

二種類の光量子計色素を用いた広帯域分光蛍光光度計 の製作

大塚 正 男* 山 部 正 彦**
及 川 充*** 小 口 正 信***

Design and Experimental Manufacturing of the Wide Wavelength Range Spectrofluorophotometer using Two Kind of Quantum Counter Dyes

Masao OHTSUKA, Masahiko YAMABE, Mitsuru OIKAWA
and Masanobu OGUCHI

Wide wavelength range spectrofluorophotometer, exchangeable for short (300~600 nm) and for long (485~825 nm) wavelength compensating channels, has been designed on the base of Shimazu RF-502 spectrofluorophotometer, using Rhodamine B and Methylene blue as quantum counter dyes.

Making of compensator suitable for this system, and spectral energy correction on fluorescent spectrometer and on photomultiplier by standard tungsten lamp have been examined.

Moreover to connect personal computer with this wide wavelength range spectrofluorophotometer an input preamplifier and programs for data treatment were designed, and consequently real time operation become enabled.

On the results of above experiments the wide wavelength spectrofluorophotometric measurements with highly accuracy has become expected, comparing fluorescent samples having long wavelength spectrum such as cyanine dyes with that of short wave characteristics having well known fluorescent quantum yield.

1. 緒 言

光量子計と電氣的な制御回路を組み込んだ分光
蛍光光度計は励起光源の変動を装置上コントロ
ールすることができ、測定試料の蛍光量子収率を精
度良く測ることができる^{1~2)}。

光量子計色素としてはローダミンBが使われ、

必要な条件に対し優れた特性を有しているが、
測定したい試料に励起する波長は 600 nm までで
これより長波長では使用できない。著者らは 600
nm より長波長側で励起できる光量子計色素の検
討を行い、メチレンブルーのエチレングリコール
溶液で 700 nm まで使用できることをすでに報告
した³⁾。

蛍光量子収率の具体的な測定方法は、測定試料
と蛍光量子収率既知の物質の蛍光スペクトルを測
定し、それらの相対比較から測定試料の蛍光量子
収率を求めている。

* 画像工学科講師

** 59年3月修士卒, 現・ゲステットナーリミテッド

*** 画像工学科教授

昭和60年10月3日受理

600 nm から長波長側に吸収をもつ 蛍光量子収率既知の物質としては 3,3'-diethyl-thiadicarbocyanine iodide (DTDCI)⁴⁻⁵⁾ など二、三である。これだけを蛍光量子収率既知として使用する場合は、それぞれの測定者が用いる既知物質の純度等から蛍光量子収率に誤差が生じる。紫外から 600 nm までに吸収を持った蛍光量子収率が報告されている物質は数多くあり信頼性も高い⁶⁻⁹⁾。著者らは島津 RF-502 形分光蛍光光度計を基に、短波長側 (300~600 nm 光量子計色素, ローダミン B) と長波長側 (475~825 nm, メチレンブルー) に分けた二つの光量子計及び関数発生器を製作し、一台の装置で使用できるようにするため、両者の相関をとり、どちらも一定の条件で使えるようにした。

これからシアニン系色素のような長波長側に吸収を持つ試料を短波長側に吸収がある蛍光量子収率既知の蛍光物質と相対比較することができ、より精度の高い蛍光量子収率の測定が行えるようになった。具体的には分光器の分光特性を補正する

コンペンセーターの製作と二次標準ランプによるエネルギーの補正を行った。

更に、蛍光スペクトルデータのパソコン処理を行うためのプリアンプの製作とソフトの作成を行い、迅速で正確な蛍光量子収率の測定を可能とした。

2. 広帯域分光蛍光光度計

2.1 関数発生器の検討と製作

Fig. 1 は今回、製作、改良したシステムを含めた分光蛍光光度計のブロックダイアグラムである。前報³⁾の通り、蛍光側ホトマルで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、

$$F(\lambda_{EM}) = K \cdot f(\lambda_{EM}) \cdot I(\lambda_{EX}) \cdot E \cdot C \cdot d\phi/d\lambda_{EM} \quad (1)$$

