であると考えられる。

終わりに本研究を行うに当たり、御指導いただきました京都大学工学部小島次雄教授に深く感謝致します。又、原油試料を提供していただきました海上保安大学校小川 勝教授に感謝致します。

文 献

- 1) 海上保安庁：“昭和 56 年版 海上保安白書”，p. 89 (1981)。
- 2) A. P. Benz: *Anal. Chem.*, **48**, 455A (1976)。
- 3) 東 国茂，萩原一芳：分化，**25**, 803 (1976)。
- 4) 田村真八郎：ぶんせき，**1978**, 379。
- 5) 東 国茂，萩原一芳：分化，**30**, 785 (1981)。
- 6) 阿部英次：“化学と情報”，大木道則，佐々木慎一，千原秀昭編，p. 114 (1981)，(岩波書店)。
- 7) 奥野忠一，芳賀敏郎，矢島敬二，奥野千恵子，橋本茂司，古河陽子：“統 多変量解析法”，p. 207 (1980)，(日科技連)。

☆

Discrimination of spilled oils by high speed gel permeation chromatography; Classification of crude oils by cluster analysis. Kunishige HIGASHI and Kazuyoshi HAGIWARA (Government Industrial Research Institute, Osaka, 1-8-31, Midorigaoka, Ikeda-shi, Osaka)

Application of cluster analysis which is a non-parametric and unsupervised pattern recognition method was studied to classify 62 kinds of crude oils in the world. These oils were produced in the Middle East, Indonesia, Africa, Mexico, Malaysia, Brunei, China, Australia, Burma, and USSR. Chromatograms of the oils were obtained by gel permeation chromatography with an ultraviolet absorption detector. Stationary and mobile phases were HSG-15 (polystyrene gel) and tetrahydrofuran, respectively. Sectional areas of each chromatogram were printed out with a data processor and ten normalized sectional areas were used as input data to perform cluster analysis. Similarity of profiles of the chromatograms was evaluated by Euclidean distance, and centroid method was used to merge two clusters into a new cluster. Branching tree diagram was obtained from results of the cluster analysis. The proposed method was found to be effective for the classification of the crude oils.

(Received Mar. 11, 1982)

Keyword phrases

classification of crude oils; high speed gel permeation chromatography; evaluation of chromatographic profiles; cluster analysis; pattern recognition method.

熱量法による蛍光量子収率の決定

高橋 紘一[®]，青木 淳*

(1982 年 3 月 18 日受理)

無放射失活により発生する熱エネルギーを測定することにより、芳香族アミノ酸とそのダンシル化物の蛍光の量子収率を測定した。トリプトファン (Trp)、ダンシルトリプトファン (DNS-Trp)、ダンシルグリシン (DNS-Gly) のエタノール溶液をそれぞれ 280 nm, 360 nm, 360 nm で励起したときの量子収率は、それぞれ 0.10, 0.54, 0.50 となった。一方、相対法による分光学的方法では、これらの物質の量子収率は、それぞれ 0.15, 0.53, 0.48 となり、両者はおよそ一致する。測定に用いた装置は市販の分光蛍光光度計 (HITACHI 204S) をほとんどそのまま利用するもので、分光学的方法に比べ、より簡便に量子収率を求めることができる。蛍光波長が長く、適当な光電子増倍管を利用できない物質については、本法は分光学的方法に対し有利である。又蛍光分析法に対する相補的な方法としての本法の利用を検討した。

1 緒 言

蛍光物質の特性を考察したり、分析の感度及び検出限

* 近畿大学理工学部化学科：大阪府東大阪市小若江 3-4-1

界を表示する際¹⁾²⁾、蛍光の量子収率が有効に用いられる。励起分子の蛍光の量子収率の測定には、本来標準光散乱板を用いる絶対測定法があるが、補正すべき係数が多く、煩雑で、この方法で測定された物質は比較的少ない。そこで一般には、絶対測定により量子収率の確定さ

れた標準物質に対する相対的な方法で決定する, いわゆる相対量子収率決定法が広く行われている. 相対法により決定された値は, 測定者や装置により異なる値が報告されることが多く, 10% 程度の誤差を認めざるを得ないのが現状である. Seybold ら³⁾, 及び Olmsted ら⁴⁾は, 励起分子の無放射失活により放出される熱エネルギーに注目する蛍光量子収率の決定法を提案した. この熱量測定による方法は, 従来の分光学的な方法と異なり, 測定すべきパラメーターの数が少なく, 原理的に誤差の少ない測定値を与えることが期待でき, 分析化学的, 光化学的に重要な意義を有する蛍光量子収率を, 簡単かつ迅速に測定できる可能性を有する.

