

# 赤-近赤外測定用分光蛍光光度計の光量子計色素の検討

大塚 正 男\*      伊 東 正 邦\*\*  
及 川      充\*\*\*      小 口 正 信\*\*\*

## Investigation of the Spectrofluorophotometric Quantum Counter Dye for Red to Nearinfrared range Measurement

Masao OHTSUKA, Masakuni ITOH, Mitsuru OIKAWA  
and Masanobu OGUCHI

Spectrofluorophotometric quantum counter dye for fluorescent samples under excitation of light 600-700 nm wavelength range was investigated.

Five kinds of cyanine, three of methylene blue and three of phthalocyanine dyes respectively, were provided for examination. As the results of characteristic measurements, we found that methylene blue trihydrate has most superior characteristics for absorption-fluorescent spectra and for stability.

Measuring the fluorescent spectra of fluorescent samples (cyanine dye) under various exciting light intensities, using the methylene blue trihydrate for spectrofluorophotometric quantum counter dye, the practical accuracy of this quantum counter dye was proofed.

Adjustment of the compensator of spectrofluorophotometer enabled us to measure corrected fluorescent spectrum until wavelength by 830 nm. Consequently, relative fluorescent quantum yields for samples such as cyanine dyes has become obtainable till nearinfrared wavelength range.

### 1. 緒 言

蛍光量子収率は色素レーザに用いる色素や生体色素などの研究に重要な情報をもたらす。

市販の分光蛍光光度計は、蛍光量子収率を求めるとき、蛍光量子収率既知の物質との相対比較により行っている。

このため分光蛍光光度計は測定上、励起光の強度を何らかの方法で常に一定にするか、等強度に換算することが必要である。その一つが光量子計

を用いる方法<sup>1)</sup>、電気的な制御と組合せて励起光強度が実質的な換算として常に一定になるようにしている。最近の高級型の分光蛍光光度計はほとんどこの方式によっている<sup>2)</sup>。

光量子計に通常使われている色素溶液は Rhodamine B のエチレングリコール溶液で、この溶液が吸収を示すおよそ 250~600 nm のスペクトル範囲で蛍光量子収率を測定しようとする試料の励起光とすることができる。

600 nm より長波長に吸収がある試料の蛍光量子収率の測定には Rhodamine B に変る適当な光量子計色素が必要である。

この報告は 600~700 nm に吸収を持つ物質の

\* 画像工学科講師

\*\* 58年3月修士卒、現・大日本スクリーン製造(株)

\*\*\* 画像工学科教授

昭和59年9月22日受理

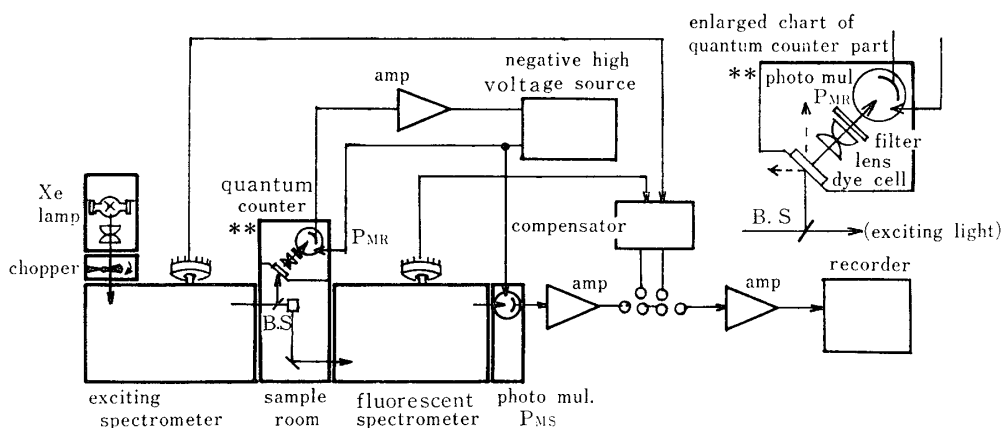


Fig. 1 Block diagrams of the spectrofluorophotometric apparatus (Shimadzu RF-502).

蛍光量子収率が測定できる分光蛍光光度計に用いる光量子計色素の検討を行ったものである<sup>3)</sup>。

## 2. 光量子計の動作と光量子計色素の条件

光量子計の動作を説明するために Fig. 1 に分光蛍光光度計のブロックダイヤグラムを示した。このブロックダイヤグラムは島津製作所 RF-502 型のもので<sup>4)</sup>、この型式のものを実験では使用した。

この装置で蛍光側ホトマルによって検出される蛍光の強度を  $F(\lambda_{EM})$ 、(単位時間当りの光子数) とすると

$$F(\lambda_{EM}) = K \cdot f(\lambda_{EM}) \cdot I(\lambda_{EX}) \cdot E \cdot \phi_{\lambda} \quad (1)$$

ここで

$K$  ; 2.303  $c \cdot d$ 、セルの光路長 ( $d$ ) と試料の溶液濃度 ( $c$ ) 等に関する定数 (ただし、測定上  $c$  は希薄溶液)

