

分光蛍光光度計 FP-8500

操作手順書

横浜国立大学機器分析評価センター

作 成 日	2023 年 8 月 28 日	
手順書 No.	FP-8500	
作 成	承 認	

目次

測定できる試料	3
準備.....	3
積分球使用時の注意.....	3
装置の起動.....	4
KBr プレート試料作成(必要な場合).....	4
アプリケーションの起動.....	6
パラメータ設定.....	6
積分球試料ホルダのセット(積分球を使用する場合)	8
取り外し	8
取り付け.....	9
試料の位置	9
スペクトルの測定	9
励起スペクトル測定(試料の励起波長が未知の場合)	9
蛍光スペクトル測定	10
測定データの保存.....	11
量子収率の計算(計算する場合).....	12
測定結果の出力	12
スペクトルデータ	12
量子収率.....	12
終了.....	13

測定できる試料

- 標準ホルダ、冷却ホルダ
 - 標準分光セル (12 mm×12 mm×45 mm (光路長: 10 mm)) を使用
 - 標準ホルダ
- 粉末・ペーストホルダ
 - 粉末あるいはペーストを、ホルダに直接セットして測定。
- 積分球
 - 液体: 標準分光セル (12 mm×12 mm×45 mm (光路長: 10 mm)) を使用し、10mm 角型セル用ホルダを使用して測定。
 - 粉末: KBr プレート (3mm から 5mm) に挟んで圧着後、専用の石英板 (3 枚セット) で挟み、試料押さえ式ホルダに挟んで測定。
 - 板・シート状: 試料押さえ式ホルダに直接挟んで測定。ただし、自立し、汚染の恐れがないこと。あるいは、専用の石英板 (3 枚セット) を使用して測定。
 - その他、光路長 2mm および 3mm の分光セルを使用したい場合は、事前に相談する。

準備

- 積分球ユニットの取り付けはスタッフが行うので、使用前にスタッフを呼ぶ。
- 冷却ホルダか粉末・ペーストホルダの取り付けは、スタッフが行うか、許可が下りていれば自身で行う。スタッフが行う場合はスタッフを呼ぶ。
- 部屋の温度はなるべく安定させること。
- 有機溶剤を使用するときは、ヒュームフードの電源を入れる。

積分球使用時の注意

- ！ 積分球の内側は、手で触れたり器具等が接触したりしないように注意する。汚れると洗浄ができず、また衝撃でコーティングが落ちることがあり、修理は高額となる。
- ！ サンプル導入の都度、ホコリ等がないことを確認し、ホコリがあった場合は、積分球内に接触しないように注意しながらゴム球のブローアで飛ばして除去する。汚れ等があった場合や、ホコリがブローアで除去できない場合などはセンターの担当者 (107 室) に連絡すること。
- ！ 蓋を閉じるときは静かに行い、勢いがついてしまい閉じるときに音が立ったような場合は、破損がないかすぐに確認すること。

装置の起動

- i. 分光計本体の電源を入れる。

注意：積分球や冷却ホルダへの交換はあらかじめ行っておくこと。ユニットの認識がされずに、データ処理で問題を生じることがある。

- ii. PC とモニタの電源を入れる。

- iii. 分光計のモーター音がしなくなったら、PC のデスクトップにあるスペクトルマネージャを立ち上げる。この操作でランプが点灯するので、しばらく待つ。(起動後、キセノンランプが安定するまで約 30 分かかる)

- iv. 使用記録に、使用開始時刻を記帳する。

注意：

分光計の電源を入れた後は、積分球の蓋を開けるときは、Ex シャッターが閉じているか、紫外線が照射されていないことと、部屋が明るい場合は Em シャッターが閉じていることを確認してから行うこと。

積分球は光が反射するので、紫外線が照射されたまま蓋を開けると、目に障害を受ける恐れがあるので特に注意する。

KBr プレート試料作成(必要な場合)

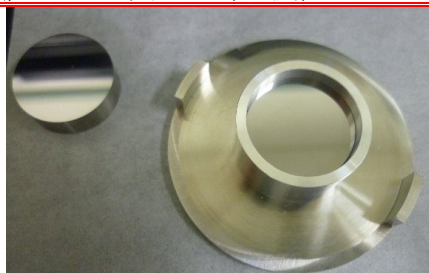
粉末状の試料を、積分球を使用して測定するときは、KBr プレートに挟んで圧着した試料を作成する必要がある。以下に、試料の作製手順を示す。

