

技術論文

高速フーリエ変換を用いた 2 成分蛍光寿命の解析

板垣 昌幸^{®*}, 渡辺 邦洋*

(1994 年 9 月 7 日受付)

(1995 年 1 月 28 日審査終了)

2 成分の蛍光物質としてエタノール中のピレンとアントラセンを選定し, 高速フーリエ変換を用いた 2 成分蛍光寿命に対する三つの解析を試みた. (1) 励起光と蛍光の減衰曲線の周波数領域でのクロススペクトルから蛍光放射の伝達関数を求め, 理論式によるシミュレーションを行うことで, 素過程の速度定数を決定した. 更に, 求めた速度定数から 2 成分蛍光寿命を計算した. (2) 周波数領域において伝達関数の実数成分と虚数成分の比からアントラセンの蛍光寿命を決定した. (3) 時間領域での蛍光放射のインパルス応答関数を求め, 最小二乗法により 2 成分蛍光寿命を決定した. これらの解析法で求めた蛍光寿命はいずれもよい一致を見せ, 高速フーリエ変換を用いた 2 成分蛍光寿命の解析の有効性が示された.

1 緒 言

蛍光分析法は, 比較的安価で取り扱いの容易な測定装置により, ppb レベルの試料の定量が可能であるので, 様々な分野で利用されている. 蛍光特性を表すパラメーターには蛍光スペクトル, 蛍光量子収率, 蛍光強度, 蛍光寿命などがある. 蛍光寿命は通常 $10^{-5} \sim 10^{-10}$ s の値であり, この値を測定することにより蛍光放射現象の速度論的解析が行える. 蛍光寿命の測定方法には, 位相差法¹⁾, パルスサンプリング法²⁾, 励起プローブ法³⁾, 時間相関单一光子計数法がある. この中で最も一般的な方法は時間相関单一光子計数法である. この方法は, 時間電圧変換器 (time to amplitude converter, TAC) により単一光子の時間軸上での確率分布を求め, 蛍光減衰曲線を決定するものである. この蛍光減衰曲線に対する解析法には, 位相面プロット法⁴⁾, ラプラス変換⁵⁾, フーリエ変換⁶⁾を用いたもの, 及び最小二乗法によるカーブフィッティングが挙げられるが, 現在ではほとんどの解析が最小二乗法によるカーブフィッティングを用いて行われている^{7,8)}.

既報⁹⁾において著者らは, 時間相関单一光子計数法を用いて測定した蛍光減衰曲線に対するフーリエ変換による新しい解析法を提案し, アントラセンの蛍光寿命と蛍光量子収率を求めることで, その解析法の有効性を確認した. 本報では, 既報の解析法を 2 種の蛍光成分を有

する溶液の解析に発展させることを目的とした. そこで, 高速フーリエ変換を用いた演算により, 周波数領域における蛍光放射の伝達関数を決定し, 二通りのプロットを行うことで, 蛍光寿命を求めた. 更に逆高速フーリエ変換により時間領域における蛍光放射のインパルス応答関数を計算し, カーブフィッティングによる解析を行った. なお, 2 種の蛍光物質として蛍光寿命が明確に異なり, 化学的に安定な試薬であるアントラセンとピレンを選定した.

2 理 論

2・1 周波数領域における伝達関数

既報⁹⁾において, 1 成分の蛍光物質を含む溶液における周波数領域での伝達関数 $H(\omega)$ の理論式を導いた. 本報では 2 成分の蛍光物質を含む系での $H(\omega)$ の導出を行う. Fig. 1 に 2 種の蛍光物質を含む溶液における蛍光放射現象のスキームを示す. 励起光照射により 2 種の蛍光物質 A・B が同時に励起され, それぞれ異なる速度定数により蛍光放射遷移・無放射遷移を起こす. 図において, k_{if} は蛍光放射遷移の速度定数, k_{iq} は無放と蛍光子, $A^{*1} \cdot B^{*1}$ は励起分子を示している. スキーム [I] において, 励起分子数をそれぞれ $\theta_A \cdot \theta_B$ とすると, $\theta_A \cdot \theta_B$ に関する物質収支は以下のように表される^{*1}.