しかし, Olmsted らの方法では, 水恒温槽中にセットされたデュワーセルに, 恒温槽外部から光を照射するもので, 紫外部の光は水及び浮遊懸濁物に吸収又は散乱されてしまい, 紫外部に吸収を持つ多くの物質に応用することは難しく, それを補うにはレーザー光を必要とする. そこで本研究では, 市販の分光光度計の試料室中にマイクロ熱量計を備えた簡便な装置を試作し, トリプトファン (Trp), ダンシルトリプトファン (DNS-Trp), ダンシルグリシン (DNS-Gly) について熱量測定による蛍光量子収率を測定した. 又本法と, 従来より用いられている分光学的な方法によって測定した値を比較し, 本法が蛍光の量子収率の測定法として優れていることを明らかにする.

2 測定原理

振動数 ν_a の光で単位時間当たり励起された n_a 個の励起分子が振動数 ν_f の n_f 個の蛍光を放出して基底状態に緩和するとき, 単位時間当たり吸収される光エネルギーを $E_a = n_a h \nu_a$, 励起分子が単位時間当たり放出する光エネルギーを $E_f = n_f h \nu_f$ とする. 無放射失活して系の熱となる単位時間当たりのエネルギーを E_q とすると, エネルギー保存則より $E_a = E_f + E_q$ となる. 蛍光量子収率 ϕ はこれら三つの関係より次のように与えられる.

$$\phi = \frac{n_f}{n_a} = \frac{E_f/h\nu_f}{E_a/h\nu_a} = \frac{\nu_a}{\nu_f} \frac{E_a - E_q}{E_a} = \frac{\lambda_f}{\lambda_a} \frac{E_a - E_q}{E_a} \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここで λ_a , λ_f は吸収と発光の波長である. 量子収率が 0 であるような, いわば完全吸収体の溶液 (以後参照溶液と呼ぶ) では $E_f = 0$ であるから, E_q は E_a に等しい. 測定しようとする試料溶液と参照溶液の吸光度が等しくなるように溶液の濃度を調整すると, 参照溶液の E_q が試料溶液の E_a となる. E_q は熱量計の温度上昇

速度に比例するので, 式 (1) は

$$\phi = \frac{\lambda_f}{\lambda_a} \frac{K_a - K_f}{K_a - K_0} \quad \dots\dots\dots (2)$$

となる. ここで K_a , K_f 及び K_0 は, それぞれ参照溶液, 試料溶液及び溶媒に波長 λ_a の光を照射したときの系の温度上昇速度である. λ_f は発光スペクトルの平均波長である. 試料溶液と参照溶液とで溶媒が異なったり, 吸光度が等しくない場合には補正が必要である. 又すべての測定試料の容量を等しくして, 測定系の熱容量を等しくする必要がある. 溶液の熱容量は溶媒のそれに等しいと仮定する.

本法では照射光の波長において光吸収しない物質の混入は, E_a に関与しないため, 測定値に影響しないという利点を持つ.

3 実験及び結果

3.1 試料

アントラセン, Trp, Tyr, Phe, DNS-Trp, DNS-Gly は再結晶し, ODS カラムの HPLC で 230 nm の UV 吸収をモニターしたとき単一成分であることを確かめて使用した. 用いた溶媒はエタノールで, 励起波長付近に吸収を持たない吸収スペクトル測定用溶媒を用いた. 完全吸収体としては光に安定でかつ広い波長領域にわたって吸収を持つテトラフェニルシクロペンタジエノンの市販品をそのまま用いた. 完全吸収体は蛍光を出さず, かつ光退色しないものでなければならないが, これらの条件を満たしていれば, 精製の必要はない.