- i. 試料成型器を用意する。成型器は真空デシケーターに入っている。

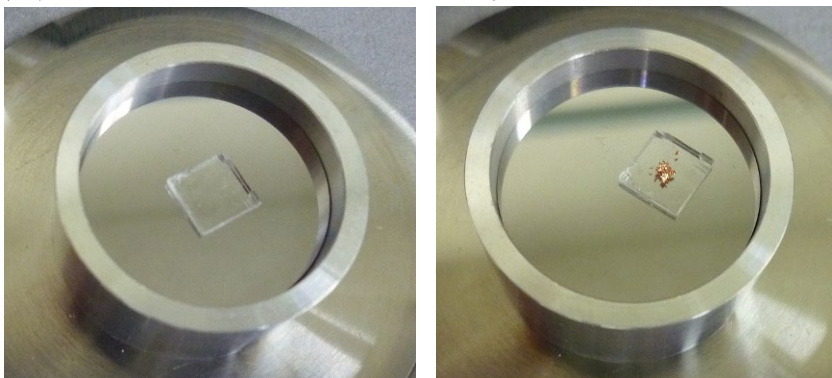


- ① 台座
- ② 支持リング
- ③ 鏡面板 上下

- ii. 台座に鏡面板を乗せ、支持リングで固定する。鏡面板の形状には上下の区別が無いが、鏡面板表面の綺麗な方が上(内側)になるように置く。

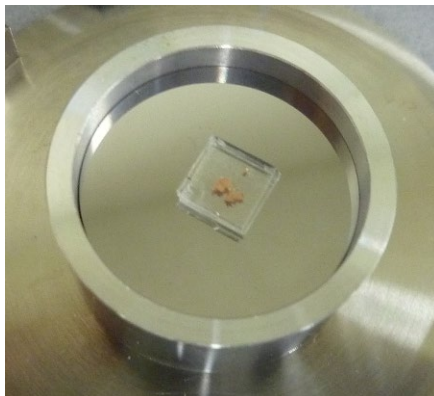


- iii. 鏡面板の上に KBr プレート置き、KBr プレートの中央に試料を乗せる。一度乗せた試料は位置の修正ができないので注意する。

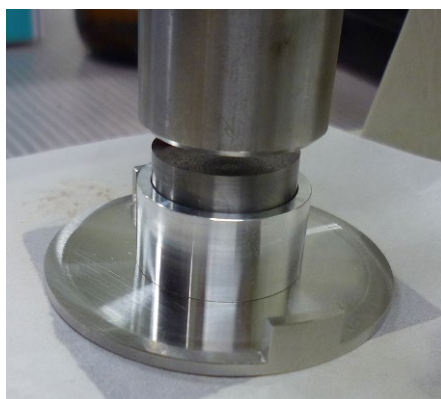


※ 試料が多すぎてプレートからはみ出してしまうと、そこから落下し、積分球を汚染する恐れがあるので、プレスすると試料が伸びて広がることも計算に入れて注意すること。少なすぎても信号強度が足りなくなるので、適切な量を入れる。

- iv. KBr プレートと試料の上に、もう一枚の KBr プレートを重なるように乗せる。ここでも、一度乗せた KBr プレートは位置の修正ができないので注意する。



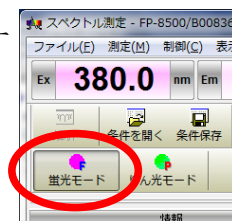
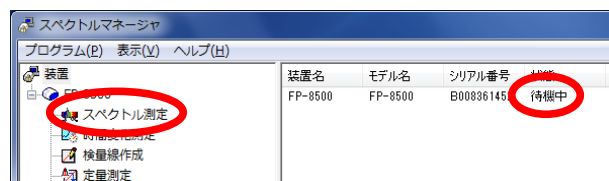
- v. 次に鏡面板を、綺麗な面を下(内側)にして被せ、手押しプレスでプレスする。「強すぎると板が割れ」、「弱すぎると密着せずにはがれてしまう」ため、適度な強さでプレスする。目安としては、プレスした KBr 板が石英板の中板と厚みが等しくなる程度が好ましい。