$f(\lambda_{EM})$  ; 蛍光側分光器の分光特性と検出器の分光特性とに関する係数

$I(\lambda_{EX})$  ; 単位時間当りの励起光子数

$E$  ; 試料の分子吸光係数

$\phi_{\lambda}$  ;  $d\phi/d\lambda_{EM}$ 、蛍光の単位波長あたりの蛍光量子収率

である<sup>4,5)</sup>。

これから蛍光量子収率を求めるには測定試料の蛍光スペクトルを全ての波長に対し積分し、これ

をこの試料の吸光度で除した値と、同じように求めた蛍光量子収率既知の試料の値の比から求められる。

(1) 式で  $f(\lambda_{EM})$  は N. B. S (National Bureau of Standard US) の標準ランプをもとにした二次標準ランプのスペクトルのエネルギー分布との差からその特性が求まり、この  $f(\lambda_{EM})$  の補正を Fig. 1 のコンペンセータ (関数発生器) で各スペクトルに対して行っている。従って蛍光側の分光器とホトマルのスペクトル特性は平坦となり、エネルギー補正された蛍光スペクトルが得られる。 $I(\lambda_{EX})$  は夫々の試料の測定時に求めればよいが瞬間的な変動等もあり正確に求めることは不可能である。そこで Fig. 1 のような光量子計と電氣的制御を用いて自動的に  $I(\lambda_{EX})$  が常に一定になるような動作をさせている。

この機構について説明すると励起側分光器で単色にされた励起光はビームスプリッタ (B. S) により一部が光量子計色素溶液に入射する。色素溶液は入射した光を全て吸収するような高濃度になっている。Rhodamine B 溶液は 250~590 nm の波長範囲で量子収率がほぼ一定とみなされるので入射した光に比例した蛍光が発光する<sup>4)</sup>。ただし、蛍光は色素溶液自体により再吸収されるためシャープカットフィルタ (R-62) を用い色素溶液の吸収が

なくなる波長より長波長側にある蛍光スペクトルの帯域だけを透過するようにしている。光電子増倍管  $P_{MR}$  の出力は光量子計に入射する励起光の光子数に比例したものになる<sup>6,7)</sup>。  $P_{MR}$  の出力は増幅され負高圧電源発生回路に入る。負高圧電源発生回路は励起光の変動がたとえあっても  $P_{MR}$  の出力が常に一定になるよう  $P_{MR}$  のダイノードに印加する電圧を自動的に発生する動作をしている。すなわち入射励起光強度の変動に応じたダイノードフィードバック電圧が  $P_{MR}$  に印加され、これと同時に蛍光側光電子増倍管  $P_{MS}$  にも同じダイノードフィードバック電圧が印加されるので、光源の変動を  $P_{MR}$  系と  $P_{MS}$  系の連係により相殺して、装置上から (1) 式の  $I(\lambda_{EX})$  が常に一定になるようにしている。

今回、分光蛍光光度計の励起波長として 600~700 nm まで測定範囲を広げるため、光量子計色素の探索を行った。その光量子計色素に必要な特性条件を挙げると

- ①600~700 nm に吸収があり、なるべく吸収係数が高い。
- ②蛍光効率が低い。

③励起光を完全に吸収した場合、600~700 nm の範囲で励起光強度と蛍光発光強度が比例する。

④退色等による経時変化が少ない。

この条件に合う色素を以下で検討する。

### 3. 測定装置

2. の光量子計色素に必要な特性項目のうち①は分光光度計で吸収スペクトルを測定すればよい。②③④は Fig. 1 の分光蛍光光度計の励起光と光量子計を使用し、特に③は分光蛍光光度計のシステム自体も用いた。しかし、600 nm より長波長側に吸収と蛍光スペクトルのある光量子計色素の検討であるからこの装置を次のように少し変えた。

シャープカットフィルタを Fig. 2 に示したように東芝 CB-39 B に (Rhodamine B の場合は R-62) して、光量子計色素の蛍光の再吸収等の影響がほぼ 700 nm まで無くなるようにした。光量子計ホトマルは浜松ホトニクス R-928 にした(同時に蛍光側ホトマルも RF-502 の標準品の R-446 から R-928 に変え、コンペンセータの調整でスペクトルの特性を補正した)。このホトマルは

