白色光励起マルチチャネル蛍光分光装置

千賀 康弘, 下川原正博, 波多野 洋, 南 茂夫

大阪大学工学部応用物理学科 吹田市山田丘 2-1 (〒565)

(1988年10月6日受理)

Multichannel Fluorometer with White Light Excitation

Yasuhiro SENG, Masahiro SHIMOGAWARA,
Hiroshi HATANO and Shigeo MINAMI

Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Osaka University
2-1, Yamada-oka, Suita, Osaka 565

(Received October 6, 1988)

A new fluorometer using white light excitation and multichannel detection technique has been developed for real-time characterization of high performance liquid chromatography (HPLC) eluate. A xenon lamp is used as an excitation source without any wavelength selectors. Fluorescence spectra are detected by a polychromator equipped with a linear photodiode array as overlying a scattering spectrum, which is measured prior to the sample injection and subtracted in a computer. A minimum detection limit of $4 \mu\text{g/l}$ has been obtained for Eosin in methanol, and a linear dynamic range of 10^3 has been observed. A fluorescence spectro-chromatogram of a mixture sample is demonstrated.

1. はじめに

物質からの蛍光発光を利用した分析法は、一般に高感度であり、かつ励起波長に対して顕著な選択性を持つことから、特に既知成分の検出、定量に広く用いられている。この特徴は混合物試料の分離分析のための液体クロマトグラフィ (HPLC) の検出器としても有効であり、既に多くの装置が市販され、普及している。これらの市販装置の大部分は、単一波長または単一波長バンドにより試料を励起し、単一波長での蛍光発光強度を検出する方式である。この方式では成分によって最適の励起波長および発光波長を選択する必要がある、多成分から成る混合物や、構成成分が全く未知の混合物試料の分析は極めて困難である。

このような多成分混合物を HPLC で分析する際には、通常の定量分析機能のみでなく実時間での定性分析機能も必要となる。この有力な手段の一つとして時間的に連続かつ高速にスペクトル波形を測定するスペクトロ・クロマトグラム測定法がある。既に吸光測定ではポリクロメータとフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を組み合わせたマルチチャネル検出によるスペクトロ・クロマトグラム測定専用装置¹⁾ がいくつか市販されている。

しかし蛍光測定においては、信号強度が微弱であり、かつ励起波長に対して選択性を持つことから、マルチチャネル検出は困難であり、いまだに研究段階にある。報告例としては、検出器を高感度化するために PDA 検出器にインテンシファイアを付加した装置^{2), 3)}, SIT 検出器を使用した装置⁴⁾, また励起エネルギーを増す目的で

レーザ光源を使用した装置⁵⁾等がある。いずれの装置でも蛍光スペクトル・クロマトグラムが得られており、これか定量・定性の両分析に有効であることが示されているが、励起波長に対する選択性により成分によっては全くスペクトルが得られない場合が生じ、また装置が高価になるなど問題点も多い。

本研究ではこの蛍光スペクトル・クロマトグラムの新しい側定法として、励起波長に対する選択性を取り除き、どのような成分に対しても効率よく励起するため、連続スペクトル光源を直接励起光として用い、ポリクロメータと PDA のみで蛍光スペクトルをマルチチャンネル検出する方式を考案し、装置を試作した。この方式では成分の選択性が失われる反面、大部分の成分に対して蛍光発光スペクトルが得られるため、多成分からなる未知混合物試料に対しても定性・定量の両分析が可能となる。

2. 測 定 原 理

従来の蛍光発光スペクトル側定では、励起光の波長を適当に選択し、蛍光発光側定側に励起光の散乱成分が混入しない領域で波長走査を行うことで高感度検出を実現している。しかしこれを HPLC に適用して多成分試料を連続的に分析する場合には、試料成分毎に最適励起波長が異なることが大きな障害となり、同一励起波長ですべての成分を分析することは不可能である。

この問題を解決し、多成分試料を一度のクロマトグラフ展開によりすべて分析するためには、試料励起を可視から紫外域において連続スペクトルを持つ白色光で行えばよい。ただしこの場合、蛍光信号は散乱光の上に重なって現れるため、あらかじめ側定した散乱光成分を除去することで蛍光スペクトルが得られる。

この関係は次のように説明できる。まず簡単のため Fig. 1 に示すように試料に対して励起方向と観測方向を直交方向にとり、セル内に溶媒のみを流した時の観測スペクトルを $R(\lambda)$ 、試料を流した時の観測スペクトルを