- vi. プレスした KBr 板は、キムワイプの上などで転がし、粉末や割れた KBr 片などが落ちないことを確認する。

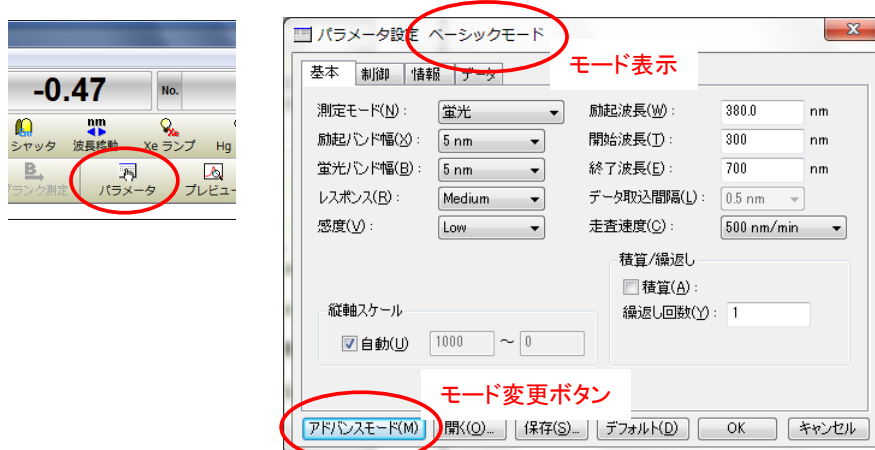
アプリケーションの起動

- i. スペクトルマネージャの画面を見て、FP-8500 の状態が「待機中」になっていることを確認し、「スペクトル測定」をダブルクリックして起動する。
- ii. ツールバーの「蛍光モード」ボタンが選択されていなければ選択する。



パラメータ設定

ツールバーの「パラメータ」ボタンをクリックし、「パラメータ設定」ダイアログを表示させる。最初に測定するときは、どのような設定になっているかわからないので、「デフォルト」ボタン



を押して初期化するとよい。

パラメータ設定には「ベーシックモード」と「アドバンスモード」があり、タイトルバーにモード表示される。モードを変更する場合は「モード変更ボタン」を押して切り替える。

- ・ 以降はベーシックモードを用いた場合の説明とする。必要に応じてアドバンスモードを選んで使用してよい。

「パラメータ設定」ダイアログには、[基本] [制御] [情報] [データ] の4つのタブがあるので、それぞれを設定する。

1: [基本] タブ

まず、測定モードを「蛍光」にして測定する。予想される励起波長と、蛍光測定のスキャン開始波長と終了波長を入力する。

- 量子収率を測定する場合は、励起波長の散乱光もスキャン範囲に入れる必要がある。

- 開始波長: 励起光ピークの短波長側の裾より短い程度(励起波長-20nm 程度)
- 終了波長: 蛍光ピークの裾がゼロ付近になるくらいの波長まで

そのほかの設定は、適切な値がわからない場合は、以下の設定を参考にするといよい。

- 励起バンド幅: 5nm
- 蛍光バンド幅: 5nm

→ バンド幅とは、単色光を分光計から取り出したときの半値全幅のこと。バンド幅が小さいほど「波長純度」が上がるが、感度は下がる。観測されたピークの1/10 以下に設定されていれば、概ね問題はない。

ただしスペクトル補正を行う場合は、バンド幅の設定を変えると、それに合わせた補正データが必要なので注意！

- レスポンス: Medium

→ レスポンス(時定数)を上げると分解能が上がり、下げるとノイズが減って感度が上がる。走査速度に合わせて設定しないと効率が落ちてしまう。
- 走査速度: 1000 nm / min

→ 走査速度が遅いほど感度良く測定できるが、測定時間がかかる。適切なレスポンスとの組み合わせは、オペレーションマニュアル(冊子)を参考にする。
- 感度: Manual (設定値は後で調整する)

