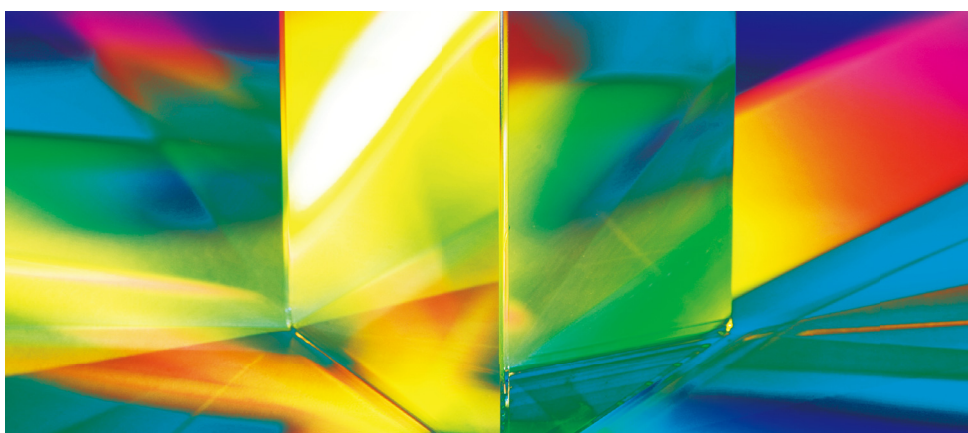


UV

TALK LETTER

Vol. 18
November 2016



紫外可視分光法と蛍光分光法について(下) …… P. 2

アプリケーション 分光蛍光光度計を用いたケミルミネッセンス
およびエレクトロルミネッセンスの分析例と
自動スペクトル補正機能のご紹介 …… P. 7

Q&A 量子収率と量子効率の違いはなんですか? …… P. 10

UV TALK LETTER

紫外可視分光法と蛍光分光法について（下）

1. はじめに

UV Talk Letter vol.17では蛍光の原理や特徴を中心に解説しましたが、本稿では蛍光分光法に用いる分光蛍光光度計の構造や測定できるデータなどについて、紫外可視分光光度計と比較しながら解説します。特に分光蛍光光度計の場合、測定できるデータ

が励起スペクトル、蛍光スペクトルや3Dスペクトルなど複数あるとともに、測定したデータには装置固有の係数が掛かっているため補正が必要があることなどについても解説します。

2. 紫外可視分光光度計と分光蛍光光度計について

■ 紫外可視分光光度計の構造とスペクトルとの関係

まず初めに紫外可視分光光度計の構造を確認します。Fig. 1は島津紫外可視分光光度計UV-2600の簡易的な構成図です。紫外可視分光光度計の場合、主に光源、分光器、試料室、検出器の4つから構成されています。光源には、紫外域用の重水素(D_2)ランプと可視から近赤外域まで対応可能なハロゲン(WI)ランプが使

われています。分光器は、光源からの紫外光または可視光を分光して単色光にします。ダブルビーム光学系の場合、試料室には試料光束用と対照光束用に2つのセルがセットできるようになっています。試料光束と対照光束が各セルを透過した後、それらの光束は検出器で交互に検出されます。

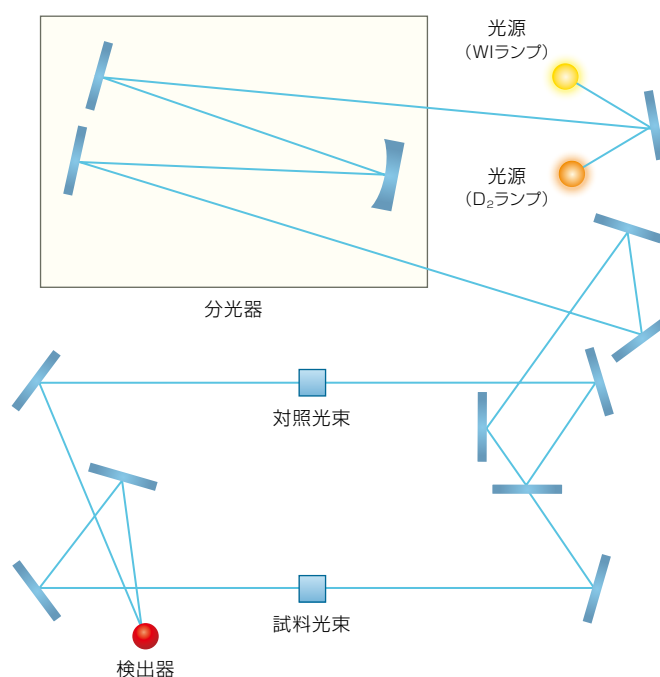


Fig. 1 紫外可視分光光度計の構造

紫外可視分光光度計では、分光器で波長を変化させながら試料の波長毎の透過光を測定し、スペクトルを求めます。また、ベースライン測定(溶媒測定)を行ってから試料測定を行います。ベース

