

高速フーリエ変換を用いた伝達関数による蛍光寿命の決定

板垣 昌幸[®], 渡辺 邦洋^{*}

(1994年7月1日受理)

高速フーリエ変換を用いた演算により, エタノール溶媒中におけるアントラセンの蛍光放射の伝達関数 $H(\omega)$ について検討した. $H(\omega)$ の理論式を蛍光放射モデルに基づいて導き, 実験的に求めた $H(\omega)$ からの蛍光寿命の決定法及び検量線の作成法を提案した. この方法は $H(\omega)$ をボード線図又は複素平面上に描くもので, 蛍光寿命を一義的に決定することができる. 本法により, アントラセンの蛍光寿命として 4.8 ± 0.2 ns を得た. 更に検量線の傾きの値からアントラセンの蛍光量子収率を計算した結果, 0.28 の値を得た. これらの値は, 従来の方法で得られた蛍光寿命及び文献値と良い一致を示した.

1 緒 言

蛍光分析法は微量物質濃度の決定に有効な方法であり, 多くの物質定量に用いられてきた¹⁾²⁾. 更に, 蛍光寿命 (τ) 及び蛍光放射の量子収率 (ϕ) を求めることで, 蛍光現象に関する多くの情報を得ることができる. 蛍光寿命の決定は, 位相差法³⁾⁴⁾又は蛍光放射の過渡応答解析で行われている. 蛍光減衰曲線は時間相関光電子計数法により測定される. 測定された過渡応答のデータ解析 (デコンボリューション) は, 位相法⁵⁾・ラプラス変換⁶⁾・フーリエ変換⁷⁾によるものが挙げられるが, 最も広く用いられている方法は, 最小二乗法を用いたカーブフィッティングによるものである. この蛍光寿命の決定法は, 仮定された蛍光の指数関数的減衰曲線 $\{h(t) = F_0 \exp(-t/\tau)\}$ と測定された励起光との畳み込み積分により蛍光放射の過渡応答曲線を計算し, この曲線を測定値に対して最小二乗法によるカーブフィッティングを行うことにより, 蛍光寿命を推定するものである. このような手順を用いて, これまでにアントラセン⁸⁾⁹⁾・シッフ塩基のアルミニウム錯体¹⁰⁾などの蛍光寿命が求められている.

この蛍光寿命決定法における問題点には以下のようなものがある.

(1) 時間相関光電子計数法で求められる蛍光放射の過渡応答曲線は, 蛍光寿命だけでなく励起光の関数にもなっ

ている. よって, 蛍光放射の過渡応答曲線だけからでは蛍光物質の特徴付けが行えない.

(2) 蛍光寿命を決定するために, 上記の畳み込み積分を用いた最小二乗法によるカーブフィッティングを行っている. よって, 一つの測定結果から複数の蛍光寿命の値が得られる可能性があり, 蛍光寿命が一義的に決まらない.

(3) (1), (2) の問題点は, 試料溶液中に複数の蛍光放射物質が含まれる場合には更に顕著となる.

このような問題を解決する手法としてフーリエ変換による解析法が挙げられる. しかし報告されているフーリエ変換による解析⁷⁾は, 指数関数減衰曲線をフーリエ平面で示したのみで, 十分に検討されているとは言いがたい. そこで, 本報では高速フーリエ変換 (FFT) の演算による蛍光放射の伝達関数を用いた蛍光放射反応の解析法について詳細に検討した. この方法によりエタノール溶媒中におけるアントラセンの蛍光寿命を決定し, 本解析法の有効性を明らかにしたので, その結果について報告する.

2 理 論

光の吸収により分子が励起され, 最低励起状態から基底状態に遷移するときに蛍光は放射される. 蛍光発光分子 A が励起から蛍光放射に至る過程の最も単純なモデルを Fig. 1 に示す. 図において, k_r は蛍光放射の速度定数, k_q は無放射遷移の速度定数, $h\nu$ と $h\nu'$ はそれぞれ励起光子と蛍光子, A^* は励起分子を示している.