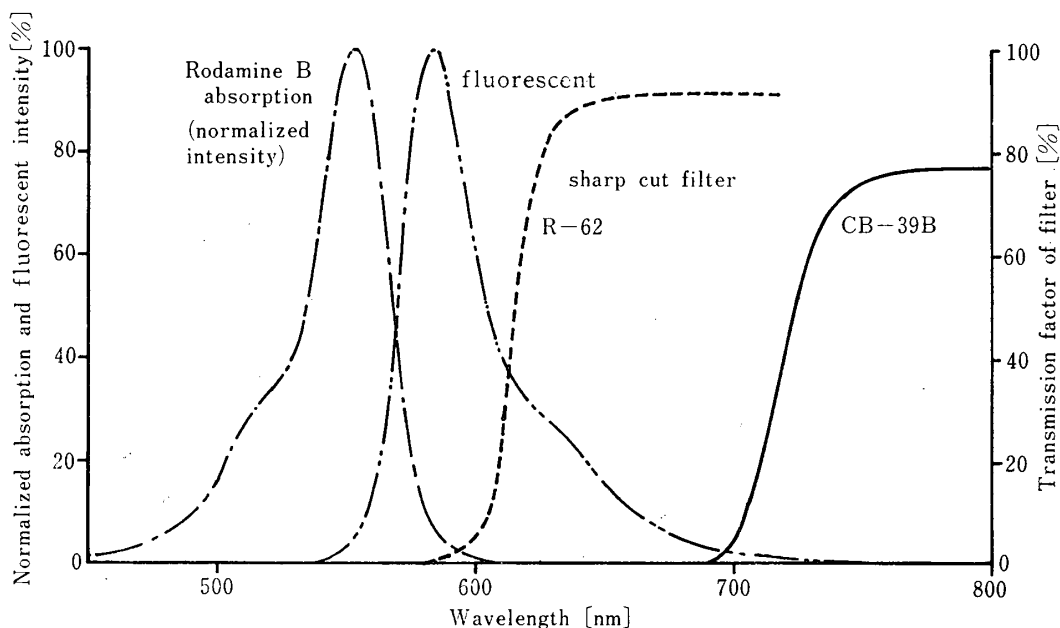
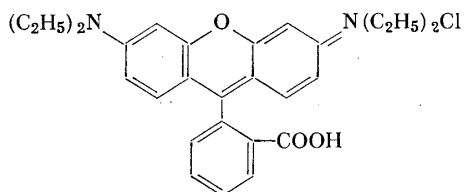


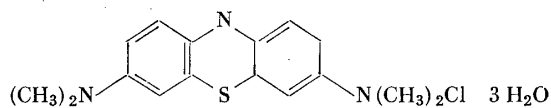
Fig. 2 Transmitting characteristics of sharp cut filter used in the quantum counter and absorption and fluorescent spectra of Rhodamine B.

Table I. The examination dyes for quantum counter dye.

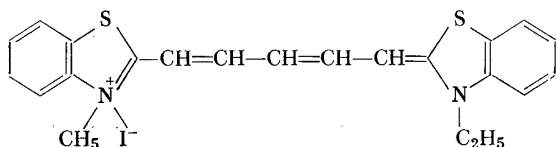
Dye 1 Rhodamine B



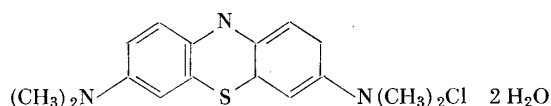
Dye 7 Methylene blue trihydrate



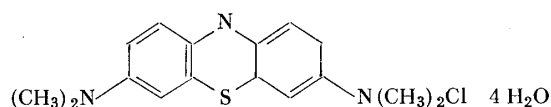
Dye 2 3,3'-diethyl-2,2'-thiadicyanocyanine iodide (DTDCI)



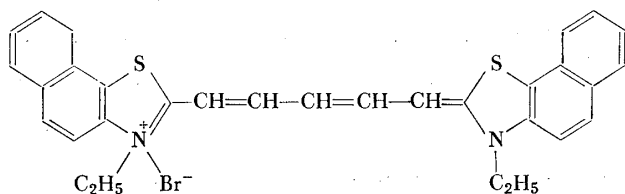
Dye 8 Methylene blue B (dihydrate)



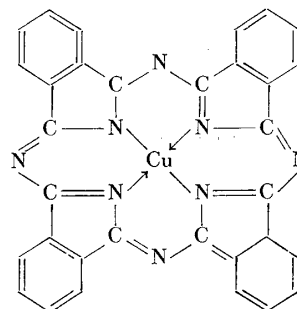
Dye 9 Methylene blue tetrahydrate



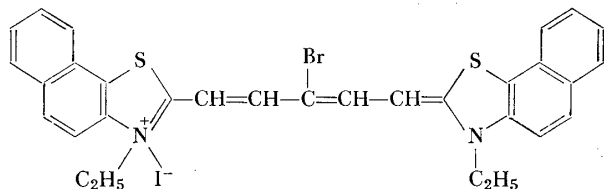
Dye 3 3,3'-diethyl-(6,7,6',7'-dibenzo)-thiadicyanocyanine bromide (DDTCB)



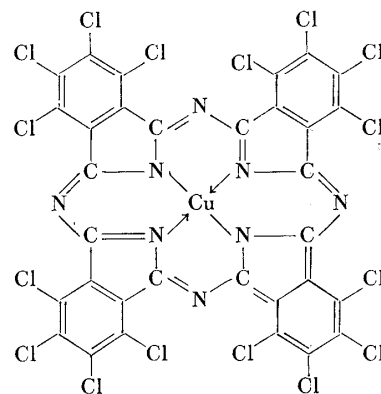
Dye 10 Phthalocyanine blue



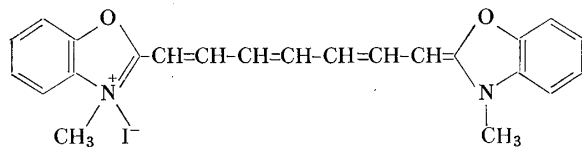
Dye 4 3,3'-diethyl-10-bromo-2,2'-(6,7,6',7'-dibenzo)-thiadicyanocyanine iodide (DBDTCI)



