

小型分光器を用いた蛍光分光測定方法の検討

高木 秀明

An examination of spectrofluorometric measurements using miniature spectrometers

Hideaki TAKAGI

Abstract

A feasibility study for fluorescence spectroscopy using miniature analyzers combined ultraviolet LED light (UV-LED) or ultraviolet fluorescent lamp (UVFL) underwent. These two analyzers were a spectrometer with 2048-pixel CCD (FLAME) and a miniature spectrometer with 288-pixel (PCF). Firstly, a piece of filter paper was painted Arabia glue to fix a sample such as green powdered tea or green tea leaves and the painted area was confirmed not to generate fluorescence on that of paper by irradiation of UV-LED. No spectra of both the powdered tea and tea leaves were obtained using UVFL as the excitation light source. The light power of the UVFL is low and insufficient excitation for fluorescence. The measurements using FLAME with UV-LED as the excitation light source were obtained fluorescence spectra of both powdered tea and tea leaves and those of peak wavelength were corresponded to reported values. These results suggested the combined system was useful for miniature analysis and educational experiments. In the case of PCF, the only a spectrum of tea leaves was obtained and that of peak wavelength was not corresponded reported values. The case of the analysis is further improvements such as a suitable light source and/or a method for collection of fluorescence.

Key words : miniature spectrometer, ultraviolet LED light, fluorescence spectroscopy, green powdered tea, green tea leaves

キーワード : 小型分光器, 紫外線LEDライト, 蛍光スペクトル, 抹茶粉末, 煎茶茶葉

1. はじめに

著者は、前号にて、小型分光器の実践研究の報告をした。紫外-可視光領域のスペクトル測定装置においては、CCDやCMOSイメージセンサがデジタルカメラなどの普及により、比較的安価な分光器が生産されるようになってきている。研究室据え置き型のような高い分解能や短い測定時間のような高いスペックではないが、小型・軽量・安価な点では、フィールド分析や定点分析など分析機器の数が必要な場面でその特徴を発揮するものと期待される。

前号では、回折格子と検出器が内蔵されたマイクロ分光器にパーソナルコンピュータにUSB接続をできるように信号処理部分を備えたマイクロ分光器カラーコンパスPCF（以降PCFと呼ぶ。）と紫外線発光ダイオードを光源とする紫外線ライトを組み合わせた簡易蛍光分光測定の試みを報告した。紫外線から可視光線の領域の単色光を試料に照射し、試料から発生する可視光線領域の蛍光を検出することで、特定の分子種を検出することができる。肉眼やカラーの画像だけではなく、分光測定することで、さらに精査することもできる¹⁾。

今回、中学校理科から高等学校生物・化学などで話題になる葉緑素^{注1)}の実験のうち、日本茶の抽出物の蛍光測定を試みることにした。著者は、過去に煎茶をアセトンで抽出し、抽出液に紫外線蛍光管ランプを照射するとオレンジ色に変化したことを経験した。

また、前述の紫外線発光ダイオードの光を煎茶の茶葉に照射すると照射部位が赤色に変化することも経験した。しかし、紫外線蛍光管ランプではこの現象は起こらなかった。抹茶の粉末では両者の方法ともこの現象は起こらなかった。そこで、肉眼ではなく、これらの現象を蛍光分光測定することにした。使用する分光器は、小型マルチチャンネル分光器FLAME-S-UV-VIS-ES（以降FLAMEと呼ぶ。）とPCFである。なお本体価格は、前者は、後者のおよそ10倍となる。後者

