

## 光ファイバー分光蛍光光度計による 三次元蛍光スペクトルの最適な測定条件

大下 浩司<sup>1,2</sup>

文化財に彩色された色材の三次元蛍光スペクトルを非破壊で測定するために、分光蛍光光度計 F-2700（日立ハイテクサイエンス製）の試料室を改良し、色材に励起光を照射しその蛍光を受光するための光ファイバーを取り付けた光ファイバー分光蛍光光度計を日立ハイテクサイエンスに特注した。本研究は、この装置を用いて三次元蛍光スペクトルを測定するための最適条件を検討した。分析試料には、植物染料の中でも蛍光強度が比較的強い紅花を用い、1) 励起側スリットと蛍光側スリット、2) ホトマル電圧、3) 光ファイバー先端部と測定点の間隔、4) スキャンスピードの各測定条件を検討した。この結果、励起側スリット / 蛍光側スリットは 10nm/5nm、ホトマル電圧は 700V、光ファイバー先端部と測定点の間隔は 3mm、スキャンスピードは 3000nm/min が、再現性良く高感度に三次元蛍光スペクトルを測定できる最適な条件であった。

### 1 はじめに

油彩画、日本画、染織品などの文化財を修復・復元する際には、文化財に使用された顔料や染料などの色材を同定することがある。文化財に彩色された色材の同定は非破壊が望ましく、顔料は蛍光 X 線分析法、染料は三次元蛍光スペクトル分析法により行われることが多い。蛍光 X 線分析法による顔料の同定は、顔料に含まれる元素を検出し、検出された元素と顔料の色相をもとに行なう。三次元蛍光スペクトル分析法による染料の同定では、標準試料と実試料の三次元蛍光スペクトルの蛍光ピーク位置を照合する。

三次元蛍光スペクトルによる染料の同定は、1992 年に分光蛍光光度計 F-4010（日立製）<sup>1)</sup>、1994 年には分光蛍光光度計 F-4500（日立製）<sup>2)</sup> を用いて行なわれた。固体試料ホルダーを用いて装置の試料室内に染料試料をセットし、三次元蛍光スペクトルを測定している。更に、装置の試料室に入らない文化財に使われた染料の三次元蛍光スペクトルを測定するために、光ファイバーを取り付けられるよう F-4500 の試料室を改造した光ファイバー分光蛍光光度計が開発された<sup>3)</sup>。本装置を用いて、染織品や浮世絵に使用された天然染料の非破壊分析に成功している<sup>4),5),6)</sup>。その後も日立から F-2500 や F-7000 が市販されると、これらをベースにした光ファイバー分光蛍光光度計が開発され実用されている。

三次元蛍光スペクトルは、紫外から可視光領域の光を試料に順次照射し、励起波長に対する蛍光波長と蛍光強度を測定して、三次元グラフ（たとえば X 軸に蛍光波長、Y 軸に励起波長、Z 軸に蛍光強度のグラフ）に測定値をプロットし得られる。三次元グラフの Z 軸方向から XY 面を俯瞰した蛍光強度の等高線図を蛍光指紋という。三次元蛍光スペクトルや蛍光指紋による分析法は、文化財に彩色された染料の同定のみならず、食品や農作物などの原材料の種類や混合割合、産地

や汚染濃度などの推定へも応用されるようになった<sup>7)~11)</sup>。

本研究は、分光蛍光光度計 F-2700 をベースにした光ファイバー分光蛍光光度計を日立ハイテクサイエンスに特注し、これを用いて再現性良く高感度に三次元蛍光スペクトルを測定するための最適条件を検討した。

