

UV

TALK LETTER

Vol. 17
May 2016



紫外可視分光法と蛍光分光法について(上)…… P. 2

アプリケーション 様々な分野で活躍する分光蛍光光度計…… P. 6

Q&A 蛍光スペクトルに現れる散乱光や高次光を検出しない方法がありますか?…… P. 10

UV TALK LETTER

紫外可視分光法と蛍光分光法について(上)

1. はじめに

我々が目にしている様々な物質は、光を発したり吸収したりします。人間の目で感知できる領域の光を可視光と呼び、我々は日常生活で目を検出器として色を観測することで定量分析や定性分析を行っています。紫外領域の光を含めた紫外可視領域の分析をより正確に行う方法として、紫外可視分光法と蛍光分光法があります。両分光法とも同じ波長域の光を使いますが、装置の構造は

異なり、測定可能な試料や検出感度などに差があります。今回と次回の2回に分け、紫外可視分光法と蛍光分光法について、原理、装置構成、長所、短所など両分光法の特徴の比較を交えながら解説します。今回は、光の吸収と蛍光の関係、蛍光の原理、「吸収」と比較した場合の「蛍光」の特長などについて解説します。

2. 光の吸収と蛍光

■ 発光・吸収と色

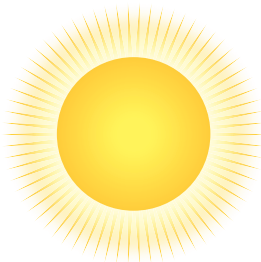
我々が目に見えるものは、図1に示すような太陽、蛍光灯、LED (Light Emitting Diode、発光ダイオード) など光を発するものと、図2のようにその光の一部を吸収・反射し、色付いて見えるものに分けることができます。

光を発することを発光と呼び、発光のメカニズムは様々です。例えば、太陽は熱によって光を発し、蛍光灯は紫外線が蛍光灯内部の蛍光塗料にあたることで可視光が発生します。LEDは電気を加えることで光を発しています。それぞれエネルギーの取得の仕方に違いがあり、その違い(刺激源)で発光の種類が分けられています。表1にその分類の一例を示します。

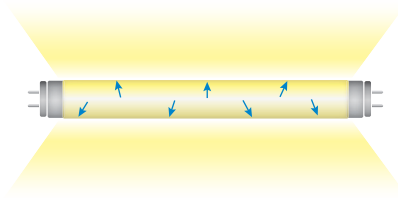
発光の中には、青色LEDやケミカルライトのように、色を伴ったものがあります。発光によって我々が感知する色は発光源から放射される光の波長に依存します。例えば、青色LEDであれば図3

の青色に相当する450 nm付近の波長の光が放射されます。分光蛍光光度計は光照射によって生じるフォトルミネッセンスを測定する装置ですが、装置によってはエレクトロルミネッセンスやケミルミネッセンスなどの発光も観測することができます。

光の吸収・透過・反射によって感知される色は、図4に示す色相環と補色が関係します。赤く見える物質は図4の色相環で赤色と180度ずれた補色の緑色の波長の光を吸収し、赤色の波長の光だけが透過あるいは反射して我々の目に赤色として識別されます。紫外可視分光光度計で赤色の物質を測定すると図3の緑色の波長に相当する530 nm付近に吸収が現れます。発光で識別できる色は発光源の光の波長に依存しますが、吸収・透過・反射では補色を考える必要があります。



太陽



蛍光灯



LED

図1 身近な発光の例

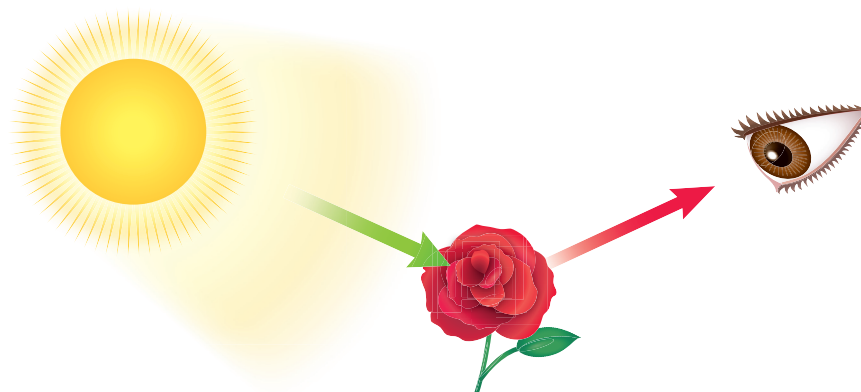


図2 吸収・反射と色

表1 発光の種類

発光(ルミネッセンス)の種類	刺激源 (エネルギーの取得方法)	例
熱輻射	熱	太陽、電球
フォトルミネッセンス(蛍光、燐光)	光照射	蛍光灯
エレクトロルミネッセンス	電圧	発光ダイオード(LED)、有機EL
ケミカルルミネッセンス(化学発光)	化学反応	ケミカルライト(過シュウ酸化学発光)、ルミノール反応
バイオルミネッセンス(生物発光)	化学反応(酸化酵素)(大部分は化学発光の範疇)	ホタル、チョウチンアンコウ