ライン測定時の光量と試料測定時の光量の比を計算するわけですが、光源の分光放射特性、分光器の波長特性、検出器の波長感度特性を考慮するとこの比は(1)式のように表されます。

$$\begin{aligned} \frac{(\text{試料測定時の光量})}{(\text{ベースライン測定時の光量})} &= \frac{[K_1 \times (\text{光源の特性}) \times (\text{分光器の特性}) \times (1 - \text{試料の吸収率}) \times (\text{検出器の特性})]}{[K_1 \times (\text{光源の特性}) \times (\text{分光器の特性}) \times (1 - \text{溶媒の吸収率}) \times (\text{検出器の特性})]} \\ &= \frac{(1 - \text{試料の吸収率})}{(1 - \text{溶媒の吸収率})} \\ &= (1 - \text{試料の吸収率}) \end{aligned} \quad (1)$$

ここで、 K_1 は定数です。通常、紫外可視域でほとんど吸収のない溶媒が使われるので、溶媒の吸収率はほぼゼロとなります。(1)式を100倍した値が透過率、(1)式の逆数の10を底とした対数値が吸光度として紫外可視分光光度計では表示されますが、それらは装置特性を含まないので、型式の異なる紫外可視分光

光度計で測定しても比較が可能です。ダブルビーム系ではさらに対照光束との比を測定することで、光源の変動は測定結果に影響を及ぼさなくなります。ダブルビーム系とシングルビーム系の違いはUV Talk Letter vol. 9を参照ください。

■ 分光蛍光光度計の構造とスペクトルとの関係

次に分光蛍光光度計の構造を確認します。Fig. 2は島津分光蛍光光度計RF-6000の簡易的な構成図です。分光蛍光光度計の場合、主に光源、励起側分光器、試料室、蛍光側分光器、検出器の5つから構成されています。詳細は後述しますが、蛍光強度は光源の強度に比例するため、光源には高輝度のキセノン(Xe)ランプを使用しています。単色化した励起光を試料に照射するために、励起側分光器で光源からの光を分光して単色光にします。分光蛍光光度計の場合、試料室は対照光束のないシングルビーム系で、1つのセルのみセットできます。次に試料から発する蛍光を波長毎に分光する蛍光側分光器があります。RF-6000の場合、

励起光が蛍光スペクトルへ及ぼす影響を抑えるために、励起光に対して直角方向で蛍光を検出する構造になっています。これは励起光が照射されたセル内の領域から蛍光が全方向に発する性質を利用しています。また、Fig. 3に示すように使用するセルが分光蛍光光度計と紫外可視分光光度計では異なります。分光蛍光光度計の場合、直角方向で蛍光を観測することから、使用するセルとしてはすべての面が研磨されている4面研磨のセルを必要とします。紫外可視分光光度計の場合、入射光と透過光が通過する面が研磨されている2面研磨のセルを必要とします。検出器では、蛍光側分光器で分光された試料の蛍光が検出されます。

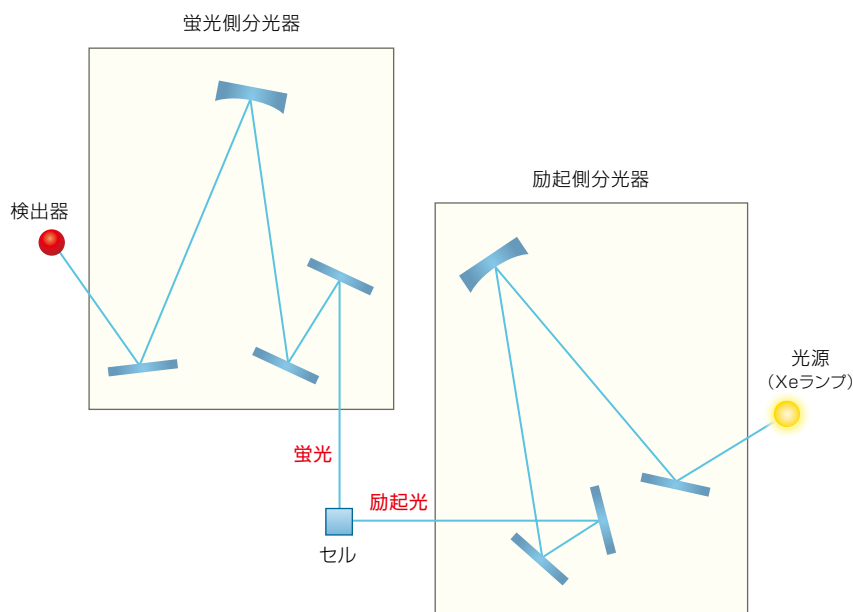


Fig. 2 分光蛍光光度計の構造



Fig. 3 左: 2面研磨セル 右: 4面研磨セル

分光蛍光光度計では主に蛍光スペクトルと励起スペクトルの2つのスペクトルを測定することができます。蛍光スペクトル測定時は、励起波長を固定し(励起側分光器は1つの波長のみ取り出し)、蛍光側分光器を走査することで、試料が発する蛍光を波長毎に測定します。励起スペクトル測定時は、蛍光波長を固定し(蛍光側分光器は1つの波長のみ取り出し)、励起側分光器を走査することで、試料が最も蛍光を発する励起波長を測定します。3Dスペクトル測定は、一定間隔毎に励起波長を変化させながら、励起波長毎の蛍光スペクトルを測定するため、どの励起波長で試料が蛍光