の価格帯で、試料の固定方法なども含め、専門・非専門を問わず幅広い層に普及できるような分析方法の構築も検討することとしている。

2. 研究方法

(1) 測定装置と分析に関連する材料、モデル試料

紫外-可視光領域のスペクトル測定は、1) 小型マルチチャンネル分光器FLAME-S-UV-VIS-ES（オーシャンオプティクス社）にコア径400mmの光ファイバーを用いた反射プローブR400-7-SR（同社）を接続し、測定部分を暗室にするために反射プローブホルダーRPH-1（同社）を使用した。試料の上に石英板を置き、その上にRPH-1を置いて測定した。2) マイクロ分光器カラーコンパスPCF（株式会社ATシステム）の測定窓に石英板を置いて試料を載せて測定した。1) 2) とともに分光器の制御には、1) はMac book Air 11インチ、2) はHP ENVY Sleekbook 4を用い、USB端子を介してそれぞれの制御ソフト下で測定をおこなった。

蛍光測定のために2種類の励起光源、パワーUV-LEDブラックライトペンタイプPW-UV141P-01（波長375nm、アズワン社）、紫外線ランプ広帯域タイプPU-21（トプコン）をそれぞれ用いた。

測定を補助するために、石英板50×50×1mm（アズワン4-2649-02）、ADVANTEC東洋ろ紙2番（直径90mm）（アドバンテック東洋）、試料を固定するためにアラビアのりは、液状のりアラビックヤマト（ヤマト）を用いた。

モデル試料は、固体の状態で蛍光測定を行うことを想定し、抹茶、煎茶（日本茶）の茶葉を用いた。

(2) 試料の固定

抹茶あるいは茶葉をそれぞれろ紙に固定するために、アラビアのりをろ紙の上に塗り、すぐに抹茶あるいは茶葉をふりかけ、一晚以上置いた。そして、固定されなかった抹茶や茶葉をろ紙を裏返しにして取り除

いた。

3. 結果と考察

FLAMEは、波長分解能に関係するピクセル数が2048のCCD素子を搭載している。公称の測定波長範囲は200～850nm、S/N比はフルシグナルで250：1、ダイナミックレンジはシステムで 8.5×10^7 である。

PCFは、測定波長範囲が、340～850nmで288画素のCMOSイメージセンサをもつC12880MA（浜松フotonix社製）センサが搭載されている。C12880MAの入射可能な光量は、同社の評価回路を用いて、センサへの波長600nmの光を入射光のスポット径が600 μ mで入射した場合、 $10^{-13.5} \sim 10^{-6}$ Wである²⁾。

励起光源として、パワーUV-LEDブラックライトペンタイプ（以下UV-LEDと呼ぶ。）と紫外線ランプ広帯域タイプ（以下紫外線ランプと呼ぶ。）を用いた。

FLAMEで先駆的な測定可能であるかを評価して、PCFで普及および実現可能性を探索するため、この順序で執筆することとする。いずれも試料として入手可能な日本茶の抹茶や煎茶を採用した。

(1) FLAMEによる測定

通常の反射測定は、光ファイバーの反射測定プローブ^{注2)}をプローブホルダに固定して、試料の上にこのホルダを置くことで、励起光の照射と反射光の測定をおこなう。蛍光測定では、励起光である照射光の反射も測定されてしまうが、単色光に近い光を用いることとその波長が蛍光波長と異なることを利用するため分別が可能である。

また、このプローブホルダには、試料に対して垂直に光を照射し、後方に反射した光を捉えるための試料窓（穴）と試料に対して斜め上方45度に向けた試料窓も用意されている。次の2種類の方法を取ることができる。(i) 45度の試料窓に反射プローブを固定し、もう一つの測定窓から試料に向けて光源を照らし、反射

プローブで蛍光をとらえる方法。(ii) 励起光源を照射用光ファイバーの末端に設置し、励起光を光ファイバー内を通過させて、反射プローブを通じて励起光を試料に照射させ、蛍光をとらえる方法。この場合、反射プローブと試料が接する面よりも7mm（または、5.5mm）内側の位置で固定した。(i)の方法は照射光の反射の影響が(ii)より少ないという利点がある。これらの2種類の方法で試料を変えながら比較した。

いずれの測定における測定条件は、Integration Time 0.1秒、測定回数は1回（平均なし）、スペクトル形状のスムージングなし、検出した光の強度から暗電流を差し引く、方法でおこなった。