## 2 実験

### 2.1 分析機器と方法

分光蛍光光度計 F-2700 (日立ハイテクサイエンス製) の試料室を改良し、これに二分岐光ファイバーを取り付けた光ファイバー分光蛍光光度計を日立ハイテクサイエンスに特注した (図 1)。分光蛍光光度計の試料室に取り付ける二分岐光ファイバーは、光ファイバー STU230D-S (三菱電線工業製、コア径 230  $\mu$  m、外径 250  $\mu$  m、UV グレード) がランダムに束ねられ、入射側・出射側ともに線芯数 48 芯 (バンドル径 2mm) を用いた。二分岐光ファイバーは、測定側 96 芯の光ファイバーの束が、入射側 48 芯と出射側 48 芯の光ファイバーの束に分けられている。二分岐光ファイバー (以下、光ファイバー) の入射側へ光源の光 (励起光) が入り、出射側から試料の蛍光が検出器へ送られるように試料室を改良し、光ファイバーを取り付けた。これにより、光源の光は、試料室から光ファイバーの入射側へ入り、光ファイバーを通じて測定側 (試料に励起光を照射し蛍光を受光する光ファイバーの先端部) に送られ、励起光が試料に当たる。試料が発光した蛍光は、光ファイバーの測定側から入り出射側へ送られ、試料室を通過して検出器に入り、試料の蛍光を測定する。光ファイバーの測定側 (先端部) は、テラオカ設備に特注した治具を用いて固定した。この固定治具の側面には、光ファイバー先端部と測定点を目視するための開閉窓を付け、固定治具の上部には、光ファイバー先端部と測定点の間隔を調整するためのスライド調節機能を備えている。三次元蛍光スペクトルの測定や解析には、USB ケーブルでコンピュータ (NEC 製 VersaPro) を光ファイバー分光蛍光光度計に接続し、FL Solutions 4.2 プログラム (日立ハイテクサイエンス製) を用いた。この光ファイバー分光蛍光光度計のスペクトル補正では、励起側 220 ~ 600nm と蛍光側 220 ~ 600nm を補正し、更に蛍光側 500 ~ 800nm と励起側 500 ~ 800nm の長波長域を補正した。測定は、光源 (キセノンランプ) の電源を入れ 30 分待ち安定させてから開始した。表 1 に、検討した測定条件と最適な測定条件 (下線) をまとめた。

### 2.2 分析試料

日本色彩大鑑 第一巻 古代の色 (河出書房新社) に掲載されている紅 (紅花) を分析試料に用いた。

## 3 結果と考察

光ファイバー分光蛍光光度計を用いて、再現性良く高感度に三次元蛍光スペクトルを測定するための最適な測定条件を検討した。測定条件は 1) 励起側スリットと蛍光側スリット、2) ホトマル電圧、3) 光ファイバー先端部と測定点の間隔、4) スキャンスピードを検討した。各測定条件

で紅花の三次元蛍光スペクトルを測定し、紅花由来の2つの蛍光ピーク（① Ex/Em = 545 nm/605 nm と② Ex/Em = 385 nm/605 nm）の蛍光強度や蛍光指紋を比較した。

まず、励起側スリットと蛍光側スリットが蛍光強度に与える影響を調べた。励起側の各スリット幅（2.5 nm、5 nm、10 nm、20 nm）に対し、蛍光側のスリット幅を2.5 nm、5 nm、10 nm、20 nmに順次変え、紅花の三次元蛍光スペクトルを測定した。三次元蛍光スペクトルから前述の蛍光ピーク①と②の蛍光強度を求めグラフに示した（表2の1）と図2）。励起側スリットと蛍光側スリットの幅が狭ければ蛍光ピーク①と②の蛍光強度は小さくなり、広ければ蛍光強度は大きくなった。両スリット幅が広すぎると、蛍光ピーク①と②の蛍光強度は測定レンジをオーバーしてしまった。表2の1）および図2）から、励起側スリット/蛍光側スリットを2.5 nm/20 nm、5 nm/10 nm、10 nm/5 nmに調整すれば、測定レンジをオーバーすることなく十分な蛍光強度が得られるとわかった。蛍光強度は、蛍光ピーク①では3000以上、蛍光ピーク②では1500以上であった。