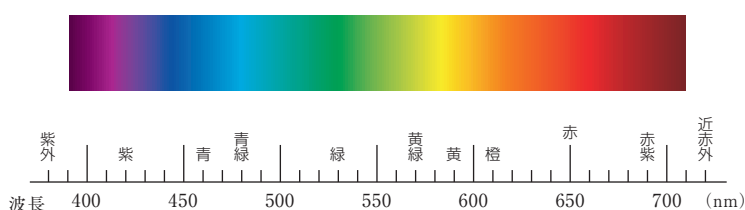


図3 光の波長と色の関係

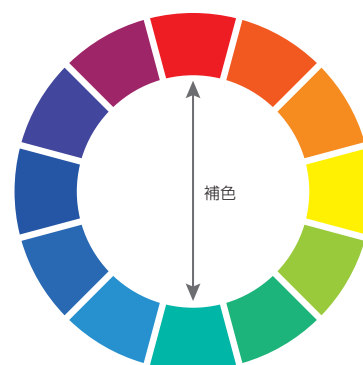


図4 色相環

■ 吸収と蛍光

物質に光を照射すると、図5に示すようにその物質の分子構造に基づいて特定の波長の光を吸収します。これは、その分子の基底状態(安定な状態)にある電子が光エネルギーを吸収して励起状態(エネルギー的に高く不安定な状態)に遷移することを示します。その後、励起状態に遷移した分子は、熱や他の分子との衝突などによりエネルギーを失い基底状態に戻ります。この過程は無放射遷移と呼ばれますが、この他に基底状態に戻るときに吸収した光エネルギーを再び光として放射することがあります。紫外可視分光光度計の場合は、物質の有無によって光の吸収に差が現れ、それを観測することで吸収スペクトルを測定しています。一方、蛍光分光光度計の場合は、物質に光を照射し物質から放射される光を観測することで、蛍光スペクトルを測定します。

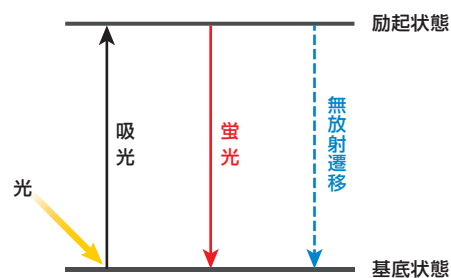


図5 準位系のエネルギー図

エネルギー準位と吸収・蛍光

次に図5をより詳しく示した図6を用いて、吸収スペクトルと蛍光スペクトルについて解説します。図6では、分子の電子基底状態を S_0 、電子励起状態を S_1 で表しています。それぞれの状態には電子エネルギーに比べてエネルギー的に小さい幾つかの振動エネルギー準位が存在し、その準位を電子基底状態では $V_0=j$ ($j=0, 1, 2, \dots$)、電子励起状態では $V_1=j$ で示しています。また、縦軸はエネルギーを表し、横軸は原子間距離を表しています。

分子は室温では、エネルギー的に最も低い図6の S_0 の $V_0=0$ に存在し、 S_1 とのエネルギー差に相当する波長(周波数)の光を吸収すると図6の①に示すように遷移します。この遷移が紫外可視分光光度計では吸収スペクトルとして、また分光蛍光光度計では励起スペクトルとして測定されます。

S_0 から S_1 へ電子が遷移するために要する時間は 10^{-15} 秒程度で、分子内の原子核の位置が伸縮振動などによって変化する前に電子は励起状態に遷移します。このため分子を構成している原子核の配置は電子遷移の前後で変化しません。この法則をFranck-Condonの原理と言います。 S_0 と S_1 では分子内の電子の偏りが異なるために、エネルギー的に低く安定な原子核の配置も S_0 と S_1 で異なります。遷移直後は $V_0=0$ の原子核の配置ですが、電子励起状態ではその配置は振動エネルギー的に高く不安定な状態となります。このエネルギー的に高い状態をFranck-Condon状態と言います。Franck-Condon状態の分

子は S_1 で最もエネルギー的に低く安定な $V_1=0$ の原子核の配置になるために、過剰なエネルギーを原子核の位置の移動による振動エネルギーとして放出し、図6の②に示すように、 $V_1=0$ へ発光現象を伴わない無輻射遷移が起こります。 $V_1=0$ から S_0 へ戻る際(図6の③)に、過剰なエネルギーを光として放出する場合、その光を蛍光と呼びます。図6で光を吸収する①の励起過程に比べて③の蛍光の放出過程はエネルギー幅が狭くなるために、蛍光スペクトルは吸収(励起)スペクトルよりも長波長側に現れます。

図7は分光蛍光光度計で測定したアントラセンのシクロヘキサン溶液の励起スペクトルと蛍光スペクトルです。図7のスペクトルに記載した「 $0 \rightarrow 1$ 」は、図6の S_0 の $V_0=0$ から S_1 の $V_1=1$ への遷移を表します。図7より励起スペクトルのピーク間隔が S_1 の振動エネルギー準位間のエネルギー差に依存していることがわかります。当然ながら、図8に示すように、紫外可視分光光度計で測定した吸収スペクトルも励起状態の振動エネルギー準位間のエネルギー差がスペクトルのピーク間隔に反映します。