Dye 11 Phthalocyanine green

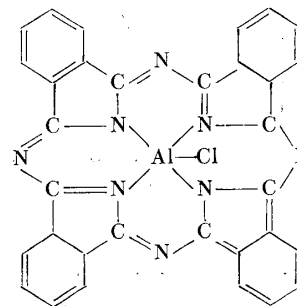
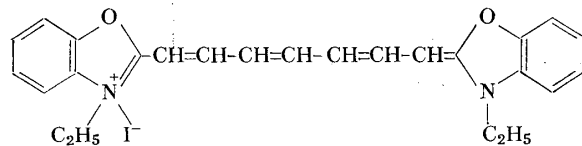


Dye 5 3,3'-dimethyl-2,2'-oxatricyanocyanine iodide (DOTCI)



Dye 12 Chloro aluminum phthalocyanine

Dye 6 3,3'-diethyl-2,2'-oxatricyanocyanine iodide (DOTCI)



190~930 nm に感度を有している。光量子計ホトマルからの蛍光出力は増幅器の後に精密級交流電圧計を接続して測定した。

光量子計ホトマルに印加する負高圧電源は任意な一定の電圧がかけられるマニュアル回路とした(先に説明した光量子計ホトマル  $P_{MR}$  へ入射する光量子計色素の蛍光の強弱で負高圧電源電圧をコントロールするオートマチックダイノードフィードバック回路からこのマニュアル回路にした)。

#### 4. 実験に使用した色素

吸収スペクトルのピークが 650 nm 付近にあり、蛍光発光がありそうな色素を Table 1 に選んだ。Dye 1 の Rhodamine B はこのスペクトル範囲ではないが光量子計色素として優れた特性を持っているので蛍光強度の経時変化の測定の基準に使用した。

Dye 2~6 はシアニン色素でチアカルボシアニンが 3 種類、オキサカルボシアニンが 2 種類でこれらは赤から近赤外に吸収を持ち蛍光効率もこのスペクトル領域の物質としては高い。合成は日本感光色素研究所で行った。

Dye 7~9 は塩基性染料のメチレンブルーで、和光純薬工業製である。Dye 10~12 はフタロシアニン染料である。このうち Dye 10, 11 は東京化成工業(株)製で、Dye 12 は市販のものがなかったため研究室で合成した。原料としては無水フタル酸、尿素、*o*-ジクロロベンゼン、塩化アルミニウム、四塩化チタンである。

### 5. 実験結果と検討

#### 5.1 色素の吸収と蛍光スペクトル

Table 2 に各色素の吸収ピークと吸収係数を示した。Dye 12 のクロロアルミニウムフタロシアニンは純度が良くないので吸収係数を除いた。各色素の溶媒は全てエチレングリコールである。これは光量子計色素溶液として蒸発による濃度変化が少いこと、溶解性が良いことから決めた。吸収係数はシアニン色素が最も良く、続いてメチレンブルー、フタロシアニンの順になっている。

Fig. 3 はシアニン、メチレンブルー、フタロシアニンの色素から各 1 種類と Rhodamine B の吸収スペクトルを示した。

各色素の蛍光発光は RF-502 を使用して測定した(同装置を用いた蛍光量子収率の測定は現時点では不可能)。その結果、シアニン色素は蛍光が最も強く、メチレンブルーはこれより少し弱い。フタロシアニンの Dye 10, 11 は無蛍光であった。Dye 11 の Cu 原子の代わりに Co (phthalocyanine cobalt) と Fe (phthalocyanine iron) を置換した色素でも蛍光は観測されなかった。従って光量子計色素としては不適当なので以後の特性測定から除いた。

#### 5.2 蛍光強度の経時変化

光量子計色素の吸収、蛍光の経時変化の特性は安定でなければ分光蛍光光度計として実用性がない。ここで先の 2. で述べた光量子計色素の条件④を検討する。同時に条件②も含まれる。

経時変化の特性測定は 3. で述べた光量子計の測定装置を用いて行った。Rhodamine B は蛍光発光強度が経時変化に対して非常に安定な色素で

Table 2. The absorption peak and absorption coefficient of testing dyes for quantum counter dye.