これら3条件のうち、なるべくシャープな蛍光スペクトルを得て、近接する蛍光ピークを分離できる測定条件は、蛍光側のスリット幅が最も狭い励起側スリット/蛍光側スリット=10 nm/5 nmである。励起側のスリット幅を狭くすれば、特定波長の光を試料に当てやすくなるが蛍光強度は小さくなる。これを広くすれば、蛍光強度は大きくなるが特定波長以外の光も試料に当ててしまう。蛍光側のスリット幅を狭くすると、波長分解能は高くなり蛍光スペクトルはシャープになるが、蛍光強度は小さくなる。これを広くすると、波長分解能は低くなり蛍光スペクトルはブロードになるが、蛍光強度は大きくなる。本研究は、三次元蛍光スペクトルの蛍光ピーク位置（蛍光ピークの励起波長と蛍光波長）から物質を同定しようとしている。このため、なるべくシャープな蛍光スペクトルを得て、近接する蛍光ピークを分離できるほうが良い。このことから、蛍光側のスリット幅が最も狭い励起側スリット/蛍光側スリット=10 nm/5 nmを最適条件とした。蛍光の弱い試料を測定する際には、各スリット幅を広くして測定するなど、目的に応じて各スリット幅を調節すると良い。

ホトマル電圧は検出感度に関係している。このホトマル電圧を250、400、700 Vに順次設定し、紅花の三次元蛍光スペクトルを測定した。紅花の蛍光ピーク①と②の蛍光強度を求めグラフに示した（表2の2）と図3の1）。ホトマル電圧を低くすると検出感度も低くなり、250 Vと400 Vでは蛍光ピーク①と②の蛍光強度は100にも満たなかった。ホトマル電圧を700 Vに設定すると、蛍光ピーク①と②の蛍光強度はそれぞれ3000以上、1500以上であった。このため、ホトマル電圧は、十分な検出感度が得られる700 Vが最適と言える。

本装置は、固定治具を用いて光ファイバーの先端部を測定点に向け測定する。光ファイバーの先端部を固定治具の上方から挿入し、固定治具側面の開閉窓を開け、光ファイバー先端部と測定点を目視してこの間隔を調整し、光ファイバー先端部を測定点に向け測定する。光ファイバー先端部と測定点の間隔を1、2、3、4、5 mmに順次調節し、紅花の三次元蛍光スペクトルを測定した。蛍光ピーク①と②の蛍光強度を求めグラフにまとめた（表2の3）と図3の2）。光ファイバー先端部と測定点の間隔が近いほど、蛍光ピーク①と②の蛍光強度は大きかった。しかし、この間隔を1~2 mmにすると近すぎるため、測定点が光ファイバー先端部に隠れ、測定点を直接目視でき

ない。間隔を 3 mm にすれば測定点を目視でき、蛍光強度は蛍光ピーク①が  $3650 \pm 60$ 、②が  $1900 \pm 20$  であった。このように十分な感度が得られたため、光ファイバー先端部と測定点の間隔は 3 mm を適当とした。

次に、スキャンスピードを 1500 nm/min、3000 nm/min、12000 nm/min に順次変え、紅花の三次元蛍光スペクトルを測定した。紅花の蛍光ピーク①と②の蛍光強度を読み取りグラフにまとめた(表 2 の 4)と図 3 の 3))。スキャンスピードによらず十分な感度が得られ、いずれも蛍光強度は①3000 以上、②1500 以上であった。更に、紅花の三次元蛍光スペクトル (X 軸に蛍光波長、Y 軸に励起波長、Z 軸に蛍光強度のグラフ) を Z 軸方向から XY 面を俯瞰した蛍光指紋 (蛍光強度の等高線図) についても比較した (図 4)。蛍光指紋の励起波長 500~550 nm・蛍光波長 600~700 nm の領域を拡大すると、スキャンスピード 1500 nm/min と 3000 nm/min では滑らかな等高線が得られたのに対し、12000 nm/min の等高線は少し乱れていた (図 4 の 4)、5)、6))。蛍光指紋は物質を同定するための重要な指標の一つであり、等高線は滑らかでノイズが小さい曲線が良い。スキャンスピードは速い方が測定時間も短く済むため、3000 nm/min を最適なスキャンスピードとした。