K : 定数

$f(\lambda_{EM})$: 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

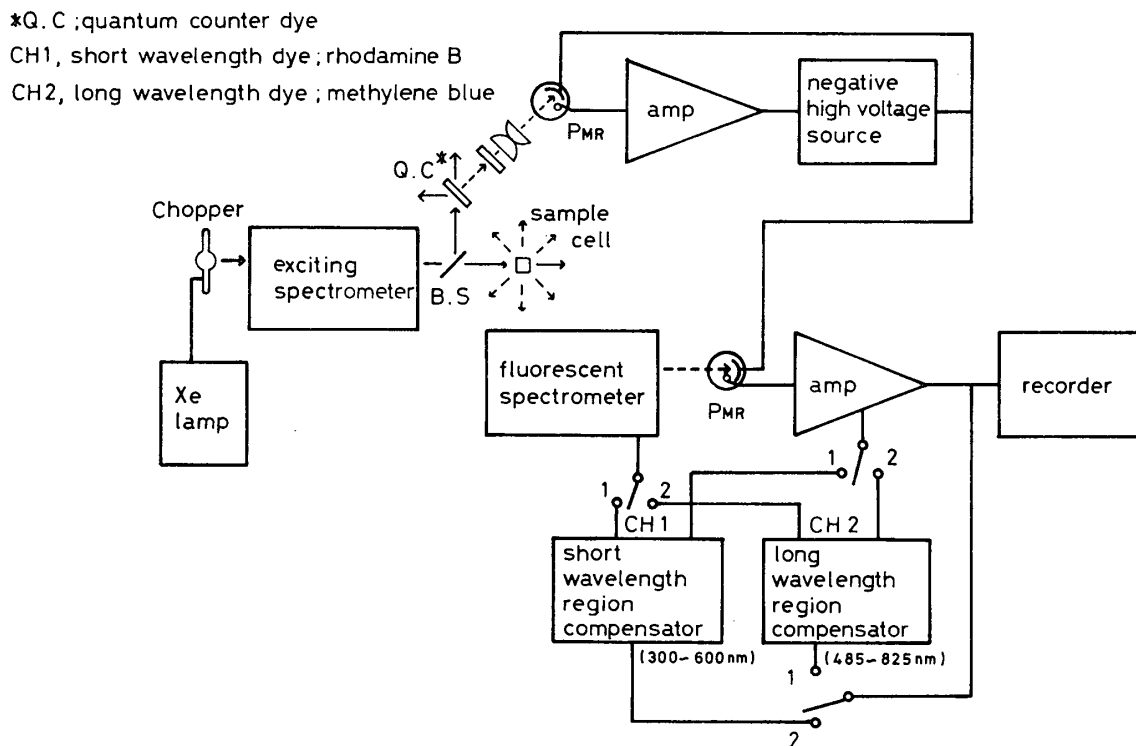


Fig. 1 Block diagram of the wide wavelength range spectrofluorophotometer apparatus.

C : 試料の濃度

$d\phi/d\lambda_{EM}$: けい光の単位波長当りのけい光収率

で表わされる.

$F(\lambda_{EM})$ が蛍光スペクトルとして記録計に自記される. この $I(\lambda_{EX})$ を一定の値にするには光量子計と検出器 P_{MS} の供給電圧を自動的にコントロールするダイノードフィードバック方式で行っている. $f(\lambda_{EM})$ は蛍光側分光器の波長駆動軸に連動する多タップポテンシオメータとこれに連結した可変抵抗群で構成した関数発生器 (コンペンセータ) で補正蛍光スペクトルが得られるようにしている.

