

技術論文

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いる顕微吸光度分析

松本 朋子^{®1}, 白木 隆一², 松本 仁², 白上 努², 保田 昌秀²

共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いた顕微吸光度分析の精度及び適応範囲などを検証するために、粒径が 50 及び 150 μm の 2 種類の球状シリカゲルにジヒドロオキソ(テトラフェニルポルフィリナト)アンチモン臭化物錯体 (1) を 0.70 ~ 3.59 mmol dm^{-3} のモル濃度 (C_1^m) で吸着させてマイクロビーズ (2) を調製した。CLSM での試料の測定領域は、対物レンズの倍率及びピンホールの直径又はファイバーコアの直径によって決められる直径が 2.14 μm の円形内であることが分かった。更に分析範囲、測定範囲などの分析条件を検討した結果、4.9 ~ 350 μm の球状試料について測定波長が 488 ~ 775 nm で分析可能であることが分かった。そこで、CLSM に付属する透過照明装置を利用して可視光吸光度分析を行い分析精度について検討を行った。その結果、吸光度 (A) から求めた 2 中の 1 のモル濃度 (C_2) は C_1^m と標準偏差 0.11 ~ 0.73 で良い一致を示した。しかし、 A が 0.8 以上のサンプルでは、直線からのずれが確認され、 A の測定範囲は 0.8 以下であることが分かった。以上のように、CLSM を用いる顕微吸光度分析は、ミクロンオーダーの光透過性の微小材料中の成分濃度を定量するために有効な方法であることが分かった。

1 緒言

新規機能性材料の開発と関連して、マイクロビーズ、微粉体、マイクロカプセルなどの数十から数百ミクロンの大きさの微小固体材料が注目されており、これらの微小材料の定量分析技術の開発が重要となっている¹⁾。今までに、フーリエ変換赤外分光分析及び紫外-vis 分光、反射分光²⁾、及び蛍光解析³⁾などによるマイクロビーズの表面解析及びその破砕物の定性分析が報告されているが、定量分析についての報告が少ない。特に、顕微可視分光光度計が普及していないために、微小領域の可視吸光度分析の報告例が少ない。

著者らは、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (confocal laser scanning microscope, CLSM) において、付属する透過照明装置を利用して吸光度分析が行えるのではないかと考え、CLSM を用いる微小領域での吸光度分析法の開発を目指している⁴⁾⁵⁾。CLSM によって光透過性の微小材料の吸光度及び光路長を正確に測定できれば、溶液における吸光度分析と同様の原理で微小材料中の特定の発色団の濃度を決定できると考えられる。

そこで、本論文では、ミクロンオーダーの球状シリカゲル (SiO_2) にアンチモンポルフィリン錯体を吸着させてマイクロビーズを調製し (Fig. 1), これを試料として用い

て CLSM による顕微吸光度分析の精度及び適応範囲等について検討を行ったので報告する。

2 実験

2.1 試薬

マイクロビーズの調製に必要なジヒドロオキソ(テトラフェニルポルフィリナト)アンチモン臭化物錯体 (1; $\text{C}_{44}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2\text{SbBr}$, 分子量 $M = 848.4$) は、既報に従って合成した⁶⁾。1 の紫外可視吸収スペクトルをアセトニトリル中で測定し、Soret 帯及び Q 帯の極大吸収波長である 417 nm 及び 547 nm におけるモル吸光係数 (ϵ_{417} 及び ϵ_{547}) をそれぞれ $5.62 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 及び $2.14 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と決定した。

マイクロビーズの調製には、平均粒径 (b_{av}) 50 μm ($\text{SiO}_2\text{-a}$ と略) 及び 150 μm ($\text{SiO}_2\text{-b}$) の 2 種類の球状 SiO_2 (富士シリシア化学, CARiACT Q-10) を用いた。濃度計算に必要な SiO_2 の粒子比重 (ρ) は、石英の比重 (2.2) 及び細孔容積 (P) を用いて式 (1) によって算出した (Table 1)。

