ILF-835型 100 mm (積分球ユニット(日本分光) 取り扱いマニュアル

文責:山上紅里 2018/09/30:鳥居彩芽

1. 積分球の設置

標準セルホルダ底のねじ2つを完全にはずす。標準セルホルダを本体からはずし、代わりに積分球を取り付ける。前にスライドさせていくと途中でガタンと落ちるので、そのあと隙間ができないようにギュッと押しこむ(しっかり押し込むのがポイント)。

*取り付けの際、測定プログラムが開いていたら Ex, Em シャッターを共に閉じて行う! ② 積分球を 4 箇所のねじで固定する(長めのプラスドライバーを用いるとよい。ひずま ないように、一旦すべてのねじを軽くしめてから完全にしめる)。 \$3 mm アパーチャーは つけたまま。やりにくければ試料室ふたも一旦はずす。

③ 分光蛍光光度計と PC の電源を入れる。(PC) [スペクトルマネージャー] \rightarrow [スペクト ル測定]。PC 画面右下に「積分球ユニット」の表示があることを確認する。

積分球



② 積分球セルホルダをねじで固定する



ФЗ mm 7パ-*f*+-

積分球の設置完了



2. スペクトル補正データ作成(担当者のみ行う)

 $[スペクトルマネージャー] \rightarrow [スペクトル補正データ作成] \rightarrow [新規作成]$ 励起発光波長が 250 - 450 nm のとき; ローダミン B による補正データ作成励起発光波長が 300 - 1010 nm のとき; 副標準ハロゲン光源による補正データ作成



副標準ハロゲン光源は積分球ユニットの側面に取り付ける。

3. 測定

測定モード 蛍光

[スペクトルマネージャー] → [スペクトル測定]を開く。

① パラメータの設定(例)、入射光量測定とサンプル測定はすべて同じ条件にする。

励起バンド幅	5 nm (推奨)	<u>蛍光バンド幅</u>	<u>10 nm (推奨) または 5 nm</u>				
励起波長	350 nm	開始波長	300 nm(励起波長より短波長)				
終了波長	750 nm	走査速度	200 nm/min				
データ取込間隔	0.2 nm	レスポンス	0.5 sec (0.2~0.5 sec にする)				
オートゲイン	off						
感度	マニュアル(入身	す光量の測定(溶媒	某のみの測定)のときの励起散乱光の				
強度が 5000-8000 になるように PMT 電圧を調節 する)							
積算	ON	積算回数	3 回				
フィルタ	交換時にスキャン	を停止する					
ブランク補正	Off	スペクトル補正	ON(光子数)				

注意1; PMT 電圧の最大値は 1500 V。

1500 V で測定しても励起散乱光の強度が 8000 に満たない場合、積分球ユニットの接続不良が考えられる。

注意2;励起波長、開始・終了波長、PMT 電圧以外の設定について、上記の数値を積分球 ユニットのデフォルト設定とする。各個人で変更は可能。 ② オートゼロの実行

Ex, Em シャッターを共に閉じる (アイコンをクリックして閉じる)。ゼロの精度を高め るために [制御] メニュー [レスポンス] でレスポンスを 2 sec に設定。それから [オート ゼロ] をクリック。オートゼロが終わったら必ず Em シャッターを開ける。

③ 入射光量の測定

測定溶媒でリンスした積分球用セルに測定溶媒を高さ約 28 mm 入れる。積分球ユニットのふたを開き、積分球固定ねじ 2 本のロックをはずす。積分球取っ手を持ち、積分球を 開く。セルをセルホルダにセットする。積分球を閉じ、積分球固定ねじを回してロックす る。積分球ユニットのふたを閉める。[試料測定]。解析画面で「名前を付けて保存」。スペ クトル補正を行い、補正したデータも保存する。

*積分球用セルは非常に高価であり、また手の脂などで少しでもセルの表面が汚れている と量子収率の値が合わなくなる。そのため、<u>積分球用セルを扱う際には必ずきれいな手袋</u> <u>を着用</u>し、セルの傷や汚れに細心の注意を払う。また、積分球内を汚すと正確な測定がで きなくなり、修理には多くのお金と時間がかかるので絶対に汚さない。