#### 4 おわりに

日立ハイテクサイエンスに特注した光ファイバー分光蛍光光度計 (F-2700 ベースの特注品) を用いて、三次元蛍光スペクトルを測定するための最適な条件を検討した。この結果、植物染料の中では蛍光強度が比較的強い紅花の三次元蛍光スペクトルの測定では、励起側スリット / 蛍光側スリットは 10 nm/5 nm、ホトマル電圧は 700 V、光ファイバー先端部と測定点の間隔は 3 mm、スキャンスピードは 3000 nm/min が最適な条件であった。この測定条件であれば、三次元蛍光スペクトルを再現性良く高感度に測定でき、ノイズが小さく滑らかな蛍光指紋 (蛍光強度の等高線図) が得られた。

本研究は JSPS 科研費 JP15K21544 の助成を受けたものです。本装置を導入するにあたり、デンマテリアル色材科学研究所の下山進氏ならびに日立ハイテクサイエンスの堀込純氏にご指導とご協力を賜りました。関係の皆様にご心より御礼申し上げます。

表 1 光ファイバー分光蛍光光度計を用いた三次元蛍光スペクトルの測定条件

項目	検討条件 <sup>a</sup>	項目	検討条件 <sup>a</sup>
測定モード	3次元	励起波長	250~750 nm
データモード	蛍光	励起側サンプリング間隔	5 nm
スキャンスピード	1500, <u>3000</u> , 12000 nm/min	励起側スリット	2.5, 5, <u>10</u> , 20 nm
ホトマル電圧	250, 400, <u>700</u> V	蛍光波長	300~800 nm
レスポンス	自動	蛍光側サンプリング間隔	5 nm
スペクトル補正	On	蛍光側スリット	2.5, <u>5</u> , 10, 20 nm
光ファイバー先端部と測定点の間隔	1, 2, <u>3</u> , 4, 5 mm		

<sup>a</sup> 最適条件に下線を付した。

表2 光ファイバー分光蛍光光度計で測定した紅花の蛍光強度<sup>a</sup>

測定条件	蛍光強度 (平均値±標準偏差)		測定条件	蛍光強度 (平均値±標準偏差)	
1) 励起側スリット (Ex スリット) と蛍光側スリット (Em スリット)					
a) Ex 2.5 nm					
Em 2.5 nm	① 49 ± 6	② 24 ± 2	Em 5 nm	① 240 ± 20	② 118 ± 5
Em 10 nm	① 980 ± 60	② 490 ± 20	Em 20 nm	① 3400 ± 400	② 1600 ± 200
b) Ex 5 nm					
Em 2.5 nm	① 204 ± 8	② 106 ± 4	Em 5 nm	① 980 ± 30	② 510 ± 20
Em 10 nm	① 4120 ± 20	② 2150 ± 5	Em 20 nm	① オーバー	② 7530 ± 60
c) Ex 10 nm					
Em 2.5 nm	① 728 ± 3	② 375 ± 2	Em 5 nm	① 3400 ± 100	② 1760 ± 60
Em 10 nm	① オーバー	② 7600 ± 400	Em 20 nm	① オーバー	② オーバー
d) Ex 20 nm					
Em 2.5 nm	① 2469 ± 70	② 1149 ± 25	Em 5 nm	① オーバー	② 5600 ± 100
Em 10 nm	① オーバー	② オーバー	Em 20 nm	① オーバー	② オーバー
2) ホトマル電圧					
250 V	① 1.6 ± 0.1	② 0.8 ± 0.1	400 V	① 53 ± 4	② 27 ± 3
700 V	① 3530 ± 10	② 1830 ± 30			
3) 光ファイバー先端部と測定点の間隔					
1 mm	① 3700 ± 100	② 1970 ± 90	2 mm	① 3750 ± 30	② 1960 ± 40
3 mm	① 3650 ± 60	② 1900 ± 20	4 mm	① 3480 ± 50	② 1820 ± 60
5 mm	① 3120 ± 80	② 1600 ± 90			
4) スキャンスピード					
1500 nm/min	① 3200 ± 100	② 1610 ± 80	3000 nm/min	① 3300 ± 300	② 1700 ± 200
12000 nm/min	① 3200 ± 200	② 1600 ± 100			