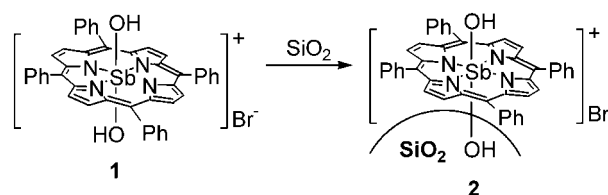


Fig. 1 Microbeads (2) absorbing 1 on SiO_2

¹ 宮崎大学工学部教育研究支援技術センター: 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

² 宮崎大学工学部物質環境化学科: 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

$$\rho = 1/(2.2^{-1} + P) \quad (1)$$

2・2 マイクロビーズ (2) の調製

メスフラスコ (250 cm³) に **1** (12.7 mg 又は 12.5 mg) を入れ、メタノール (50 cm³) を加え、トルエンでメスアップして溶液 I を調製した。また別に、トルエン-メタノール (4:1) 混合溶媒 (溶媒 II) を用意した。次に、ナスフラスコに重量 W_0 (100 mg) の SiO₂ を入れ、溶媒 II を V_2 cm³ 及び溶液 I を V_1 cm³ 加えた。加えた溶液 I 中に含まれる **1** の重量 (W_1 /mg) を式 (2) で求めた。各濃度のマイクロビーズの調製に必要な V_1 と V_2 の量を Table 2 に示す。

次に、エバポレーターでナスフラスコからメタノールを留去し、次に冷却管を付けて 18 時間還流した。還流後、室温まで冷却し、マイクロビーズを汙別し、アセトン (5 cm³) で洗浄して、汙液と洗浄液を回収した。回収した汙液及び洗浄液をエバポレーターで濃縮してメスフラスコ (10 cm³) に移し、メタノールでメスアップして溶液 III とした。溶液 III の吸光度 (A) を 417 nm で測定し、SiO₂ に吸着されなかった **1** の重量 (W_2 /mg) を ϵ_{417} 及び M を用いて式 (3) から求めた。SiO₂ に吸着した **1** の重量 (W_3 /mg) を式 (4) によって算出し、マイクロビーズ中の **1** の重量百分率 (C_1^w /wt%) 及びモル濃度 (C_1^m /mol dm⁻³)

をそれぞれ式 (5) 及び (6) によって求めた。調製したマイクロビーズはデシケーターに入れて真空乾燥させて、CLSM 分析に用いた。Table 2 に調製したマイクロビーズの C_1^w 及び C_1^m を示す。ここで、マイクロビーズは、用いた SiO₂-a ($b_{av} = 54 \mu\text{m}$) 及び SiO₂-b ($b_{av} = 150 \mu\text{m}$) によって、それぞれ **2a** 及び **2b** と表し、括弧内の数値は W_1 の値を示している。

$$W_1 = 12.5 V_1/250 \quad (2)$$

$$W_2 = MA/(100\epsilon_{417}) \quad (3)$$

$$W_3 = W_1 - W_2 \quad (4)$$

$$C_1^w = 100 W_3/W_0 \quad (5)$$

$$C_1^m = 1000 C_1^w \rho / (100M) \quad (6)$$

3 結果及び考察

3・1 CLSM の測定範囲

CLSM は、一般的にレーザー光をガルバノミラー及び対物レンズによって試料上を走査し、試料の表面及び内部の焦点面から発した蛍光を対物レンズ及び共焦点に位置するピンホールを経て検出し、空間分布をコンピュータ処理によって画像に変換する顕微鏡である。特に、深さ方向の分解能が極めて高く、高画質な画像解析を行うことができる。本研究に用いた CLSM は、本体 (Olympus FV-300) に分光器 (Seki Technotron STFL 250) をガラスファイバーでつなぎ、画像解析だけでなく蛍光及び吸収スペクトルの測定を行うことができる。吸光度分析では顕微鏡の透過照明装置のハロゲンランプを光源として用い、試料を透過した透過光は、対物レンズで集光され、ピンホール及びファイバーを通り、分光器及び検出器 (PMT) で検出される (Fig. 2)。