蛍光スペクトルのピーク間隔は S_0 の振動エネルギー準位間のエネルギー差に依存しますが、紫外可視分光光度計ではこのエネルギー差は確認できません。また、励起スペクトルと蛍光スペクトルが交差する波長域に $0-0$ バンドが現れます。励起状態と基底状態の振動エネルギー準位の間隔が近似している時、励起スペクトルと蛍光スペクトルは $0-0$ バンドを中心に鏡像の関係になります。

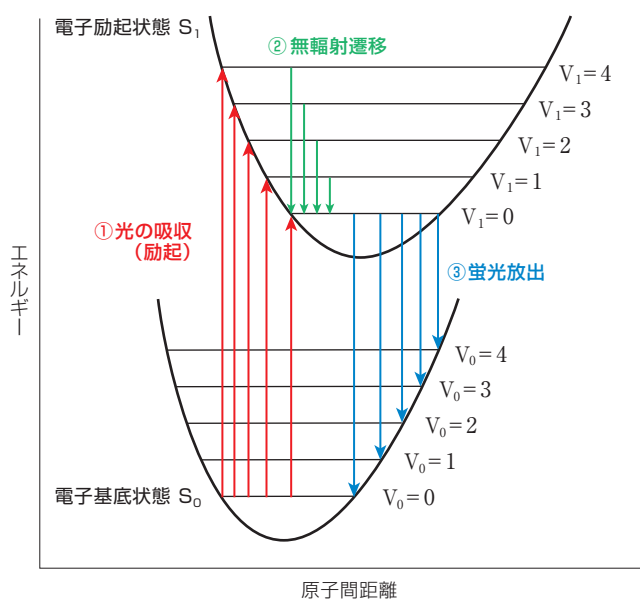


図6 エネルギー準位と吸収・蛍光

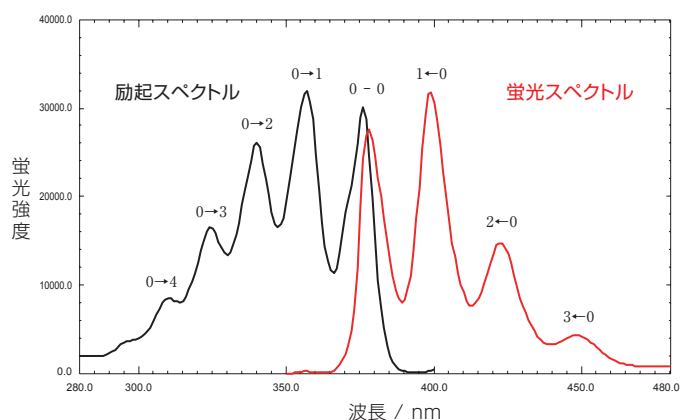


図7 アントラセン(シクロヘキサン溶液)の励起・蛍光スペクトル

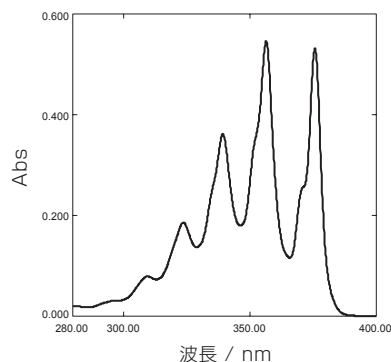


図8 紫外可視分光光度計で測定したアントラセン(シクロヘキサン溶液)の吸収スペクトル

■ 吸収スペクトル、励起スペクトル、蛍光スペクトル

紫外可視分光光度計の場合、単色光に分光された試料への入射光と試料の吸収によって光量が減少したその透過光を使って吸収スペクトル(透過率スペクトル)を測定します。つまり、紫外可視分光光度計では装置の光源の光の増減を測定しています。一方、蛍光分光光度計の場合、主に2種類の測定方法があります。一つ目の測定は、試料に対して励起光を固定し、試料から発した蛍光を分光することによって求める蛍光スペクトルです。もう一つの測定は、試料に対し励起光を連続的に変化させ、観測する蛍光波長を固定して測定する励起スペクトルです。つまり、前述で

も述べましたが蛍光分光光度計では試料から発する光を測定しています。図9に各スペクトル測定時のイメージ図を示します。

蛍光スペクトルでは、試料の蛍光波長と強度を観測することで、試料が発している蛍光の中でどの波長が一番強く光っているかがわかります。一方、励起スペクトルでは、どの波長で励起すると一番強く蛍光を発するか(最適励起波長)が測定できます。多くの場合、強い吸収がある波長では強く励起され蛍光も強く、吸収の弱い波長では少しか励起されないで蛍光が弱くなります。

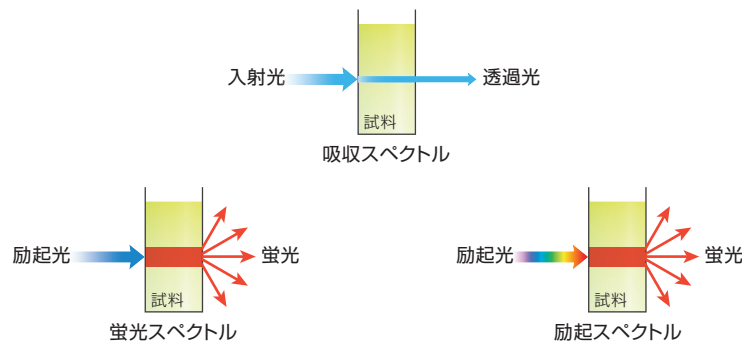


図9 吸収スペクトルと蛍光スペクトル、励起スペクトルのイメージ図

■ 選択的測定の差異

紫外可視分光光度計で得られる吸収スペクトルは分子による光の吸収のみが関係しますが、分光蛍光光度計で得られる蛍光スペクトルは励起と蛍光放出の二つの現象が関係します。そのため例えば、分子Aと分子Bで吸収スペクトルが近い波長域に現れたとしても、それらの電子励起状態の最低振動エネルギー準位に