	Dye 1	Dye 2	Dye 3	Dye 4	Dye 5	Dye 6	Dye 7	Dye 8	Dye 9	Dye 10	Dye 11	Dye 12
Abs. peak [nm]	553	658	693	682	689	690	663	661	659	682	658	682
Abs. coeff. [ $\times 10^5$ ]	1.08	2.02	1.52	1.13	1.13	1.83	0.99	0.93	1.02	0.36	0.41	—

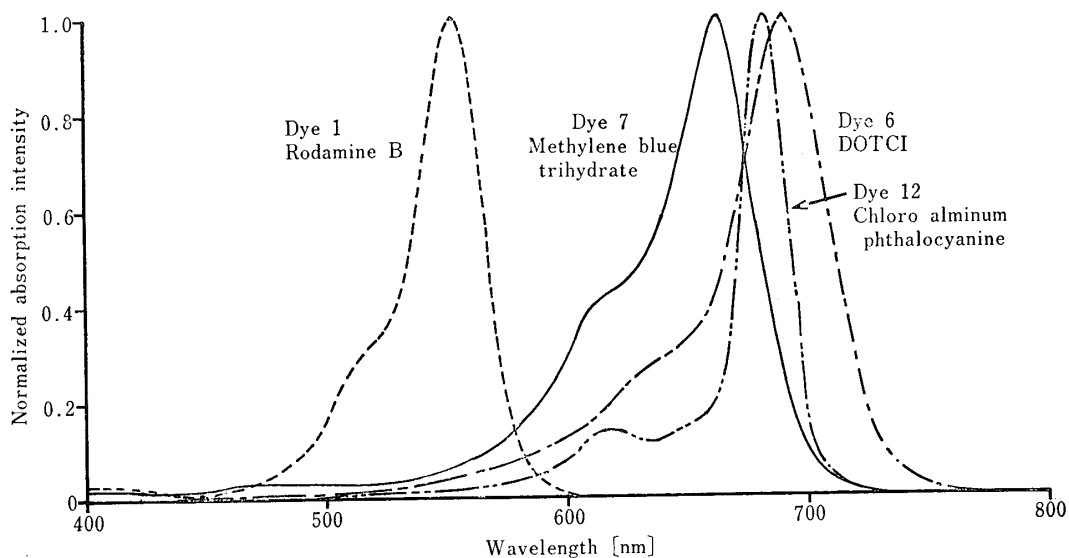


Fig. 3 Absorption spectra of dye solutions for quantum counter dye. (ethylene glycol;  $10^{-5}$  mol/l)

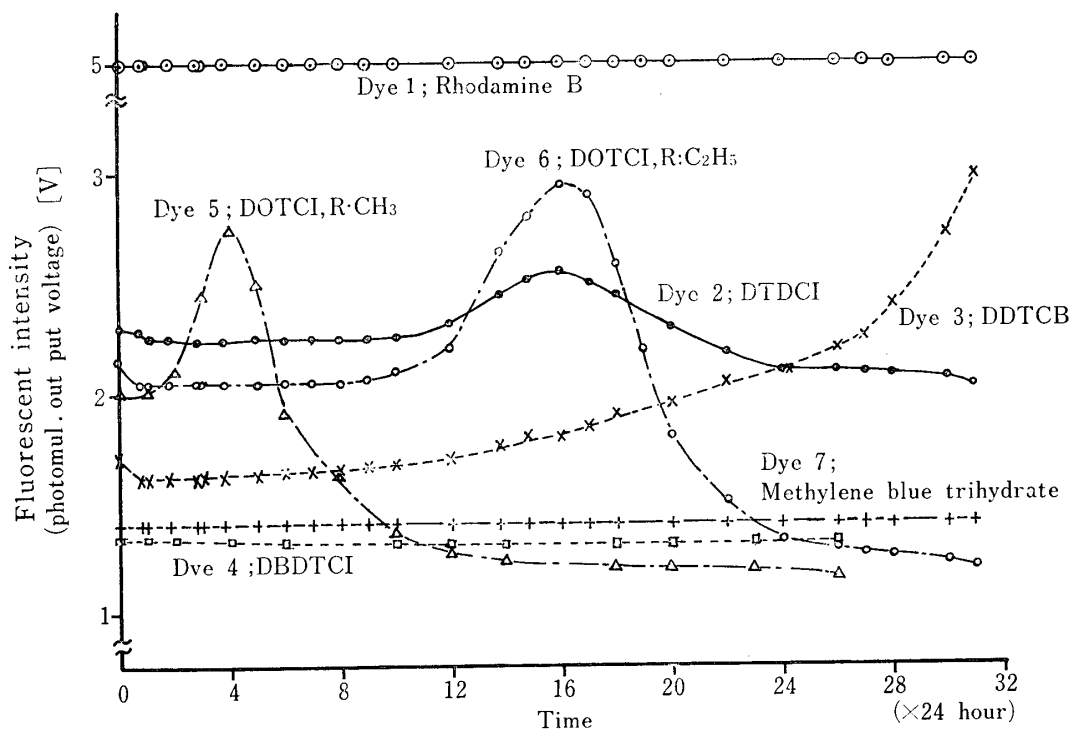


Fig. 4 Fluorescent characteristic stability of dye solutions for quantum counter dye. (ethylene glycol sol.; Dye 1; 8 g/l, Dye 2~7;  $10^{-3}$  mol/l)