* 東京理科大学理工学部工業化学科: 278 千葉県野田市山崎 2641

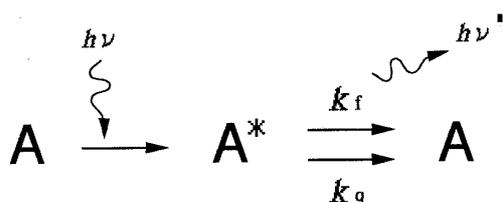


Fig. 1 Scheme of fluorescence emission model. $h\nu$ and $h\nu'$ represent the excitation ray and fluorescence, respectively. k_f and k_q represent the rate constants of fluorescence emission and quenching, respectively.

Fig. 1 において、励起された分子数を θ とすると、 θ に関する物質収支は以下のように表される*1。

$$d\theta/dt = 2.3\epsilon Cl I_L - (k_f + k_q)\theta \quad (1)$$

ここで、 ϵ は試料のモル吸光係数、 l は光路長、 C は試料の濃度、 I_L は励起光の光子数を示す。入射する励起光の強度が正弦波状で変調する場合、励起分子数 θ は

$$\theta = \theta_0 + |\Delta\theta| \exp(j\omega t) \quad (2)$$

と書ける。ここで、 j は虚数、 ω は角速度を表す。式(2)を式(1)に代入し、全微分すると

$$j\omega d\theta = 2.3\epsilon Cl dI_L - (k_f + k_q)d\theta \quad (3)$$

$$d\theta/dI_L = 2.3\epsilon Cl / (j\omega + k_f + k_q) \quad (4)$$

となる。一方、Fig. 1 において放射される蛍光の光子数 I_F は、

$$I_F = k_f \theta \quad (5)$$

と書け、その全微分は以下のようになる。

$$dI_F = k_f d\theta \quad (6)$$

$$dI_F/d\theta = k_f \quad (7)$$

蛍光放射のための Fig. 1 における伝達関数 $H(\omega)$ は励起光と蛍光の光子数の比で表され、式(4)と式(7)から以下のように書くことができる。

$$H(\omega) = dI_F/dI_L = 2.3\epsilon Cl k_f / (j\omega + k_f + k_q) \quad (8)$$

又、量子収率 ϕ は速度定数 k_f 、 k_q と以下の関係があるので、

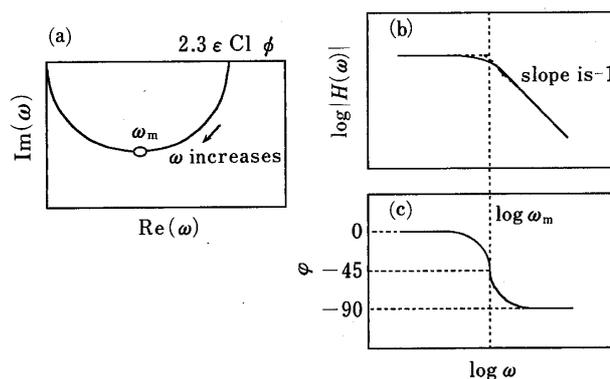


Fig. 2 The schemes of (a) Nyquist plots and (b), (c) bode plots to represent the transfer function of fluorescence emission, $H(\omega)$

$$\phi = k_f / (k_f + k_q) \quad (9)$$

$H(\omega)$ は次式で表される。

$$H(\omega) = 2.3\epsilon Cl k_f / (j\omega + k_f/\phi) \quad (10)$$

式(10)において、 $H(\omega)$ の実数部を $\text{Re}\{H(\omega)\}$ 、虚数部を $\text{Im}\{H(\omega)\}$ とすると、これらはそれぞれ、

$$\text{Re}\{H(\omega)\} = 2.3\epsilon Cl k_f^2 \phi / (k_f^2 + \omega^2 \phi^2) \quad (11)$$

$$\text{Im}\{H(\omega)\} = -2.3\epsilon Cl k_f \phi^2 \omega / (k_f^2 + \omega^2 \phi^2) \quad (12)$$

