

小型分光器と紫外線ライトを用いた簡易蛍光分光測定を試み

高木 秀明

A trial study of a simple fluorescence analysis using a miniature spectrometer and an ultraviolet light

Hideaki TAKAGI

Abstract

A feasibility of simple fluorescence analysis using a miniature spectrometer with 288-pixel number and an ultraviolet light was conducted. General consumers are able to purchase both the spectrometer and the light. To confirm a shape of a spectrum same as previous report the spectra of yellow light emitting diode were measured by the spectrometer. These shapes of the spectra corresponded to those of previous reports in that the pixel number of the spectrometer was 2048 and about one-tenth pixel number has little influence of the shape of the spectrum. To prepared fluorescent samples were painted on an individual filter papers with yellow and pink highlighters. These painted areas faced to measuring window of the miniature spectrometer. Ultraviolet light was irradiated to backsides of these painted areas and the fluorescent spectra were obtained, respectively. These results suggest that the equipment of this work is feasible simple method of fluorescence analysis by selecting an applicable light source for excitation.

Key words : miniature spectrometer, ultraviolet light, fluorescence spectroscopy, fluorescent marking pen (highlighter)

キーワード : 小型分光器, 紫外線ライト, 蛍光分光測定, 蛍光ラインマーカー

1. はじめに

著者は、これまで紫外線から近赤外線領域を分光測定する装置の実践研究を行ってきた^{1), 2)}。従来から普及している研究室据置型タイプの分光光度計とは異なり、研究室を離れて測定現場にて分析が行えるタイプの分光光度計を中心に実践研究を行ってきた。これらの研究では、専門家向けあるいは半導体メーカーから提供される評価用キットを対象としており、価格の面では高価な機器であった。ここ数年フィジカルコンピューティングやIoT (Internet of Things) の普及、スマートフォンなどのカメラを顕微鏡として使うなど従来の自然科学的な研究の一部を容易に行えるようになってきている。分光測定においてもデジタルカメラで取得した画像のRGBの各プロファイルを適切に処理すれば簡易ではあるがスペクトル様の情報が得られる。

本研究で実践研究調査を行った手のひらにのる大きさの小型分光器カラーコンパスPCFには、マイクロ分光器と呼ばれる分光・検出部分が内蔵されている。浜松ホトニクス社が開発したもので、回折格子(グレーティング)とスリット付きCMOSイメージセンサーを一体化されており、ICのように10個のピンで基板に固定し、各ピンと外部回路との電気的な接続ができるようになってきている。マイクロ分光器からの信号をパーソナルコンピュータで処理できるように電子回路が組みまれ、USB接続でコントロールソフトを介して分光測定と測定結果が表示される。2018年1月に購入したものであるが、現在では赤外カットフィルターや波長別感度補正が付け加えられ、名称がカラーコンパスMFに変更され、電子工作材料の販売会社から3万5千円程度で販売されている³⁾。また、農業センシングと呼ばれる分野で、植物の光環境の計測に用いるために、マイクロ分光器とマイコンArduino MEGAを組み合わせた自作の分光器も紹介されている⁴⁾。

本研究で対象とした分光測定は、試料に紫外線から

可視光領域の特定の波長の光を照射する(励起する)と可視光を発する蛍光現象を測定する方法である。励起光の波長と蛍光の波長から試料に含まれる蛍光を発する物質を推定することが可能である。励起光は、単色光が必要となるが、紫外線から可視光領域にかけての発光ダイオードが市販されるようにもなり、また、ライトとしても販売されているので、紫外線防護などの取り扱いに気をつけながら簡便に蛍光測定ができるようになってきている。