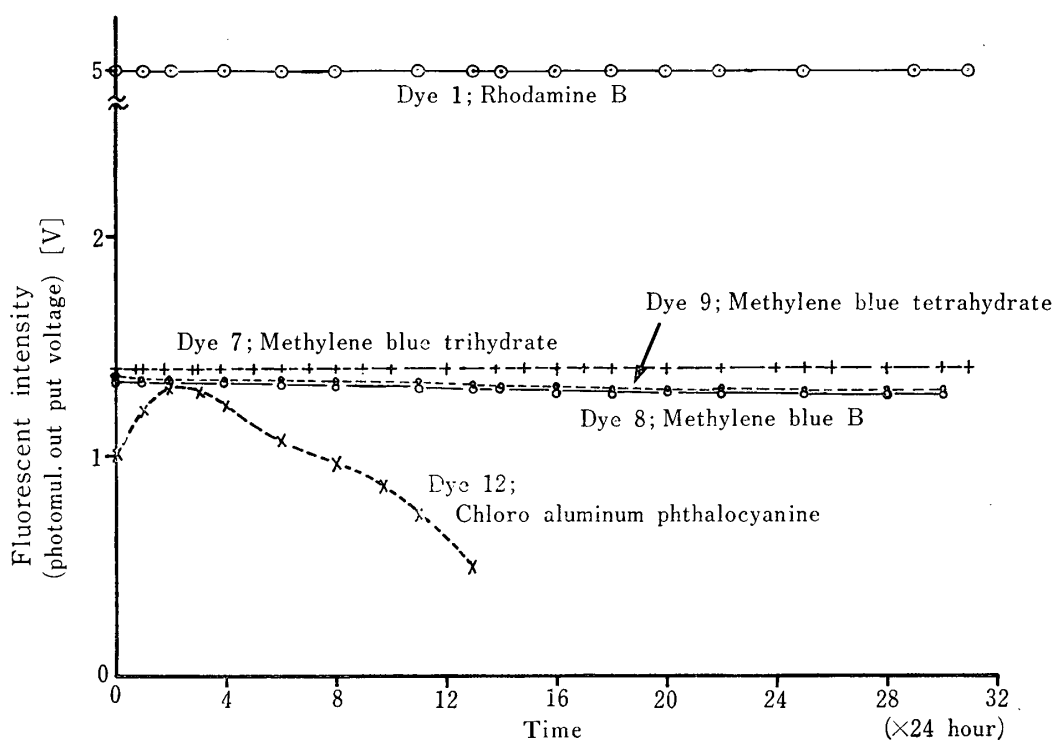


Fig. 5 Fluorescent characteristic stability of dye solutions for quantum counter dye. (ethylene glycol sol. Dye 1; 8 g/l, Dye 7-9;  $10^{-3}$  mol/l, Dye 12; not clear)

ある. Rhodamine B エチレングリコール溶液の蛍光がホトマル  $P_{MR}$  の出力電圧で 5 V になるよう Xe ランプの電流調節によって励起光強度を一定にして、各試料色素の蛍光発光強度を（光量子計の装置に増幅器および交流電圧計を接続して）電圧測定した。各色素の励起波長はその色素の吸収ピークとした。

Fig. 4, Fig. 5 が測定結果である。Rhodamine B の溶液濃度は 8 g/l で、他の色素は  $10^{-3}$  mol/l である。ただし、Dye 12 は純度が悪く、これよりかなり薄い。溶媒は全てエチレングリコールである。Fig. 4 のシアニン色素の中では Dye 2 が蛍光が最も強い。この色素は溶液にした後 10 日間位は安定した蛍光強度を持っているがその後少しずつ強度が高くなる。16 日目には最大となりその後徐々に減少する。途中で、蛍光発光電圧が上るのは色素が退色して色素濃度が薄くなり散乱や再吸収の影響が少くなるためと考えられる。その後減少しているのは退色がさらに進み色素濃度

が薄くなりすぎたことによると考えられる。Dye 3 は同じくチアカルボシアニン色素で 1 カ月の測定期間で徐々に蛍光発光の電圧が増加している。さらに測定期間を延せば、おそらく Dye 2 のようなピークを持つと思う。Dye 4 はチアカルボシアニンでメソ位に Br を置換した色素である。5 種類のシアニン色素のうちではこの色素が蛍光発光電圧は低い最も安定した色素である。Dye 5 と Dye 6 はオキサカルボシアニンで Dye 2~4 のチアカルボシアニンより退色が早い。

Dye 7 のメチレンブルートリヒドレイトは Dye 4 より蛍光発光出力も安定性も優れている。Fig. 5 のメチレンブルー B (Dye 8) やメチレンブルーテトラヒドレイト (Dye 9) よりも Dye 7 のメチレンブルートリヒドレイトは最も特性が良い。Dye 12 のクロロアルミニウムフタロシアニンは退色が早い純度を上げればもっと良い結果が出ると思える。