となる。式(11)、(12)から蛍光発光の伝達関数 $H(\omega)$ の複素平面上でのプロットの模式図を Fig. 2(a) に示す。角速度 ω が 0 の場合に $H(\omega)$ は Re 軸と交わり、 ω の増加につれて第 2 象限において半円を描き、再び原点で Re 軸と交わる。 $\omega=0$ のとき、

$$\text{Re}\{H(0)\} = 2.3\epsilon Cl \phi \quad (13)$$

となるが、蛍光物質とセルが一定である場合 $\epsilon l \phi$ は決まるので、 $\text{Re}\{H(0)\}$ は試薬濃度で一義的に決まる値であり、この値により試薬濃度を決定することができる。更に $\text{Re}\{H(0)\}$ と C のプロットの傾き $2.3\epsilon l \phi$ から量子収率を計算することができる。又、 $\text{Im}\{H(\omega)\}$ が最小値をとる場合の ω を ω_m とすると式(12)から $\omega_m = k_f/\phi$ となり、以下の関係を用いて蛍光寿命 τ を決定することができる。

$$\begin{aligned} \tau &= 1/(k_f + k_q) \\ &= \phi/k_f \\ &= 1/\omega_m \end{aligned} \quad (14)$$

$$= 1/2\pi f_m \quad (14')$$

ここで、 $\omega_m = 2\pi f_m$ であり、 f_m は励起光強度の変調周

*1 一般に吸収される励起光は $I_L(1 - 10^{-\epsilon Cl})$ で表されるが、 ϵCl が小さい場合には $2.3\epsilon Cl I_L$ と書ける。

波数を意味する。

更に, 伝達関数の絶対値 $|H(\omega)|$ は式(11)・(12) から以下のように導かれる。

$$|H(\omega)| = 2.3\epsilon Clk_f \phi / (k_f^2 + \omega^2 \phi^2)^{1/2} \quad (15)$$

又, $H(\omega)$ の位相遅れ ϕ は次式で表される。

$$\begin{aligned} \phi &= \arctan[\text{Im}\{H(\omega)\} / \text{Re}\{H(\omega)\}] \\ &= \arctan(-\omega \phi / k_f) \end{aligned} \quad (16)$$

$$= \arctan(-\omega \tau) \quad (16')$$

式(15) 及び (16) による角速度 ω の対数に対する $H(\omega)$ のボード線図の模式図をそれぞれ Fig. 2(b), (c) に示す。 $\log|H(\omega)|$ は低角速度域では一定の値であり, 高角速度域においては -1 の傾きをもって $\log \omega$ とともに減少する。 Fig. 2(b) より, 低角速度での $|H(\omega)| (= 2.3\epsilon Cl\phi)$ から試薬濃度を決定することができる。一方, 高角速度域では $\log|H(\omega)| = \log(2.3\epsilon Clk_f) - \log \omega$ の関係があるので, $\log \omega = 0 (\omega = 1)$ に外挿したときの $|H(\omega)|$ の値から k_f に関するパラメーターを得ることができる。更に上記の 2 直線の折れ点での角速度は式(14)と同様の関係を持ち, この角速度 ω_m から蛍光寿命 τ を決定することができる。 Fig. 2(c) において ϕ の値は, 低角速度では 0° であり, 角速度が大きくなるにつれて -90° に近づいていく。その遷移過程において Fig. 2(b) において折れ点となる角速度 $\omega = \omega_m$ のとき $\phi = -45^\circ$ となる。