本研究の目的は、蛍光現象を励起光の試料への照射方法を工夫し、小型分光器で検出可能かを検討することである。

2. 研究方法

(1) 使用機器

黄色発光ダイオードをモデル光源としてスペクトル測定するために既報¹⁾と同じ電子部品を使用して発光ダイオードを点灯し、同じ方法で測定した。紫外-可視スペクトル測定は、カラーコンパスPCF(株式会社ATシステム)を用いた。PCFには、ミニ分光器マイクロシリーズC12880MA(浜松ホトニクス株式会社)が内蔵されており、PCFとWindows搭載のパソコンとをUSBケーブルで接続することで付属のコントロールソフトを介して分光測定ができるようになっている。コントロールソフトにて取得できる情報は、縦軸の検出器への入射光量のA/D変換値(分解能12bit)(光子数のカウント値ではない。)^{注1)}。また、横軸の波長は、素子毎に検査成績書により供給された波長変換係数を用いて波長1nm毎に変換されている⁵⁾。したがってデータの個数は340~850nmの区間に1nm毎に511個ある。PCFと接続したパーソナルコンピュータは、Boot Camp上にWindows10 ProをインストールしたMac book Air 11インチを用いた。PCFにはC12880MAの測光部に光を導くための窓穴が開けられている。蛍光ラインマーカの彩色部分から蛍光を発生させる紫外線ライトは、パワーUV-LEDブラック

ライトペンタイプPW-UV141P-01（波長375nm, アズワン株式会社）を用いた。

(2) 黄色発光ダイオードの発光スペクトル測定

黄色発光ダイオードのスペクトル波形を確認するために、既報¹⁾と同様にろ紙を用いて拡散光を生成し、ろ紙の上にPCFの測定窓を伏せる形で測定を行った。点灯していない状態で測定し、これを暗出力とした。コントロールソフトには、暗出力を記憶しておき、暗出力を差し引く（ダークを引く）処理が搭載されているが、今回は、差し引かずに測定を行った。発光ダイオードを点灯し、ろ紙1枚をのせて拡散光を測定し、さらにもう1枚重ね2枚とし、減光した状態でのスペクトル測定を行った。

(3) 蛍光ラインマーカーの蛍光スペクトル測定

蛍光ラインマーカーから発生する蛍光をPCFを用いてスペクトル測定を行った。黄色蛍光ラインマーカーはトンボWA-TC91（水性・顔料）、ピンク色蛍光ラインマーカーはコクヨPM-L202P（水性・顔料）を用いて、ろ紙にそれぞれ彩色した。彩色した面積は、直径3mmであるPCFの測定穴より十分広い10mm×10mmであった。PCFの測定穴の上に彩色したろ紙を彩色側をPCF側に向けて置き、その彩色部分の裏面から紫外線ライトを照射した。ろ紙とライトとの距離は固定せず、コントロールソフト上でリアルタイムに計測され表示されるパソコンの画面を介して、観察した。観測光が飽和しないよう、ライトをろ紙に近づけたり、遠ざけたりしながら測定をし、データファイルとして保存・記録した。なお、測定環境は、暗室とせず研究室での日常の照度下で測定を行った。

3. 結果と考察

(1) 黄色発光ダイオードの発光スペクトル測定

発光ダイオードの光をろ紙を用いて拡散し、ろ紙越しに発光スペクトルを測定した。拡散させる理由は、

光量の調整と既報¹⁾にも述べたように紙面からの蛍光発生モデルとするためである。

発光ダイオードを点灯する前にろ紙をPCFの測定窓を伏せて、暗出力を測定した。図1における340～850nmにわたる暗出力の平均値は、849.94であった。最大値は、873.5、最小値は、827.5であった。

発光ダイオードを点灯し、ろ紙1枚をPCFと発光ダイオードの間に置いたときのスペクトルは、図2、2枚置いたときのスペクトルは、図3である。ともに既報と波長範囲を合わせるために極大波長付近の550～650nmを散布図グラフにしている。また、589～593nmのA/D変換値を表1に示している。枚数が増えると光量が減少するため、縦軸のA/D変換値は、ろ紙1枚よりも2枚のほうが小さくなっている。ともに、591nmに極大波長が現れた。既報では、594.4nmとなっているが、極大波長は概ね一致していると考えている。スペクトルの形状は、ろ紙2枚時のようにA/D変換値が小さい時には、より大きい1枚の時と比べると滑らかさが下がっている。

既報と比べると分光器の画素数が2048素子（検出可能波長領域179.506～869.647nm）から288素子（同340～850nm）と14分の1に減少しているが、波長-A/D変換値のデータは、2048個から511個と4分の1となっている。そのため、極大波長付近では、測定点を結ぶ間隔が広がっているが波形の確認に支障はない。最大のA/D変換値4095を超えない最大光量で検出するのが良い方法であるとされている⁶⁾。1枚と2

