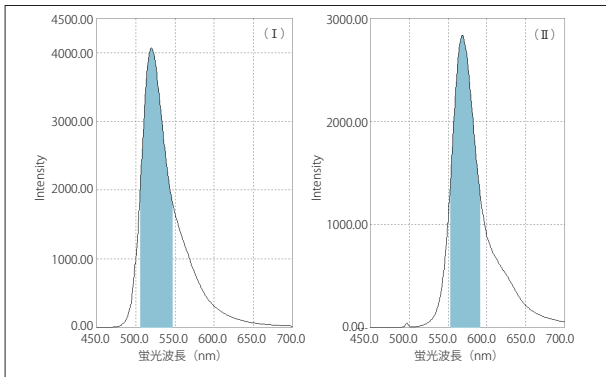


Fig. 5 ウラニンエタノール溶液 (I) とローダミン B エタノール溶液 (II) の蛍光スペクトル
Emission Spectra of Uranine (I) and Rhodamine B (II) in Ethanol

標準試料テーブル					
No.	name	QY	Abs	RI	Memo
0	ウラニン	0.9700	0.0243	1.3000	

未知試料テーブル					
No.	name	QY	Abs	RI	Memo
1	ローダミンB	0.7149	0.0216	1.3000	

Fig. 6 ローダミン B エタノール溶液の量子収率
QY: 量子収率 Abs: 吸光度 RI: 溶液の屈折率
Quantum Yield of Rhodamine B in Ethanol
QY: Quantum Yield Abs: Absorbance
RI: Refractive index of Solution

参考文献

1) 木下一彦, 御橋廣真編, 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 (1983)

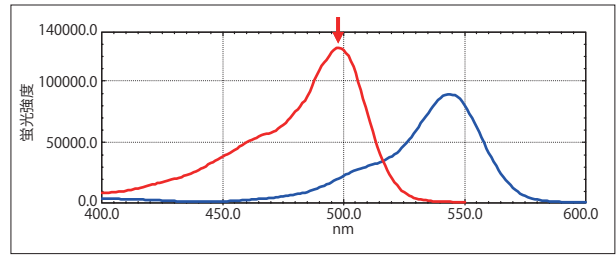


Fig. 3 ローダミン B エタノール溶液 (青色) とウラニンエタノール溶液 (赤色) の励起スペクトル
Excitation Spectra of Rhodamine B (Blue) and Uranine (Red) in Ethanol

Table 1 測定条件
Measurement Conditions

測定装置	: RF-6000	ウラニン	: 520 nm
蛍光波長	: ローダミン B : 568 nm		
スキャン速度	: 200 nm/min		
スリット幅	: Ex = 3 nm	Em = 3 nm	
感度	: Low		

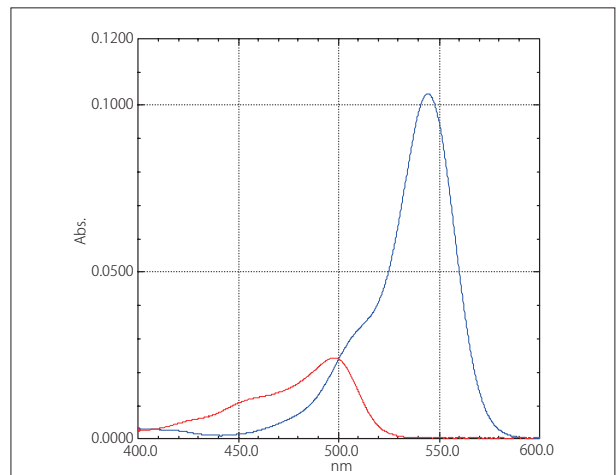


Fig. 4 ローダミン B エタノール溶液 (青色) とウラニンエタノール溶液 (赤色) の紫外可視スペクトル
UV-Visible Spectra of Rhodamine B (Blue) and Uranine (Red) in Ethanol

Table 2 測定条件
Measurement Conditions

測定装置	: UV-2600
スペクトルの種類	: 吸光度
スキャン速度	: 中速
スリット幅	: 2 nm

Table 3 測定条件
Measurement Conditions

測定装置	: RF-6000
励起波長	: 498 nm
スキャン速度	: 200 nm/min
スリット幅	: Ex = 3 nm Em = 3 nm
感度	: Low

■まとめ

Conclusion

RF-6000 はリアルタイムで補正蛍光スペクトルを測定することができるので、LabSolutions RF ソフトウェアに標準装備されている量子収率プログラムを用いると目的物質の量子収率を容易に求めることができます。