差があれば蛍光スペクトルが観測される波長域に差が現れることとなります。そのため蛍光分光法は紫外可視分光法に比べて他成分の影響を抑えてスペクトルの測定や強度値を取得できる可能性があります。

■ 蛍光測定の注意点

吸収は基底状態と励起状態のエネルギー差に相当する波長の光が照射されれば観測されるので、入射光とその透過光の測定が可能な紫外可視分光光度計の場合、紫外可視域に吸収がある分子であれば全てに対してそのスペクトルを測定することができます。一方、蛍光は全ての分子によって放出されるわけではなく、過剰なエネルギーを熱として放出する場合は無輻射遷移とな

ります。エネルギー失活の要因が無輻射過程か光エネルギー放出かによって、分光蛍光光度計で測定可能かどうかが決まります。また、蛍光を放出する分子であっても励起状態から過剰なエネルギーを全て光として放出して基底状態に戻るわけではなく、一部は熱としてエネルギー放出します。

3. まとめ

今回は光の吸収と蛍光の関係、蛍光の原理、吸収に比した蛍光の特徴、注意点を中心に解説しました。次は蛍光分光光度計の構造を解説しながら、蛍光測定の理解をより深めたいと思います。

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
田島孝博
祖父江和樹

様々な分野で活躍する分光蛍光光度計

分光蛍光光度計を用いることにより、様々な分野で分析、確認を行うことができます。どのような分野でどのような分析例があるのか。今回は分光蛍光光度計RF-6000を使用した各分野でのそれぞれの分析例を紹介します。

1. 化学分野

[軽油中のクマリン分析]

軽油には地方税である軽油取引税が課せられていますが、灯油やA重油には課せられていません。これを悪用し、軽油に税金のかからない灯油やA重油を混ぜるといった脱税行為を行う業者がいます。これを取り締まるために、灯油やA重油には1 ppmのクマリンが添加されており、軽油中のクマリン有無を確認する方法が石油学会規格(JPI-5S-71-2010)で決まっています。

クマリンは異性化するとトランス-*o*-ヒドロキシケイヒ酸になり、

蛍光を発するため、その蛍光強度を測定することで、クマリンを定量することができます。

図1にクマリン標準溶液の濃度違いの蛍光スペクトルを、図2に検量線を示します。検量線の相関係数の二乗である r^2 は0.99965となり、精度よく定量できることがわかります。詳細は「島津アプリケーションニュース A494 軽油中のクマリンの簡易測定」をご参照ください。

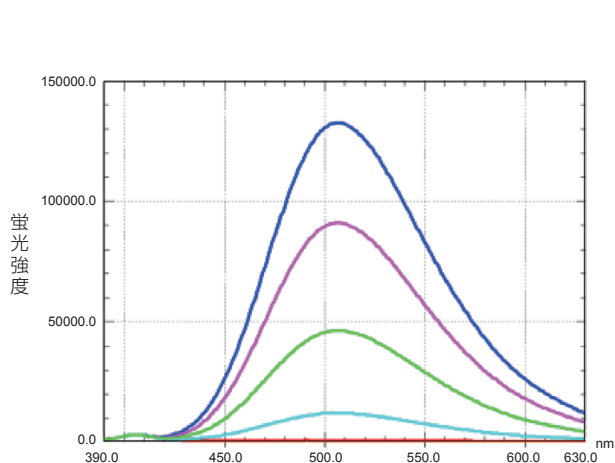


図1 クマリン標準溶液の濃度違いの蛍光スペクトル

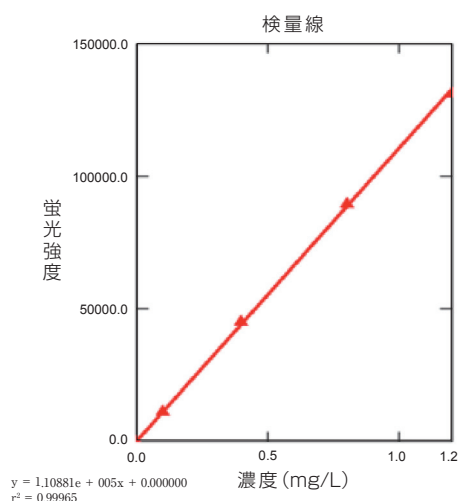


図2 クマリン標準溶液の濃度違いの検量線

2. 食品分野

[牛乳の分類・判別]