表1 黄色発光ダイオードの発光スペクトルの波長とA/D変換値

波長 / nm	暗出力	ろ紙1枚	ろ紙2枚
589	840.2	2634.8	1716.6
590	846.1	2692.4	1744.1
591	851.9	2750.0	1771.5
592	855.6	2728.4	1757.4
593	859.2	2705.3	1742.5

枚の比較を行うために露光時間を統一して測定を行ったが、露光時間を長くすることで光量を増加させることができる。

(2) 蛍光ラインマーカの蛍光スペクトル測定

紫外から可視光線領域のスペクトル測定においてインクや絵具、塗料などで彩色された表面の反射光測定や色を持った溶液や透明な固体の透過光測定、照明やLEDなどの光源の発光スペクトル測定においては十分な性能があることが技術資料からわかる。より微弱な発光スペクトルが測定可能であるかを検討するため、文具として販売されている黄色とピンク色の蛍光ラインマーカでろ紙の表面を塗った。ろ紙を裏返しにしてPCFの測定窓の部分に彩色部分が来るように調整した。ろ紙彩色面の裏側から紫外線ライトを照射し、蛍光スペクトルの測定が可能であるかを検討した。

1) 蛍光ラインマーカを塗っていない場所の測定

紫外線ライトの光がろ紙越しにどのようにして分光器に到達するか、また、ろ紙からの蛍光がないかを確認する測定を行った。図4に示すように376nmに極大値をもつことがわかる。また、450～850nmの領域においては光を放出していないと言える。ろ紙を用いて適切な蛍光測定が行えると判断した^{注2)}。

2) 黄色蛍光ラインマーカ彩色面の蛍光測定

ろ紙の裏側から紫外線ライトを照射すると目視で蛍光を発していることが確認できるほど強い蛍光が確認できた。

紫外線ライトの376nmの光量と蛍光極大の関係を確認するために、紫外線ライトをろ紙に近づけたり遠ざけたりしながら376nmの光量のA/D変換値が4000を超える場合の蛍光スペクトルと超えていない場合の蛍光スペクトルを測定した。図5は、4000を超える場合で、図6は超えていないA/D変換値が3277場合である。ともに518～519nmに極大値、A/D変換値1899.1、1620を示している。ただし、図5のスペクトル

においては極大値が512nm (A/D変換値1905.8) にもある。519nmにかけてA/D変換値が極端に下降していないため、暗出力の一時的な増大によるものと考えており、スペクトルの形状の判断から519nmに極大があるものと推定している。

これらの二つのスペクトルにおいて紫外線ライトに起因するA/D変換値の大小は、ろ紙にライトを近づけたり、遠ざけたりした結果によるものである。紫外線ライトのA/D変換値が大きくなれば、518～519nmの極大値も大きくなる。

3) ピンク色蛍光ラインマーカ彩色面の蛍光測定

黄色蛍光ラインマーカと同じくろ紙の裏側から紫外線ライトを照射すると目視で蛍光を発していることが確認できた。

黄色蛍光ラインマーカと同じように紫外線ライトをろ紙に近づけたり遠ざけたりしながらこのライトに由来する376nmのA/D変換値が4000を超えたところで測定をし(図7)、さらに3770付近で測定をした(図8)。

ともに598nmに極大値をもち図7ではA/D変換値が2156.4、図8では、1275.8である。

4) 発光ダイオードの発光スペクトル測定と蛍光ラインマーカの蛍光スペクトル測定の比較

発光ダイオードのスペクトル形状は、一般的に極大波長の垂線に対して線対称の形状である。今回の測定では、ほぼ、対称のスペクトル形状が得られた。一方、溶液または固体表面から発生する蛍光スペクトルを測定した場合、対称になるとは限らず、形状については言及されないことが多い。蛍光ラインマーカの蛍光スペクトルについても測定した形状と検出器の性能を結びつけることは困難である。

これらの測定から、蛍光現象を測定することが可能であると言え、さらに定量的に測定を取り扱うには、光源の選択や試料を適切に固定、再現性のある測定を行うための試料室の設置、波長毎に分光感度特性の補正^{注3)}、^{注4)} などが必要となってくる。

4. まとめ

カラーコンパスPCFを用いて蛍光現象のスペクトル測定が可能かを検討するために、黄色発光ダイオードの発光スペクトルを測定し波形を確認することと、蛍光ラインマーカを塗った部分に紫外線ライトを照射し、発生する蛍光のスペクトル測定を行った。