1) アラビアのりの測定

粉末試料を固定するために市販のアラビアのりを用いることとし、UV-LED光源を照射した場合の蛍光発生をFLAMEを用いて測定した。UV-LEDは、45度の方向から試料に照射した。反射プローブは垂直に固定し、石英板から7mm上方に末端がある。図1-1がのりを塗布していない紙上に石英板を置いて測定した蛍光スペクトル、図1-2がのりを塗布した部分が乾燥した上に石英板を置いて測定した蛍光スペクトルである。UV-LED光源を照射しても蛍光は観測されなかった。引き続き、UV-LEDを光ファイバーを通じて試料に対して垂直に照射させた。この場合も蛍光は観測されなかった（図1-3はのりが塗布されていない紙上、図1-4はのりを塗布した部分）。

2) 抹茶の測定

ろ紙にアラビアのりで固定した抹茶の粉末の上に石英板を置いて、UV-LEDを照射して蛍光測定をおこなった。UV-LEDを45度の方向から試料に照射した。683nm付近に蛍光とみられる光が検出された（図2-1）。次に反射プローブを垂直に固定し、石英板から7mm上方に末端がある状態にして測定した。垂直に照射した場合680nm付近に光が検出された（図2-2）。UV-LEDを光ファイバーを通じて、垂直方向から試料に照射する方法では、バックグラウンドの部分が長

波長になるにつれて、光強度が低下していく傾向にあることから、UV-LEDを45度の方向から照射する方法がより適切であると考えられる。

蛍光測定では、試料中に含まれる蛍光を発する成分の濃度が高い場合は、検出される光の強度が低くなる場合があるため、ろ紙上の抹茶の粉末を少し取り除いて、粒子間に空隙ができるようにした。UV-LEDを45度、垂直の二方向の測定をそれぞれおこなった。絶対的な光の強度の数値で比較することは困難ではあるが、試料濃度の差による強度の変化は見られなかった。

3) 日本茶の煎茶茶葉の測定

粉末の抹茶測定では、UV-LEDを45度方向から照射する方法が最適な方法であったが、粉末のため、照射スポット内で試料均一に光が照射されていると判断した。茶葉は、粉末ではなく、不規則にカットされた葉の部分や茎の部分が試料内に含まれている。そこで照射スポットが一定になるよう、UV-LEDを試料に対して垂直に照射するようにし、反射プローブは45度方向から励起光を妨げないようできる限り試料に近い位置に固定し、測定した。図3-1のスペクトルが得られた。カットされた茶葉が折り重なっているため、一片のみを照射対象として測定した結果が図3-2である。いずれのスペクトルも680nm付近と730nm付近に極大値が認められる。抹茶の粉末測定と同じく、UV-LEDを45度方向から照射し、図3-2と同じ試料状態で測定をおこない得られたスペクトルが図3-3である。この時、反射プローブの先端と石英板の間は5mmである。図3-2と図3-3の比較からUV-LEDを試料に垂直に照射し、反射プローブを45度方向に固定する方法が最適であると判断できる。

クロロフィルを対象にした実験では、励起光の波長は、400～450nmであるが、680nm付近に蛍光極大が観測されている^{3,4)}。緑茶エタノール抽出液の紫外-可視吸収スペクトルにはUV-LEDの極大波長の375nm付近にも吸収帯がある³⁾。UV-LEDを光源として煎茶の茶葉に照射したときに肉眼で照射部分が赤色

になったことを確認できるが、680nmの極大値がこのことを裏付けていると考えている。

(2) PCFによる測定

PCFの測定窓に向けて測定したい光を入射させて測定をおこなうことになるため、測定窓を上向きにしてその上に石英板を置き、試料を置き、その上から励起光を照射する方法をとった。PCFの露光時間は0.5秒、測定回数は1回とした。部屋を暗くし、外光の影響がないことをスペクトルで確認したのち、測定をおこなった。