$D(\lambda)$ とする。ただし λ は波長を表わす。また光源自体のスペクトルを $S(\lambda)$ とおく。この時、 $R(\lambda)$ と $D(\lambda)$ にはフローセルの壁面からの散乱光とフローセル内部を通った光が含まれ、近似的に次のように表される。

$$R(\lambda) = p S(\lambda) + q S(\lambda) 10^{-A_r(\lambda)} \quad (1)$$

$$D(\lambda) = p S(\lambda) + q S(\lambda) 10^{-A_r(\lambda)} 10^{-A_f(\lambda)} + f(\lambda) \quad (2)$$

p 試料に到達せずに観測される散乱光の割合

q セル内の試料を通過して観測される散乱光の割合

$A_r(\lambda)$ 溶媒の平均吸光度

$A_f(\lambda)$ 試料の平均吸光度

$f(\lambda)$ 試料からの蛍光発光強度

ここで(1)式と(2)式の差 $F(\lambda)$ を求めると、

$$F(\lambda) = D(\lambda) - R(\lambda) \\ = f(\lambda) + q S(\lambda) \cdot 10^{-A_r(\lambda)} (10^{-A_f(\lambda)} - 1) \quad (3)$$

となる。通常溶媒については $A_r(\lambda) \approx 0$ とみなせ、また希薄試料溶液では、 $A_f(\lambda) \ll 1$ と近似できることから、

$$F(\lambda) \approx f(\lambda) - A_f(\lambda) q S(\lambda) \quad (4)$$

となる。したがって $q \ll 1$ とみなせる散乱光の少ない方向で観測すれば

$$F(\lambda) \approx f(\lambda) \quad (5)$$

と近似できる。

一方、試料からの蛍光強度 $f(\lambda)$ は、励起光スペクトル $S(\lambda)$ に依存し、次のように表わせる。

$$f(\lambda) = \int_{\lambda_0}^{\lambda} S(\lambda') \{1 - 10^{-A_f(\lambda')}\} \cdot \phi(\lambda) \cdot d\lambda' \quad (6)$$

ただし、 λ_0 は励起光の短波長端であり、これは主に光学系の材質により決まる。また $\phi(\lambda)$ は量子収率を表わす。ここで $A_f(\lambda) \ll 1$ とみなせる希薄溶液では、

$$f(\lambda) = \int_{\lambda_0}^{\lambda} S(\lambda') A_f(\lambda') \phi(\lambda) d\lambda' \\ = \phi(\lambda) \int_{\lambda_0}^{\lambda} S(\lambda') A_f(\lambda') d\lambda' \quad (7)$$

となり、発光波長 λ での蛍光強度は λ より短波長域で吸収した光子の全積分値に比例し、しかも $\phi(\lambda)$ に比例する。したがって、この方式では極めて効率よく試料励起がき、しかも簡単な減算のみで蛍光スペクトルが得られるという大きな特徴を持っている。ただし、これは希薄溶液に対しては成立するが高濃度溶液では(4)、(7)式の近似が成立せず、スペクトル波形に歪が生ずることになる。

Fig. 1 Geometric relation of the excitation source spectrum $S(\lambda)$, a solvent spectrum $R(\lambda)$, and an observed spectrum with a sample $D(\lambda)$

信号検出においては試料の流量に合わせて高速性が要求されるため、ポリクロメータと PDA を結合したマルチチャンネル検出法が有効である。このように白色光励起方式とマルチチャンネル検出法を組み合わせることによって多成分混合物試料の迅速な定性・定量分析が可能となる。ただし PDA のダイナミックレンジはせいぜい 10^3 程度であるため、蛍光測定方向にはできる限り散乱光の少ない方向を選ぶ必要がある。また積算によってダイナミックレンジを拡大することも必要となる。

3. 装 置

3.1 蛍光検出器

3.1.1 励起光学系

本システムの測定系全体の構成を Fig. 2 に示す。試料励起用光源には可視・紫外域で連続スペクトルを持つ 150 W キセノンランプ (L2175, 浜松ホトニクス) を用い、熔融石英製レンズ L1 ($f=60$ mm, $\phi=30$ mm), L2 ($f=45$ mm, $\phi=30$ mm) を使って円筒形の石英フローセル (外径 4 mm, 内径 1.6 mm) に集光する。セル中での光源電極アーク像の大きさは $1\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ となっている。一方、セルのホルター部には迷光を少なくするため励起用窓として $2\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ 、発光測定用窓として $1\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ の窓をつけ、他の部分は遮蔽した。