吸光度分析における試料の測定領域は、対物レンズの倍

Table 1 Characterization of SiO₂

	$b_{av}/\mu\text{m}^{\text{a}}$	$P/\text{cm}^3 \text{g}^{-1 \text{b}}$	$\rho/\text{g cm}^{-3 \text{c}}$	area/ $\text{m}^2 \text{g}^{-1 \text{d}}$
SiO ₂ -a	54	1.17	0.616	300
SiO ₂ -b	150	1.19	0.608	285

a) Average diameter (b_{av}); b) Pore volume (P); c) The density (ρ) was calculated according to eq 1; d) Surface area

Table 2 Preparation of the microbeads (2)

2	SiO ₂ ^{a)}	$V_1^{\text{b)}}$ /cm ³	$V_2^{\text{c)}}$ /cm ³	$W_1^{\text{d)}}$ /mg	$W_2^{\text{e)}}$ /mg	Amounts of 1 in 2		
						W_3 /mg	$C_1^{\text{wf)}$, wt%	$C_1^{\text{mg)}}$ /mmol dm ⁻³
2a (0.1)	SiO ₂ -a	2	13	0.102	0.002	0.100	0.100	0.73
2a (0.2)	SiO ₂ -a	4	11	0.203	0.005	0.198	0.198	1.44
2a (0.3)	SiO ₂ -a	6	9	0.305	0.007	0.298	0.298	2.16
2a (0.4)	SiO ₂ -a	8	7	0.406	0.014	0.392	0.392	2.85
2a (0.5)	SiO ₂ -a	10	5	0.508	0.014	0.494	0.494	3.59
2b (0.1)	SiO ₂ -b	2	13	0.100	0.002	0.098	0.098	0.70
2b (0.2)	SiO ₂ -b	4	11	0.200	0.003	0.197	0.197	1.41
2b (0.3)	SiO ₂ -b	6	9	0.300	0.005	0.295	0.295	2.11
2b (0.4)	SiO ₂ -b	8	7	0.399	0.006	0.393	0.393	2.82
2b (0.5)	SiO ₂ -b	10	5	0.499	0.009	0.490	0.490	3.52

a) Weight of SiO₂ (W_2) was 100 mg; b) Volume of solution I in cm³; c) Volume of solution II in cm³; d) Amount of **1** (mg) calculated from eq 2; e) Amount of **1** (mg) involved in solution III which were calculated from eq 3; f) Weight% calculated from eq 5; g) Molar concentration of **1** calculated from eq 6