3.2 恒温装置

温度制御装置を Fig. 1 に示す. 日立 204S 分光蛍光光度計のセル室に 204S のオプションである水還流式の恒温セルホルダーを取り付けた. このセルホルダーに循環する水は二重槽式の水恒温槽により温度制御されている. 外槽の水の温度は, オペアンプとサーミスタを用いて作製したオン/オフ型の制御回路によって約 21°C に制御されており, $\pm 0.01^\circ\text{C}$ 程度の制御能を持つ. 一方, 内槽の温度は三角波発生方式による比例制御型の回路により制御されており, この内槽の水が恒温セルホルダーを循環する. この回路の感温素子であるサーミスタはセルホルダーの中に埋め込まれており, セルホルダーの温度は $(25.00 \pm 0.01)^\circ\text{C}$ に制御される.

キセノンランプを点灯すると, 204S ではランプハウスが分光器の壁に取り付けられているため, セル室内への熱伝導があることと, 分光された一次光がセル室に取

Fig. 1 The temperature control system

Amp: Amplifier; TC1: The linear regulation temperature controller; TC2, TC3: ON/OFF temperature controller; WC: Water cooler; T: Thermister; TLC: Thermilinear component; CH: Cell holder; H: Heater; IB, OB, AB: Inner, outer and air baths; Arrows show the flow of water.

り付けられたシャッターの裏側に当たることにより、セル室内の温度が上昇する。そこで補助の熱交換器をセル室に内張りするように取り付け、これら外因性の熱の流入を迅速に取り除いた。恒温槽の内槽の水はセルホルダーと補助熱交換器を直列に流れる。

ランプハウスを除く分光器全体をアクリル板製の箱で包み、空気恒温槽を形成し、オン/オフ型制御回路で $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ に制御した。一方、ランプハウスはファンで空冷した。分光器本体の温度を一定に保つことにより、内部に格納されている光電子増倍管の出力も安定する。

外界の温度が 20°C 以上の高温になるときには 5°C に冷却された水を水恒温槽の外槽と空気恒温槽の中の銅製の管に流し冷却する。

測定用試料セルとしては、市販の水冷却式恒温吸収セルをそのまま用いた。セルの冷却水循環層には水は流さず、空気断熱層として利用した。このセルをセルホルダーに装着し、本装置を作動させると、試料溶液の温度は $\pm 0.005^\circ\text{C}$ 以内に制御できる。

3.3 分光学的相対量子収率の測定法

本研究による熱量法的量子収率の測定値の信頼性をみるため、従来より行われている分光学的量子収率を測定した。Melhuish⁵⁾ によって絶対測定されたアントラセンのエタノール溶液 ($\phi=0.270$) を標準として、Trp, Tyr, Phe, DNS-Trp, DNS-Gly の量子収率を測定した。まずローダミンBの光量子計を用いて、ランプのパワースペクトルを求め、次に光量子計を MgO 拡散反射板に置き換え、光電子増倍管の出力を記録する。これを光源のパワースペクトルと反射板の反射係数で補正し、

光電子増倍管の感度特性を求めた。実測の発光スペクトルをこの感度特性を用いて補正し、発光する光子数を求めることにより量子収率を決定した。

3.4 光マイクロカロリーメーター; K の測定

測定セルにステンレス製のサーミスタ用ポケットを取り付けた。ポケットの先端をできるだけ光照射される部分に近付ける。ポケットの中にはサーミスタが感温素子として入っているが、ポケットの先端すなわちサーミスタの上下の位置は重要である。試料の光照射された部分から離れすぎると、サーミスタの感じる温度変化が鈍くなり、逆に近付けすぎると入射光が直接ステンレス管に当たり、内部のサーミスタが加熱され、溶媒のみの温度上昇速度 K_0 が大きくなってしまい測定精度が悪くなる。

試料の放出する熱エネルギーは溶液が希薄なため非常に少なく、従って溶液温度の上昇も微弱である。そこでわずかの温度変化を検出できる温度計が必要であり、これを作製した。感温素子には YSI 社製サーミリアコンポーネント (YSI 44202) を使用した。このサーミスタは温度に対し電圧出力が線型に応答するので計測に便利である。用いた 44202 の特性を Fig. 2 に示す。サーミスタのわずかな出力変化をアンプで増幅し計測した。アンプの構成を Fig. 3 に示す。サーミリアコンポーネントを一辺に持つブリッジ回路の出力を、温度に対