本節において, (1) 蛍光放射モデルと伝達関数の関係, (2) 伝達関数の 2 種の表記法, (3) 伝達関数と蛍光寿命の関係, (4) 伝達関数による試薬濃度決定法と検量線の傾きから量子収率が求められたこと, を示した。この方法を用いてエタノール溶媒中におけるアントラセンの蛍光放射現象を解析する。

3 実 験

3.1 試 薬

アントラセン標準溶液: 市販特級品 (和光純薬工業製) 0.0100 g をエタノールに溶解して 100 ml とした。これをエタノールで希釈することで, 所定の濃度 (0.4~6 ppm) のアントラセン標準溶液を調製した。

3.2 装 置

150 W キセノンランプを光源とした島津分光蛍光光度計 RF-540 により, 試薬の最大励起波長を決定した。励起光及び蛍光放射の過渡応答の測定は, 高圧水素フラッシュランプを光源とした堀場蛍光寿命測定装置

NAES-500 を使用した。

3.3 測定方法

25 ml の試薬溶液は, 15 分間の N_2 脱気を行った後, 測定に用いた。蛍光放射の過渡応答は, 330 nm の波長を持つ励起光を用い時間相関光電子計数法により測定した。励起光は, 光源をフィルターにより 4.0% に強度を絞りながらアルミニウム板で反射させることで, 受光器において直接測定した。

4 結果と考察

4.1 畳み込み積分によるアントラセンの蛍光寿命の決定

Fig. 3(b) に時間相関光電子計数法で得た励起光の過渡応答 $I_L(t)$ とアントラセン (エタノール中に 4 ppm) の蛍光放射の過渡応答 $I_F(t)$ を示す。約 50 ns に及ぶ鋭い $I_L(t)$ とともに蛍光が放射され $\{I_F(t)\}$, 励起光が消滅した後も蛍光の放射が観察される。この蛍光放射の時間遅れが蛍光寿命に特徴付けられるものである。 Fig. 3 の測定において蛍光寿命は, 蛍光放射過程が線形システムであるという立場で, 畳み込み積分の計算値の測定値に対する最小二乗法を用いたカーブフィッティングにより決定される⁵⁾。

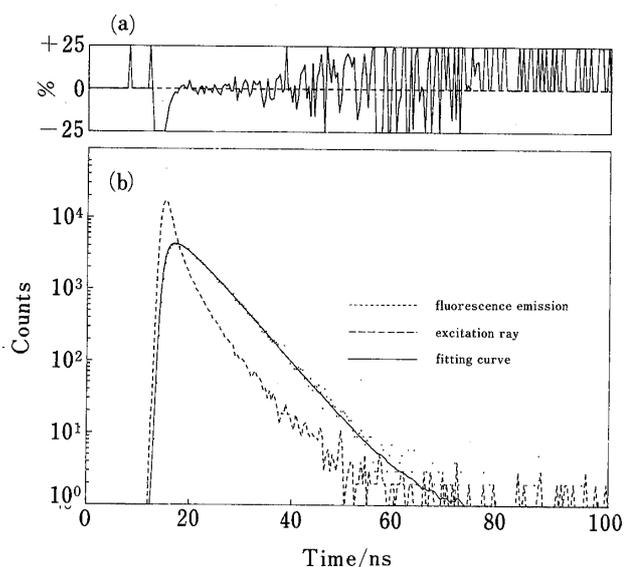


Fig. 3 (a) Expresses the residue for least-squares fitting, (b) The transient curves of excitation ray and fluorescence emission

Specimen is anthracene in degassed ethanol. The lifetime, 4.8 ns, is calculated from the deconvolution by curve fitting with Eq. (17).

$$I_F(t) = \int_0^t F_0 \exp(-T/\tau) \cdot I_L(t-T) dT \quad (17)$$

式(17)で、 F_0 は任意の定数である。このデコンボリューションにより求めた蛍光寿命は4.8 nsであった。このデコンボリューションでは、任意に F_0 と τ を仮定したカーブフィッティングにより τ が決定されるため、同程度の残差表示{Fig. 3(a)}から複数の τ が求められる可能性があるなど、一義的に τ を決定することができない問題点がある。このあいまいさは、試料溶液中に蛍光発光物質が複数種含まれる場合更に顕著となる。