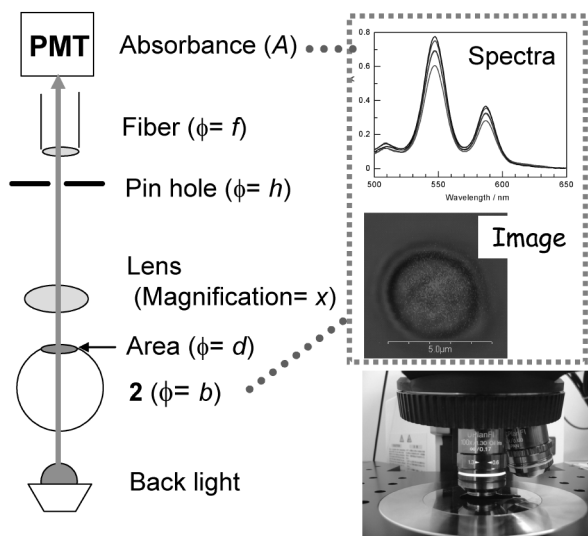


Fig. 2 Absorption spectrophotometry in CLSM

率 (x) 及びピンホールの直径 (h) 又はファイバーコアの直径 (f) によって決められる円形内となる。円形の直径 (d) は, f の三倍の値又は h の値の小さいほうで規制され, $h \leq 3f$ の場合は式(7) で, $h \geq 3f$ のときは式(8) で表される。本装置において, x を 40 倍, f を $100 \mu\text{m}$, h を $300 \mu\text{m}$ に設定して測定を行った場合, d は $2.14 \mu\text{m}$ と計算された。 d は 2 の粒径 (b) に比べて狭い範囲になっているので, 光路長は測定領域内ではほぼ一定と見なされ, また, ビーズ外の領域からの漏光は完全に排除されている。

また, d を $2.14 \mu\text{m}$ とした場合, 2 の粒径 b が $4.9 \mu\text{m}$ 以上であれば, 測定範囲での光路長の誤差は 10% 以内に抑制でき, 光路長は測定領域内ではほぼ一定と見なすことができる。対物レンズの倍率を 40 倍に設定した場合, CLSM の画像で測定できる b の最大値は $350 \mu\text{m}$ となっている。したがって, 本法で測定できる 2 の b の範囲は $4.9 \sim 350 \mu\text{m}$ となる。

測定の波長範囲は, 光源の波長領域及び検出器のフィルターで決められ, 本装置では 488 nm 以下はフィルターでカットされ, 検出器の長波長側の限界は 775 nm であるので, $488 \sim 775 \text{ nm}$ の領域が可視光吸光度分析の波長範囲となる。

$$d = h / (3.5x) \quad (7)$$

$$d = 3f / (3.5x) \quad (8)$$

3.2 CLSM による顕微吸光度分析の方法

2 の吸光度 (A) は, 溶液の吸光度分析の場合と同様に Lambert-Beer 則によって, 光路長, ϵ_{547} , 及び 1 のモル濃

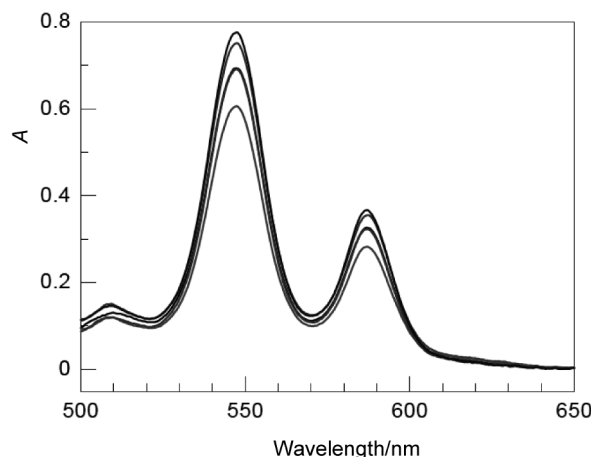


Fig. 3 Absorption spectra of $2b$ (0.2).

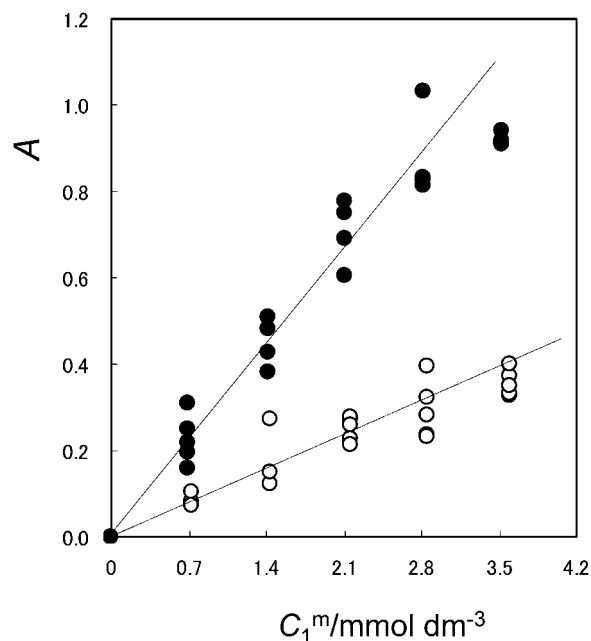


Fig. 4 Dependence of A on C_1^m for $2a$ (○) and $2b$ (●)