ろ紙と黄色発光ダイオードを用いてスペクトルの形状を検討した結果、ろ紙1枚から2枚にすると、極大波長(591nm)は変化せず、光量を表すA/D変換値が2750.0から1771.5と減少したが、形状は変化しなかった。

黄色とピンク色の蛍光ラインマーカをろ紙に塗り、塗った部分をPCFの測定窓の方に向け裏側から極大波長が376nmの紫外線ライトを照射し、蛍光測定を行った。黄色の蛍光ラインマーカを塗った部分は、518～519nmに極大値、ピンク色の蛍光ラインマーカを塗った部分は、598nmに極大値を持つスペクトルがそれぞれ得られた。

これらの結果、今回の測定条件下では、蛍光スペクトルの測定が可能であることがわかり、対象試料に応じて適切な励起光を選択することで簡易な蛍光スペクトル測定を行える可能性があると思われる。

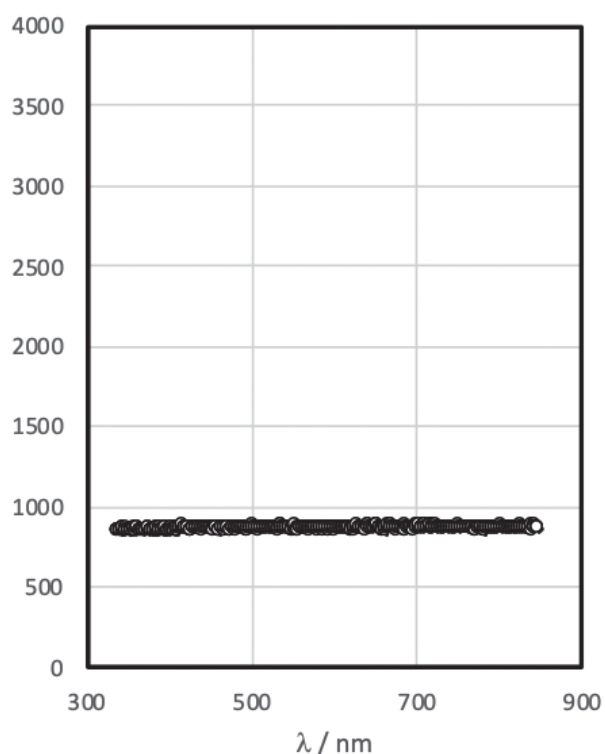


図1 発光ダイオードが点灯していない状態のスペクトル (暗出力)

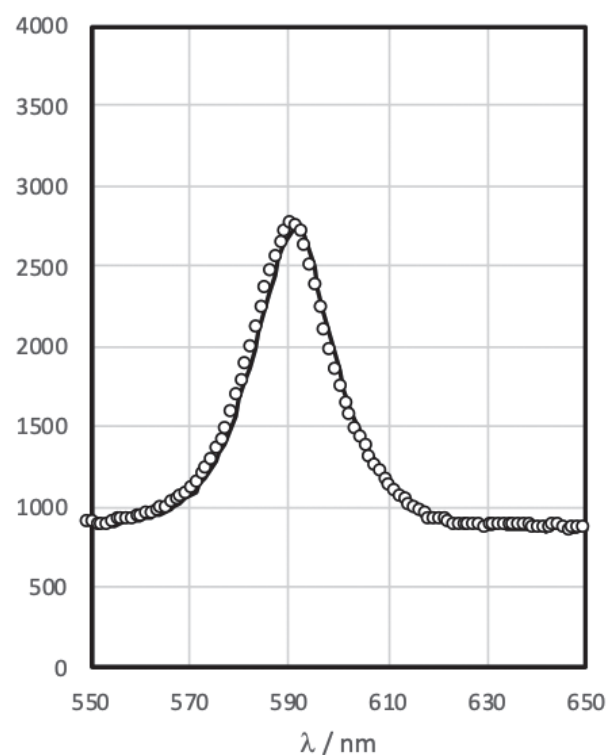


図2 点灯した発光ダイオードのスペクトル (ろ紙1枚)