4・2 伝達関数 $H(\omega)$ による蛍光寿命の決定

従来の蛍光寿命決定は蛍光放射現象の線形性に基づいて行われている¹¹⁾。本解析でもこの立場にのっとり以下の手順によりアントラセンの蛍光放射の伝達関数 $H(\omega)$ を決定した。励起光と蛍光の過渡応答 $I_L(t) \cdot I_F(t)$ として、4・1での測定値を用いた。測定された $I_L(t)$ と $I_F(t)$ を用いて卓上コンピュータにより次式のFFTによる演算を行うことで伝達関数 $H(\omega)$ を決定した。

$$H(\omega) = \text{FFT}\{I_F(t)\} / \text{FFT}\{I_L(t)\} \quad (18)$$

ここで、 $\text{FFT}\{X\}$ は X の高速フーリエ変換を意味する。本測定でのサンプリング数は256点であるが、このデータ列をゼロパディング^{*2}により1024点として演算を行っている。Wildら⁷⁾により、FFTによるデコンボリューションの方法が検討されているが、本報のように伝達関数をボード線図・複素平面上に現すこと、及び蛍光寿命と量子収率との関係を明らかにするまでには至っていない。得られた $H(\omega)$ は次のように絶対値と位相変化で表すことができる。

$$H(\omega) = |H(\omega)| \exp(j\psi) \quad (19)$$

Fig. 4(a) に伝達関数の絶対値 $|H(\omega)|$ の周波数 f ^{*3} に対する両対数プロット(ボード線図)を示す。いずれの試薬濃度の場合でも、 $\log|H(\omega)|$ は低周波数域では一定の値となり、高周波数域では $\log f$ に対して -1 の傾きを持って減少している。これらの現象は2理論で推定した Fig. 2(b) の形状と一致している。Fig. 4(a) に

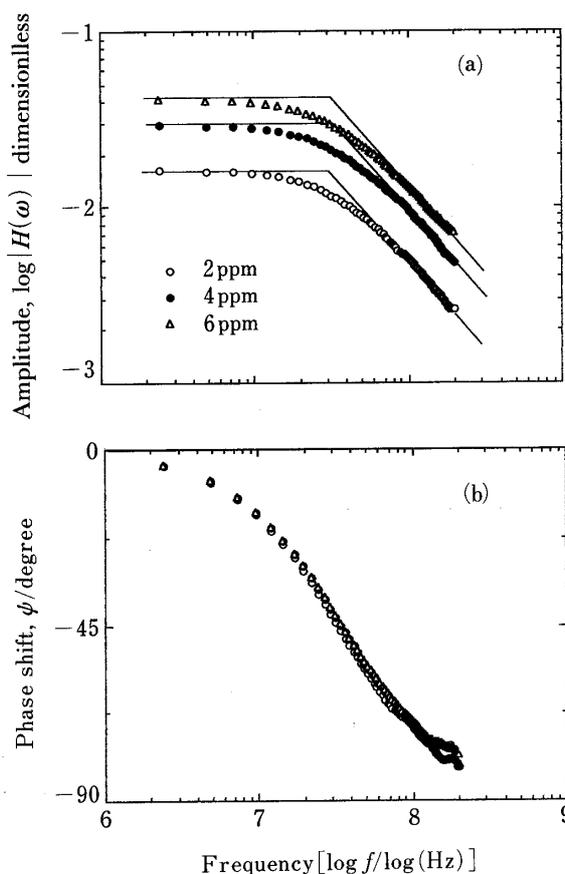


Fig. 4 Bode plots of transfer function of fluorescence emission, $H(\omega)$

(a) and (b) represent the frequency dependencies of amplitude and phase shift, respectively. Specimen is anthracene in degassed ethanol.