3.1.2 蛍光発光測定系

セルからの蛍光発光は励起光に対して側面方向でレンズ L3 ($f=60$ mm, $\phi=45$ mm) を用いて集光し、凹面回折格子を持つポリクロメータ ($F=2.5$, 日本分光) で分光する。スペクトル検出には 512 素子のフォトタイオードアレイ S2301-512Q (浜松ホトニクス) を用いてマルチチャンネル検出した。ポリクロメータの逆分散は 20 nm/mm であり、PDA のアパーチャが $50\text{ }\mu\text{m} \times 2.5\text{ mm}$ であることから、チャンネル分解能は 1 nm となる。ポリクロメータの入射スリット幅は 0.5 mm とし、2 次回折光を除去するため、入射スリットの直前に、 310 nm にカットオフを持つバイレックス製スライトガラス (厚さ 1 mm) をシャープカットフィルタとして挿入し

Fig. 2 Block diagram of the optical system.

Fig. 3. Block diagram of the data acquisition system

た。これにより、側定波長域を 340 nm – 620 nm に限定した。

3.2 高速液体クロマトグラフ

試料送液系および信号検出用電気系の構成を Fig. 3 に示す。高速液体クロマトグラフ (HPLC) 装置には LC-5A (島津) 送液ポンプを中心として、SIL-1A (島津) サンプルインジェクタ、CTO-1 (島津) 恒温槽を用い、分離カラムには逆相の CLC-ODS (島津) を使用した。また、試作した蛍光検出システムと直列に UV 検出器 (UVD-1, 島津) を接続し、吸光度による試料のモニターも行なった。この UV 検出器は、非蛍光成分の検出にも有効となる。

3.3 信号検出系

PDA からの信号は、マルチプレクサを通して 12 ビット A/D 変換され、パーソナルコンピュータ (PC9801, NEC) に転送される。PDA の駆動には専用駆動回路 (C2324-28S, 浜松ホトニクス) を用いた。PDA の 1 チャンネル当りの信号読み取り時間は $52\text{ }\mu\text{sec}$ 、1 回の露光時間は 27.3 msec であり、蛍光強度が微弱な場合には、最高 32 回まで積算する。モニター用として接続した UV 検出器からの信号はマルチプレクサにより PDA 信号と交互に切り替えて読み取る。PDA の走査開始、マルチプレクサの選択、A/D 変換の開始等の制御はすべてパーソナルコンピュータより機械語プログラムによって実行した。

3.4 信号処理アルゴリズム

Fig. 4 に液体クロマトグラフ動作時のデータ収集のフローチャートを示す。まず試料注入前に溶離液のみを流した状態で、参照スペクトル波形 $R(i)$ を測定する (ただし i は PDA のチャンネル番号を表す)。この波形はクロマトグラム測定中、一定であると仮定している。この後、試料を注入し、蛍光を含んだスペクトル波形 $D_i(i)$

Fig 4. Flow chart of data acquisition procedure.

とUV検出器の出力 A_t を測定する。ここで参照スペクトル波形の減算を行ない蛍光スペクトル $F_t(i)$ を求める。実際の $R(i)$ および $D_t(i)$ にはスペクトル信号以外にPDA自体の持つ暗電流分布が含まれるが、これは測定中はほぼ一定であるため $F_t(i)$ には含まれなくなる。メモリ内には $F_t(i)$ をすべて格納し、CRT上にはこの波形とともに、これを波長軸にそって積分した積分蛍光強度 F_t を、UV出力信号とともにクロマトグラムとして表示する。この動作を一定時間 (t_e) 繰返す。スペクトロクロマトグラフは全測定終了後、必要に応じて読み出し、解析に用いる。

4. 測定結果

4.1 実測波形の特徴

実際に本システムを用いて蛍光試料を測定した例をFig 5に示す。試料には2-Phenylindoleのメタノール溶液 (0.8 mg/l) を用い、カラムには通さずに直接フローセルに流して測定した。メタノールの場合も同様に測定し、これを参照スペクトル信号 $R(i)$ とし、試料を流した時の信号 $D_t(i)$ との差として蛍光スペクトル

Fig 5 Examples of observed spectra (a) Raw data from PDA $R(i)$ a solvent (100% methanol) spectrum, $D_t(i)$ an observed spectrum with 2-Phenylindole, $v(i)$ variance of $R(i)$ during 1 hour. (b) Fluorescence spectrum of 2-Phenylindole calculated as $D_t(i) - R(i)$