市販の無脂肪乳、低脂肪乳、特濃乳の三次元蛍光スペクトルを図3に示します。三次元蛍光スペクトルより、種類を区別できる可能性が示唆されました。

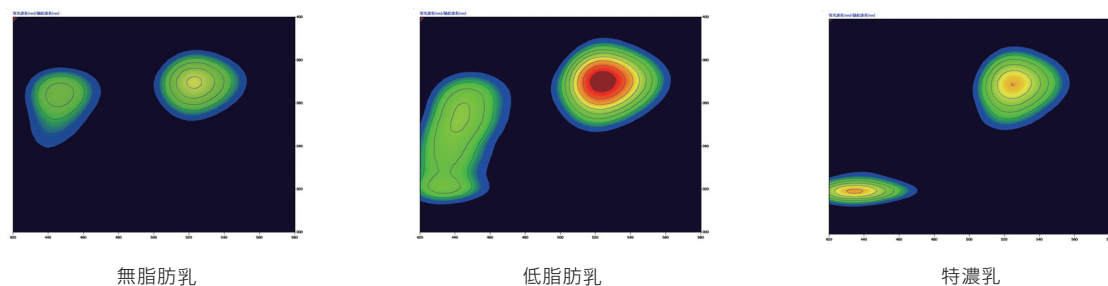


図3 市販の無脂肪乳、低脂肪乳、特濃乳の三次元蛍光スペクトル

3. 電気・電子分野

[固体半導体材料の蛍光量子効率測定]

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蛍光量子効率または蛍光量子収率と言い、蛍光物質の発光効率や発光強度を評価する際の重要な指標となっています。RF-6000の付属品の積分球ユニットを使用すると蛍光物質の量子効率を容易に求めることができます。

積分球ユニットを使って、有機ELデバイスの発光層に使われる固体半導体材料(トリス(8-ヒドロキシキノリナト)アルミニウム)

の蛍光量子効率を測定した例を図4に示します。図4では、「AF」は試料に照射された光子数と試料によって吸収された光子数の比、「QEIn」は量子効率、「QEex」は試料に照射された光子数と蛍光として放射された光子数の比を示します。

LabSolutions RFソフトウェアを用いると、直感的な操作で、瞬時に蛍光量子効率(蛍光量子収率)を算出することができます。

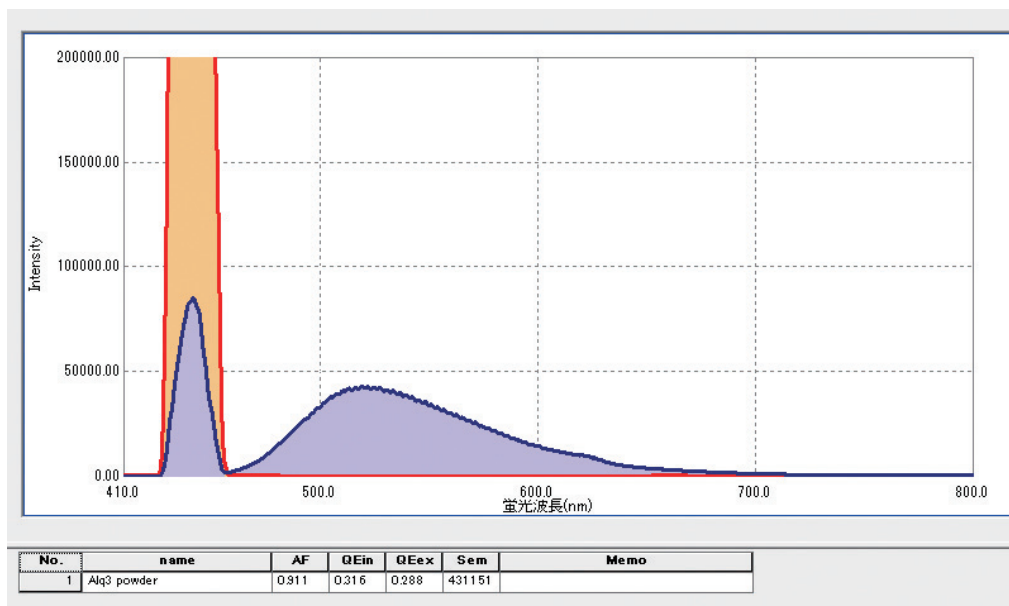


図4 固定半導体材料の蛍光量子効率

4. 環境分野

[水中のオイル測定 ASTM D5412]

アメリカ材料試験協会(American Society for Testing Materials: ASTM)のテスト規格(ASTM D5412)では、水中に含まれるオイル類の、発がん性物質に分類されている多環芳香族炭化水素の分析を規定しています。多環芳香族炭化水素5種の混合液の蛍光スペクトルを図5に示します。通常の測定では5種類が混合したスペクトルしか得られませんが、シンクロスキャン※を行うと、複数種の成分が混在していても、図6に示すように各成分のスペクトルを確認することができます。