* 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

^{*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.

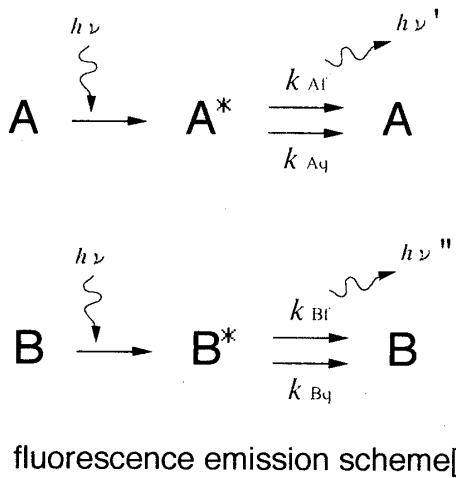


Fig. 1 Scheme of fluorescence emission from two fluorescent substances

$h\nu$ represents the excitation ray, $h\nu'$ and $h\nu''$ represent the fluorescence. k_{Af} and k_{Aq} represent the rate constants of fluorescence emission and quenching, respectively.

$$d\theta_A/dt = 2.3\epsilon_A I C_A I_L - (k_{Af} + k_{Aq}) \theta_A \quad (1)$$

$$d\theta_B/dt = 2.3\epsilon_B I C_B I_L - (k_{Bf} + k_{Bq}) \theta_B \quad (2)$$

ここで、 $\epsilon_A \cdot \epsilon_B$ はそれぞれの試料のモル吸光係数、 I はセル長、 $C_A \cdot C_B$ はそれぞれの試料の濃度、 I_L は励起光の光量子数を示す。入射する励起光の強度が正弦波状で変調した場合、励起分子数 θ_i は

$$\theta_i = \theta_{io} + |\Delta\theta_i| \exp(j\omega t - \phi_i) \quad (3)$$

と書ける。ここで、 j は虚数、 ω は角速度、 ϕ_i は位相差、 θ_{io} は励起光が定常で入射されると仮定した場合の励起分子数を表す。式(3)を式(1)、(2)に代入し、全微分すると

$$j\omega d\theta_A = 2.3\epsilon_A I C_A dI_L - (k_{Af} + k_{Aq}) d\theta_A \quad (4)$$

$$j\omega d\theta_B = 2.3\epsilon_B I C_B dI_L - (k_{Bf} + k_{Bq}) d\theta_B \quad (5)$$

となり、更に変形して

$$d\theta_A/dI_L = 2.3\epsilon_A I C_A / (j\omega + k_{Af} + k_{Aq}) \quad (4')$$

$$d\theta_B/dI_L = 2.3\epsilon_B I C_B / (j\omega + k_{Bf} + k_{Bq}) \quad (5')$$

となる。一方、スキーム [I] において放射される蛍光の光量子数 I_F は、

$$I_F = k_{Af} \theta_A + k_{Bf} \theta_B \quad (6)$$

と書け、その全微分は以下になる。

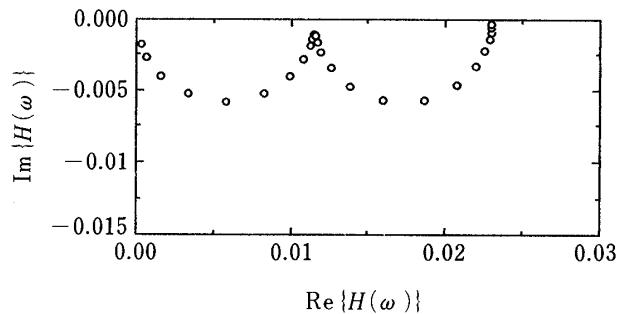


Fig. 2 Simulated results for the transfer function of the fluorescence emission, $H(\omega)$, from two fluorescent species

$$k_{Af} = k_{Aq} = 5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}, k_{Bf} = k_{Bq} = 1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}, \epsilon_A = \epsilon_B = 0.1 \text{ cm}^{-1} \text{ ppm}^{-1}, I = 1 \text{ cm}, C_A = C_B = 0.1 \text{ ppm}$$