→ 量子収率測定の場合は、ブランクの励起光に合わせて感度を 5000～8000 カウントに調整するので、測定時にマニュアルで調整する(後述)。

2: [制御] タブ

- スペクトル補正: 通常は Off。量子収率を測定する場合は On にするといよい。
 スペクトル補正は、バンド幅が同じで測定波長も補正データの波長範囲にないと補正データファイルが使用できないため、違うものは指定できない。
- 測定時のみ Ex シャッターを開く: On。

3: [情報] タブ

試料名、オペレータ(測定者)、所属、コメントを自由に書くことができる。(次回の測定者にも同じ内容が見えるので、秘密情報は書かないこと)

4: [データ] タブ

- 自動保存する: Off
- スペクトル解析へデータを転送する: On
- 測定データを印刷する: Off

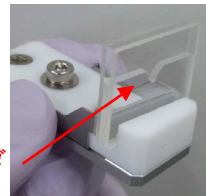
パラメータの設定を終えたら、[OK] ボタンをクリックしてダイアログを閉じる。

積分球試料ホルダのセット(積分球を使用する場合)

- 試料ホルダは、試料押さえ式ホルダと、10 mm 角型セル用ホルダの 2 種類が用意されている。



試料押さえ式ホルダ



KBr プレートホルダ

KBr プレートホルダを
試料押さえ式ホルダ
にセットしたところ

- 試料押さえ式ホルダは、石英板 3 枚を挟んで KBr プレートホルダにすることができる。
- 試料押さえ式ホルダは、板状試料、2 mm 溶液セル、3 mm 粉末セルを使う場合にも用いる。
- ホルダの取扱いは、手袋をして行うこと。
- 積分球の蓋を開ける際は、紫外線が出ていないことと Em シャッターが閉じていることを確認のこと。

試料ホルダの取り付け、取り外しは、以下のように行うこと。積分球内で不適切に扱うと、試料を落としてしまったり、球内を傷つけてしまったりすることがある。

10 mm 角型セル用ホルダ → 10mm セルを外した状態で行う。

試料押さえ式ホルダ → KBr プレートホルダや、各種セルを取り付けた状態で行う。

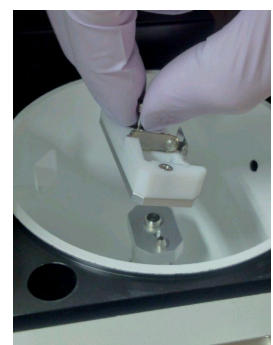
ホルダに触れるときは、必ず手袋をして作業を行うこと。また、手袋をしていても、積分球のコーティング表面にはできるだけ当たらないようにすること。

積分球の蓋を開ける際は、励起波長が紫外線に設定されている場合は Ex シャッターが閉じていることを確認すること。また、Em シャッターは閉じた方がよい。

取り外し

- ホルダの手回しネジ (六角レンチ穴が彫ってあるが、工具は使わずに手で回す) を左回し(反時計回り)で緩める。

手回しネジは、ホルダからは外れない構造になっているので、



ネジをつまんでいればホルダが落下する心配はない。

- ii. ネジは 5 ～ 6 mm 緩めると外れるので、充分緩めたらホルダが積分球に当たらないように注意しながら、ネジをつまみ上げるようにホルダを取り外す。

取り付け

- i. 試料押さえホルダの場合、試料をホルダにセットする。
KBr プレートは固定されていないので、落下に注意！
- ii. ホルダの裏側の穴と、ホルダ台の突起が合うように取り付け、ネジを手回しで右（時計回り）に締める。（レンチ等の工具は使わない。）

試料の位置

- i. 励起光が試料に適切に当たっていることを確認するには、550 nm 程度の波長（緑色）で目視しながら調整する。（紫外線で目視しようとしないうに注意）

波長の変更は、波長移動アイコンで設定できる。

- ii. 励起光が試料に当たらない割合が大きくなり過ぎないように、適切なアパーチャを取り付ける。

- ・ 照射スポットは、アパーチャの約 2 倍の大きさになる。
- ・ アパーチャは広げればよいというわけではなく、試料に光が当たる面積比が多いほど良い。
- ・ 励起光の大きさは、励起バンド幅に応じて上下に狭くなるため、照射スポットは上下が欠けた形になる場合がある。スポットの形状は次の表を目安にすること。