アラビアのりで抹茶の粉末を固定し、乾燥後、裏返して石英板上に置いたが、UV-LEDの光が測定窓に届かなかった。そこで、抹茶の粉末を石英板の上に散布し、測定窓上方からUV-LEDを照射し、測定をおこなったが蛍光スペクトルは得られなかった。

茶葉を石英板の上、測定窓の上方になるように置いて、茶葉上方からUV-LEDを照射した。図4-1のスペクトルが得られ、622nmに吸収極大が得られた。FLAMEを用いたときと比べ、極大値の波長が約60nm短波長側にある。この差については、PCFとFLAMEの測定結果の差を比較しても大きい（既報¹⁾の黄色LEDのピーク波長、PCFは591nm、FLAMEは594.4nm）ことから、機器間の差ではなく、そのほかの実験条件を検討する必要があると思われる。

(3) 紫外線ランプを光源として測定

紫外線ランプは、薄層クロマトグラフィーのスポットの検出でも用いられる。広帯域タイプのランプでガラス溶液に入れた煎茶のアセトン抽出溶液を照らすと蛍光を発し、肉眼でも蛍光を確認できる。そこで、FLAMEでの測定の励起光源として検討をおこなった。反射プローブを45度方向の測定窓に固定し、試料に垂直に紫外線が照射するよう垂直方向の試料窓から紫外線を照射した。

茶葉を置く前（図5-1）と後（図5-2）ではス

ペクトルにほとんど変化がなく、試料表面には励起に十分な強度の光が届いていないと判断している。

4. まとめ

仕様の異なる2種類の小型分光器（FLAME, PCF）を用いて、抹茶の粉末や煎茶の茶葉の蛍光分光測定を試みた。測定に先立ち試料の固定方法も検討した。分光器のほかに、励起光源を2種類（UV-LED, 紫外線ランプ）比較した。石英板やアラビアのりなどで試料を固定する方法は、蛍光測定に影響を与えず、有効であることが分かった。紫外線ランプは、今回の測定機器と測定方法において励起光としては十分な強度を

持っていないと判断した。UV-LEDとFLAMEの組み合わせでは、抹茶の蛍光スペクトルと茶葉の蛍光スペクトルがそれぞれ得られた。これらの蛍光極大の波長は、クロロフィルを対象としている研究での蛍光スペクトルでの蛍光極大と同じ波長であった。UV-LEDとPCFの組み合わせでは、抹茶では蛍光スペクトルが得られなかったが、茶葉では蛍光スペクトルと断定はできないがスペクトルが得られた。PCFを用いて蛍光スペクトルを得るために、光源を変えて測定する、測定窓を改良して測定するなどの検討が必要であると思われる。