Fig. 2 The characteristic of thermilinear component (YSI 44202)

Sensitivity: $0.005687 E_{1\text{in}}/^\circ\text{C}$; $E_{1\text{in}}: 2.386 \text{ V}$

Fig. 3 The block diagram of linear amplifier (linear thermometer)

V.R.: Voltage regulator which supplies the constant voltage (2.386 V); Amp: The instrumentation amplifier which consists of high input impedance operational amplifiers; Filter: The low pass filter of which cut frequency is 13 Hz

して安定なバイポーラ型高性能オペアンプを持つインストルメンテーションアンプで受け, 最大 40.8 dB まで増幅する。次いでハイカットフィルターで 13 Hz 以上の温度計測には不必要な高周波成分をノイズとみなしカットした。アンプの出力をストリップレコーダーに記録する。その精度はチャート紙 1 目盛で 0.0001°C 程度となる。

測定溶液 0.7 ml を試料セルに入れ, すべての制御装置を作動させて数時間放置する。ランプ点灯後約 20 分の後再び温度が落ち着いた時点でレコーダーのチャート紙をしばらく作動しベースラインを記録する。シャッターを開き試料に励起光を照射すると, 温度が直線状に上昇する。適当な時間の後シャッターを閉じると, 温度が下がり始め, もとのベースラインにまで戻ったと思われる時点で 1 回目の測定が終了する。発熱曲線の直線部の傾きを K の測定値とする。ベースラインが傾いている場合にはその補正をする。発熱量が大きい高濃度溶液での典型的な温度上昇曲線を Fig. 4 に示す。この例では低い測定レンジを用いているためベースラインの傾きはほとんどなく, 曲線の傾きそのものを K とした。

3.6 結 果

蛍光量子収率は温度により変化するが, その変化の様子は物質により異なる。Trp, Tyr, Phe の水溶液につ

Fig. 4 Curves of temperature elevation of the calorimeter

A: Reference (tetraphenylcyclopentadienone); B: Sample (DNS-Gly); C: Solvent (ethanol); Broken lines show the gradient K .

いて, その蛍光強度の温度変化を Fig. 5 に示す。これらの物質では $(25.0 \pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ で量子収率を測定するのが望ましい。

Fig. 5 Temperature dependencies of fluorescence intensity of Trp, Tyr, and Phe

Intensities are normalized to unity at 20°C . Open and solid circles show temperature increase and decrease, respectively.

絶対測定されたアントラセンのエタノール溶液を標準として, これら三つのアミノ酸の水溶液の蛍光量子収率を, $(25.00 \pm 0.01)^{\circ}\text{C}$ において分光学的に測定した。光学セル内で均等に発光が放射されるように, 吸光度が 0.1 以下の希薄溶液を用いた⁹⁾。アントラセンではストークスシフトが小さく, 発光の再吸収を無視することはできない。再吸収の補正を Demas-Crosby⁹⁾の方法で行った。蛍光量子収率の実測値を Table 1 に示す。

Table 1 Fluorescence quantum yields and fluorescence sensitivity indexes (F.S.I.) of aromatic amino acids

Solute	Solvent	Fluorescence quantum yields						F.S.I., $\phi D_2/H$ (μm)†	
		This work	Chen ⁷⁾	Tiele-Weber ⁸⁾	Børresen ⁹⁾	Eisinger ¹⁰⁾	Nishikawa ¹¹⁾	This work	Nishikawa ¹¹⁾
Trp	water	0.15 ± 0.01	0.13	0.20	0.119	0.14	—	8.0×10^{-3}	—
Tyr	water	0.14 ± 0.01	0.14	0.21	0.088	—	0.178	2.7×10^{-3}	1.84×10^{-3}
Phe	water	0.018 ± 0.003	0.024	0.04	—	—	—	5.3×10^{-5}	—

† D_2 is an absorbance of $1 \mu\text{g/ml}$ at wavelength λ (nm). H is a half width of photon spectrum of emission in μm^{-1} .