光量子計色素をローダミン B とメチレンブルーで切換えて使うとそれぞれの波長領域を補正する関数発生器が必要となる. 補正蛍光スペクトルをおよそ 300~830 nm の波長範囲で得るには 530 nm の帯域を有する関数発生器が必要となる. しかし, RF-502 形の多タップポテンシオメータは 350 nm 分しか補正帯域を有さない. そこで今回の主な目的の広帯域関数発生器を製作するにはポテンシオメータを 2 連のものとすると都合が良いが特殊な二連のポテンシオメータが入手困難なこ

とと装置内のスペースに余裕がないため, 現存のポテンシオメータで使えないか検討した. 幸いこのポテンシオメータはストッパーなしで波長駆動に合わせ連続回転することから, 短波長側及び長波長側の 2 種類の光量子計色素に合わせた 2 台の関数発生器を備え, ポテンシオメータの 33 個のタップを多端子のコネクターを使い切換えるようにした.

Fig. 2 は今回製作した短波長側の関数発生器 (補正蛍光波長域 300~650 nm) で, 長波長側の関数発生器 (補正蛍光波長域 475~825 nm) は本来付いていたものを使用し可変抵抗器の抵抗を変えることにより補正蛍光スペクトルの調整をした. この回路は蛍光側分光器の波長走査に連動した接点 P_i を有するポテンシオメータとポテンシオメータの各波長タップについて入力信号の分圧比を可変できる抵抗網で構成され, 任意の波長関数を VR 群の調整により作り出している. 波長関数の発生帯域幅は 350 nm である.

2.2 関数発生器の調整と補正蛍光スペクトル

関数発生器による蛍光スペクトルの補正は Fig. 3 のシステムに従った. 蛍光側分光器に入射する光源は N. B. S (National Bureau of Standard

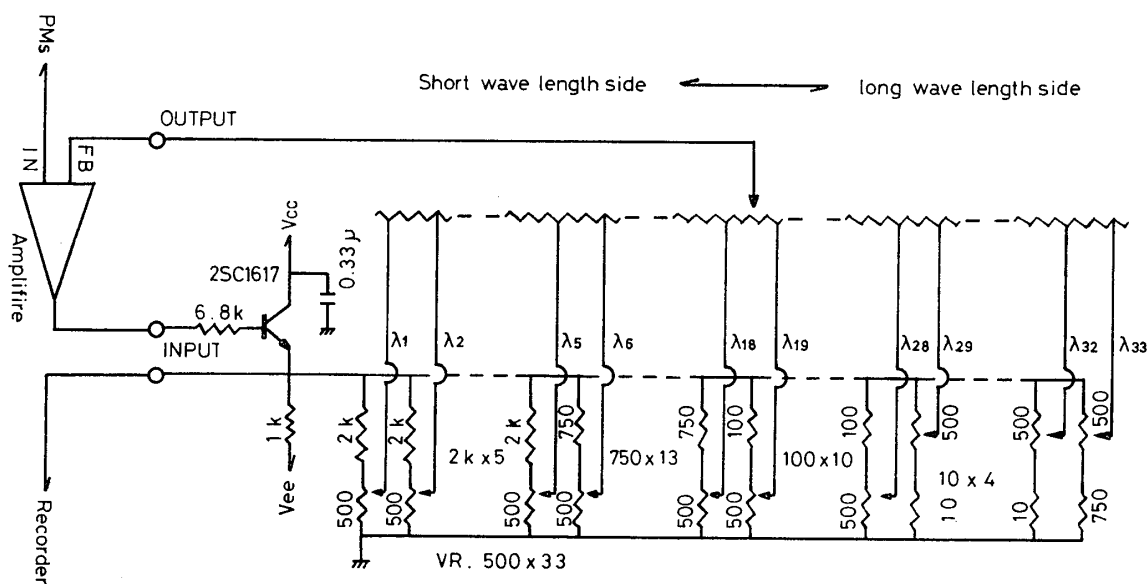


Fig. 2 Circuit of the compensator with short wavelength region.