$$dI_F = k_{Af} d\theta_A + k_{Bf} d\theta_B \quad (7)$$

又、式(7)を変形すると

$$dI_F/dI_L = k_{Af} d\theta_A/dI_L + k_{Bf} d\theta_B/dI_L \quad (8)$$

となる。式(8)は励起光と蛍光の光量子数の比であり、スキーム [I] における伝達関数 $H(\omega)$ を表す。伝達関数 $H(\omega)$ は式(8)と式(4')及び(5')から以下のように書くことができる。

$$H(\omega) = dI_F/dI_L \\ = 2.3\epsilon_A I C_A k_{Af} / (\omega + k_{Af} + k_{Aq}) \\ + 2.3\epsilon_B I C_B k_{Bf} / (\omega + k_{Bf} + k_{Bq}) \quad (9)$$

式(9)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、

$$\text{Re}\{H(\omega)\} \\ = 2.3\epsilon_A I C_A k_{Af} (k_{Af} + k_{Aq}) / \{\omega^2 + (k_{Af} + k_{Aq})^2\} \\ + 2.3\epsilon_B I C_B k_{Bf} (k_{Bf} + k_{Bq}) / \{\omega^2 + (k_{Bf} + k_{Bq})^2\} \quad (10)$$

$$\text{Im}\{H(\omega)\} \\ = -2.3\epsilon_A I C_A k_{Af} \omega / \{\omega^2 + (k_{Af} + k_{Aq})^2\} \\ -2.3\epsilon_B I C_B k_{Bf} \omega / \{\omega^2 + (k_{Bf} + k_{Bq})^2\} \quad (11)$$

となる。Fig. 2 に任意の速度定数を式(10)、(11)に代入した場合の $H(\omega)$ を示す。図において $H(\omega)$ は二つの半円の合成となっており、高周波側から、それぞれ A・B の蛍光寿命の伝達関数に対応するものになっている。既報⁹⁾において、蛍光物質が一つの場合には半円の頂点での周波数 f_m が蛍光寿命 τ と以下の関係を持つこ

とを報告した。

$$\tau = 1/2\pi f_m \quad (12)$$

しかし 2 成分系の場合には、2 成分の分離が十分に行われていなければ、式(12)の関係を厳密には満たさない。しかし実験結果に対して、式(9)を用いたシミュレーションを行うことで素過程における各速度定数 k_i を求めることができる。更にシミュレーションにより得られた各速度定数を用いることで、各蛍光物質の蛍光寿命を以下の関係から求めることができる。

$$\tau_A = 1/(k_{Af} + k_{Aq}) \quad (13)$$

$$\tau_B = 1/(k_{Bf} + k_{Bq}) \quad (14)$$

次に $H(\omega)$ の実数成分に対する虚数成分の比による蛍光寿命の決定法を検討する。式(10), (11)から $H(\omega)$ の虚数成分と実数成分の比を角速度で割った値 $-\text{Im}\{H(\omega)\}/\omega \text{Re}\{H(\omega)\}$ を計算すると以下のようになる。

$$\begin{aligned} -\text{Im}\{H(\omega)\}/\omega \text{Re}\{H(\omega)\} \\ = \{K_A \tau_A / (\omega^2 \tau_A^2 + 1) + K_B \tau_B / (\omega^2 \tau_B^2 + 1)\} \\ / \{K_A / (\omega^2 \tau_A^2 + 1) + K_B / (\omega^2 \tau_B^2 + 1)\} \end{aligned} \quad (15)$$

ここで $K_i = 2.3\epsilon_i IC_i \phi_i$, $\phi_i = k_{if}/(k_{if} + k_{iq})$ である。
 $\tau_A \ll \tau_B$ のとき, $\omega \rightarrow \infty$ では式(15)は

$$-\text{Im}\{H(\omega)\}/\omega \text{Re}\{H(\omega)\} = \tau_A \quad (16)$$

となり^{*2}, $\omega \rightarrow 0$ では

$$\begin{aligned} -\text{Im}\{H(\omega)\}/\omega \text{Re}\{H(\omega)\} \\ = (K_A \tau_A + K_B \tau_B) / (K_A + K_B) \end{aligned} \quad (17)$$