度 ($C_2 / \text{mol dm}^{-3}$) の積で表すことができる。 1 をシリカゲルに担持させても, 極大吸収波長がメタノール中のものほとんど変わらないことから, シリカゲルの影響は小さいものと思われ, マイクロビーズでの 1 の ϵ_{547} はメタノール中の値を用いた。また, A を 2 の中心線で測定した場合, 光路長は 2 の粒径 (b / cm) と同じになることから, A は式(9) で表され, 更に式(9) は C_2 を表す式(10) に変換できる。

$$A = b\epsilon_{547}C_2 \quad (9)$$

$$C_2 = A / (b\epsilon_{547}) \quad (10)$$

Table 3 CLSM-analysis of **2**

2	$C_1^{m a)}/$ mmol dm^{-3}	$A^{b)}$	$b^{c)}/\mu\text{m}$	$A/b/\text{cm}^{-1}$	$C_2^{d)}/$ mmol dm^{-3}	$C_2^{av e)}/$ mmol dm^{-3}	STD ^{f)}
2a (0.1)	0.73	0.071	46.8	15.2	0.71	0.78	(0.13)
		0.072	45.2	15.9	0.74		
		0.074	51.2	14.5	0.68		
		0.084	51.5	16.3	0.76		
		0.104	48.0	21.7	1.01		
2a (0.2)	1.44	0.125	49.3	25.3	1.16	1.56	(0.54)
		0.149	54.0	27.6	1.29		
		0.150	49.4	30.3	1.42		
		0.150	49.1	30.5	1.43		
		0.271	50.3	53.9	2.52		
2a (0.3)	2.16	0.213	50.3	42.3	1.98	2.27	(0.24)
		0.229	50.8	45.1	2.11		
		0.261	53.7	48.5	2.27		
		0.273	50.3	54.3	2.54		
		0.276	52.2	52.9	2.47		
2a (0.4)	2.85	0.231	46.7	49.4	2.31	2.75	(0.45)
		0.238	51.0	46.6	2.18		
		0.281	46.6	60.6	2.82		
		0.322	55.6	65.6	3.07		
		0.396	55.0	72.0	3.36		
2a (0.5)	3.59	0.328	51.6	63.6	2.97	3.39	(0.73)
		0.333	51.9	64.1	3.00		
		0.352	52.2	67.4	3.15		
		0.371	55.2	67.2	3.14		
		0.402	40.0	100.5	4.70		
2b (0.1)	0.70	0.161	156.7	10.3	0.48	0.66	(0.16)
		0.194	164.3	11.8	0.55		
		0.219	160.4	13.7	0.64		
		0.249	161.9	15.4	0.72		
		0.308	154.6	19.9	0.93		
2b (0.2)	1.41	0.380	149.8	25.4	1.19	1.34	(0.11)
		0.428	163.1	26.2	1.23		
		0.484	167.7	28.9	1.35		
		0.507	159.4	31.8	1.49		
		0.509	167.1	30.5	1.42		
2b (0.3)	2.11	0.606	141.8	42.7	2.00	2.14	(0.18)
		0.691	157.1	44.0	2.06		
		0.693	164.4	42.2	1.97		
		0.751	158.0	47.5	2.22		
		0.776	148.2	52.4	2.45		
2b (0.4)	2.82	0.813	169.4	48.0	2.24	2.49	(0.33)
		0.829	163.1	50.8	2.38		
		0.832	168.5	49.4	2.31		
		0.834	159.1	52.4	2.45		
		1.031	152.8	67.5	3.15		
2b (0.5)	3.52	0.909	147.0	61.8	2.89	2.78	(0.14)
		0.911	158.9	57.3	2.68		
		0.912	150.9	60.4	2.82		
		0.916	165.0	55.5	2.59		
		0.943	148.7	63.4	2.96		