を発しているかわかります。

分光蛍光光度計で励起/蛍光スペクトルを測定した場合、得られたデータには装置の特性が含まれます。励起スペクトルの場合、光源の分光放射特性と励起側分光器の波長特性が試料それ自体の励起スペクトルに乘じられることとなります。一方、蛍光側分光器の波長特性と検出器の波長感度特性は、蛍光側分光器が特定の波長に固定されているため励起スペクトルの波長毎の強度には影響しません。装置特性を含んだ励起スペクトルを「見掛けの励起スペクトル」とすると(2)式で表されます。

$$(\text{見掛けの励起スペクトル}) = K_2 \times (\text{光源の特性}) \times (\text{励起側分光器の特性}) \times (\text{試料の励起スペクトル}) \quad (2)$$

ここで、 K_2 は定数です。

また、蛍光スペクトルの場合、試料それ自体の蛍光スペクトルに蛍光側分光器の波長特性と検出器の波長感度特性が乘じられることとなります。一方、光源の分光放射特性と励起側分光器の波長

特性は、励起側分光器が特定の波長に固定されているため蛍光スペクトルの波長毎の強度には影響しません。装置特性を含んだ蛍光スペクトルを「見掛けの蛍光スペクトル」とすると(3)式で表されます。

$$(\text{見掛けの蛍光スペクトル}) = K_3 \times (\text{試料の蛍光スペクトル}) \times (\text{蛍光側分光器の特性}) \times (\text{検出器の特性}) \quad (3)$$

ここで、 K_3 は定数です。

「見掛けの励起スペクトル」と「見掛けの蛍光スペクトル」は装置特性を含んでいるので、装置の型式によってそれらのスペクトル形状が異なり、また同じ装置でも経年変化によってスペクトル形状が変化する可能性があります。そのため装置特性を除去した励起スペクトルと蛍光スペクトルが必要となります。

(2)式の「(光源の特性)×(励起側分光器の特性)」と(3)式の

「(蛍光側分光器の特性)×(検出器の特性)」で示される装置特性は、詳細は省略しますが、波長に対する輝度分布が既知の標準タングステンランプや光量子計(ローダミンBのエチレングリコール溶液)を用いると使用している分光蛍光光度計ごとを求めることができます。(2)式と(3)式をそれぞれの装置特性で除したスペクトルを補正励起スペクトルおよび補正蛍光スペクトルと言い、(4)式と(5)式のように表されます。

$$\begin{aligned} (\text{補正励起スペクトル}) &= \frac{(\text{見掛けの励起スペクトル})}{[(\text{光源の特性}) \times (\text{励起側分光器の特性})]} \\ &= K_2 \times (\text{試料の励起スペクトル}) \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} (\text{補正蛍光スペクトル}) &= \frac{(\text{見掛けの蛍光スペクトル})}{[(\text{蛍光側分光器の特性}) \times (\text{検出器の特性})]} \\ &= K_3 \times (\text{試料の蛍光スペクトル}) \end{aligned} \quad (5)$$

補正励起スペクトルと補正蛍光スペクトルは装置特性が除去され、試料それ自体の励起スペクトルと蛍光スペクトルとなるので、異なった型式の装置間での比較が可能で経年変化も受けません。

3. 吸光度と蛍光強度

■ 固定波長での吸光度と蛍光強度

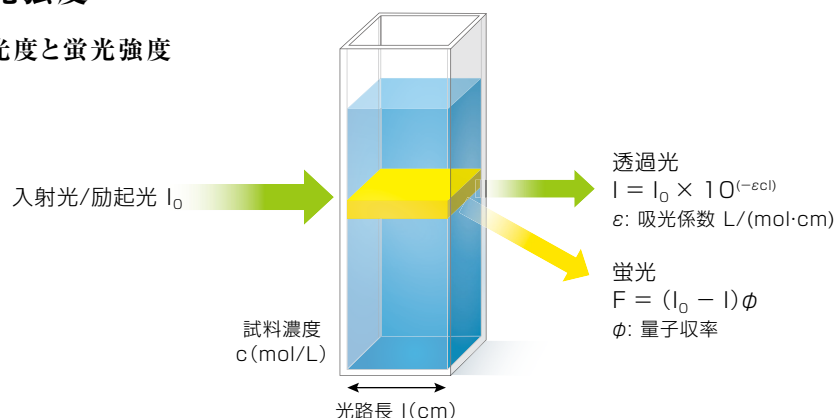


Fig. 4 セル内での吸収・蛍光

Fig. 4に示すように、試料の濃度が c (mol/L)、セルの光路長が l (cm)で、測定波長での試料の吸光係数が ϵ (L/(mol·cm))、入射光の強度が I_0 、その透過光の強度が I の時、吸光度 A はLambert-Beerの法則にしたがって(6)式で与えられます。