となる。式(16)より小さい時定数を持つ蛍光寿命 τ_A を決定することができる。更に, K_A , K_B は Fig. 2 におけるそれぞれの半円の直径に相当するが、これらの直径を実験的に求めることができれば、 τ_B を決定することも可能である。

2・2 フーリエ変換による実験結果からの伝達関数とインパルス応答関数の決定法

蛍光放射現象の線形性から、時間領域における励起光量と蛍光放射量の関係は次式で記述される。

$$I_F(t) = \int_0^t h(T) I_L(t-T) dT \quad (18)$$

^{*2} いわゆる位相差法¹⁾における以下の理論式と同義である。

$$\tan \delta = 2\pi f\tau \quad (\delta \text{ は位相遅れ})$$

ここで、 $h(t)$ は蛍光放射のインパルス応答関数である。一般的には、 $h(t)$ を以下のように複数の指数関数の和と仮定し、式(18)の畳み込み積分により蛍光減衰曲線を計算した後、実測値と比較することで $h(t)$ を決定する。

$$h(t) = \sum_{i=1}^n F_i \exp(-t/\tau_i) \quad (19)$$

式(18)は周波数領域においては簡単な積で表される。

$$I_F(\omega) = H(\omega) I_L(\omega) \quad (20)$$

$$H(\omega) = I_F(\omega) / I_L(\omega) \quad (20')$$

式(20)で $I_F(\omega)$ 及び $I_L(\omega)$ はそれぞれ以下の演算により決定することができる。

$$I_F(\omega) = \text{FFT}\{I_F(t)\} \quad (21)$$

$$I_L(\omega) = \text{FFT}\{I_L(t)\} \quad (22)$$

ここで、 $\text{FFT}\{X\}$ は X の高速フーリエ変換を示す。更に、式(20)で求めた伝達関数 $H(\omega)$ に対して逆高速フーリエ変換 (IFFT $\{X\}$) を行うことで、蛍光放射のインパルス応答関数を求めることができる。

$$h(t) = \text{IFFT}\{H(\omega)\} \quad (23)$$

Andre ら¹⁰⁾は式(23)の演算を用いて、1 成分の蛍光物質を含む系での蛍光放射のインパルス応答関数を求めている。

3 実験

3・1 試薬

2 種の蛍光物質として、異なる蛍光寿命を有するアントラセンとピレンを含む溶液を試料とした。エタノールを溶媒とする 100 ppm のアントラセン標準溶液と 100 ppm のピレン標準溶液を混合し、これをエタノールで希釈することで、所定の濃度 (アントラセン 0.16 ppm, ピレン 0.02~0.2 ppm) の試験溶液を調製した。本実験での試料はすべて特級試薬と 2 回蒸留水で調製されている。

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 ガス脱気を行った後、測定に用いられた。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された。励起光は、光源をフィルターにより 1.1% に強度を絞りながらアルミニウム板で反射することで、受光器において直接測定した。測定された励起光と蛍光の減衰曲線を直接卓上コンピュータに取り込み、2 理論で示した手順により伝達関数 $H(\omega)$ 及びインパルス応答関数 $h(t)$ を計算した。

4 結果と考察

4・1 周波数領域における解析

式(20')の演算で得られた $H(\omega)$ を実数部と虚数部に分離し、複素平面上にプロットしたものが Fig. 3 である。なお、解析の精度を向上させるために、256 点の測定数を 1024 点にゼロフーリング⁹⁾した後、FFT による演算処理を行った。いずれのピレン濃度の場合も、第四象限において二つの半円が観察される。高周波数側の半円は、いずれの場合もほぼ一定の直径をもつことから、アントラセンの蛍光放射に対応するものである。低周波数側の半円はピレンによるもので、濃度増加に従い直径が大きくなっている。Fig. 3において、二つの半円を明確に分離することができれば、それらの頂点での周波数から式(12)の関係を用いてそれぞれの蛍光寿命を決定することができる。それぞれの半円の直径から溶質濃度と蛍光量子収率に関する情報を得ることができる。しかし、Fig. 3においてピレン濃度が 40 ppb と 80 ppb の場合の $H(\omega)$ を除いては、二つの半円の境界は明りようではない。