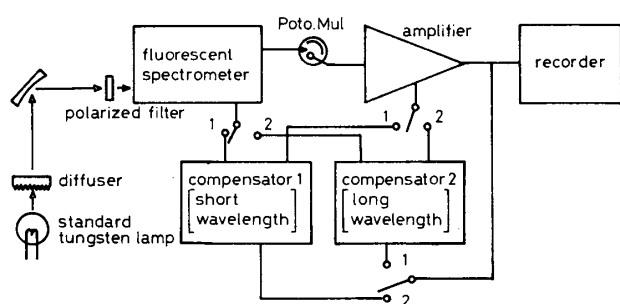


Fig. 3 System for calibration of compensator to correct spectra energy.

US) の標準ランプをもとにした二次標準タングステンランプで拡散板を介して使用した。蛍光側分光器からの光は 200~900 nm まで分光感度のある R-928 のホトマルで受光した。今回は、このホトマルの熱的な雑音を減少させ S/N 比の向上を計るため、ペルチェ効果を利用した浜松ホトニクス、電子冷却装置: C 659-S を組み込んだ。これにより蛍光側分光器の出射光がホトマルの受光面より拡がってしまうため、光路上に新たにレンズ (F 2.3, $f=50.5$ mm) を設け、焦点をホトマルの受光面に合わせるようにした。

Fig. 4, a), b) が補正スペクトルの特性曲線で二次標準ランプのスペクトルエネルギーに合わせるよう蛍光側分光器の波長ダイヤルを回しながらフォトマルを通して記録計に現われる値を関数発生器の VR 群からなる各波長つまみを回しながら

ら調整した。この調整で 780 nm 付近に回折格子の grating anomalies が現われ関数発生器だけでは補正できないため蛍光側分光器の入射スリットの前に偏光フィルターを挿入し異常光を解消した。従ってこのフィルターは蛍光スペクトルを実測する場合にも入れてある。

Fig. 4 の a) は短波長側、b) は長波長側の関数発生器の補正スペクトルの結果である。a) の補正したスペクトルは全域にわたり二次標準ランプの特性に一致させることができた。b) の補正では 800 nm 付近で標準ランプの特性と少し差がでた。この部分は多タップポテンショメータの波長タップ間隔が広いのでこれ以上の特性は得られなかった。

以上から 300~825 nm の蛍光測定波長範囲で補正蛍光スペクトルが得られ広帯域分光蛍光光度計に改良することができた。

2.3 2種類の光量子計の感度測定

2組の光量子計と関数発生器の装置により短波長側にある蛍光量子収率既知の蛍光物質を標準として長波長側のたとえばシアニン色素などの測定試料の蛍光量子収率を求めるには短波長側と長波長側の分光蛍光光度計 (それぞれの光量子計と関数発生器で構成した) の相対感度を求めなければならない。このため2つの光量子計の測定領域が重なるローダミンBのエタノール溶液を同一の試