※シンクロスキャンとは、分光蛍光光度計の励起分光器と蛍光分光器を一定波長間隔ずらした状態で両方を同時に走査するスキャンモードです。

詳細は「島津アプリケーションニュース A500 同時蛍光法による分離分析」をご参照ください。

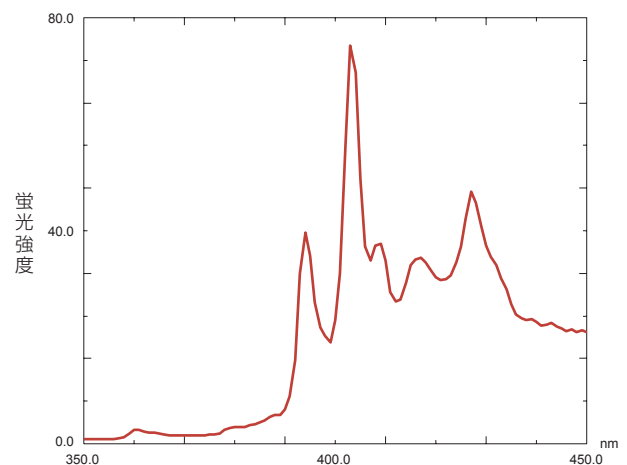


図5 多環芳香族炭化水素5種混合物の蛍光スペクトル (Ex. 300 nm)

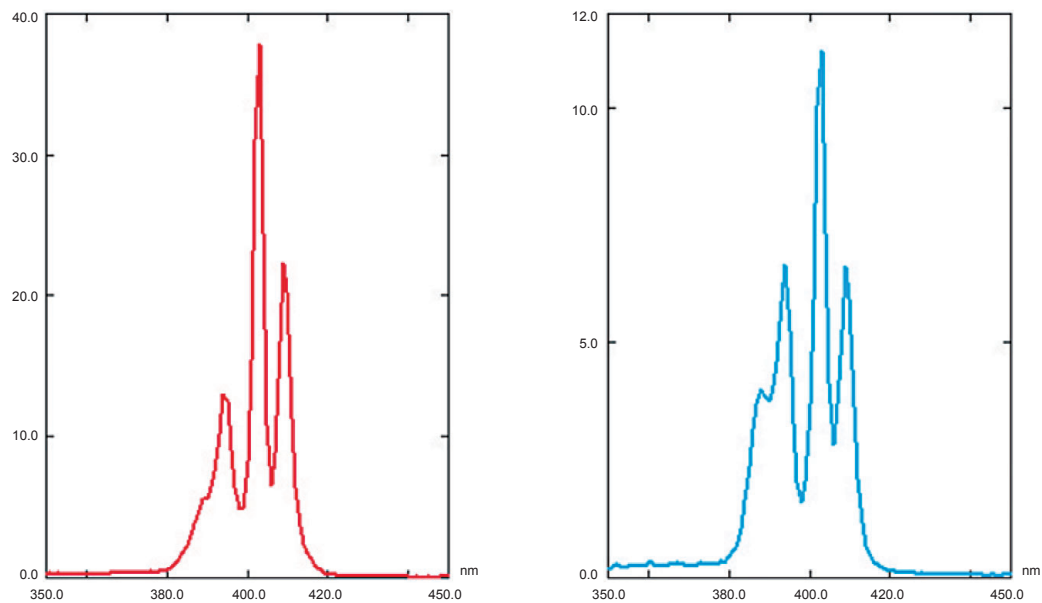


図6 左: ベンゾ[a]ピレンのシンクロスキャンスペクトル
 右: 多環芳香族炭化水素5種混合物のシンクロスキャンスペクトル
 (双方ともoffset 6 nm)

5. ライフサイエンス分野

[DNA検出用蛍光色素の測定]

ウイルス検査キットには蛍光色素プローブが使われます。この蛍光色素プローブはターゲットウイルスのDNAに相補的に結合します。この蛍光プローブと相補的に結合したDNAの蛍光量を測定することで、ウイルスの有無を確認することができます。図7に蛍光プローブ色素の三次元スペクトルの一例を示します。少量

のサンプルを希釈しても、分光蛍光光度計を用いると感度よく確認することができます。詳細は「島津アプリケーションニュース A490 高速三次元スペクトル測定機能を用いたDNA検出用蛍光プローブの蛍光測定」をご参照ください。

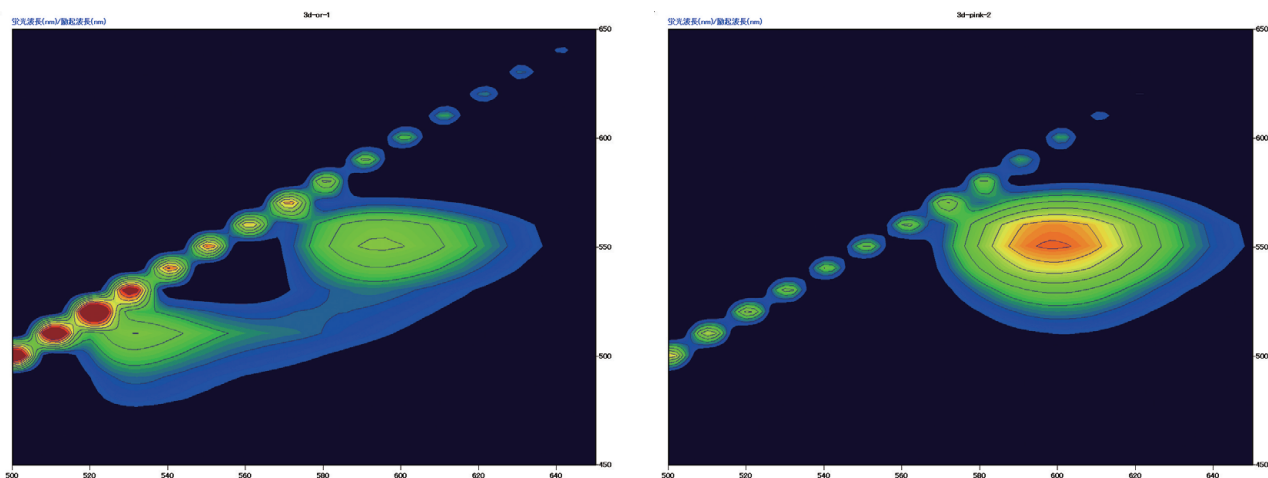


図7 2種類の蛍光色素プローブの三次元スペクトル

6. 医薬分野

[塩酸デュロキセチンの測定]