実験結果に対して、式(10)、(11)を用いてシミュレーションを行った結果を Fig. 4 に示す。図において、各速度定数は任意に仮定されており、モル吸光係数³⁾、セル長及び試薬濃度は実測値を用いた。いずれのピレン濃度においても、軌跡は二つの半円を描き、ピレン濃度の増加に伴って低周波数側の半円が大きくなっている。又、シミュレーションによる半円の直径及び周波数依存性も測定結果 (Fig. 3) と一致しており、Fig. 1 のスキームでここでの蛍光放射現象を説明できることを示している。Fig. 4 で得られた速度定数から、式(13)、(14)を用いてアントラセン、ピレンの蛍光寿命を計算する

³⁾ 分光光度計(島津 UV-2100S)を用いて測定したところ、アントラセン、ピレンのモル吸光係数 ε は 330 nm でそれぞれ $2.16 \times 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol cm}$ 、 $1.80 \times 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol cm}$ であった。

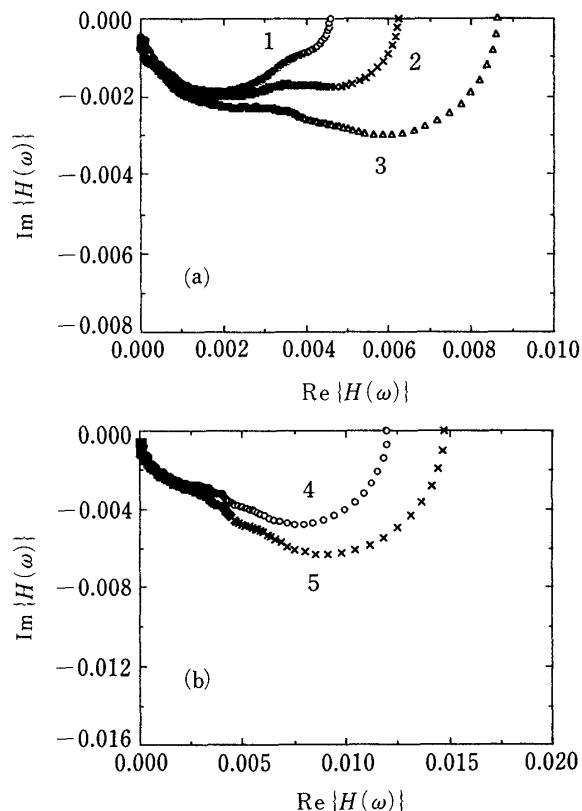


Fig. 3 Nyquist plots $H(\omega)$ in an ethanol solution containing anthracene and pyrene

The concentration of anthracene is 0.16 ppm. The concentrations of pyrene are 0.02 ppm in solution 1, 0.04 ppm in solution 2, 0.08 ppm in solution 3, 0.12 ppm in solution 4, and 0.2 ppm in solution 5

と、それぞれ 5, 71 ns となる。

次に、式(20')を用いて実験結果から計算した $H(\omega)$ の虚数部と実数部の比を角速度で割った値 $-Im\{H(\omega)\}/\omega Re\{H(\omega)\}$ を周波数に対してプロットした結果を Fig. 5 に示す。いずれのピレン濃度においても低周波数域及び高周波数域において平坦部がみられ、それらの中間周波数域において値が遷移している。式(16)に従い、Fig. 5 の結果から τ_A は 5.9 ± 0.9 ns となる。

4・2 時間領域における蛍光放射のインパルス応答関数

時間相関单一光子計数法で得られた蛍光減衰曲線は、励起光と蛍光放射のインパルス応答関数の畳み込み積分 {式(18)} の結果であり、現実には励起光の光源の種類と状態に依存する。本研究で用いた NAES-500 の励起光パルスは減衰するまでに約 50 ns の遷移時間を必要と