以上からシアニン色素は蛍光出力は高いが経

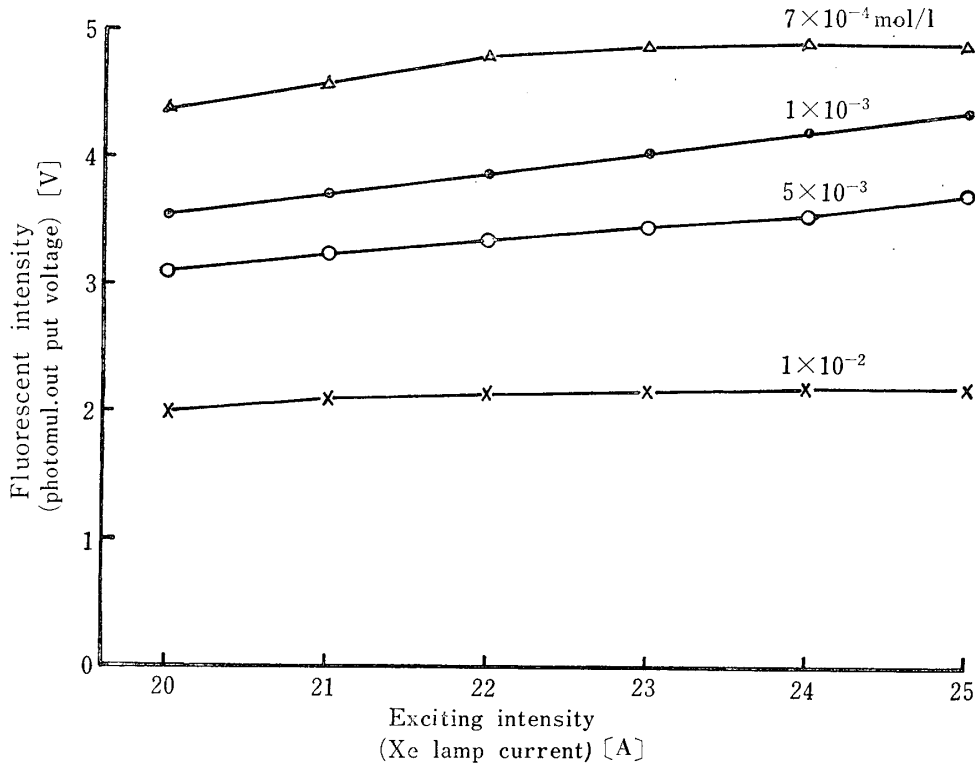


Fig. 6 Relationships between exciting and fluorescent intensities of methylene blue trihydrate quantum counter dye. (ethylene glycol sol.)

時変化が不安定である。しかし、この系の色素は、さらに長波長側に分光特性を持っているものが多数あるから、一例としてチアカルボシアニンのメソ位にハロゲンを付けたような色素を検討すれば、長波長側の光量子計色素として使える可能性がある。メチレンブルートリハイドレイト (Dye 7) が最も安定な色素であることが明らかになったので以下ではこの色素を光量子計色素として使えるか 2. の条件③を検討する。

### 5.3 メチレンブルートリハイドレイトの色素濃度と励起波長の動作特性

#### i) 最適濃度溶液

光量子計色素の動作条件の一つとして、励起光強度と蛍光発光強度が比例 (光子数) し、かつ感度が良くなければならない。これを検討するために、メチレンブルートリハイドレイト (Dye 7) 光量子計色素の最適な溶液濃度を最初に決めた。測定装置は 3. に従い光量子計色素セルにメチレンブルートリハイドレイト溶液を入れ励起光強

度を変えて (Xe lamp の電流を変えて行ったが、あらかじめ照度計で直線性をチェックした) その時の蛍光発光電圧を記録した。メチレンブルートリハイドレイトの濃度は  $7.0 \times 10^{-4}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$ ,  $5.0 \times 10^{-3}$ ,  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/l の 4 種類である。

Fig. 6 が結果で、 $1.0 \times 10^{-3}$  mol/l の溶液が入出力の直線性が最も良く、蛍光発光出力も大きい。従って分光蛍光光度計として入射励起光の変動に対して感度良くダイノードフィードバック電圧が動作するため測定感度も良くなる (しかし、可視・紫外の光量子計色素 Rhodamine B に比べればかなり劣る)。

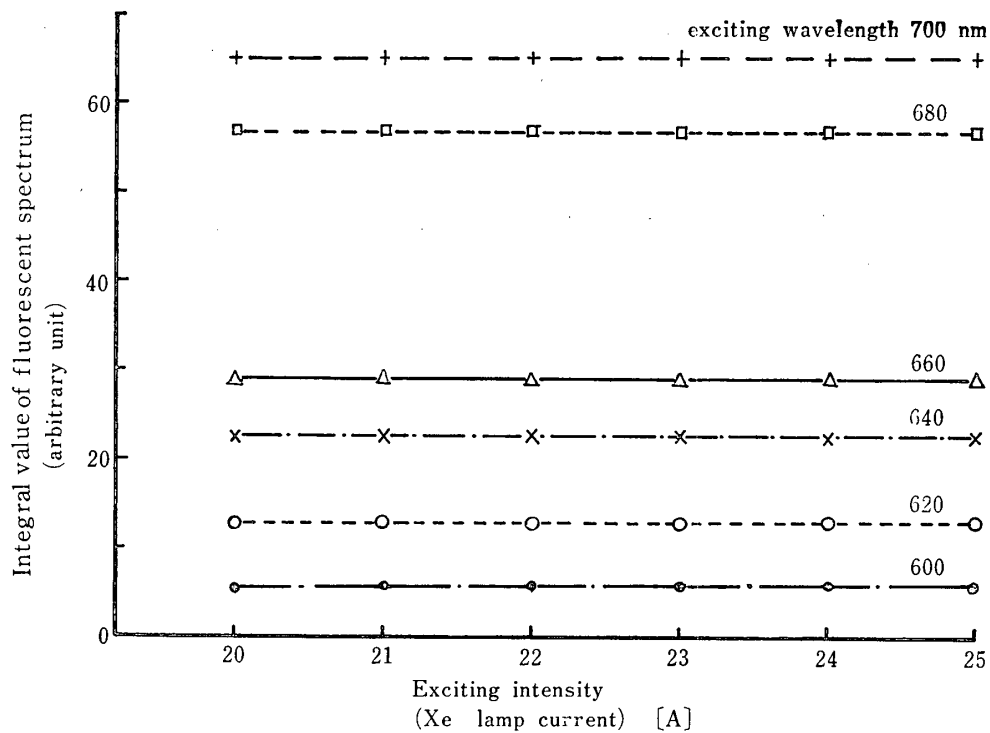
#### ii) 励起波長と励起光強度を変えた場合の蛍光試料の蛍光スペクトルの影響