Table 1 には蛍光分析の感度比較に 繁用される 蛍光感度指標 $F. S. I.$ ¹⁾, $\phi D_{\max}/H$ を併せて示した. ここで $D_{\max}$ は吸収極大波長における 吸光度, H は蛍光スペクトルの 半値幅である. ϕ の実測値は Chen 及び Eisinger の値と近い. ϕ/H は発光極大での単位波数間隔中に発光する光子の数であり, 物質により定まる値である. 蛍光分析では $D_{\max}$ との積である $F. S. I.$ が使われる.

Trp, DNS-Trp, DNS-Gly のエタノール溶液の蛍光量子収率について, 熱量法, 分光学的方法の二つの方法での実測値を Table 2 に示す.

Table 2 Calorimetric and spectroscopic fluorescence quantum yields of Trp, DNS-Trp, and DNS-Gly

Solute	ϕ_{cal}	Solvent	ϕ_{spe}	Solvent	Exciting wavelength (nm)
Trp	0.10	ethanol	0.15 ± 0.01	water	280
DNS-Trp	0.54	ethanol	0.53	ethanol	360
DNS-Gly	0.50	ethanol	0.48	ethanol	360

本法は又, 蛍光量子収率の小さい物質については, 励起分子の出発発熱量が多いので, 蛍光分析に相補的な分析方法として利用できる可能性がある. Fig. 6 には用いた試料についての K の検量線を示す. 熱的測定では試料中のすべての光吸収物質が関与するため, 試料をクロ

Fig. 6 Calibration curves of tetraphenylcyclopentadienone (A), DNS-Trp (B), and DNS-Gly (C).

マトグラフィーなどにより, あらかじめ分離し, 不純物を除いておく必要がある. ただし不純物が照射光の波長において光吸収しないものはこの限りではない.

4 考 察

Table 1 に示すように, 三つのアミノ酸水溶液では, 本報における分光学的な蛍光量子収率の測定値は Chen 及び Eisinger の測定値に近い. 一方 DNS-Gly と DNS-Trp のエタノール溶液では, 分光学的, 熱量的両方法とも互いに近い値を与えるが, Trp のエタノール溶液の熱量法による値は, Trp 水溶液の分光学的方法による値よりも 50% 小さい値となった. 水よりも極性の小さなエタノール溶液では Trp の量子収率はいくらか大きな値となるかも知れない¹²⁾.

従来, 蛍光量子収率は研究者により異なる測定値が報告されることが多い. 測定装置及び測定法の特徴に由来する系統的な誤差がその原因と考えられる. 例えば Trp では, Tiele-Weber の値は大きすぎることが指摘されており⁶⁾⁹⁾, Trp の収率を 0.09 として標準に用いたとき, 幾つかのアミノピリジンでは収率が 1.0 以上になる例もある¹³⁾. このように従来の分光学的方法のみでは, いずれの報告がより正しいかを判断する基準を決めにくい.

DNS-アミノ酸の DNS 基については, 分光法, 熱量法ともほぼ等しい値を与えるが, これら二つの本質的に異なる測定法により得られた値が等しいときには, その測定値の信頼性は高く, 現在, 相対的分光学的量子収率決定法の標準と考えられている多くの物質を熱量法により評価し直すことが必要と考えられる.

試料溶液と参照溶液とで吸収スペクトルの形が励起波長付近で著しく異なる場合には, 励起波長 λ_a についてのスリット幅の補正が必要である. 本測定ではこの補正は行わなかった.

熱量測定による量子収率決定法を持つ意義を次の五つに要約することができる. まず (1) 熱量法では ϕ を決定するためのパラメーターが少なく, 分光学的方法に比べ原理的に精度の高い測定値が期待できる. (2) 光と熱という全く異なる物理量に注目する二つの異なる方法が, 同一の ϕ を与える場合には, 測定値の確度が高いことを意味しており, 従来一般に 10% 程度の誤差を認めざるを得なかった分光学的相対量子収率を, 熱量法で測定し直すことにより, 再評価することができる意義は大きい. (3) Seybold や Olmsted の方法に比べて, 本報による方法が非常に簡便であることは大きな特徴である. Olmsted らの方法では励起光を恒温槽中の水槽を