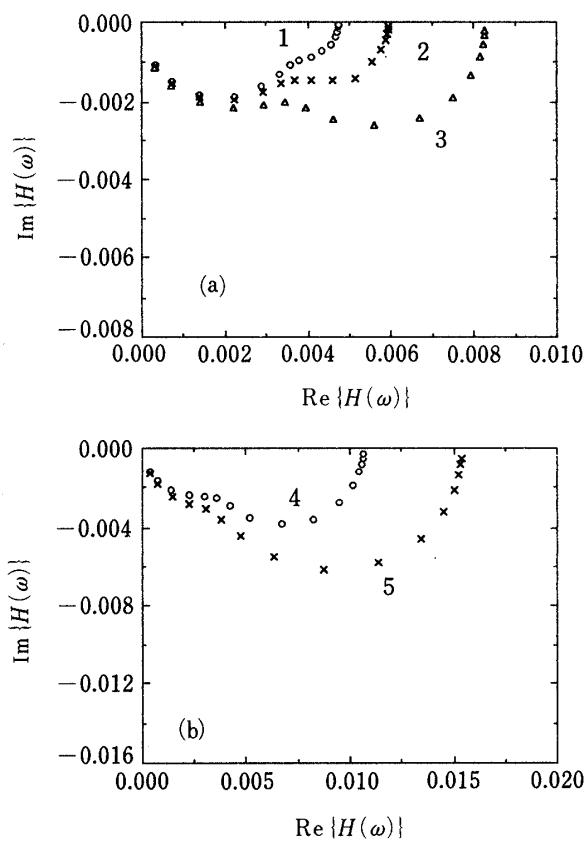


Fig. 4 Simulated results of $H(\omega)$
 $k_{Af}=1.6 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$, $k_{Aq}=4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, $k_{Bf}=4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$,
 $k_{Bq}=1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, $\epsilon_A=2.16 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,
 $\epsilon_B=1.8 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $l=1 \text{ cm}$, $C_A=0.16$
 ppm , $C_B=0.02 \text{ ppm}$ (1), $=0.04 \text{ ppm}$ (2), 0.08 ppm
(3), 0.12 ppm (4), 0.2 ppm (5)

する^{*4}。アントラセンの蛍光寿命は約 5 ns であることから、蛍光減衰曲線は励起光に対してわずかな時間遅れをみせるのみで、一般的にはこのデータに対して式(18)を用いたカーブフィッティングを行うデコンポリューションから蛍光寿命を決定する。本節ではフーリエ変換を用いた演算により、蛍光減衰曲線を励起光で補正することで、時間領域における蛍光放射のインパルス応答関数 $h(t)$ を求め、その結果から試料中に含まれる 2 種の蛍光体の蛍光寿命を求める。式(23)の演算により計算したピレンとアントラセンを含む試料溶液の蛍光放射のインパルス応答関数 $h(t)$ を Fig. 6 に示す。周波数領域におけるクロススペクトルでは高周波数域の雑音が強調されるために、逆高速フーリエ変換時においては 250 MHz

^{*4} 数 ps のパルス幅を持つレーザーによる励起光を用いた蛍光寿命装置¹¹⁾では本節で述べていることは問題とはならない。

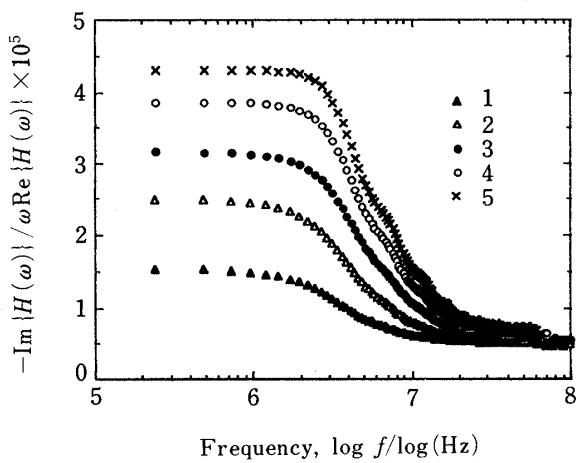


Fig. 5 Plots of $-\text{Im}\{H(\omega)\}/\omega \text{Re}\{H(\omega)\}$ vs. $\log f$
The concentrations of anthracene and pyrene refer to Fig. 3.