米国薬局方(USP)収載化合物である塩酸デュロキセチンは抗うつ剤として知られています。図8に塩酸デュロキセチンのスペクトルと検量線を示します。分光蛍光光度計RF-6000を用いると、

低濃度まで正確に測定できることがわかります。(定量下限値は0.0007 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、検出下限値は0.0002 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

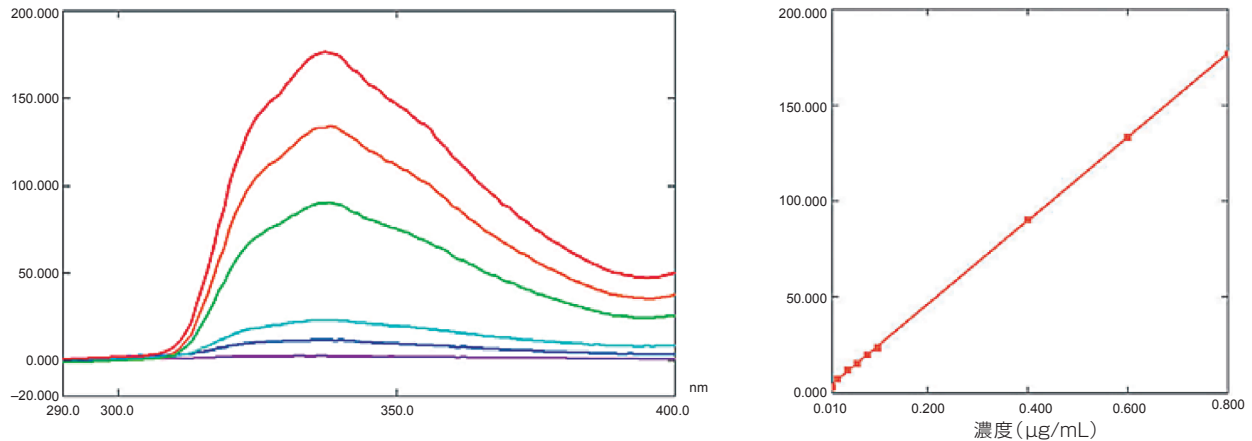


図8 左: 塩酸デュロキセチンのスペクトル 右: 検量線

7. まとめ

分光蛍光光度計は紫外可視分光光度計に比べ感度が良く、RF-6000では装置関数を利用することにより、リアルタイムでスペクトルが補正されます(装置関数に関しては次号で説明します)。そのため、装置関数の載らない真のスペクトルが得られ、試料相互の確認も容易です。また、RF-6000は900 nmまでの長波長測

定も可能であり、広範囲において高感度測定が可能です。さらに、三次元測定が高速であるため、新規開発物質の励起波長と蛍光波長も短時間で確認できます。

このように、分光蛍光光度計には種々の特長があり、様々な分野で欠かせない分析機器です。

Q

蛍光スペクトルに現れる散乱光や高次光を検出しない方法はありますか？

A

蛍光スペクトルを測定した場合に散乱光や高次光を検出することがあります。散乱光や高次光はフィルタを使用することで除去できます。図1に分光蛍光光度計で測定したローダミンBエタノール溶液の3Dスペクトルを示します。縦軸が励起波長、横軸が蛍光波長です。黄線で対角方向に囲んでいる領域は励起波長と蛍光波長が同じであることから、励起光の散乱光であることがわかります。赤線で斜めに囲んでいる領域には溶媒のラマン散乱光、白線で囲んでいる領域にはローダミンBの蛍光スペクトルが確認できます。また、緑線の領域は励起波長の2倍と3倍に観測されていることから、励起光の高次光(2次光: 500 nm~, 3次光: 750 nm~)であることがわかります。青線の領域には、励起光と同時に照射される励起光の1/2の波長の光が現れています。高次光は回折格子の特性によるもので、フィルタを用いることで除去することができます。回折格子による高次光の詳細はUV Talk Letter Vol.3を参照してください。