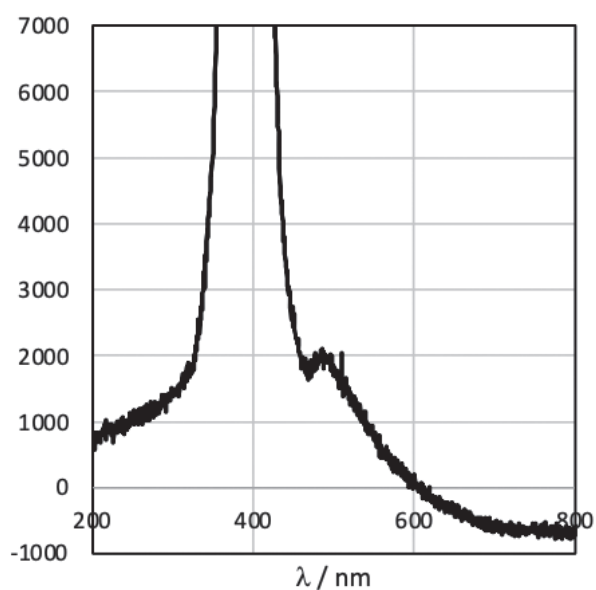


図1-1 アラビアのりを塗布する前のろ紙表面の蛍光スペクトル（UV-LEDは45度方向から照射, FLAME）

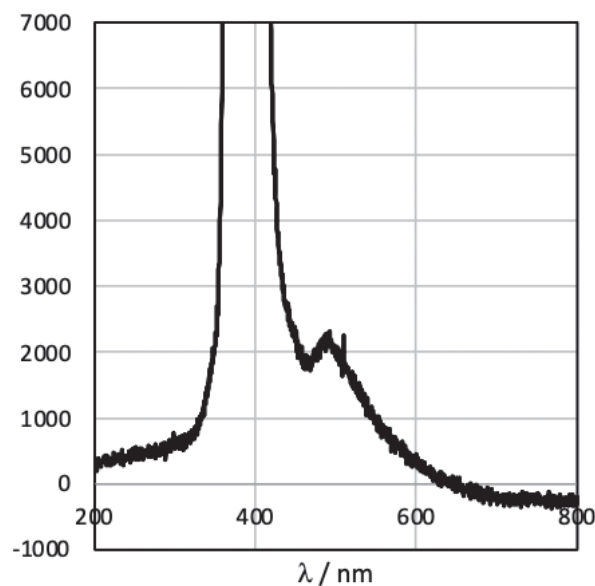


図1-2 アラビアのりを塗布した部分、乾燥後の表面の蛍光スペクトル（UV-LEDは45度方向から照射, FLAME）

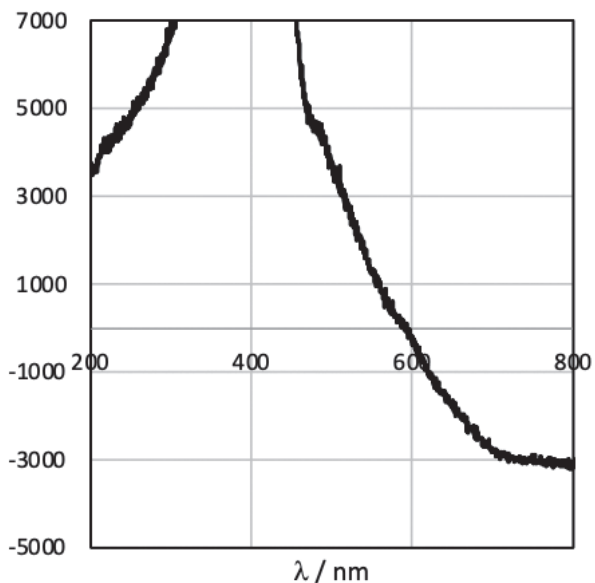


図 1-3 アラビアのりを塗布する前のろ紙表面の蛍光スペクトル (UV-LEDは垂直方向から照射, FLAME)

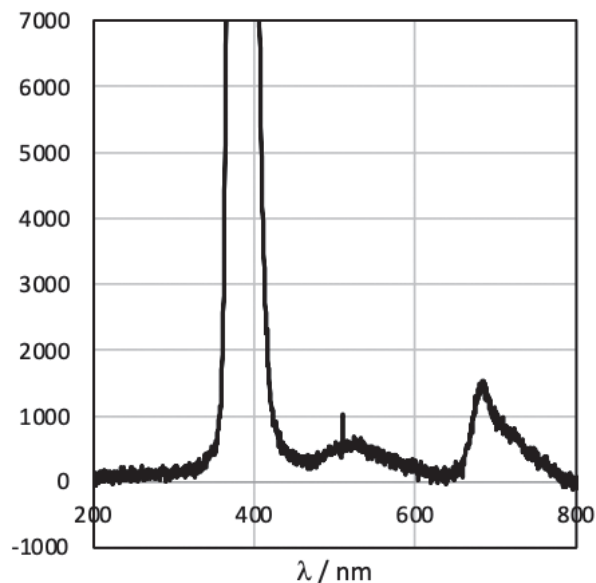


図 2-1 抹茶の粉末の蛍光スペクトル (UV-LEDは45度方向から照射, FLAME)