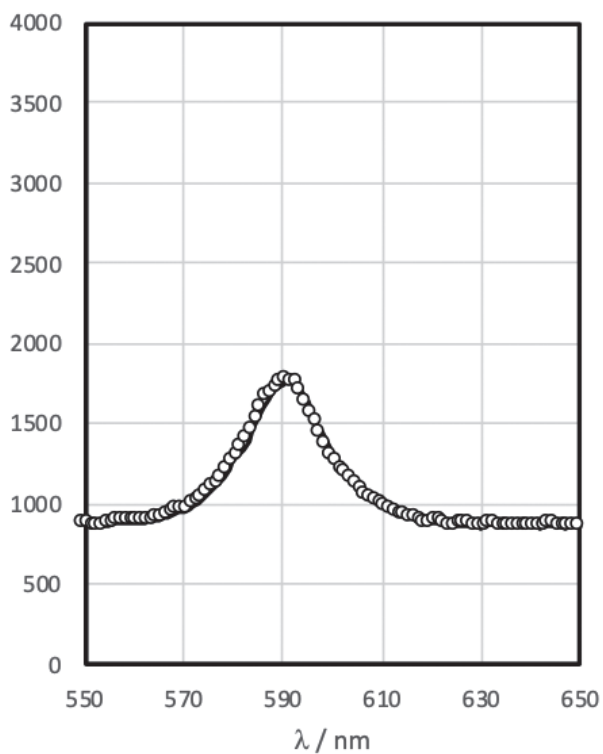


図3 点灯した発光ダイオードのスペクトル (ろ紙2枚)

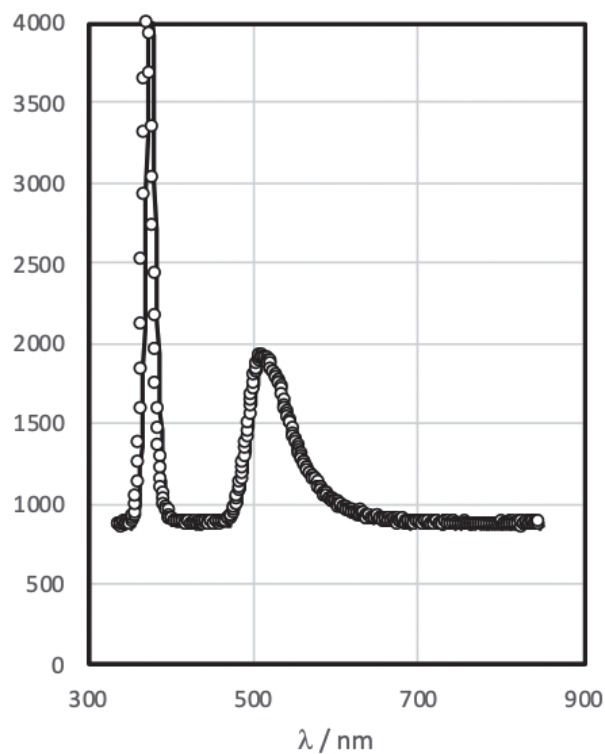


図5 黄色蛍光ラインマーカのスペクトル (紫外光量多)