a) Concentration (C_1^m) of **1** in the prepared **2**; b) Absorbances (A) were determined at 551 nm by CLSM; c) Diameter (b) of microbeads measured by CLSM; d) Concentration of **1** (C_2) was determined by CLSM according to eq. 10; e) Average of C_2 (C_2^{av}); f) Standard deviation (STD) = $[(n\Sigma C_2^2 - (\Sigma C_2)^2)/n(n-1)]^{1/2}$; $n = 5$

顕微吸光度分析は次のように行った。CLSMのステージに置いたスライドガラス上に数十個の**2**を置き、その上にカバーガラスを乗せて固定した (Fig. 2)。同時に、スライドガラス上に**1**を固定化していない同じ粒径のSiO₂数

個を置き、吸光度分析の空試験値として用いた。無作為に5個の**2**を選んで、ステージを移動させて顕微鏡の視野の中心に**2**の中心線が来るようにした。吸収スペクトルを500~650 nmの範囲で測定し、**2**の極大吸収波長の547

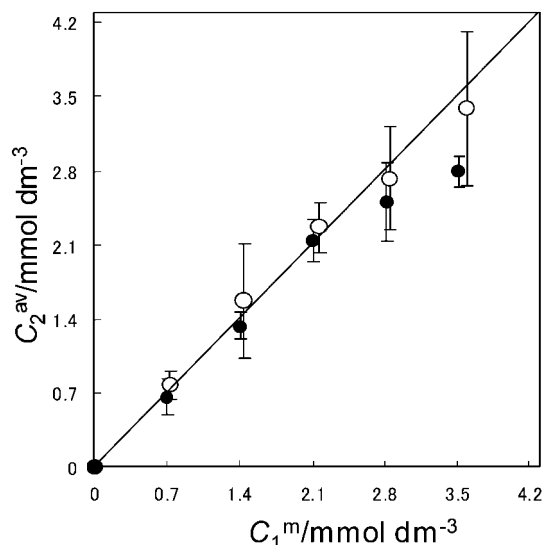


Fig. 5 Plots of C_2^{av} vs. C_1^{m} for **2a** (○) and **2b** (●). Slope = 0.979 ($r^2 = 0.991$) for **2a** and 0.936 ($r^2 = 0.990$) for **2b**. Straight line showed the $C_2^{\text{av}} = C_1^{\text{m}}$.

nm における A を測定した. 例として **2b**(0.2) の吸収スペクトルを Fig. 3 に示す.

3.3 顕微吸光度分析の分析範囲と精度

分析範囲を検討するために, **2a-b** の顕微吸光度分析によって求めた A の値を C_1^{m} に対してプロットを行った (Fig. 4). b に分布があるために各 C_1^{m} における A の値にはばらつきが見られるが, **2a** の場合, A は全体的に C_1^{m} に対して良好な直線関係を示している. 一方, **2b** では C_1^{m} が 3.5 mmol dm^{-3} の点において A が頭打ちになっている. これらのことから, 顕微吸光度分析は, A が C_1^{m} に対して比例関係にある約 0.8 以下で行うことが求められる.

2a-b の顕微吸光度分析から求めたモル濃度 (C_2), 5 つの C_2 を平均した平均モル濃度 (C_2^{av}), 及び標準偏差 (STD) を Table 3 に示す. 次に, C_2^{av} と C_1^{m} の同等性を検証するために, C_2^{av} を C_1^{m} に対してプロットを行った (Fig. 5). **2a** の場合, 相関係数 (r^2) 0.991 で良好な直線関係が得られ, その傾きが 0.979 であった. **2b** の場合は, 直線からずれた **2b** (0.5) の点を除いた 4 点の直線の傾き