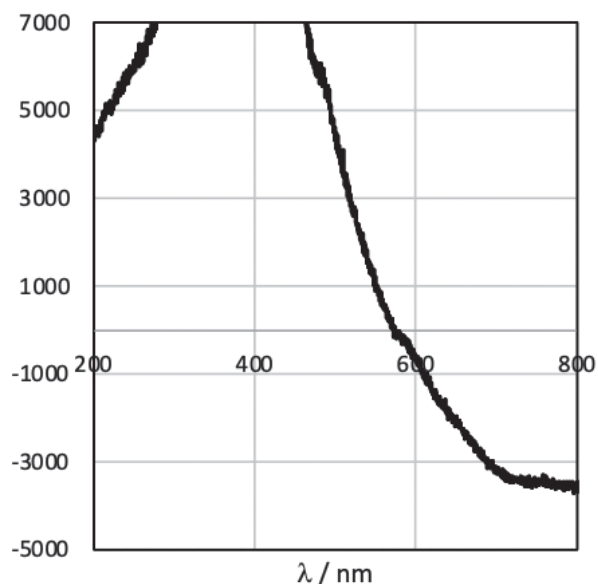


図 1-4 アラビアのりを塗布した部分, 乾燥後の表面の蛍光スペクトル (UV-LEDは垂直方向から照射, FLAME)

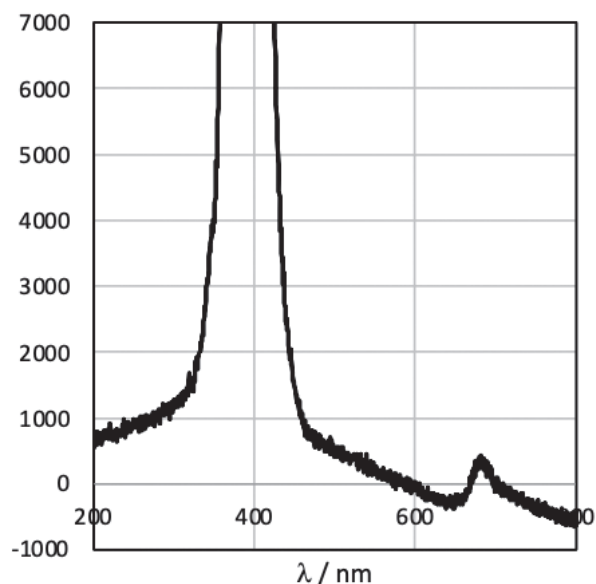


図 2-2 抹茶の粉末の蛍光スペクトル (UV-LEDは垂直方向から照射, FLAME)

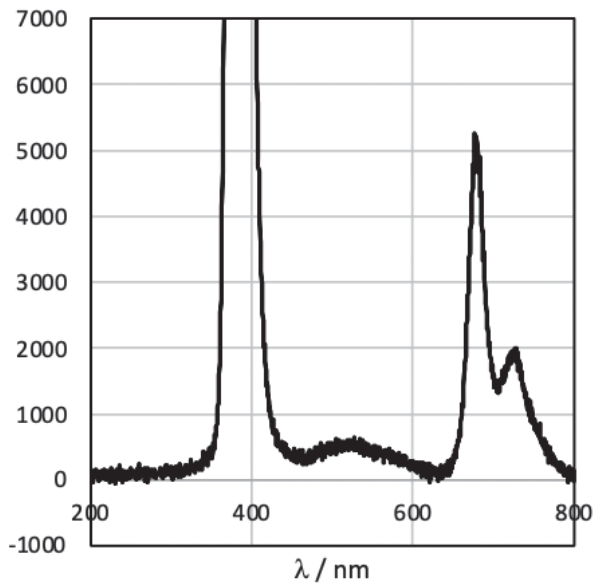


図3-1 煎茶茶葉の蛍光スペクトル (反射プローブは45度方向に固定, UV-LEDは試料に垂直に照射, FLAME)