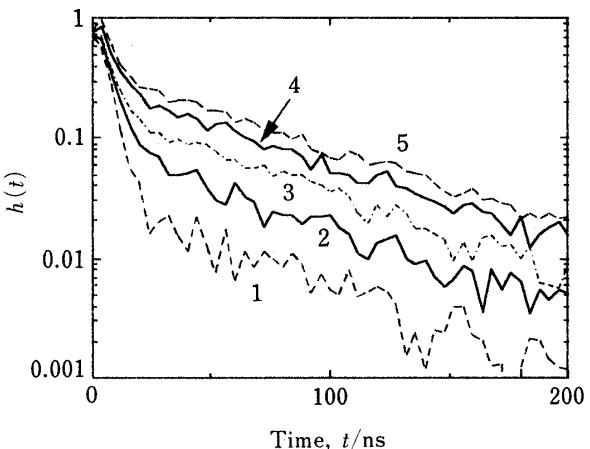


Fig. 6 Impulse response functions, $h(t)$, of fluorescence emission from anthracene and pyrene
The concentrations refer to Fig. 3.

以上の高調波成分を無視している。いずれの場合も二つの直線的な減衰が見られ、ピレン濃度が上昇するに従って長時間側の蛍光強度が大きくなっている。本実験では蛍光体は 2 種であることから式(19)において $n=2$ として、最小二乗法によるカーブフィッティングを行い蛍光寿命を決定した。このようにして求めた蛍光寿命を Fig. 4, 5 で求めた結果と併せて Table 1 に示す。決定法にかかわらずいずれの結果同士もだいたい一致を示しているものの、多少のばらつきも見せている。これは、Fig. 6 の結果においては蛍光減衰曲線測定時に低ピレン濃度の試料では高周波雑音の影響を大きく受けたためであ

Table 1 Fluorescence lifetimes obtained by various analytical method

	Anthracene	Pyrene
(a) Simulation of $H(\omega)$		
solution 1~5	5.0 ns	71 ns
0.16 ppm anthracene	5.1 ns	
0.02 ppm pyrene		70 ns
(b) $-\text{Im}/\omega$ replots		
solution 1	5.1 ns	
solution 2	5.0 ns	
solution 3	5.3 ns	
solution 4	6.1 ns	
solution 5	6.8 ns	
(c) Curve fitting of $h(t)$		
solution 1	4.7 ns	74 ns
solution 2	6.1 ns	70 ns
solution 3	4.5 ns	63 ns
solution 4	5.8 ns	67 ns
solution 5	4.8 ns	68 ns

The fluorescence lifetime of pyrene is smaller than that obtained in a previous study¹²⁾ in a degassed solvent, because dissolved oxygen influences the fluorescence emissions.

り, Fig. 5においては τ_A が高濃度のピレンの蛍光放射の影響から完全に分離されていないことによるものと考えられる. Rayer⁷⁾ ら及び Ware⁸⁾ らにより, 脱気されたエタノール溶媒中でのアントラセンの蛍光寿命はそれぞれ 5.0, 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. しかし, 報告されている脱気されたエタノール溶媒中のピレンの蛍光寿命は 130 ns であり¹²⁾, 本報での結果とは大きく違っている. これは本報で行った N_2 ガスによるバブリング脱気が十分ではないことに起因するものである.

4・3 高速フーリエ変換を用いた蛍光寿命の解析の特徴及びその発展

周波数及び時間領域において, 高速フーリエ変換を用いた幾つかの蛍光寿命決定法を検討したので, その特徴(長所及び短所)について述べる.

- (1) 周波数及び時間領域での伝達関数を決定できる.
- (2) 蛍光放射現象の素過程を仮定した反応スキームから伝達関数を理論的に導くことができ, 測定結果と比較することで, 素反応の速度定数を推定することができる. これは, 蛍光放射に複雑な消光過程が存在する場合・エクサイマー化反応が存在する場合などの解析に有効となる.
- (3) Fig. 5 のプロットから高周波数側のみであるが, 一義的に蛍光寿命が決定される.

(4) $H(\omega)$ の複素平面プロットにおいて, 二つの半円を明確に区別できない場合がある. これは 2 種の蛍光体の蛍光強度のバランスと蛍光寿命の相違から生じるものである. しかし, 蛍光放射現象の素過程を仮定したシミュレーションを行うことで解析を行うことができ, 更に各反応パラメーターを決定することができる.