メチレンブルートリハイドレイト光量子計色素を用いた分光蛍光光度計で 600~700 nm の励起波長範囲で試料溶液の蛍光スペクトルを測定する時、(1) 式の  $I(\lambda_{EX})$  を一定にするため励起光強度の変化に対して光量子計と負高圧電源発生回路



**Table 3.** Characteristics between fluorescent spectra of DDTCB cyanine dye and exciting intensities of the spectrofluorophotometer using methylene blue trihydrate as quantum counter dye. (DDTCB ethanol sol.  $10^{-6}$  mol/l)

Exci. intensity (Xe lamp current)	Integral value of fluorescent spectrum (arbitrary unit) excitation wavelength [nm]					
	600	620	640	660	680	700
20	5.78	13.30	22.68	29.31	57.17	64.77
21	5.77	13.24	22.79	29.14	57.22	64.73
22	5.69	13.15	22.65	29.13	56.98	64.64
23	5.80	13.20	22.58	29.20	57.05	64.59
24	5.77	13.23	22.70	29.18	57.10	64.48
25	5.64	13.25	22.75	29.28	57.15	64.87

**Fig. 7** Characteristics between fluorescent spectra of DDTCB cyanine dye and exciting intensities of the spectrofluorophotometer using methylene blue trihydrate as quantum counter dye. (DDTCB ethanol sol.  $10^{-6}$  mol/l, methylene blue trihydrate ethylene glycol sol.  $10^{-3}$  mol/l)

のダイノードフィードバック電圧とで補正が完全になされているか分光蛍光光度計の実用性を含め検討した。

メチレンブルートリヒドレイトはエチレングリコール  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/l 溶液とした。蛍光スペクトルの測定試料はシアニン色素 DDTCB (Dye

3) の  $10^{-6}$  mol/l のエタノール溶液である。分光蛍光光度計 RF-502 を用いて蛍光スペクトルの測定を行ったが光量子計と蛍光側ホトマルは 3. で述べた変更の通りである。

Table 3, Fig. 7 がこの結果で、蛍光スペクトル積分値は蛍光スペクトル曲線下の面積を求めた

相対値である。DDTCB の吸収係数により積分値は各励起波長で変っているが、励起波長が一定の場合は励起光強度の変化に対し常に一定の蛍光スペクトルが得られており、メチレンブルーテトラヒドロイト光量子計色素が有効であることが分る。

## 6. 結 論

600~700 nm の励起波長で使用できる分光蛍光光度計の光量子計色素を検討した。

その結果、メチレンブルートリヒドロイトが吸収・蛍光スペクトル特性、退色等による経時変化、励起波長に対する励起強度（単位時間当りの光子数）変化と蛍光スペクトル特性等で光量子計色素として最も良い特性を有していることが明らかとなった。

メチレンブルートリヒドロイトを光量子計色素として実際に分光蛍光光度計（島津 RF-502 を

一部変更）に使用することにより、蛍光試料の励起波長 600~700 nm（短波長側にはさらに拡張できるが Rhodamine B がある）、試料からの蛍光スペクトルでは 830 nm までの赤から近赤外の蛍光スペクトルの測定が可能となった。これによってシアニン色素等の蛍光量子収率が求められる。

## 参 考 文 献

- 1) B. Witbolt and L. Brand: Rev. Sci. Instrum., 39, 1271 (1968).
- 2) たとえば、柴田和雄: スペクトル測定と分光光度計. 講談社, (1974) p. 283.
- 3) 大塚, 及川, 小口: 第 30 回応用物理学会講演予稿集 (1983) 5 a-X-9, p. 74.
- 4) 栗田, 山本, 高田, 小柴: 島津評論. Vol. 32, No. 3・4 (1975) p. 225.
- 5) 文献 2) の p. 281.
- 6) W. H. Melhuish: J. Opt. Soc. Am., 52, 1256 (1962).
- 7) J. Yguerabide: Rev. Sci. Instrum., 39, 7. 1048 (1968).