$$A = \log_{10} (I_0/I) = \epsilon c l \quad (6)$$

また、透過率 T は(7)式で表されます。

$$T(\%) = (I/I_0) \times 100 \quad (7)$$

一方、蛍光はセル内で吸収された光 ($I_0 - I$) が発光する現象で、蛍光強度を F とすると

$$F = (I_0 - I) \Phi = (1 - I/I_0) \Phi I_0 \quad (8)$$

で表され、蛍光強度は入射光(光源の強度)に比例します。ここで、 Φ は量子収率と呼ばれ、(9)式で示すように試料が吸収した励起光の光子数(N_{abs})と蛍光として放出した光子数(N_{em})の比で、発光効率を示す重要な指標です。なお、(8)式は波長を固定した状態での蛍光強度を論じているので、前節で述べた分光器と検出器の波長特性が定数で乗じられることになりますが、ここでの取り扱いでは問題とならないので省略します。

$$\Phi = N_{\text{em}}/N_{\text{abs}} \quad (9)$$

(6)式を自然対数で表すと

$$(1/\log_e 10) \times \log_e (I_0/I) = \epsilon c l \quad (10)$$

(10)式から

$$I/I_0 = e^{-2.303 \epsilon c l} \quad (11)$$

(8)、(11)式より

$$F = (1 - e^{-2.303 \epsilon c l}) \Phi I_0 \quad (12)$$

となります。濃度が十分に薄い時、(12)式は

$$F = 2.303 \epsilon c l \Phi I_0 = 2.303 A \Phi I_0 \quad (13)$$

で表され、蛍光強度は吸光度と同様に濃度に比例します。

(6)式に示すように、吸光度は入射光と透過光の強度比から求められます。したがって、濃度が薄くなったとき、入射光と透過光の強度に差が見分けられるか否かが検出下限を決定することになります。一方、蛍光強度は発光現象を直接測定した値で、言わばゼロからの積み重ねとなるので、蛍光分光法は紫外可視分光法よりも感度が高くなります。

補正励起スペクトルと吸収率スペクトル

見掛けの励起スペクトルを $E_x(\lambda)$ 、光源の強度を $L(\lambda)$ 、励起側分光器の波長特性を $M(\lambda)$ (ここで、 λ は波長を表します)とすると、見掛けの励起スペクトルは(14)式で表せます。

$$\begin{aligned} E_x(\lambda) &= K_4 \times [L(\lambda) \times M(\lambda) - \alpha(\lambda) \times L(\lambda) \times M(\lambda)] \times \Phi(\lambda) \\ &= K_4 \times [1 - \alpha(\lambda)] \times L(\lambda) \times M(\lambda) \times \Phi(\lambda) \end{aligned}$$

(14)

ここで、 K_4 は定数、 $\alpha(\lambda)$ は入射光がセルを透過する比率(透過率の1/100の値)です。(14)式から補正励起スペクトルは(15)式で表せます。

$$\begin{aligned} (\text{補正励起スペクトル}) &= E_x(\lambda) / [M(\lambda) \times L(\lambda)] \\ &= K_4 \times [1 - \alpha(\lambda)] \times \Phi(\lambda) \end{aligned}$$

(15)

量子収率が波長に依存せず一定の場合は、定数として取り扱えるので

$$(\text{補正励起スペクトル}) = K_5 \times [1 - \alpha(\lambda)]$$

(16)

$$K_5 = K_4 \times \Phi(\lambda)$$

(17)

(16)式から補正励起スペクトルは、紫外可視分光光度計から求めた透過率を使って表せる吸収率スペクトル $[1 - \alpha(\lambda)]$ と形状が一致することになります。また、励起スペクトルの強度に直線性がある場合は、濃度が十分に低いので、(16)式は前節に準じて

$$\begin{aligned} (\text{補正励起スペクトル}) &= K_5 \times 2.303 \varepsilon(\lambda) c l \\ &= K_6 \times A(\lambda) \end{aligned}$$

(17)

$$K_6 = K_5 \times 2.303$$

(18)