(5) 従来のデコンボリューションによる蛍光寿命の決定法^{7,8)}に比較して, 本法では同様の装置で蛍光減衰曲線を測定し解析法が異なるだけなので, 必然的に同程度の精度しか得られない. しかし本法を用いることで, 上に述べた蛍光放射現象に関する様々な情報を得ることができる.

(6) 周波数領域において, 高周波数域での雑音の影響が大きい. この問題は蛍光減衰曲線に対してスムージングを行うことである程度解決することができるものと考えられる. 又, 励起光を正弦波で変調し蛍光強度と位相変化を測定すること(位相差法の応用)で, 雑音を軽減し精度を向上させることができると考えられ, 今後の検討課題とする. 更に励起光の正弦波変調時に蛍光放射の高調波成分を測定することで, 非線形反応に対応する解析に発展できる.

文 献

- 1) E. Gratton, M. Limkeman, J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, H. Cerek, G. Laczko: *Biophys. J.*, **46**, 480 (1984).
- 2) A. M. North, I. Soutar: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, **68**, 1101 (1972).
- 3) K. P. Ghiggino, A. J. Robert, D. Phillips: *J. Phys. E.*, **13**, 446 (1980).
- 4) J. N. Demas, A. W. Adamson: *J. Phys. Chem.*, **75**, 2463 (1971).
- 5) A. Gafni, R. L. Modlin, I. Brand: *Biophys. J.*, **15**, 263 (1975).
- 6) U. P. Wild, A. R. Holzwarth, H. P. Good: *Rev. Sci. Instrum.*, **38**, 1621 (1977).
- 7) D. M. Rayer, A. E. Mckinnon, A. G. Szabo, P. A. Hackett: *Can. J. Chem.*, **54**, 3246 (1976).
- 8) W. R. Ware, C. J. Lewis: *J. Chem. Phys.*, **57**, 3546 (1973).
- 9) 板垣昌幸, 渡辺邦洋: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 1143 (1994).
- 10) J. C. Andre, L. M. Vincent, D. O'Connor, W. R. Ware: *J. Phys. Chem.*, **83**, 2285 (1979).
- 11) 斎藤 博, 田中祐一, 塩谷繁雄: “ナノ, ピコ秒の化学”, 化学総説 No. 24, p. 41 (1979), (学会出版センター).
- 12) 木下一彦, 御橋廣眞編: “蛍光測定—生物科学への応用—”, p. 187 (1988), (学会出版センター).



Analysis of two-component fluorescence lifetimes 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)

Three different methods using the fast Fourier transformation (FFT) have been used to analyze the fluorescence lifetimes for a two-component system. In this study, anthracene and pyrene were used for the two components. In the first method, the transfer function, $H(\omega)$, for fluorescence emission was obtained from the cross spectra of the excitation ray and fluorescence decay curves in the frequency domain. A rate constant for each step in the fluorescence emission process was determined on the basis of simulations with a theoretical model. Fluorescence lifetimes, τ_i , of the two components were calculated using the following relation, $\tau_i = 1/(k_{if} + k_{iq})$, where k_{if} and k_{iq} represent rate constants of fluorescence emission and quenching, respectively. In the second method, the fluorescence lifetime of anthracene was determined from plots of $-\text{Im}\{H(\omega)\}/\omega\text{Re}\{H(\omega)\}$ vs. $(\omega/2\pi)$ in the frequency domain, where $\text{Im}\{X\}$ and $\text{Re}\{X\}$ represent imaginary and real parts of X , respectively. In the third method, the impulse response function, $h(t)$, of the fluorescence emission was obtained from the inverse-FFT of $H(\omega)$. Fluorescence lifetimes were determined from curve fitting of the two component exponential decay curves for $h(t)$. The two component fluorescence lifetimes obtained by the three analytical methods agreed well with each other, and the applicability of FFT analysis on fluorescence lifetime was proven.

(Received September 7, 1994)

(Accepted January 28, 1995)

Keyword phrases

fluorescence lifetime; fast Fourier transformation (FFT); transfer function; impulse response function.