アパーチャ	照射スポット径	励起バンド幅におけるスポットの形状目安				
		1 nm	2.5 nm	5 nm	10 nm	20 nm
1 mm	2 mm					
2 mm	4 mm					
3 mm (標準)	6 mm					
5 mm	10 mm					

スペクトルの測定

励起スペクトル測定（試料の励起波長が未知の場合）

良好な蛍光測定結果を得るには、励起波長が適切に設定されている必要がある。したがっ

て、適切な励起波長が不明の場合などには、励起スペクトルを測定して調整を行う。

パラメータ設定において、測定モードを「励起」にして測定すると、励起波長をずらしながら蛍光強度をプロットすることができる。これにより、蛍光が最大となる励起波長を求めることができる。

ただし、測定の目的によっては安易に最大値では決定できないので注意を要する。

また、励起波長と蛍光スペクトルのピークが近すぎる場合は、蛍光のスペクトルに励起光が入り込み、不適切な値となることがあるため、少し励起波長を低波長にずらして測定するとよい。

極大波長サーチの機能を使用すると、一連の作業を自動化し、励起波長と蛍光波長の極大を同時に求めることができる。

蛍光スペクトル測定

通常は試料蛍光スペクトルの測定のみが必要となるが、量子収率を計算する場合は、以下のスペクトルについても測定する。

- ・ 入射光スペクトル → **【必須】**
- ・ 間接励起試料蛍光スペクトル → **【試料の透過率または反射率が高いか、蛍光が強い場合】** 反射した光が再度試料に当たり、蛍光が発生しやすい場合に必要になる。
- ・ ダーク測定 → **【蛍光が著しく弱い場合】**

いずれのスペクトルも 10,000 カウントを超えないように注意し、もし超えた場合は必要なすべてのスペクトルを測定しなおす必要がある。入射光スペクトルが一番強くなるので、初めにそれを測定してパラメータを調整するとよい。

測定データはスペクトル解析アプリケーションへ自動で転送される設定にしているが、データ数が多いので、測定が終わったら都度に保存 (B-6-6 測定データの保存) した方がよい。

試料蛍光スペクトル測定

- i. 試料をセットする。
- ii. 蛍光強度のモニターがほぼ 0 でなければ、オートゼロのボタンを押す (Em シャッターは自動で閉じる)。
- iii. Em シャッターが開いているのを確認のうえ、試料測定ボタンを押し、スペクトルを測定する (Ex は自動開閉設定を On にしておくのが通常手順)。
- iv. スペクトル測定を繰り返しながら、パラメータを最適にする。

量子収率測定の場合は、入射光の減少率が低い場合は、試料の中心に光が当たっていないか、薄すぎたりすることがあるので、サンプルを再確認するとよい。

既に感度パラメータが決定しているのに、蛍光ピークに十分なカウントが得られない場合は、積算測定を検討する。

既に入射光スペクトル等を測定している場合、パラメータを変更した場合は、もう一度入射光等を測定する必要がある。また入射光測定等でパラメータに変更を加えたら、再度試料スペクトルも測定する。

入射光スペクトル測定

- i. KBr 板や溶媒を使う場合など、ブランク試料が必要な場合は用意する (不要な場合は空気でもよい)。
- ii. 蛍光強度のモニターがほぼ 0 でなければ、オートゼロのボタンを押す (Em シャッターは自動で閉じる)。
- iii. Em シャッターが開いているのを確認のうえ、**試料測定ボタン**を押し、スペクトルを測定する (Ex は自動開閉設定を On にしておくのが通常手順)。
- iv. スペクトル測定を繰り返しながら、パラメータを最適にする。

入射光のピークが 5000～8000 カウントになるように、感度パラメータの電圧を調整する (大きい方がよい)。

間接励起試料蛍光スペクトル測定

Em シャッターを閉じて積分球の蓋を開け、試料がこぼれないように目視しながら、SAMPLE ツマミをゆっくり OUT にして、試料を励起光の光路から外す。溶液セルなどの場合は、危ないので一度試料を取り出してから、ツマミを回すこと！

