



VI. 蛍光光度法



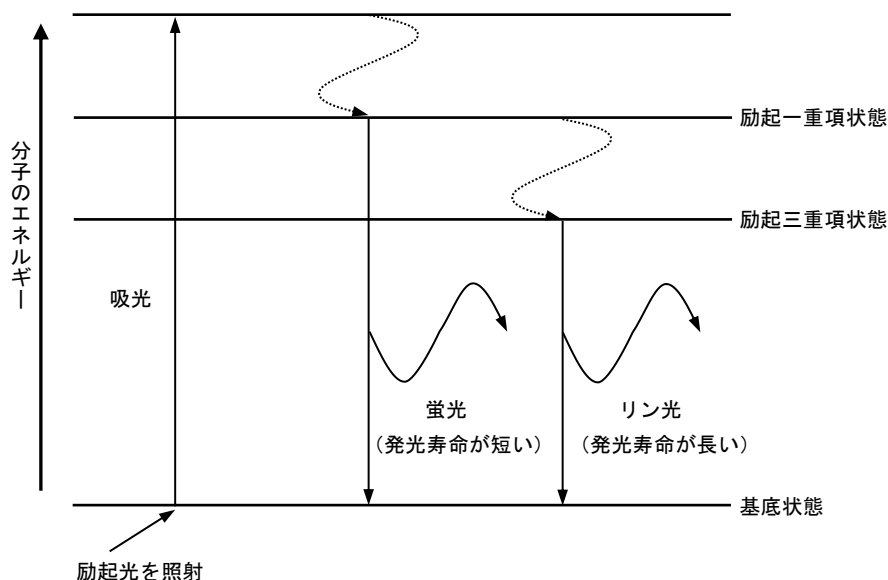
1 基礎

1) 概要

蛍光光度法は、蛍光物質の溶液に特定波長域の励起光を照射するとき、放射される蛍光の強度を測定する方法である。この方法はリン光物質にも適用される。

2) 原理

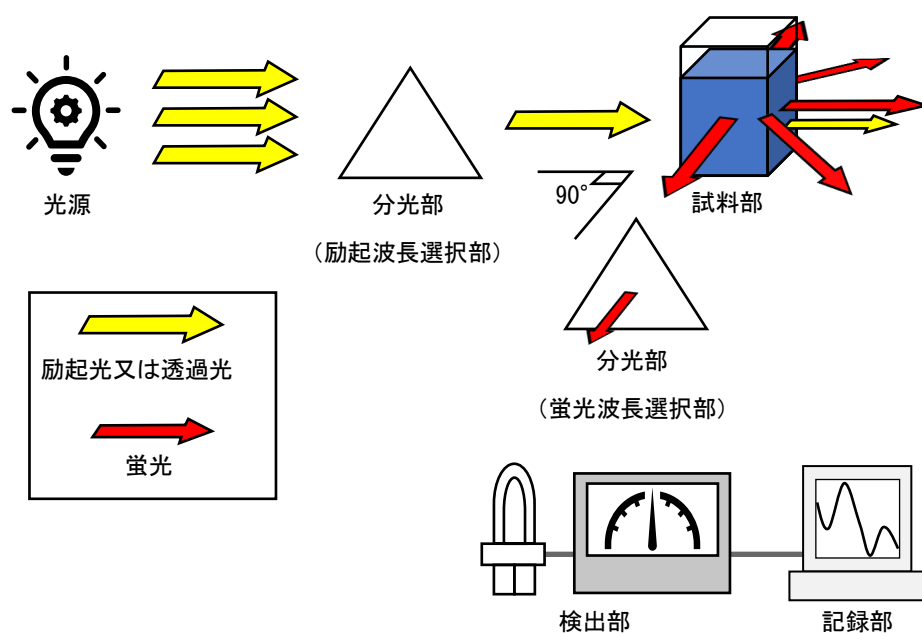
蛍光は吸収した励起エネルギーの一部を振動エネルギーなどにより無放射遷移した状態（励起一重項状態）から基底一重項状態に遷移する際に放射される光である。リン光は励起一重項状態からさらに無放射遷移した状態（励起三重項状態）から基底一重項状態に遷移する際に放射される光である。



物質に吸収された光の一部は、振動や熱などのエネルギーとして失われるため、物質から放射される蛍光やリン光のエネルギーは、励起光よりも小さくなる。以下は励起光、蛍光、リン光のエネルギーと波長の関係である。

	励起光	蛍光	リン光
エネルギー	大	←	小
波長	短	→	長

2 装置



① 光源

光源にはアルカリハライドランプ、キセノンランプ、レーザーなど励起光を安定に放射するものが用いられる。

② 分光部

励起波長を選択するか蛍光波長を選択するかにより、2種類のスペクトル（励起スペクトル、蛍光スペクトル）を得ることができる。

③ 試料部（セル）

通例、1 cm×1 cm の四面透明で無蛍光の石英製セルを用いる。

④ 検出部

検出部は、光源からの透過光を検出しないように励起光に対して直角の90°に配置される。

測定の際、レイリー散乱光（励起光と同じ振動数の散乱光）やラマン散乱光（励起光と異なる振動数の散乱光）の影響を受ける。

3 定量・定性分析

1) 蛍光強度(F)

蛍光強度(F)は、希薄溶液では溶液中の蛍光物質の濃度(c)及び層長(l)に比例する。また、励起光の強さ(I_0)及び蛍光又はリン光量子収率(ϕ)、モル吸光係数(ε)に比例する。

$$F = k I_0 \phi \varepsilon c l$$

k : 比例定数

$$\text{量子収率}(\phi) = \frac{\text{発光した蛍光又はリン光量子の数}}{\text{吸収した励起光量子の数}}$$

蛍光強度は溶液の濃度、温度、pH、溶媒又は試薬の種類、及びそれらの純度などによって影響されることが多い。以下、蛍光強度に影響を与える要因である。

濃度	高濃度になると内部遮蔽や相互作用により、 蛍光強度は減少する 。
温度	高温になると分子運動が活性化し、分子の衝突によりエネルギーを失うため、 蛍光強度は減少する 。
pH	分子形とイオン形の割合が変化することにより、 蛍光強度が変化する 。
クエンチャー	消光や擬似発光現象を起こす物質（クエンチャー）により 蛍光強度が変化する 。
光	蛍光物質には光で分解するものが多く、長時間励起光を照射すると 蛍光強度が減少する 場合がある。
粘度	粘度が高いと分子内運動が抑制し、分子の衝突が減少し、 蛍光強度が増加する 。

※**蛍光強度は相対値**であり、測定に用いる装置の励起光強度により強度が異なる。

2) スペクトル

蛍光光度法には、**励起スペクトル**と**蛍光スペクトル**がある。励起スペクトルは試料の吸収スペクトルとよく一致し、吸収極大波長でもっとも強い蛍光を生じる。蛍光スペクトルは励起スペクトルで得られた最も蛍光強度の高い波長（励起極大波長）を固定して、蛍光波長を変化させて得られるスペクトルである。

励起スペクトル	蛍光波長を固定し、 励起光の波長を変化 させて蛍光強度を測定したものである。
蛍光スペクトル	励起波長を固定し、 蛍光の波長を変化 させて蛍光強度を測定したものである。