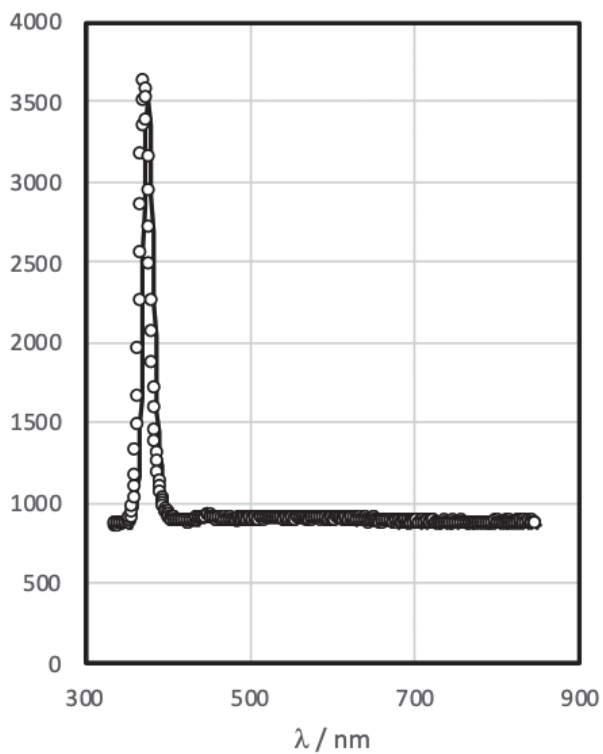


図4 蛍光ラインマーカを塗っていない場所のスペクトル

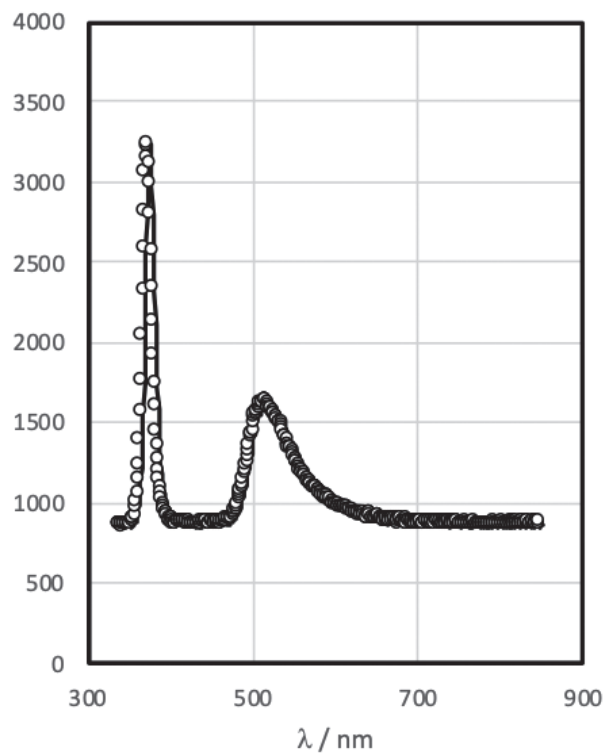


図6 黄色蛍光ラインマーカのスペクトル (紫外光量少)

