

Application News

No. A496

光吸收分析
Spectrophotometric Analysis

测定溶液样品的荧光量子效率

Measuring the Fluorescence Quantum Efficiency of Liquid Samples

荧光物质会吸收物质固有波长的光，而发射出较长波长的荧光。荧光物质吸光后发射的荧光光子数与所吸收的激发光光子数的比值被称为荧光量子效率。其与荧光物质的荧光强度有关。

荧光量子效率采用绝对法测定的方式，是对积分球测定得到的荧光物质的荧光光谱直接进行计算的方法。荧光量子产率采用相对法测定的方式，将样品的荧光强度与已知标准荧光物质强度进行比较的计算方法。由于绝对法仅对目标荧光物质进行计算，因而比相对法更加简便。

本文向您介绍使用荧光分光光度计 RF-6000 和积分球附件，计算荧光量子效率的方法和对硫酸奎宁进行测定的示例。

■ 荧光量子效率的计算方法

Method of Determining Fluorescence Quantum Efficiency

图 1 为用于测定荧光效率的荧光光谱仪 RF-6000；图 2 为荧光量子效率计算方法的模式图。由图可知，在计算荧光量子效率时，首先测定空白样品（液体样品时为溶剂）的荧光光谱，接着测定样品的荧光光谱，上述光谱必须为经过仪器校正后的荧光光谱。通过以往的旧机型很难简便地得到校正后的荧光光谱，但 RF-6000 能够得到自动校正的荧光光谱，因此可以快速计算荧光量子效率。

与荧光量子效率相关的量有吸收率、内量子效率和外量子效率。表 1 为各定义式。由表可知，吸收率为照射在样品中的光子数被吸收的比例。内量子效率为吸收的光子数中被作为荧光发射的光子数的比例。外量子效率为照射的光子数中被作为荧光发射的光子数的比例。按照图 2 中①、②、③、④区域的积分面积值计算上述各数值。由此可知，荧光量子效率与内量子效率对应。

RF-6000 的标准软件 LabSolutions RF 可以计算吸收率、内量子效率（荧光量子效率）、外量子效率的所有量。



图 1 荧光光谱仪 RF-6000
RF-6000 Spectrofluorophotometer

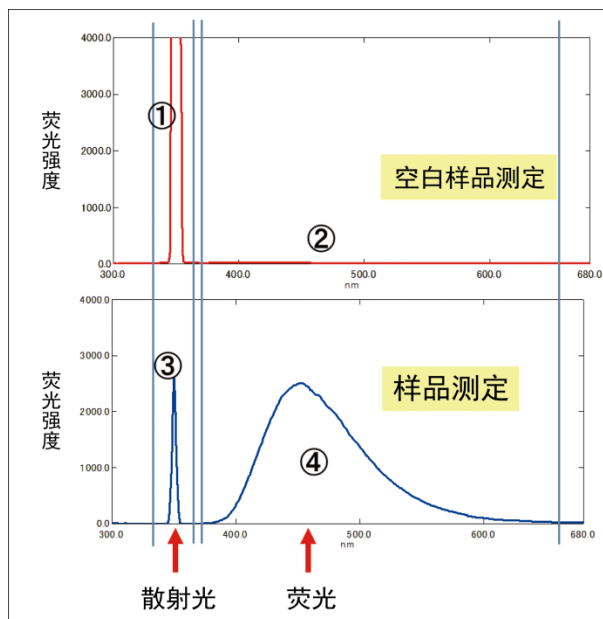


图 2 荧光量子效率的测定方法
Measurement Method of Fluorescence Quantum Efficiency

表 1 与荧光量子效率相关的公式
Formulas Related to Fluorescence Quantum Efficiency

$$\begin{aligned} \text{吸收率} &= \text{吸收/照射} = (\text{①}-\text{③}) / \text{①} \\ \text{内量子效率} &= \text{放出/吸收} = (\text{④}-\text{②}) / (\text{①}-\text{③}) \\ \text{外量子效率} &= \text{放出/照射} = (\text{④}-\text{②}) / \text{①} \\ \text{外量子效率} &= \text{内量子效率} \times \text{吸收率} \end{aligned}$$

- ①：照射的光子数
- ②：基线中所含光子数
- ③：未被吸收光子数
- ④：[荧光+基线] 光子数
- ①-③：被吸收的光子数
- ④-②：被作为荧光发射的光子数