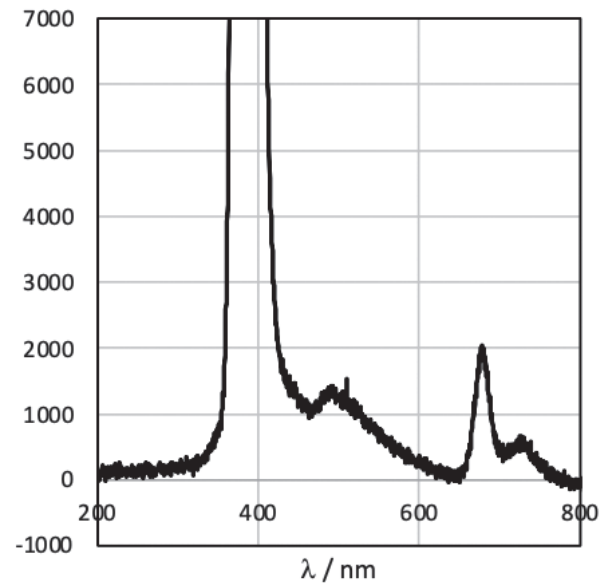


図3-3 茶葉一片のみを対象にした蛍光スペクトル (反射プローブは試料に垂直に固定, UV-LEDは45度方向から照射, FLAME)

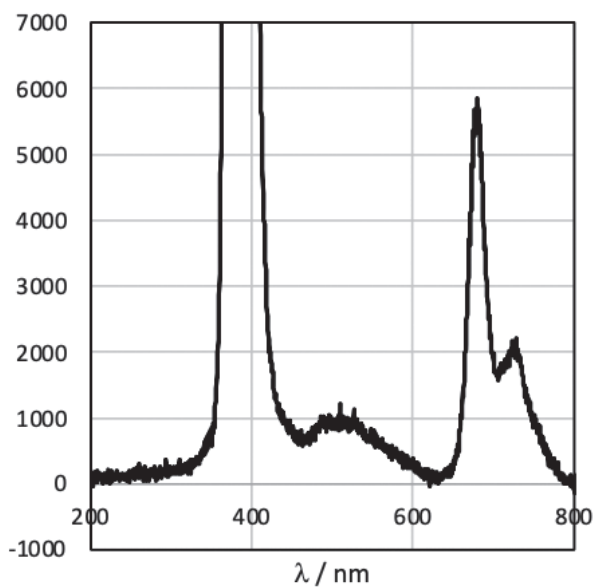


図3-2 茶葉一片のみを対象にした蛍光スペクトル (反射プローブは45度方向に固定, UV-LEDは試料に垂直に照射, FLAME)

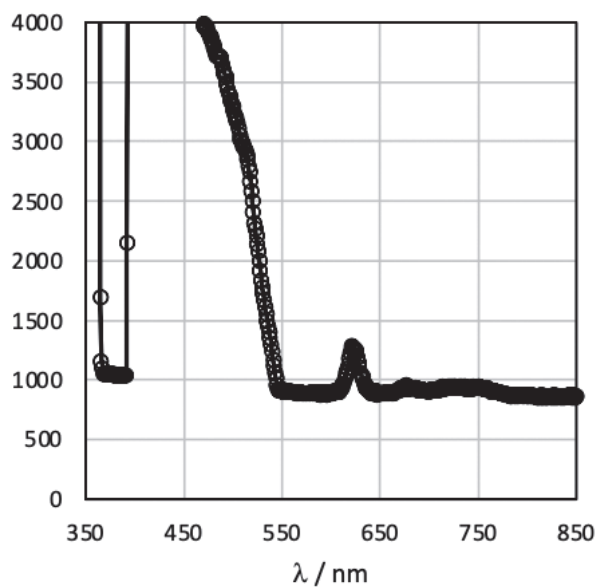


図4-1 茶葉の蛍光スペクトル (PCF)