Table 4 Absorption spectrophotometry in micro-region using CLSM^{a)}

Spectral range	488 ~ 775 nm
Range of diameter (b) of beads	4.9 ~ 352 μm
Area of measurement (d)	2.14 μm
Maximum of absorbance (A)	0.8
Accuracy ^{a)}	0.11 ~ 0.73

a) Measurement conditions—the magnifications of objective lens (x): 40, the diameter of fiber core (f): 100 μm , the diameter of pinhole (h): 300 μm , light source : halogen lamp ; b) Standard deviation (STD) of Fig. 5

は 0.936 ($r^2 = 0.990$) であった. これらのことから C_2^{av} は C_1^{m} にほぼ等しいことを示しており, 標準偏差 0.11 ~ 0.73 の精度で **2** 中の **1** の定量分析ができることを示している.

4 結 言

Table 4 に示す顕微吸光度分析の分析条件及び適応範囲から, CLSM を用いた顕微吸光度分析は数十から数百ミクロン程度までの光透過性の微小材料中の成分濃度を定量するために有効な方法であることを示している. マイクロビーズは有機合成における触媒, 吸着剤, 固相合成のための担体, バイオセンサーなどに活用されており⁷⁾, 本法は, この分野の研究への貢献が期待される.

文 献

- 1) 保田昌秀, 白上 努, 松本 仁: 光化学, **38**, 9 (2007).
- 2) E. Pere, H. Cardy, O. Cairon, M. Simon, S. Lacombe : *Vibrational Spectroscopy*, **25**, 163 (2001).
- 3) H. Yamasaki, S. Hirayama, M. Okamoto : *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.*, **51**, 237 (1990).
- 4) J. Matsumoto, T. Fuchikawa, Y. Komiya, Y. Fueda, T. Matsumoto, T. Shiragami, M. Yasuda : *Chem. Lett.*, **34**, 1484 (2005).
- 5) J. Matsumoto, T. Matsumoto, Y. Senda, T. Shiragami, M. Yasuda : *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.*, **197**, 101 (2008).
- 6) Y. Andou, T. Shiragami, K. Shima, M. Yasuda : *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.*, **147**, 191 (2002).
- 7) F. Z. Dorwald : “*Organic Synthesis on Solid Phase : Supports, Linkers, Reactions*”, 2nd ed., (2002), (Wiley-VCH, Weinheim, New York).

Microscopic Spectrophotometry Using Confocal Laser Scanning Microscope

Tomoko MATSUMOTO¹, Ryuichi SHIRAKI², Jin MATSUMOTO²,
Tsutomu SHIRAGAMI² and Masahide YASUDA²

¹ Technical Center Faculty of Engineering, University of Miyazaki, Gakuen-Kibanadai, Miyazaki-shi, Miyazaki 889-2192

² Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, University of Miyazaki, Gakuen-Kibanadai, Miyazaki-shi, Miyazaki 889-2192

(Received 17 April 2008, Accepted 3 August 2008)

In order to elucidate the applicable range and accuracy of absorption spectrophotometry in the micro-region using a confocal laser scanning microscope (CLSM), micro-silica gel beads (**2**) immobilizing a given molar concentration (C_1^m) of dihydroxo(tetraphenylporphyrinato)-antimony(V) bromide (**1**) were prepared. The measurable area on the beads was determined to be a circle of 2.14 μm diameter by magnifications of an objective lens, the diameter of fiber core, and the diameter of a pinhole. Moreover, the range of the diameter of the beads and the spectral range were decided to be 4 μm \sim 350 μm and 488 \sim 775 nm, respectively. Using a halogen lamp as a light source on CLSM, the molar concentrations (C_2) of **1** in **2** were determined by absorption spectrophotometry. The value of C_2 showed good agreement with C_1^m with 0.11 \sim 0.73 of the standard deviation. Thus, absorption spectrophotometry in the micro-region will be a powerful tool for the quantitative analysis of transparent materials of micron-order.

Keywords : absorption spectrophotometry ; confocal laser scanning microscope ; micro-silica gel beads.