Em シャッターを開いて、スペクトルを測定する。



ダーク測定

Em シャッターを閉じてスペクトルを測定する。

測定データの保存

測定データは「スペクトル解析」アプリケーションに転送されるように、パラメータで設定されている。設定していなかった場合は、測定の都度スペクトル測定から名前を付けて保存をする必要がある。

「スペクトル解析」アプリケーションから保存するには、必要なデータを選んで保存する。基本的に測定順にファイルができるが、測定の都度、保存することを推奨する。

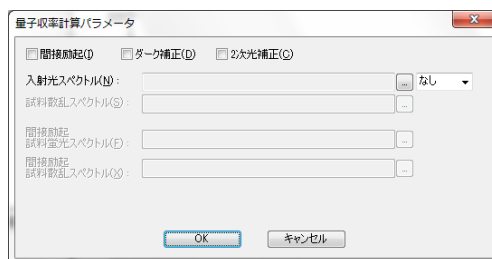
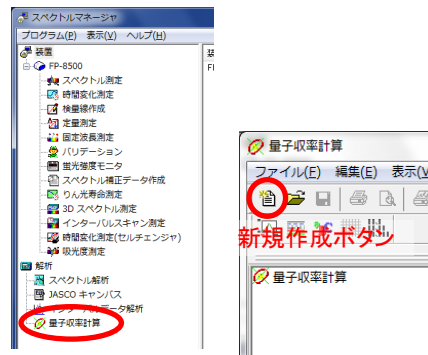
データは C:\¥Data¥研究室名 のフォルダをつくり、必要に応じてサブフォルダを作るなりして保存する。

量子収率の測定で、パラメータ設定においてスペクトル補正を Off にして測定した場合は、メニューバーの [データ処理] – [FP-オプション] – [スペクトル補正] でスペクトル補正をして別名保存する。

量子収率の計算(計算する場合)

量子収率の計算には、スペクトル補正されたデータが必要なため、ここで使う「量子収率計算」アプリケーションでは、スペクトル補正されたデータしか選べないようになっている。

- i. 「スペクトルマネージャー」から [量子収率計算] をダブルクリックして「量子収率計算」アプリケーションを起動する。
- ii. 新規作成ボタンをクリックする。
- iii. 「スペクトルを開く」ダイアログが出るので、先ほどの試料蛍光スペクトルのデータを選ぶ。
- iv. 「量子収率計算パラメータ」ダイアログが出るので、入射光スペクトルの保存場所を[...]から設定する。
- v. 間接励起やダーク測定をした場合、それぞれチェックを入れて、ファイルを選ぶ。
- vi. [OK] ボタンをクリックすると、試料吸収率と、外部量子効率、内部量子効率が表示される。



量子効率等の名称やその意味については、オペレーションマニュアル(冊子)の解説ページを参考にすること。

測定結果の出力

印刷する場合は、ファイルとして印刷 (PDF プリンタドライバか、Microsoft XPS Document Writer プリンタドライバを使う) する。

USB メモリを使う場合、機器分析評価センターの窓口で貸し出している色付きの USB メモリを使用する。持参した USB メモリ等を使用しないこと。

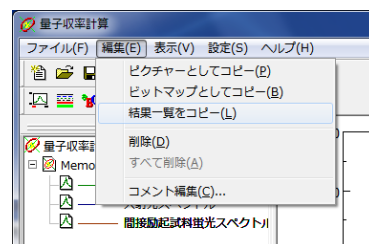
スペクトルデータ

ファイルメニューからエクスポートを選んで CSV 等に出力する。

スペクトル画像を残すときは、編集メニューの『ピクチャー (メタファイル) またはビットマップ (画像ファイル) としてコピー』することで、ワードパットやペイントに貼り付けることができる。

量子収率

「量子収率計算」アプリケーションから印刷するか、編集メニューから「結果一覧をコピー」し、ワードパットなどに貼り付けて保存する。



終了

- i. アプリケーションをすべて閉じ、PC とモニタの電源を切る。
- ii. 積分球内に何も入っていないことを確認し、分光計本体の電源を切る。
- iii. 使用記録に、使用終了時刻と分光計本体の停止時刻、積分球の使用のチェック、試料の性状を記帳する。