信号 $F_t(i)$ を求めたものである。露光時間はともに1秒である。

(a)に示されるように、蛍光信号は大きな散乱光の上に重なって現れているが、(b)に示した計算から求められた蛍光スペクトルは従来の分光蛍光光度計での測定結果とよく一致している。

また本システムでは、参照スペクトル $R(i)$ は測定期間中はほぼ一定であると仮定しているが、実際にはPDA自体の持つ暗電流分布や光源スペクトル強度の時間変動により多少変化する。この変動はそのまま蛍光スペクトル計算での誤差となるため、できる限り抑える必要がある。Fig 5(a)中の $v(i)$ はこの参照スペクトルの安定度を調べるため、光源強度がほぼ安定状態になってから後、メタノール溶媒のみを試料セルに流した状態で1時間の間、露光時間1秒で連続的に $R(i)$ を測定し、この間の強度変動の分散を求めた結果である。分散は波長に依らずほぼ一定であり、ピーク値に対して5%以下となっており、この程度であれば実用上はほとんど問題ないといえる。しかし蛍光信号が弱い場合にはこの参照信号の変動の影響を受けるため、積算によってSN比向上を計る必要がある。

4.2 最適観測方向の検討

散乱光強度は観測方向によって大きく異なる。このため、蛍光の検出感度を上げるためには、散乱光が少なく、かつ大きな蛍光強度の得られる方向で観測するのが有利である。そこでFig 6に示すように励起光軸 (z 軸) を

Fig. 6. Geometric relation of observation angles

フローセル (x 軸) と直交する方向に固定し、観測方向のみを変更して散乱光強度を測定した。観測方向は励起光軸との角度 α と、励起光軸を含みフローセルと直交する面 (yz 面) からの角度 β をパラメータとして決定した。この結果を Fig. 7 に示す。この測定にはメタノールをフローセルに流し、露光時間 1 秒で連続 100 回測定し、これらの平均波形を波長軸にそって積分した値を縦軸の散乱強度とした。角度走査範囲は光学系の配置上の制約から、 $85^\circ \leq \alpha \leq 110^\circ$, $0^\circ \leq \beta \leq 28.5^\circ$ とした。この結果より、角度 α は 100° 近傍で散乱光が最小となっている。一方、角度 β については $\alpha = 100^\circ$ の場合、散乱強度に大きな差は認められない。

そこで次に角度 β の最適値を決定するため、角度 α を散乱光が最小となる 100° に固定した状態で蛍光強度の角度 β に対する依存性について調べた。この結果を Fig. 8 に示す。蛍光試料として Eosin のメタノール溶液を使用し、これを直接フローセルに流した。蛍光強度としては、前述の散乱強度の測定と同様に露光時間 1 秒で 100 回測定した平均波形を求め、同様に測定したメタノールのみ

Fig. 7. Observation angles dependence on scattering intensity.

Fig. 8. Observation angles dependence on fluorescence and scattering intensity

による平均参照波形を減算し、この結果を波長軸にそって積分した積分蛍光強度を用いた。図中には同時に平均参照波形をそのまま積分した積分散乱強度も示した。図より散乱強度は β に依存せずほぼ一定値となっているが、蛍光強度は 21° で最大値をとっている。これはフローセル内で励起光が多重散乱し、試料励起部分が流出方向に広がっているためと考えられる。これらの結果を考慮して以下では、 $\alpha = 100^\circ$, $\beta = 21^\circ$ に固定して測定を行った。

4.3 定常測定例

本励起方式での蛍光スペクトルの特徴を調べるため、種々の蛍光試料を本 HPLC システムにより展開し、各成分の溶出ピーク位置でのスペクトル波形を測定した。これらの結果を Fig. 9 に示す。試料には、Anthracene, 2 Aminoanthracene, Pyrene, Eosin を用いた。溶離液には 100% メタノール溶液を用い、流量 1 ml/min とし、各測定波形はピーク位置で 1 秒間露光した観測波形より求めた結果を面積が一定となるように規格化して表示した。ここには、比較のため、同一試料を市販の分光蛍光光度計 (日立 650-10) で測定した結果も示した。分光蛍光光度計での測定条件は励起側スリット幅 2 nm、蛍光側スリット幅 5 nm とした。両測定結果を比較すると、Anthracene, 2 Aminoanthracene, Pyrene ではよく一致したスペクトル波形が得られている。しかし Eosin では通常測定法における 320 nm 励起時の波形とは一致するものの、280 nm 励起時に現れる 350 nm 近傍のピークが本測定法では現れていない。これは本システムでの光源エネルギー分布が 300 nm より短波長域で急激に減少していることに起因していると考えられる。しかし、大部分の蛍光物質の分析には本システムでの励起波長域で充分有効である。また、必要ならば光源を短波長域で高エネルギーを持つものに交換すればさらに多くの物質

Fig. 9. Fluorescence spectra obtained by the developed system (upper) and a commercial spectrofluorometer (lower). (a) Anthracene. (b) 2-Aminoanthracene. (c) Pyrene. (d) Eosin.