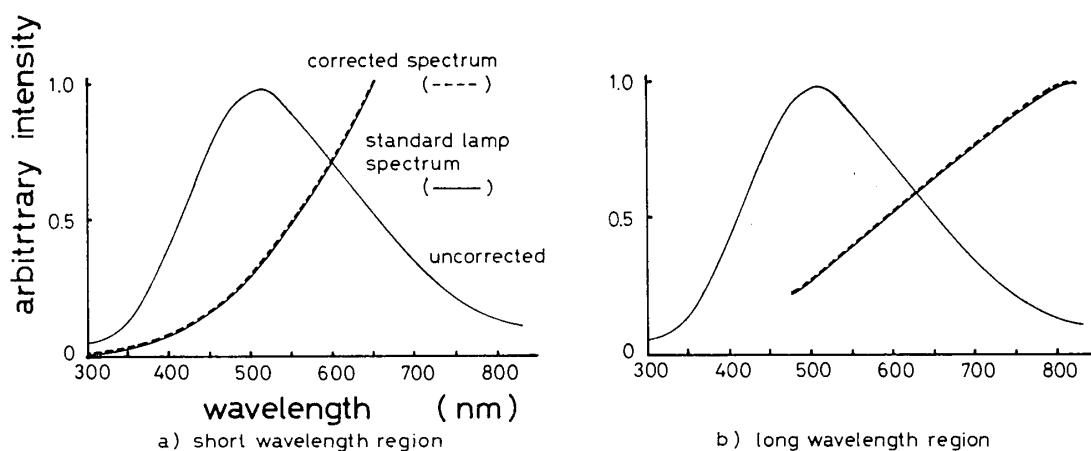


Fig. 4 Characteristics of corrected spectra energy by short (a) and long (b) wavelength compensators.

料として相関をとった。その感度は、短波長側蛍光分光器/長波長側分光器=3.57である。

次に短波長側の既知蛍光量子収率の検定を硫酸キニーネ、フルオレッセン、ローダミンBで行った。その結果からこれらの既知試料の平均をとってローダミンBを $\phi=0.69$ として既知蛍光標準物質とした。またこの長波長域での分光蛍光光度計の感度は蛍光量子収率にしておよそ $\phi=0.005$ である。

3. 蛍光量子収率測定のパソコン処理

3.1 システムの検討

(1) 式からけい光収率 ϕ は

$$\phi \propto \frac{\int F(\lambda_{EM}) d\lambda_{EM}}{I(\lambda_{EX})}$$

で表わされ、 $I(\lambda_{EX})$ が一定の場合、測定試料と蛍光量子収率既知物質の吸光度と蛍光スペクトルの全波長に亘る積分から相対比較により求められる。

従来は、この積分をスペクトルの曲線内の重量の測定から求めていたが、記録紙のスペクトル部分を切り取ってしまうためデータの保存に不便なこと、コピーをしてから重量を量る場合には、常に紙の質やコピーの定着の仕方等注意しなければならない。また天秤で測る場合には、時間がかかるなどの欠点がある。

そこで改良した分光蛍光光度計に更に今回パソコンを付けデータ処理を行うことにより上記の問

題に対処した。Fig. 5がこのシステムで蛍光強度の電気出力 V_0 をA/Dコンバータを通しパーソナルコンピュータに接続した。 V_0 は蛍光スペクトルの強弱により10mVから0.2V位まで変化する。A/Dコンバータの入力電圧 v_i はICにセットされた基準電圧により定まっており、使用したNS ADC 0808 8 bid A/Dコンバータでは最大5Vである。 V_0 と V_i の整合のためプリアンプが必要で、この製作を行った。

このプリアンプの増幅度はA/Dコンバータにおける量子化時のダイナミックレンジを損なわないよう蛍光測定試料の蛍光の強さ v_0 の変化に対応して段階的に選択するようにした。

Fig. 6が回路図で製作の注意点を簡単に挙げると、

1) 増幅度 10mV~0.2Vの入力信号を最大5Vに増幅するには増幅度は28dBから54dBにする必要があり、NFB回路の帰還率をダイヤルスイッチにより、9段階に切り換え、増幅度の値を蛍光量子収率を求める時、正確に換算するようにした。

2) 周波数特性 分光蛍光光度計の光源用のチョッパーは50Hzの低周波であるから、プリアンプはDCアンプ構成とした。

3) 入出力特性と最大出力制限 Fig. 7が入出力特性の測定結果で、リニアな結果が得られた。また、プリアンプの動作点がくるわないよう電源回路の安定性に留意した。