点線で示した折れ点周波数 f_m により、蛍光寿命を式(14')から計算することができ、4 ppm のアントラセンでは4.7 nsとなっている。又、Fig. 4(a)で全周波数域において、試薬濃度に比例して $|H(\omega)|$ の値が大きくなっている。Fig. 4(b)に位相変化 ψ を示すが、低周波数域ではほぼ0であるが、周波数が大きくなるに従い負に移行する。 $\psi = -45^\circ$ となる周波数は Fig. 4(a)で折れ点となる周波数と一致しており、Fig. 2(c)と一致している。更に、Fig. 4(b)において ψ が試薬濃度に依存していない点も、式(16)の理論式と一致している。

このように蛍光放射の伝達関数 $H(\omega)$ を求めることで蛍光寿命を一義的に決定することができる。又、4・1における蛍光寿命の結果及び文献値との比較は次節において行う。

*2 FFT演算の精度を上げるため、データ列の前後を0の値で満たすことでデータ数を増し、演算を行うこと。

*3 2理論では周波数を角速度として ω で示したが、実際の測定で得られる値は周波数 f であり、 $\omega = 2\pi f$ の関係がある。

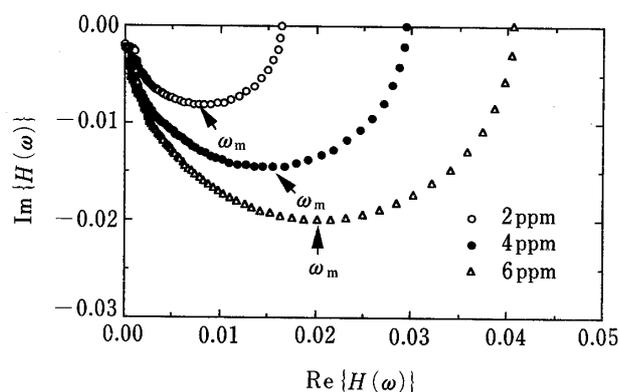


Fig. 5 Nyquist plots of transfer function of fluorescence emission, $H(\omega)$

Specimen is anthracene in degassed ethanol.

4.3 $H(\omega)$ の複素平面表示による蛍光寿命の決定と検量線の作成

式(18)の演算で得られた $H(\omega)$ を実数部と虚数部に分け, 複素平面上にプロットしたものが Fig. 5 である. 第2象限において半円を描き, Fig. 2(a) の特徴と一致している. Fig. 5 において半円の頂点における周波数 f_m が蛍光寿命に対応し, 式(14') を用いて蛍光寿命 τ を算出することができる. このようにして求めた各試薬濃度での蛍光寿命 τ を畳み込み積分(4.1)及びボード線図(4.2)より求めたものと共に Table 1 に示す. いずれの場合にも τ は 4.8 ± 0.2 ns の値をとり決定法に依存していない. Ware ら⁹⁾及び Rayner ら⁸⁾により, 脱気したエタノール中でのアントラセンの蛍光寿命はそれぞれ 5.0 ns, 5.1 ns と報告されており本報の結果とほぼ一致している. 更に, 同様の蛍光寿命の測定をナフタレン及びピレンについても行ったので, その結果を Table 1(b), (c) に示す. いずれの試薬の場合も畳み込み積分による結果と $H(\omega)$ によるものとの間にほとんど差がみられず, FFT 演算による伝達関数 $H(\omega)$ を用いた蛍光寿命決定法は, 従来の方法である畳み込み積分により求めた結果と比較してそんな色のないことが分かる. 脱気溶媒中におけるナフタレン¹²⁾, ピレン¹³⁾の蛍光寿命はそれぞれ 96, 130 ns と報告されており, 本報での結果は文献値と比較して小さな値となっている. これは本報での N_2 のバブリングによる脱気が不完全であるため, 長寿命を持つナフタレンとピレンの蛍光放射過程が溶存酸素による消光作用を受けたためである(Fig. 1 において, この作用は k_q に含まれる).