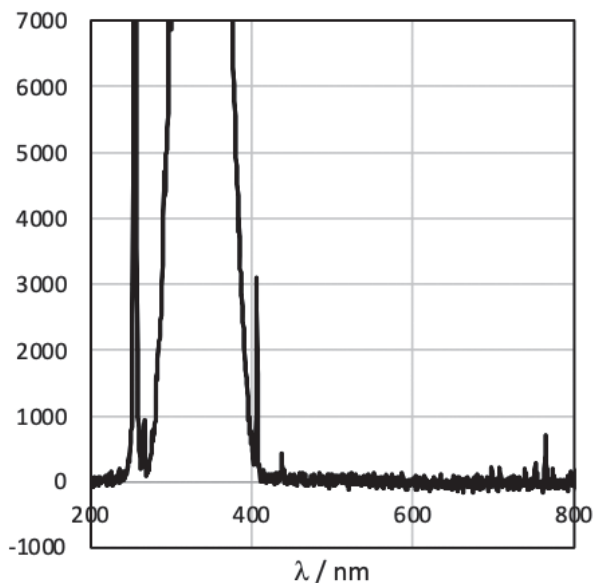


図5-1 紫外線ランプをろ紙上に照射したときのスペクトル

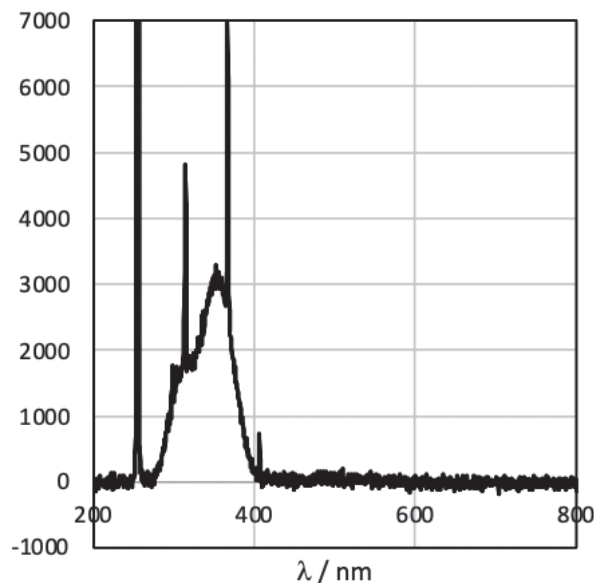


図5-2 茶葉に紫外線ランプを照射したときのスペクトル

注

- 注1) 植物の光合成と関係があるクロロフィルの蛍光測定に関する研究は、リモートセンシング⁵⁾や植物プランクトンの活性⁶⁾などの研究に用いられている。
- 注2) 反射プローブは、照射光と試料からの反射光をそれぞれ光の進行方向が異なる光ファイバーがプローブのところまで束ねられている。プローブの反対側には2本のファイバーが分岐されたような形状になっており、光源のコネクタ、検出器のコネクタにそれぞれが接続される。

参考文献

- 1) 高木秀明著「小型分光器と紫外線ライトを用いた簡易蛍光分光測定の試み」吉備国際大学研究紀要(医療・自然科学系), 31号, 33-40, 2021年.
- 2) 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, 2021年12月29日閲覧.
- 3) 本田数博・有菌秀敏・森義仁・藤枝修子著「青色LEDを光源に用いる緑茶クロロフィルの蛍光測定」化学と教育, 50巻4号, 326-328, 2002年.
- 4) 芳竹良彰・合田四郎・山崎秀夫・森重清利・西川泰治・重松恒信著「微分蛍光法によるクロロフィルa, b及びフェオフィチンa, bの超微量定量-励起微分スペクトルの有効性-」分析化学33巻12号, 667-679, 1984年.
- 5) 大政謙次著「植物のクロロフィルa傾向の画像化とリモートセンシングにおける問題点と展望-細胞から地球観測まで-」日本リモートセンシング学会誌, 38巻5号, 386-400, 2018年.
- 6) 鈴木光次・吉川尚・古谷研・才野敏郎著「クロロフィル蛍光による植物プランクトンの光合成活性の測定」日本プランクトン学会報, 49巻1号, 27-36, 2002年.