最大出力制限としてA/Dコンバータの最大入力電圧が5Vと制限されているのでツェナーダイオードにより4.97Vに出力制限をした。

3.2 パソコンによるデータ処理結果

以上のシステムでFig. 8のデータ処理のソフト(フローチャート)によりシアニン色素DDTCB(3,3'-diethyl-6,7,6',7'-dibenzothiadicyanobromide)とDOTCI(3,3'-diethyl-2,2'-oxatricyanobromide)の蛍光スペクトルのデータ処理を行った。パーソナルコンピュータはNEC PC 8001である。

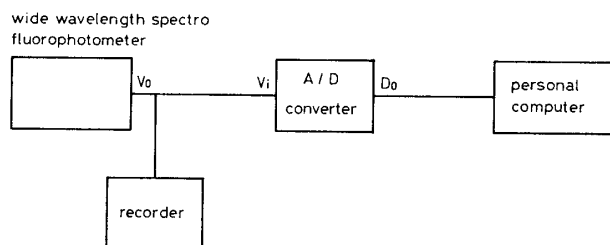


Fig. 5 Explanatory diagram of input-output voltage for connection of personal computer to the wide wavelength range spectrofluorophotometer.

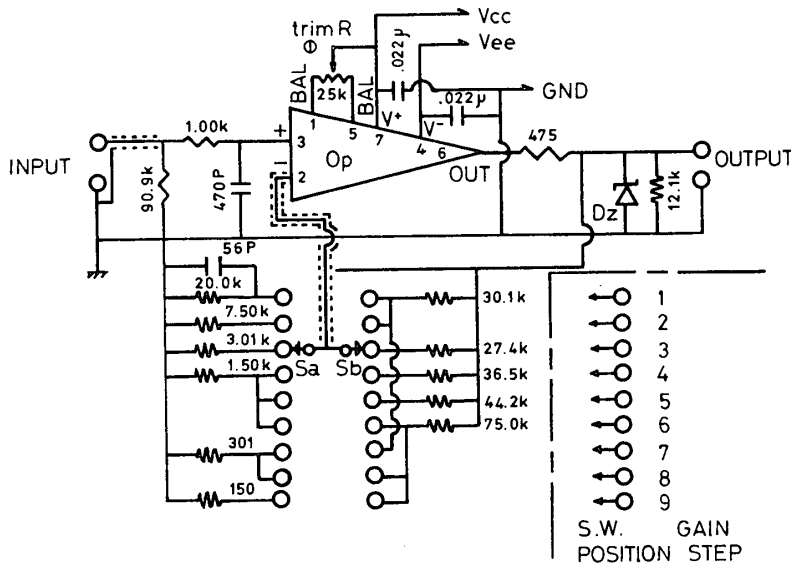


Fig. 6 Circuit of preamplifier and power supply for connective personal computer.