データ保存の例)

生データ	:	AT999_nyuusha_Ex350	(実験番号、入射光量、励起波長)
補正後	:	1_cor. AT999_nyuusha_Ex350	(cor. = correction; 補正)

注意;補正データは測定したバンド幅に合うもの、かつ最新のデータを選択する。 例)励起;ILF_Ex_5_Fin_200-850_20180930、蛍光;ILF_Em_10_Fin_200-1010_20180930





④ 試料測定

サンプルは濃いもの(サンプル A1; Abs ≒ 1.0) と薄いもの(サンプル A0.1; Abs ≒ 0.1) の2種類を用意し、以降の操作はそれぞれについて順に行う。サンプルをセルに入れ、in の 状態でセルホルダにセット。[試料測定]。解析画面で[名前を付けて保存]。スペクトル補正 を行い、補正したデータも保存する。

データ保存の例)	濃いとき	A1、薄いとき A0.1 と書く	とわかりやう	すい
生データ:	▲ AT999_A1_Ex350	または	AT999_A0).1_Ex350
			実験番号、	濃さ、励起波長)

補正後 : **2_cor.**AT999_A1_Ex350 または **2_cor.**AT999_A0.1_Ex350 (cor. = correction; 補正)

注意;補正データは測定したバンド幅に合うもの、かつ最新のデータを選択する。 例)励起;ILF_Ex_5_Fin_200-850_20180930、蛍光;ILF_Em_10_Fin_200-1010_20180930

- 4. 見かけの内部量子収率の計算
- ① 入射光量測定時のバックグラウンドスペクトル作成

[スペクトルマネージャー] → [スペクトル解析画面] を開く。 3-③ で得た補正済みの データ (1_cor.AT999_nyuusha_Ex350) に対し、[データ処理] → [補正] → [不要ピーク除 去] で励起散乱光を除去する (350 nm で励起した場合、約 330-370 nm の励起散乱光を 除去する) 。 実行、OK。名前を付けて保存する。

データ保存の例) 3_jokyo_cor.AT999_nyuusha_Ex350

② 試料吸収率の計算

[スペクトルマネージャー] → [量子収率計算] プログラムを開く。[新規作成]、 試料のスペクトルとして 3-④ で得た補正済みのデータ (2_cor.AT999_A1_Ex350 または 2_cor.AT999_A0.1_Ex350) を選択、

入射光スペクトルとして 3-③ で得た補正済みのデータ (1_cor.AT999_nyuusha_Ex350) を選択。散乱面積の計算波長範囲を設定する。

③ 試料吸収率を考慮したバックグラウンドスペクトルを算出するための係数の計算

4-② で得られた試料の各濃度の<u>試料吸収率</u>より、(100 – 試料吸収率) × 0.01 をそれぞれ計算し、この数値を係数 K としてそれぞれ記録する。

④ 試料吸収率を考慮したバックグラウンドスペクトルの作成

 $[スペクトルマネージャー] \rightarrow [スペクトル解析画面] を開く。4-① で得られたバックグ$ $ラウンドスペクトル (3_jokyo_cor.AT999_nyuusha_Ex350) をアクティブにした状態で、$ $[データ処理] → [演算] → [四則演算] 画面を開く。左上の <math>\Box \times S_1$ の口部分に 4-③ で求 めた係数 K を入力する。新たに得られたスペクトルを各濃度のバックグラウンドスペクト ルとしてそれぞれ保存する。

データ保存の例) **4_back_**AT999_A1_Ex350または **4_back_**AT999_A0.1_Ex350

⑤ 見かけの内部量子収率 Φobs の計算

 $[スペクトルマネージャー] \rightarrow [量子収率計算] プログラムを開く。[ファイル] → [再計算$ (C)] 画面を開く。[ダーク補正] にチェックを入れ、[ダークスペクトル] として 4-④ で得 $られた各濃度に対応するバックグラウンドスペクトル (4_back_AT999_A1_Ex350 または$ $4_back_AT999_A0.1_Ex350) を開く。散乱面積の計算波長範囲と蛍光面積の計算波長範囲$ をそれぞれ設定する。このときに表示されている濃いサンプル (A1) の [内部量子収率] が $試料の「見かけの内部量子収率 <math>\Phi_{obs}$ 」 である。 5. 試料濃度を考慮した内部量子収率の計算のための係数 a の算出