通して試料に照射するため, 特に紫外部の短波長の光の強度が減少し, 大きな出力のランプやレーザー光源などを必要とせざるを得ない. 本報による方法では, 市販の分光光度計を用いて分光された任意の波長の励起光を選択することができる. (4) 発光波長が著しく長く, 適当な光電子増倍管を用いることができない物質に対しては, 熱量法は分光学的方法に対し有利である. (5) 本法は蛍光分析法に対する新しい分析法となる可能性がある. Fig. 6 に示したように, 試料の温度上昇速度 K と濃度との間には直線関係があり, 切片は K_0 を示す. 本熱量測定装置を用いて, 少なくとも 360 nm に吸収を持つ物質については誤差 $\pm 7\%$ 以内で定量することができる.

5 結 語

本研究では, 試作した装置を用いトリプトファン, チロシン, フェニルアラニンの蛍光量子収率, 蛍光分析における蛍光の感度指標 (F. S. I.) を検定した. トリプトファン, ダンシルトリプトファン, ダンシルグリニンについて, 熱量測定による方法と分光学的方法の両方法で蛍光量子収率を測定し, 熱量法の有効性を検討した. 更に蛍光分析の対照標準物質や, 生化学領域における蛍光物質の蛍光量子収率の正確な値を決定するため本法を適用中であり, これについては改めて報告する.

本研究の一部は, 近畿大学研究助成金によって行った.

文 献

- 1) C. A. Parker, W. T. Rees : *Analyst* (London), **85**, 587 (1960).
- 2) R. M. Dagnall, S. J. Partt, R. Smith, T. S. West : *Analyst* (London), **93**, 638 (1968).
- 3) P. G. Seybold, M. Gouterman, J. Callis : *Photochem. Photobiol.*, **9**, 229 (1969).
- 4) M. Mardelli, J. Olmsted III : *J. Photochem.*, **7**, 277 (1977).
- 5) W. H. Melhuish : *J. Phys. Chem.*, **65**, 229 (1961).
- 6) J. N. Demas, G. A. Crosby : *J. Phys. Chem.*, **75**, 991 (1971).
- 7) R. F. Chen : *Anal. Lett.*, **1**, 53 (1967).
- 8) F. W. Teale, G. Weber : *Biochem. J.*, **65**, 476 (1957).
- 9) H. C. Borresen : *Acta Chem. Scand.*, **21**, 920 (1967).
- 10) J. Eisinger : *Photochem. Photobiol.*, **9**, 247 (1969).
- 11) Y. Nishikawa : 投稿準備中.
- 12) F. W. Teale : *Biochem. J.*, **76**, 381 (1960).
- 13) A. Weissstuch, A. C. Testa : *J. Phys. Chem.*, **72**, 1982 (1968).

☆

The calorimetric determination of fluorescence quantum yield. Koichi TAKAHASHI and Atsushi AOKI (Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka-shi, Osaka)

Fluorescence quantum yields of aromatic amino acids and those derivatives are determined by measuring thermal energies which are produced by nonradiative deactivation of excited molecules. The fluorescence quantum yields of ethanol solution of DNS-Trp, DNS-Gly, and Trp excited at 360 nm, 360 nm, and 280 nm, are 0.54, 0.50, and 0.10, respectively. Spectroscopically determined values of fluorescence yields of DNS-Trp and DNS-Gly are 0.53 and 0.48, respectively. These values which are determined by two methods coincide satisfactorily. The present method can be used as a new method for quantum yield which is substantially different from ordinary spectroscopic method. We suggest a possibility of opto-calorimetric analysis of absorptive and non-fluorescent compounds. Especially, for a long wavelength emission which can not be detected by a photomultiplier, the present method gets advantage over the spectroscopic method. The experimental system is very simple, consisting of fluorophotometer (Hitachi 204 S) with some optional devices, and its measurements are also simple.

(Received Mar. 18, 1982)

Keyword phrases

photomicrocalorimeter; spectroscopic and calorimetric fluorescence yields; Trp, Tyr, Phe, DNS-Trp, DNS-Gly.