Fig. 5 において $\text{Re}\{H(0)\}$ の値は試薬濃度に依存して増加しているが, $\text{Re}\{H(0)\}$ の試薬濃度に対する検量

Table 1 Fluorescence lifetimes obtained by various analytical methods.

Sample	Concentration, ppm	Fluorescence lifetime/ns		
		Convolution	Bode plots	Nyquist plots
(a)anthracene	0.4	4.8	4.7	4.7
	2	4.9	5.0	5.0
	4	4.8	4.7	4.7
	6	4.8	4.7	4.7
(b)naphthalene [†]	0.4	38	37	37
	2	34	34	34
	4	37	36	36
	6	36	36	36
(c)pyrene [†]	0.040	38	39	39
	0.2	42	43	43
	0.4	47	47	47
	0.6	49	49	49

(a), (b) and (c) are results for anthracene, naphthalene and pyrene in ethanol, respectively.

[†] These values are smaller than previous ones^{12),13)} in degassed solvent, because dissolved oxygen gasses influence the fluorescence emissions.

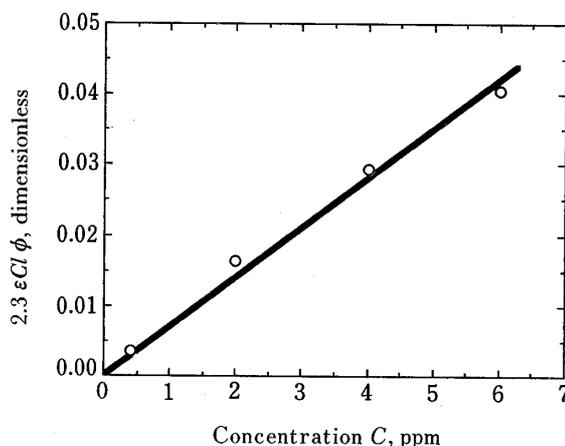


Fig. 6 Calibration curve to determine the concentration of anthracene was obtained from the Nyquist plots of transfer function, $H(\omega)$, in Fig. 5.

線を Fig. 6 に示す. 両者は直線関係にあり式(13)の関係を満たしており, その傾きが $2.3\epsilon l\phi$ となる. 分光光度計(島津 UV-2100S)を用い測定した励起波長 330 nm でのアントラセンのモル吸光係数 ϵ は 2.16×10^3 $\text{dm}^3/\text{cm mol}^{-1}$ であった. この ϵ の値と $l(1.0 \text{ cm})$ 及び検量線の傾きから計算された量子収率 ϕ は 0.28 であり, 文献値 0.3¹⁴⁾ とほぼ一致している. 更に, $k_f = \phi/\tau$

及び $k_q = 1/\tau - k_f$ の関係から, $k_f = 5.8 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, $k_q = 1.5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ と求めることができる。

4・4 蛍光放射の伝達関数 $H(\omega)$ による解析の長所と今後の発展

本報では FFT 演算により蛍光放射の伝達関数 $H(\omega)$ を求め, $H(\omega)$ の二通りの表示法を示した。更に, $H(\omega)$ による蛍光寿命 τ の決定法及び検量線の作成法を提案した。以下に本報で試みた解析法を従来の方法と比較した場合の長所と今後の発展の可能性を述べる。

(1) 反応機構と伝達関数を関連づけることができるため, 単に蛍光寿命 (時定数) を決定するのみでなく, 素反応の速度定数 k_f , k_q の決定を行える。更に, 他の消光作用の解析にも対応させることができる。