4. の結果のうち濃度の高い試料 (A1) では、蛍光の再吸収・再蛍光があるため、見かけの内部量子収率 Φ_{obs} は実際よりも低い値になる(しかし、量子収率を求めるにはある程度の濃度が必要である…)。 これを補正するための係数 a を求める。

① 各試料の蛍光スペクトルに対しバックグラウンド補正を行う。

[スペクトルマネージャー] → [スペクトル解析画面] を開く。

3-④ で得た各濃度の補正済みの蛍光スペクトル (2_cor.AT999_A1_Ex350 または 2_cor.AT999_A0.1_Ex350) と、4-④ で作成した各濃度のバックグラウンドスペクトル

(4_back_AT999_A1_Ex350 または 4_back_AT999_A0.1_Ex350) を各濃度ごとに (A1 同士、A0.1 同士で) それぞれ重ね書きする (一方のスペクトルを他方のスペクトルにドラッグ)。

[データ処理] → [演算] → [四則演算] 画面を開く。各試料の蛍光スペクトルを S1、バッ クグラウンドスペクトルを S2 として S1 – S2 の演算を行い(逆になっている場合は画面 右上の [スペクトル交換] → [適用])、新たに得られた蛍光スペクトルを各試料のバック グラウンド補正済みのスペクトルとして保存する。

保存の例)5_backOK_cor.AT999_A1_Ex350 または 5_backOK_cor.AT999_A0.1_Ex350

② A1(λ) が A0.1(λ) の長波長側と一致する A1(λ) の倍率 X を求める。

5- ⁻ でバックグラウンド補正を行った試料 A1 と A0.1 の蛍光スペクトル (5_backOK_cor.AT999_A1_Ex350 または 5_backOK_cor.AT999_A0.1_Ex350)を重ね書 きする。 [データ処理] → [差スペクトル] 画面を開く。[スペクトル交換] をクリックし て

「サンプルA1 の蛍光スペクトル – サンプル A0.1 の蛍光スペクトル」となるようにする。 [スケール] でスペクトルの長波長側を拡大する。2つのスペクトル(画面上)が長波長側 で重なり、差スペクトル(画面下)の長波長領域が平らになるように係数を調節する。[ス テップ] をはじめは大きめにし、段々小さくして調節する。この係数を X として記録する。



長波長側で2つのスペクトルが重なるように 係数を調節する ③ 式 (1) を用いて係数 a を求める。

[スペクトルマネージャー] → [量子収率計算] プログラムを開く。 試料 A1 の [試料蛍光面積] を S(A1)、試料 A0.1 の [試料蛍光面積] を S(A0.1) とする。

$$a = 1 - \frac{S(A1)}{XS(A0.1)} \tag{1}$$

6. 試料濃度を考慮した内部量子収率の計算

4,5 の結果から、再吸収・再蛍光を考慮した内部量子収率 Φ_{true} を式 (2) をもとに計算する。このときの Φ_{obs} は 4-⑤ で求めた濃度が濃いサンプル (A1) の見かけの内部量子収率を適用する。[量子収率計算] プログラム上では Φ_{obs} は「%」表記されているが、式 (2) を用いて計算する際は「%」ではなく小数点に直して計算する。

(例; Φobs が 32.201% のとき、式 (2) では 0.32201 に直して計算する。)

$$\phi_{\text{true}} = \frac{\phi_{\text{obs}}}{1 - a + a\phi_{\text{obs}}}$$
(2)

7. 補足

蛍光量子収率が10%以下と予想されるサンプル(蛍光が弱いサンプル)の場合、積分球 ユニットを用いた正確な測定は難しいかも。蛍光が弱いサンプルでは相対量子収率測定が おすすめ。相対量子収率測定の方法は以下のマニュアルを参考にするとよい。

・ 蛍光分光光度計 (JASCO FP-8600 spectorometer) 操作マニュアル p6 (Web)

・「日本分光学会 測定法シリーズ 3 蛍光測定 生物学への応用」 p71