Fig. 10. Analytical curve for Eosin in methanol. The noise level is defined as 3 times of the standard deviation of reference spectra.

分析が可能となる。

Fig. 10 は Eosin を用いて濃度に関する検量線を求めた結果である。この測定には、100% メタノール溶液を溶離液として用い、一定量の試料を注入、展開して積分蛍光強度クロマトグラム波形を測定し、このピーク位置での強度と、この時の濃度（セル容量、クロマトピーク波形および試料注入量より換算した値）をプロットしたものである。図より $10 \sim 10^4 \mu\text{g/l}$ の範囲でよい直線性が認められる。検出限界は、溶離液のみを流したときの信号の標準偏差の 3 倍をとると、 $4 \mu\text{g/l}$ となる。

4.4 液体クロマトグラフィ適用例

実際に本システムを用いて蛍光物質の混合液のスペク

Fig. 11. Chromatograms of three component mixture. (a) Absorption signal at 254 nm observed by UVD-1 (Shimadzu). (b) Integrated fluorescence signal. (c) Spectro-chromatogram.

トロ・クロマトグラムを測定した例を Fig. 11 に示す。分離条件は溶離液として 100% メタノール溶液、流量 1 ml/min、カラム温度 50°C とした。試料には 2-Phenylindole, Anthracene, Pyrene を含み、各々(1), (2), (3)

の順に検出されている。各成分の溶出の様子は(b)の積分蛍光強度クロマトグラムによく現れている。また(c)のスペクトロ・クロマトグラムからは各成分の定性情報がはっきりと現れている。これらの結果は同時に検出した(a)のUV吸収スペクトルともよく対応している。この結果より、試料の溶出ピークのモニターには積分蛍光強度が有効であり、成分同定にはスペクトロ・クロマトグラムが効果的であることがわかる。また、蛍光測定と吸収測定の併用も定性分析能力をさらに強化するものであることがわかる。

5. ま と め

本システムは、液体クロマトグラフィにおける定性分析能力の強化を目的として、蛍光スペクトルの高速マルチチャネル測定を可能にしたものである。システム構成はきわめて簡単である上に、連続スペクトルを持つ白色光源を非分散で用いているため光源エネルギーを有効に利用でき、かつ最適励起波長の異なる物質も一様に励起できるため、多成分混合物の分析もきわめて効率的にできる。この方式では励起波長に対する選択性は失われるが、この点は発光スペクトル波形が得られることで定性情報は逆に増加している。

たまた問題点として、検出感度が従来の蛍光測定法に

比べて多少低いことが挙げられる。これは蛍光信号が、強い散乱光の上に重なって現れるためであり、これを解決するためには、散乱光自体をもっと減少させるようなセル形状の工夫が必要である。また、本方式では展開時間が長くなるとテータ量が膨大となりデータの保管が困難となる。この点は、積分蛍光強度クロマトグラムとそのピーク部分でのスペクトルのみを保管するテータ圧縮法の開発が必要である。

これらの点を解決すれば、きわめて実用的なシステムとなる。また本システムでの蛍光測定とともに吸光スペクトル測定も同時に行えば、より効率的で信頼性の高い定性分析が実現できると考えられる。

文 献

- 1) D. G. Jones. *Anal. Chem.* **57**, 1057A (1985).
- 2) M. A. Ryan, R. J. Miller, and J. D. Ingle, Jr.: *Anal. Chem.* **50**, 1772 (1978).
- 3) J. C. Gluckmann, D. C. Shelly, and M. V. Novotny. *Anal. Chem.* **57**, 1546 (1985).
- 4) L. W. Hershberger, J. B. Callis, and G. D. Christian. *Anal. Chem.* **53**, 971 (1981).
- 5) D. B. Skoropinski, J. B. Callis, J. D. S. Danielson, and G. D. Christian. *Anal. Chem.* **58**, 2831 (1986).