(2) 従来の方法のようにカーブフィッティングからでなく, 固有値から蛍光寿命を決定できる。又, 検量線作成における試薬濃度に対応するパラメーター (本報では $2.3\epsilon Cl\phi$) が一義的に決まり, 検量線の傾きから量子収率を求めることができる。

(3) 蛍光発光の過渡応答は発光現象自体のみでなく, 励起光の条件にも依存する。本報で求めた伝達関数は蛍光現象固有の値であり, 励起光に依存しない。

最後に, 実験の一部を担当していただいた富沢之貴氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) 西川泰治, 平木敬三: “蛍光・りん光分析法”, 日本分析化学会編, (1987), (共立出版)。
- 2) S. G. Schulman: “Molecular Luminescence Spectroscopy”, Chemical Analysis Vol. 77, (1985), (J. Wiley & Sons, New York)。
- 3) 西川泰治, 平木敬三: “蛍光・りん光分析法”, 日本分析化学会編, p. 81 (1987), (共立出版)。
- 4) E. Gratton, M. Limkeman, J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, H. Cerek, G. Laczko: *Biophys. J.*, **46**, 480 (1984)。
- 5) J. N. Demas, A. W. Adamson: *J. Phys. Chem.*, **75**, 2463 (1971)。
- 6) A. Gafni, R. L. Modlin, I. Brand: *Biophys. J.*, **15**, 263 (1975)。
- 7) U. P. Wild, A. R. Holzwarth, H. P. Good: *Rev. Sci. Instrum.*, **38**, 1621 (1977)。
- 8) D. M. Rayer, A. E. Mckinnon, A. G. Szabo, P. A. Hackett: *Can. J. Chem.*, **54**, 3246 (1976)。
- 9) W. R. Ware, C. J. Lewis: *J. Chem. Phys.*, **57**, 3546 (1973)。
- 10) 渡辺邦洋, 森上 賢: 分析化学, **42**, 557 (1993)。
- 11) R. A. Lampert, L. A. Chewter, D. Phillips, D. V. O'Connor, A. J. Roberts, S. R. Meech: *Anal. Chem.*, **55**, 68 (1983)。
- 12) 木下一彦, 御橋廣真編: “蛍光測定—生物科学への応用—”, p. 187 (1988), (学会出版センター)。
- 13) 南 茂夫: “ナノ, ピコ秒の化学”, 化学総説 No. 24, p. 32 (1979), (学会出版センター)。
- 14) 西川泰治, 平木敬三: “蛍光・りん光分析法”, 日本分析化学会編, p. 77 (1987), (共立出版)。



Determination of fluorescence lifetime with transfer function processed by fast Fourier transformation. Masayuki ITAGAKI and Kunihiro WATANABE (Department of Industrial Chemistry, Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo, 2641, Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278)

The transfer function, $H(\omega)$, for fluorescence emission of anthracene in ethanol has been calculated from the excitation ray and fluorescence time profiles by the fast Fourier transformation (FFT) process. The theoretical expressions of the $H(\omega)$ have been derived on the basis of the fluorescence emission model, $H(\omega) = 2.3\epsilon Clk_f / (j\omega + k_f + k_q)$, where ϵ is the molar extinction coefficient, C is the concentration of specimen, l is the cell length, and k_f and k_q are the rate constants of fluorescence emission and quenching, respectively. New analytical methods to determine the fluorescence lifetime τ and to construct the calibration curve have been proposed using the $H(\omega)$. The fluorescence lifetime of anthracene obtained from both bode plots and Nyquist plots of the $H(\omega)$ was 4.8 ± 0.2 ns. From the slope of the calibration curve, the fluorescence quantum yield of anthracene has been determined to be 0.28. These results are in good agreement with the previous works. Furthermore, rate constants of fluorescence emission and quenching have been calculated from the analysis of $H(\omega)$.

(Received July 1, 1994)

Keyword phrases

transfer function; fluorescence lifetime; anthracene; fast Fourier transformation.