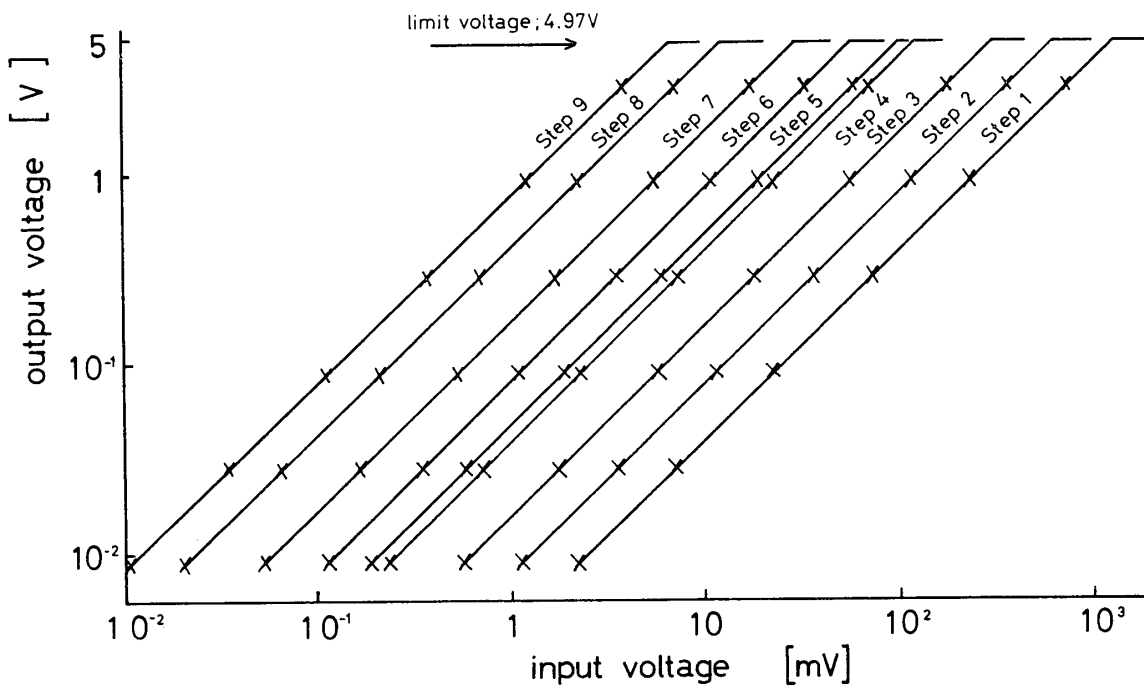


Fig. 7 Input-Output put characteristics of the preamplifier.

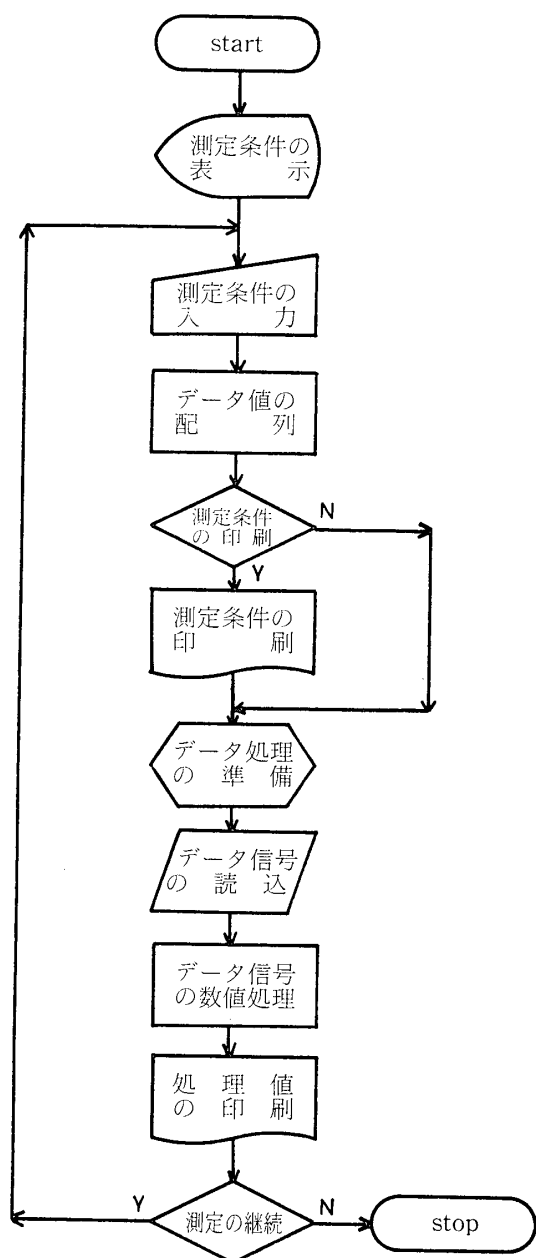


Fig. 8 Flow chart with process of fluorescent spectra data.