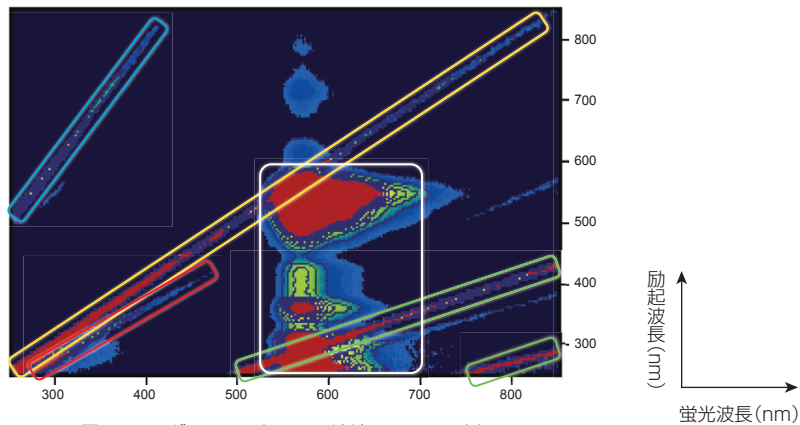


図1 ローダミンBエタノール溶液の3Dスペクトル

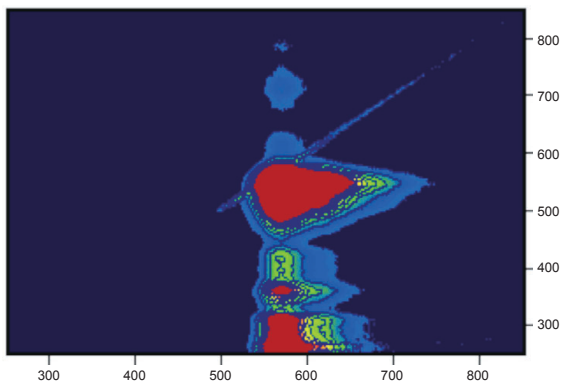


図2 フィルタY-50を使用した場合

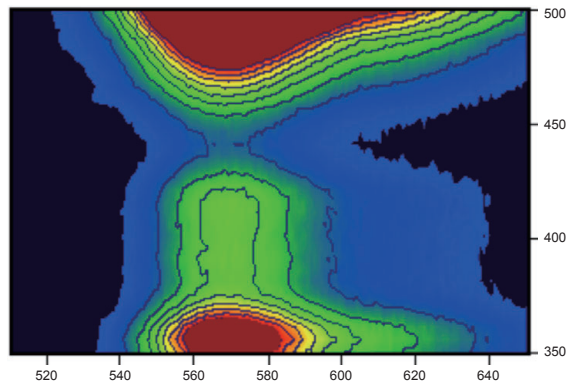


図3 測定領域を狭めた場合

散乱光や高次光をカットするフィルタの選択には、試料の蛍光波長と高次光の波長に注意します。図1の場合、蛍光スペクトルが550～700 nmに現れていることから、一つ目のフィルタの条件は550 nmより長波長を透過できることです。また、図1の緑線の2次光が蛍光スペクトルと重なっていることから、二つ目のフィルタの条件は蛍光スペクトルの半分である275～350 nmの波長をカットできることです。二つの条件を踏まえると、図1の場合はフィルタセット(P/N S204-04691)からY-50を選択します。Y-50を使用して測定した場合は図2に示すように、500 nmより短波長の散乱光と500～850 nmの領域の高次光を検出せずに測定ができます。ただしフィルタを用いる場合は、蛍光強度が減少すること、フィルタがカットする波長領域の信号を検出できないことに注意する必要があります。一方、高次光が試料の蛍光スペクトルと重ならない場合や高次光が試料の蛍光スペクトルと重なっている領域を観測する必要がない場合は、フィルタを使用せずに、散乱光や高次光が現れない範囲に測定波長領域を狭めることで、図3のようにそれらを検出しないこともできます。

表1にフィルタセットに含まれるハイパスフィルタの特性を示します。図4には、一例としてY-50の波長特性を示します。フィルタの名称の数字は透過率が50%になる波長に関連することが多いです。また、フィルタはカットできる励起波長の2倍及び3倍の高次光も同時にカットします。表1を参考に、測定に合ったフィルタを選択します。

表1 フィルタと波長の関係

フィルタ	カットできる励起波長	観測できる蛍光波長
IHU-310	200 ~ 310 nm	310 nm ~
L-42	200 ~ 420 nm	420 nm ~
Y-50	200 ~ 500 nm	500 nm ~
O-56	200 ~ 560 nm	560 nm ~
R-60	200 ~ 600 nm	600 nm ~

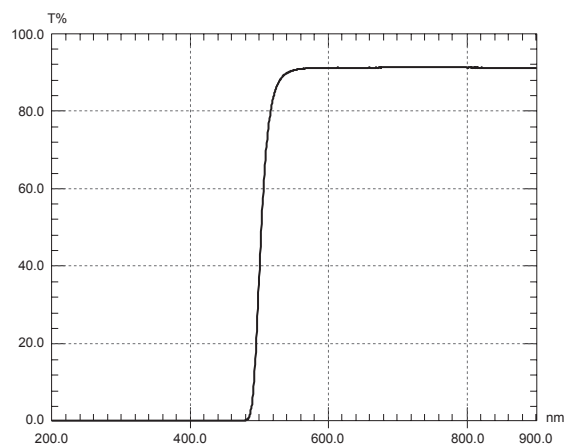


図4 Y-50の波長特性

追い求めたものは至高の精度と操作性

島津分光蛍光光度計RF-6000は、今まで島津が培ってきた技術力と、新しい技術力が結集して開発されました。

比類なき測定精度と、使いやすさを追求してデザインされた新ソフトウェア『LabSolutions RF』による至高のパフォーマンスでお客様の多様な測定ニーズをサポートします。

分光蛍光光度計
Spectrofluorophotometer

RF-6000