で表せ、吸光度で表示されたスペクトルと形状が一致することになります。

4. むすび

今回は紫外可視分光光度計と分光蛍光光度計の装置構成や吸光度と蛍光強度、スペクトル補正などについて、特徴を比較しながら述べました。これらのまとめをTable 1に示します。紫外可視分光法と蛍光分光法にはそれぞれ特徴がありますが、それらを理解することで分光分析法として両分光法をより活用できると考えます。

Table 1 紫外可視分光法と蛍光分光法の比較

	蛍光測定	紫外可視吸光度測定
装置構成	光源 → 励起分光器 → 試料室 → 蛍光分光器 → 検出器	光源 → 分光器 → 試料室 → 検出器
長所	・ 蛍光（発光現象）を直接検出し、言わばゼロからの積み重ねとなるので感度が高い（紫外可視吸光度測定法に比べて3桁以上高い*）。 ・ 物質により励起・蛍光波長が異なるので、選択性がある。	・ 紫外・可視領域に吸収があれば全ての物質で測定可能。 ・ ベースライン測定をするため、装置特性を含まない試料のスペクトルを測定することができる。 ・ 異なった紫外可視分光光度計で測定しても、スペクトルや吸光度は基本的に一致する。
短所	・ 紫外・可視領域に吸収があっても蛍光を発するとは限らない。 ・ 分光器や検出器の装置特性が、試料の励起・蛍光スペクトルに含まれる。	・ 入射光と透過光の比（差）を検出する。検出下限値は入射光と透過光に差が現れるかに起因する。 ・ 蛍光測定法よりも感度が低い。
その他	・ 補正した励起スペクトルは、吸光度スペクトルと同じ形状を示す。 ・ 励起状態の振動エネルギー準位間のエネルギー差が励起スペクトルに、基底状態の振動エネルギー準位間のエネルギー差が蛍光スペクトルに反映する。	・ 励起状態の振動エネルギー準位間のエネルギー差が紫外可視スペクトルに反映する。

* 日本分析学会 編 井村 久則、菊地 和也、平山 直紀、森田 耕太郎、渡會 仁、分析化学実技シリーズ 機器分析編「吸収・蛍光分析」、共立出版。

分光蛍光光度計を用いたケミルミネッセンス およびエレクトロルミネッセンスの分析例と 自動スペクトル補正機能のご紹介

物質には吸収したエネルギーを光で放出するものがあります。この発光現象をルミネッセンスと言い、刺激源によっていろいろな種類に分けられます。

光を刺激源とするものをフォトルミネッセンス、化学反応を刺激源とするものをケミルミネッセンス、電気エネルギーを刺激源とするものをエレクトロルミネッセンス、また、蛍の発光のように生物エネルギーによるものをバイオルミネッセンスといいます。

今回は、装置毎に異なる装置関数を自動で補正する「自動スペクトル補正機能」に加えて、電気エネルギーおよび化学反応を刺激源としたエレクトロルミネッセンスとケミルミネッセンスの分析例を紹介します。

1. 自動スペクトル補正機能

同じ試料を異なった分光蛍光光度計で測定した場合、それぞれで光源の放射特性や光学系の分光特性などの装置関数が異なるため、スペクトル上のピークの強度や位置が異なります。Fig. 1に、補正スペクトルと未補正スペクトルを比較した結果を示しますが、スペクトル形状やピーク位置に違いが確認できます。島津

分光蛍光光度計RF-6000では、装置関数が除かれた補正スペクトルと装置関数が重畳した未補正スペクトルが同時に保存されます。スペクトル補正を行うことで、異なった装置で測定したデータを比較することができます。

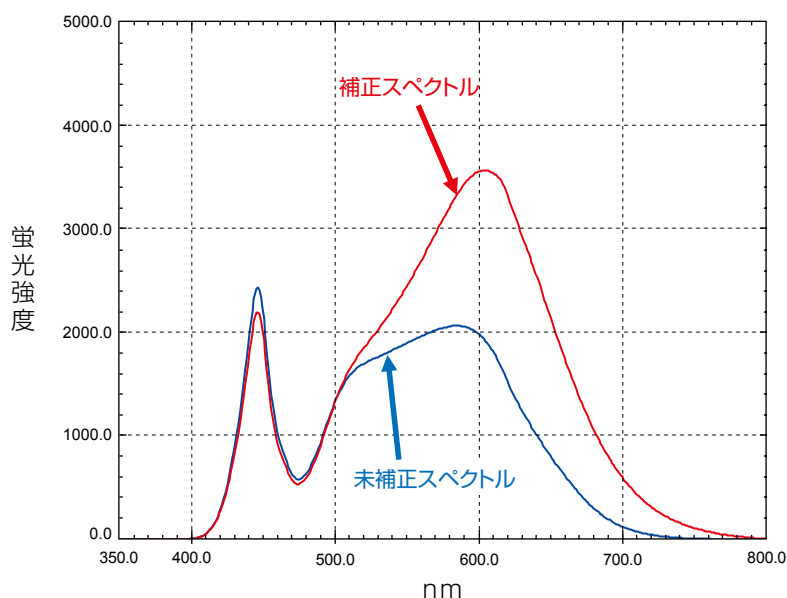


Fig. 1 補正スペクトルと未補正スペクトル

2. LED電球の発光スペクトル測定(エレクトロルミネッセンス)

LED電球など可視光を放射する光源は特有の発光スペクトルを持ち、どの波長の光をどの程度多く発しているかで光の色合いが決まります。そのため、光源がどのような光を放つかを知るために、その発光スペクトルを測定することは重要です。RF-6000は装置関数を自動除去する機能(自動スペクトル補正機能)を有するため、装置関数の影響を受けない正確な発光スペクトルを測定することができます。