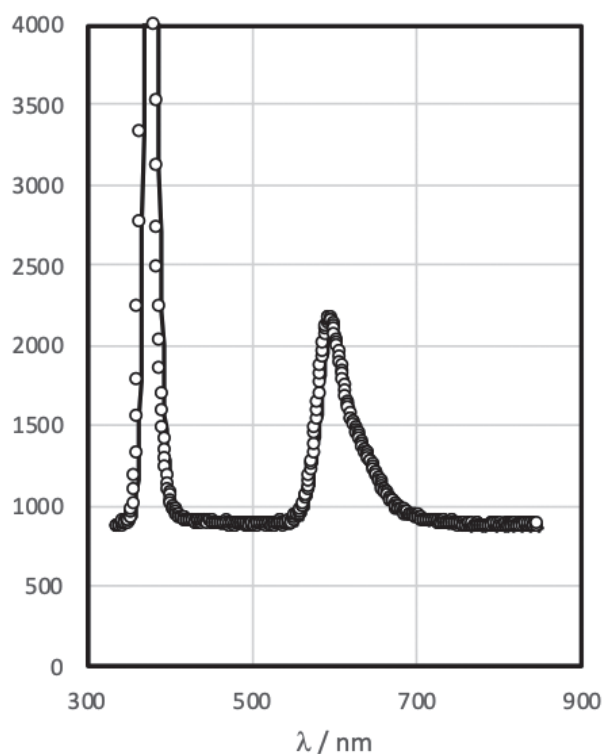


図7 ピンク色蛍光ラインマーカのスペクトル（紫外光量多）

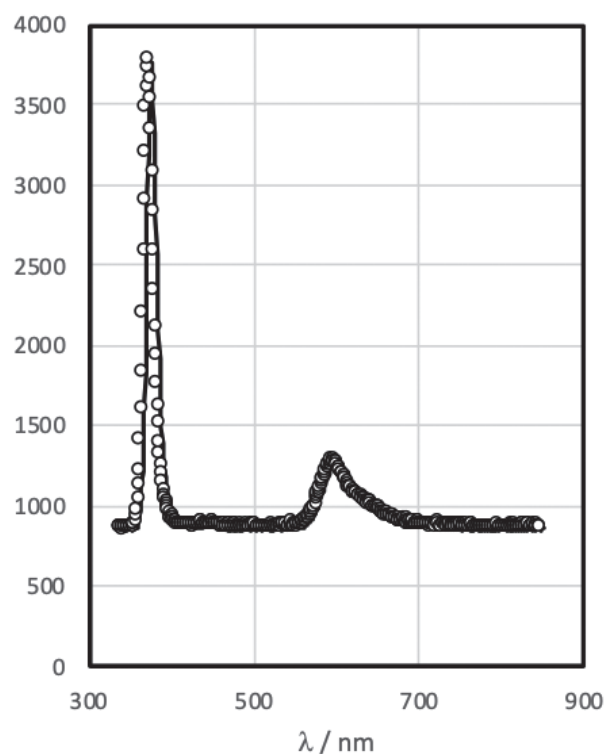


図8 ピンク色蛍光ラインマーカのスペクトル（紫外光量少）

注

- 注1) ミニ分光器マイクロシリーズC12880MAにはスリット付高感度CMOSリニアイメージセンサが搭載されており、センサで検出した素子毎の光量をビデオ信号として電圧で出力される。ビデオ信号は、アナログ値であるため、A/D変換器によってデジタル値に処理されている。
- 注2) 紫外-可視-近赤外領域の蛍光測定を行うためには、励起光の波長による光量差の補正と検出器の波長による光量差の補正が必要となる。蛍光測定では、光子の数を直接計測しないといけなため、標準光を測定し、補正しなければならない。一方、反射光測定や透過光測定では、暗出力の差し引きと、参照光測定を行い相対測定（反射率や吸光度測定）ができる。本論文においては簡易測定の可能性を検討することが目的で、そのことに対する適切な蛍光測定という意味である。
- 注3) 波長毎に異なる分光感度特性は、次の二つの要因が重なったものである。1) 分光器には、刻線のある回折格子が搭載されている。光を波長毎に分光する光学素子であり、刻線で起こる反射光の強度が波長毎に異なる。2) 光を検出するCCDやCMOSイメージセンサは、波長毎に感度特性が異なる。これらは暗出力の補正だけでは補正できないため、特定の波長毎に光量が明示された標準光測定を行う必要がある。ただし、透過光測定や反射光測定の場合は、暗出力の他にブランク測定（透過率100%）、白色板（反射率100%）として補正することができる。
- 注4) 現在市販されているATシステム社のカラーコンパスMFは、同社保有の標準光源で補正されている³⁾。

参考文献

- 1) 高木秀明著「光ファイバー分光器を用いたマイクロレンズアレイを通過した可視光線のスペクトル測定」, 吉備国際大学研究紀要 医療・自然科学系, 第30号, 45-51, 2020年.

- 2) 高木秀明著「近赤外線分光法を活用した文化財の素材分析の試み－評価用分光装置の使用を通して」, 吉備国際大学研究紀要 医療・自然科学系, 第28号, 17-23, 2018年.
- 3) (a) ATシステム株式会社のカラーコンパスMFの紹介ページ, <https://colorcompass.net/colorcompass>, 2021年1月2日閲覧. (b) 秋月電子通商株式会社カラーコンパスMFの紹介・通信販売のページ, <https://akizukidenshi.com/catalog/g/gM-13597/>, 2021年1月2日閲覧.
- 4) (a) 星岳彦著「農業センシングの世界－その12測るもの：光のスペクトル（分光分布） 道具：マイクロ分光器」, インターフェース, 2019年9月号, 10-14, 2019年. (b) 星岳彦著「農業センシングの世界－その13測るもの：光環境や光源 道具：マイクロ分光器」, インターフェース, 2019年10月号, 14-15, 2019年. (c) 星岳彦著「農業センシングの世界－その14測るもの：光環境や光源 道具：マイクロ分光器」, インターフェース, 2019年11月号, 12-13, 2019年. (d) 星岳彦著「農業センシングの世界－その15測るもの：栽培環境の光質 道具：自作マイクロ分光器ALBunko」, インターフェース, 2019年12月号, 12-13, 2019年. (e) 星岳彦著「農業センシングの世界－その16測るもの：葉の分光特性 道具：自作マイクロ分光器ALBunko」, インターフェース, 2020年1月号, 12-13, 2020年.
- 5) カラーコンパスPCF取扱説明書.
- 6) 浜松ホトニクスミニ分光器マイクロシリーズC12880MAデータシート, https://www.hamamatsu.com/resources/pdf/ssd/c12880ma_kacc1226j.pdf, 2020年12月25日閲覧.