Fig. 9 がその結果で、マイコンによる蛍光スペクトルの面積の測定したものをマイコン法、従来の方法の天秤で計った蛍光スペクトルの値を重量法と呼んだ。X軸とY軸の値を変えるための蛍光スペクトルの大きさは測定試料を励起する波長変化で行った。

両者の結果は良く一致した。重量法で求めた所

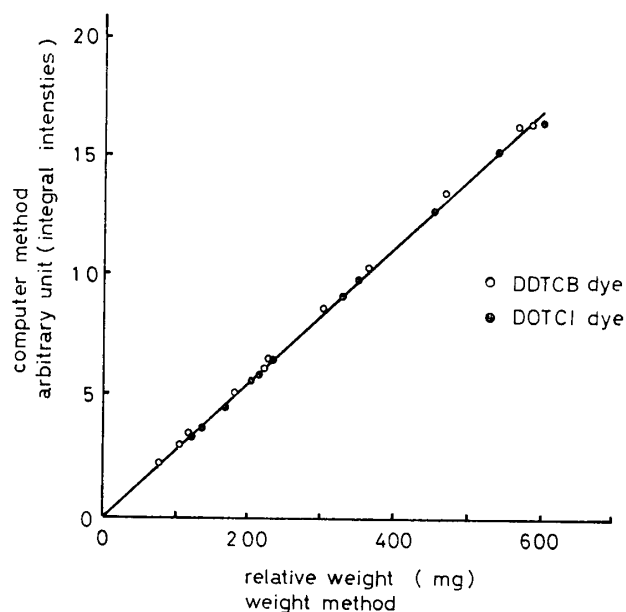


Fig. 9 Comparison with computer method and weight method of integral fluorescence intensities.

用時間に比べパソコン法は蛍光測定とリアルタイムで行え、迅速で正確なデータが得られるようになった。

4. 結論

蛍光量子収率の報告が多くある短波長側の蛍光物質とシアニン色素のような長波長側に蛍光のある試料を相対比較により蛍光量子収率が精度良く求められるよう島津 RF-502 形をベースにして分光蛍光光度計の広帯域化を行った。

ローダミン B とメチレンブルーを光量子計色素として、短波長側 (補正蛍光波長範囲 300~600 nm) 及び長波長側 (同じく 475~825 nm) に切替える関数発生器の製作と標準ランプによる蛍光側分光器及びホトマルのエネルギー補正を行い、測定試料に励起できる波長 250~700 nm, 蛍光スペクトル 300~825 nm の測定が行える広帯域分光蛍光光度計の改良をすることが出来た。市販の分光蛍光光度計と比べて測定波長範囲は最も広いものである。

更にこの分光蛍光光度計にパーソナルコンピュータを付けてデータ処理を行うため、プリアンプ

の製作とデータ処理のソフトを作成し、試料の蛍光量子収率を迅速で正確に求めることを可能にした。

参考文献

- 1) 栗田, 山本, 高田, 小柴: 島津評論. Vol. 32, No. 3・4 (1975).
- 2) 日本化学会編: 新実験化学講座 4 (基礎技術 3 光 [I][II]), 丸善 (1976).
- 3) 大塚, 伊東, 及川, 小口: 東京工芸大学工学部紀要, Vol. 7, No. 1, 31 (1984).
- 4) Nancy J. L. Roth, Arnold C. Craig: J. Phys. Chem, **78**, 1154 (1974).
- 5) D. N. Dempster, T. Morrow, R. Rankin, G. F. Thomson: J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2, **68**, 1479 (1972).
- 6) N. Filipescu, G. W. Mushrush, C. R. Hurt and N. McAvoy, Nature, 211, 260 (1966).
- 7) W. H. Melhuish, J. Phys. Chem., 65, 229(1961).
- 8) H. V. Drushel, A. L. Sommers and R. C. Cox, Anal. Chem., 35, 2166 (1963).
- 9) E. C. Lim, J. D. Laposa and J. M. H. Yu, J. Mol. Spectrosc. 19, 412 (1966).