市販のLED電球を測定した例を示します。電球色および昼白色のLED電球の写真をFig. 2に、各電球の蛍光スペクトル(電球

色4種、昼白色4種)の重ね描きをFig. 3およびFig. 4に示します。Fig. 3より、電球色のLED電球は、可視光領域において緑系統(500-600 nm)や赤系統(600-700 nm)の光が多く、その混色により黄色味を帯びた光となっていることがわかります。またFig. 4から、昼白色のLED電球は青系統(400-500 nm)、緑系統、赤系統の光の面積がほぼ同じであり、それらが混合して白色になってい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 A497 LED電球の発光スペクトル」をご参照ください。

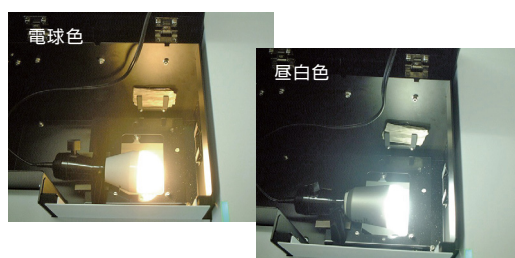


Fig. 2 LED電球

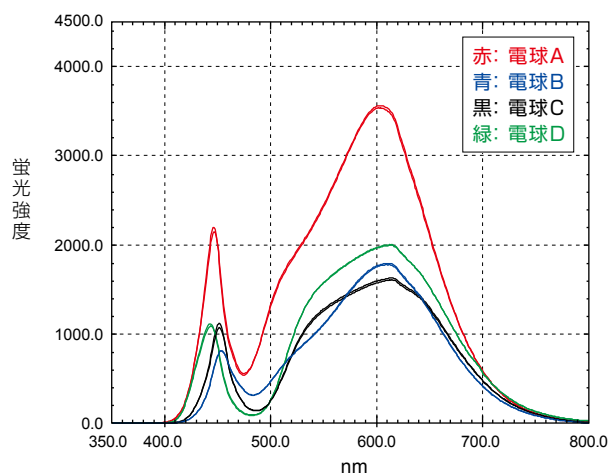


Fig. 3 電球色の発光スペクトル

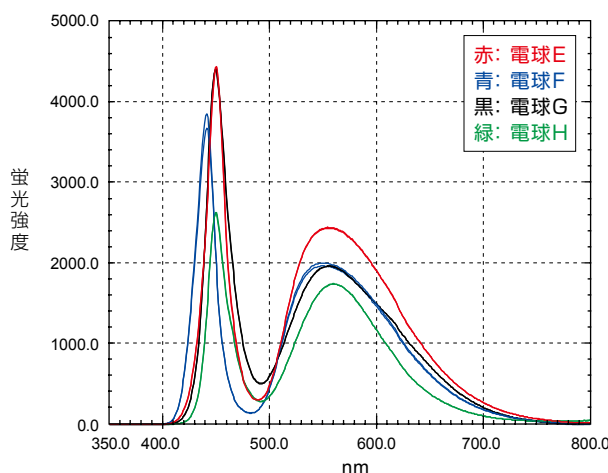


Fig. 4 昼白色の発光スペクトル

3. 過シュウ酸の発光過程とケミカルライト蛍光色素のスペクトル測定(ケミルミネッセンス)

過シュウ酸の化学発光は、蛍光色素を含む溶液中でシュウ酸エステルと過酸化水素の化学反応によって発生する現象で、発光効率が高く、発光時間が長いことが特徴です。発光過程をFig. 5に示します。