■ 测定硫酸奎宁的荧光量子效率

Measuring the Fluorescence Quantum Efficiency of Quinine Sulfate

使用硫酸奎宁二水合物（和光纯药工业株式会社制造，特级试剂），制备 200 mg/L 的硫酸奎宁溶液（溶剂：1.0 N 硫酸）。

硫酸奎宁的荧光量子效率的计算步骤如下：

- ① 将积分球安装到 RF-6000 的样品室中。
- ② 如图 3 所示，将装有空白样品（溶剂：1.0 N 硫酸）的荧光比色皿放置到积分球内的池架内，关闭积分球。
- ③ 通过 LabSolutions RF “量子效率”测定程序测定空白样品的荧光光谱。然后替换为装有硫酸奎宁溶液的比色皿，测定荧光光谱。如图 3 所示，激发光经过积分球入射窗口照射在样品上，发射出荧光，此时积分球内还存在激发光的散射光。其中部分荧光从积分球出射窗口进入荧光分光器中，从而得到荧光光谱。
- ④ 按照已设波长范围计算空白样品和硫酸奎宁溶液的峰面积。使用表 1 的公式计算 AF（吸收率）、QE_{in}（内量子效率）和 QE_{ex}（外量子效率），如图 4 所示。计算时使用的波长范围可以通过移动图 5 所示的两根竖线任意设定。

本次分析中，根据图 5 中蓝色箭头所示的 320 nm~370 nm 的波长范围计算了图 2 的①、③峰面积；根据绿色箭头所示 370 nm~680 nm 的波长范围计算了②、④的峰面积。由此得到的硫酸奎宁荧光量子效率为 0.5336，符合文献值¹⁾规定的范围（0.50~0.57）。

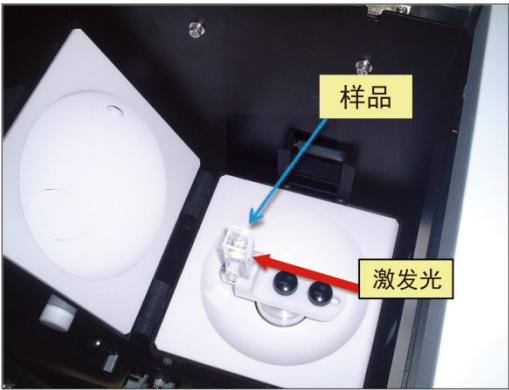


图 3 将样品放置在积分球内
Sample Mounted to the Integrating Sphere

表 2 测定条件
Measurement Conditions

仪器	: 荧光光谱仪 RF-6000
光谱类型	: 荧光光谱
激发波长	: 350 nm
测定波长范围	: 300 nm ~ 680 nm
数据间隔	: 1.0 nm
扫描速度	: 200 nm/min
带宽	: Ex 3 nm、Em 3 nm
灵敏度	: 自动

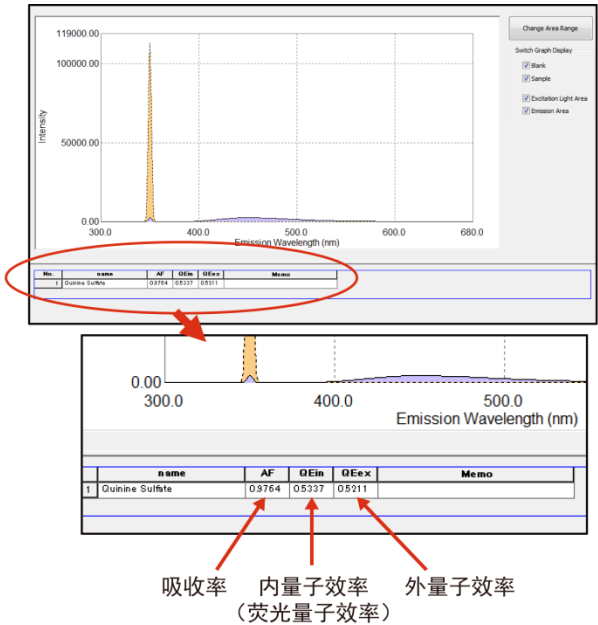


图 4 在量子效率测定模式下计算荧光量子效率
Fluorescence Quantum Efficiency Calculated with Quantum Efficiency Measurement Mode

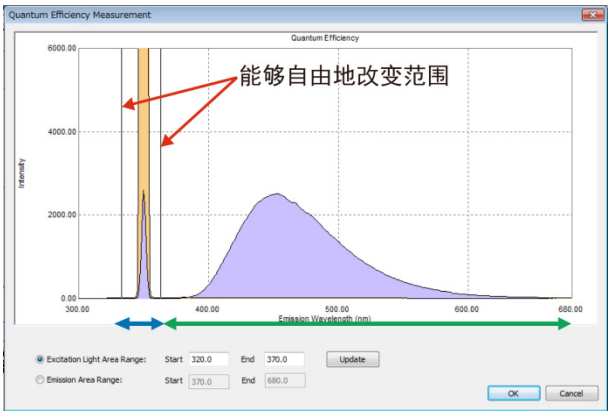


图 5 设置计算范围
Setting for Calculation Range

■ 总结
Conclusion

综上所述，通过 RF-6000 的自动光谱校正功能，能够轻松地得到荧光量子效率测定所需的校正后荧光光谱。使用积分球附件和标准软件 LabSolutions RF，则能够简便地得到目标物质的荧光量子效率。

1) 日本分光学会 测定法系列 3 荧光测定 生物科学中的应用（学会出版中心）