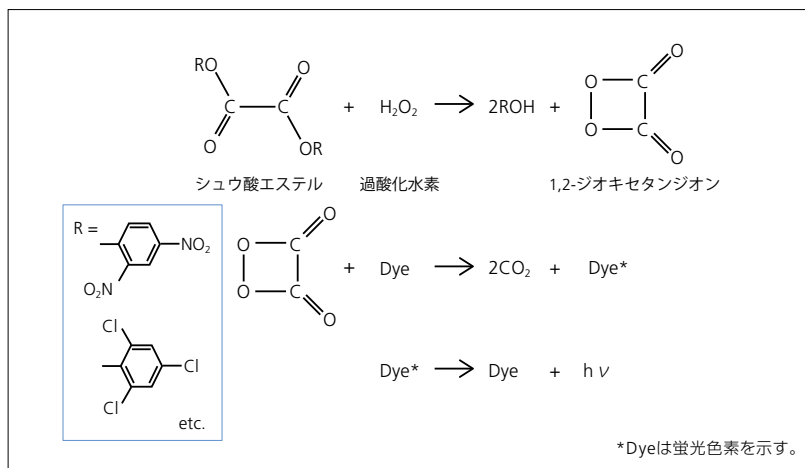


Fig. 5 過シュウ酸の化学発光過程

Fig. 5に示したように、シュウ酸エステルは過酸化水素によって酸化され、ROHと1,2-ジオキセタンジオンになります。1,2-ジオキセタンジオンは高エネルギー反応中間体で、蛍光色素と電子を交換しながら二酸化炭素に分解しますが、電子が蛍光色素へ戻る際に最低空軌道に入るため蛍光色素が励起状態になります。励起状態の蛍光色素は光(hν)を放出して基底状態に戻りますが、この際に放出される光の波長は使用する蛍光色素に依存します。

市販のケミカルライト3種類をFig. 6に示します。ケミカルライトはシュウ酸エステルと蛍光色素が溶液状態で密閉した薄いガラス容器に入れられ、そのガラス容器は触媒が加わった過酸化水素水と共にポリエチレンの筒の中に入れてられています。ポリエチレンの筒を曲げるとガラス容器が破壊されて両液が混合し発光することによって、ケミカルライトは光ります。ケミカルライトで使用する蛍光色素は多環芳香族系である場合が多く、蛍光色素が励起状態から基底状態に戻る際に放出される光の波長によって色が異なります。



Fig. 6 ケミカルライト

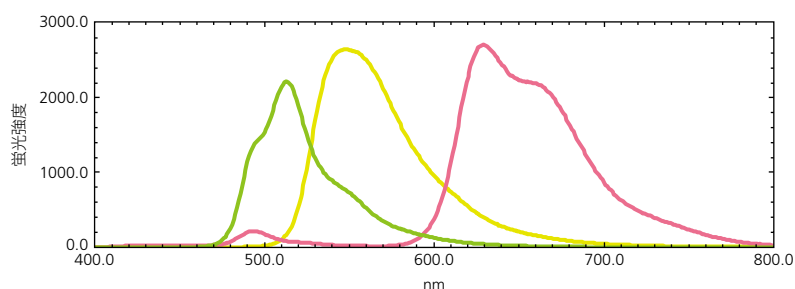


Fig. 7 ケミカルライトの蛍光スペクトル

Fig. 7は測定した黄緑色、黄色、赤色のケミカルライトの発光スペクトルで、スペクトルの色とケミカルライトの色が対応しています。

4. まとめ

今回はエレクトロルミネッセンスとケミルミネッセンスのスペクトル測定例を紹介しました。ここに示したスペクトルは自動スペクトル補正後のスペクトルであり、装置関数の除かれた真のスペクトルと言えます。

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
橋本紅良



量子収率と量子効率の違いは何ですか？



蛍光物質が吸収した励起光の光子数と蛍光として放出した光子数の比は量子収率と呼ばれています。量子収率を求める方法として相対法と絶対法の2つの方法があり、それぞれの方法で求められた量子収率を相対量子収率(または量子収率)と絶対量子収率(または量子効率)と呼びます。

相対法による測定法は、量子収率既知の蛍光物質を標準試料として用い、未知試料の量子収率を算出します。算出式としては(1)式のように表せます。

$$\phi_{un} = \phi_{st} \times \left(\frac{F_{un}}{F_{st}} \right) \times \left(\frac{Abs_{st}}{Abs_{un}} \right) \times \left(\frac{n_{un}^2}{n_{st}^2} \right) \times \left(\frac{D_{un}}{D_{st}} \right) \quad (1)$$

ここで、 ϕ は量子収率、 Abs は励起波長における吸光度、 F は補正蛍光スペクトルの面積、 n は溶媒の屈折率、 D は蛍光スペクトル測定時に希釈した場合の希釈率です。(1)式で、添え字の st と un はそれぞれ標準試料と未知試料を表します。相対法の場合、まず量子収率既知の標準試料を選ぶ必要があります。また、標準/未知試料の蛍光スペクトルを分光蛍光光度計で測定するだけでなく、紫外可視分光光度計等を用いて励起波長における吸光度を測定する必要があります。濃度が高い試料は、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ので希釈して測定します。希釈の目安は励起波長における吸光度が0.05 Abs以下を推奨しています。ウランエタノール溶液とローダミンBエタノール溶液の吸光度スペクトルをFig. 1に、蛍光スペクトルをFig. 2に示します。相対法では、2つの試料の蛍光スペクトルが計算に必要であることがわかります。詳細はアプリケーションニュース No. A504を参照ください。

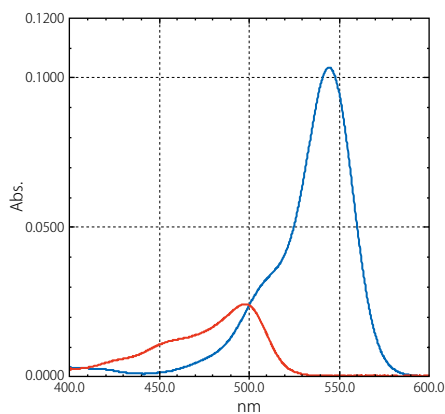


Fig. 1 ウランエタノール溶液(赤線)とローダミンBエタノール溶液(青線)の吸光度スペクトル

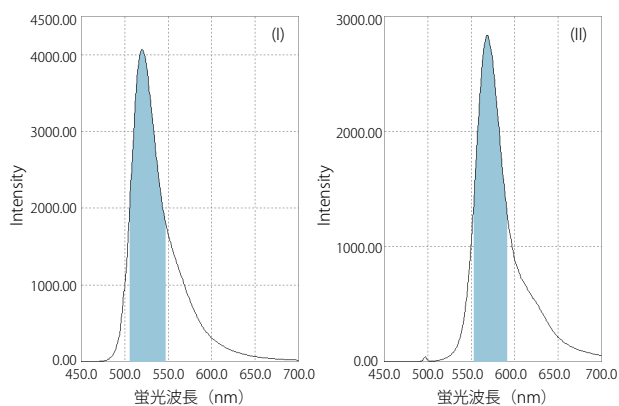


Fig. 2 ウランエタノール溶液(I)とローダミンBエタノール溶液(II)の蛍光スペクトル

絶対法による測定法は、積分球を用いて未知試料が吸収した光子数と蛍光の光子数を、それぞれ励起光の散乱光面積と蛍光面積から算出し、量子収率を算出します。算出式としては(2)式のように表せます。

$$\phi = \left(\frac{S_s E_m - S_b E_m}{S_b E_x - S_s E_x} \right) \quad (2)$$

ここで、 $S_s E_m$ と $S_b E_m$ はそれぞれ試料とブランク液(溶媒のみ)の補正蛍光スペクトルの面積、 $S_s E_x$ と $S_b E_x$ はそれぞれ試料とブランク液の励起光による散乱光面積です。測定手順としては、まずブランク液をセットし蛍光スペクトル測定から、溶媒による励起光の散乱光と蛍光を観測します。次に試料をセットし蛍光スペクトル測定から、試料による励起光の散乱光と試料による蛍光を観測します。(2)式の分母は試料による励起光の吸収量を表し、分子は試料による蛍光量を表すことから量子効率が求まります。Fig. 3に硫酸キニーネ溶液(溶媒:1.0N 硫酸)と溶媒の蛍光スペクトルを示します。絶対法では溶媒と試料の蛍光スペクトルとともに励起光の散乱光が計算に必要であることがわかります。詳細はアプリケーションニュース No. A496を参照ください。

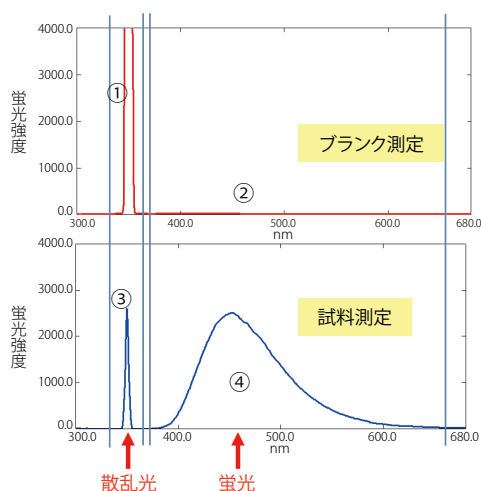


Fig. 3 絶対法による測定手順 ① $S_b E_x$ ② $S_b E_m$ ③ $S_s E_x$ ④ $S_s E_m$

Table 1に量子収率と量子効率のそれぞれのメリットとデメリットを比較した結果を示します。

Table 1 量子収率と量子効率の比較

	量子収率 (相対量子収率)	量子効率 (絶対量子収率)
メリット	・ 蛍光スペクトルの比較が簡便 ・ 必要な付属品は4面研磨セルのみで、安価	・ 標準試料が不必要 ・ 吸光度測定が不必要
デメリット	・ 量子収率が既知の標準試料が必要 ・ 標準/未知試料の吸光度が必要 ・ 吸光度測定後に蛍光測定する場合希釈する必要がある場合がある	・ 積分球が高価 ・ 積分球の劣化とともにスペクトル補正を行う必要があり、管理が手間