<sup>a</sup> 蛍光強度 (平均値±標準偏差) は3回の測定から計算した。①は Ex/Em = 545 nm/605 nm、②は Ex/Em = 385 nm/605 nm の蛍光ピークを示した。測定は表1の条件で検討した。ただし、1)はスキャンスピード 12000 nm/min、ホトマル電圧 700 V、光ファイバー先端部と測定点の間隔 3 mm、2)はスキャンスピード 12000 nm/min、励起側スリット 10 nm、蛍光側スリット 5 nm、光ファイバー先端部と測定点の間隔 3 mm、3)はスキャンスピード 12000 nm/min、ホトマル電圧 700 V、励起側スリット 10 nm、蛍光側スリット 5 nm、4)はホトマル電圧 700 V、励起側スリット 10 nm、蛍光側スリット 5 nm、光ファイバー先端部と測定点の間隔 3 mm の条件で検討した。

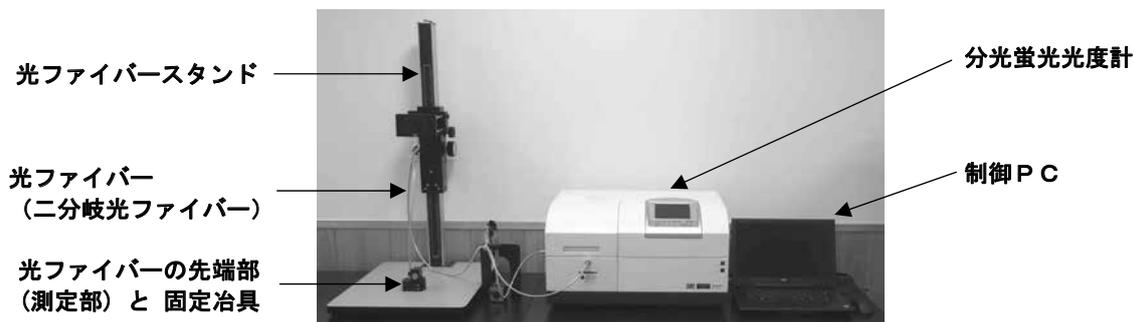


図1 光ファイバー分光蛍光光度計

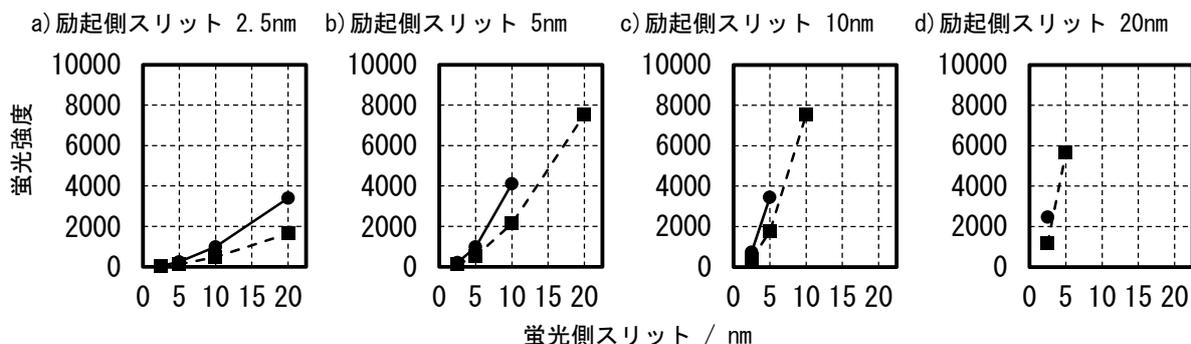


図2 蛍光強度に対する励起側スリット (Ex スリット) と蛍光側スリット (Em スリット) の影響<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 表2の1)の測定条件と蛍光強度。●は Ex/Em = 545nm/605nm、■は Ex/Em = 385nm/605nm の蛍光ピーク。

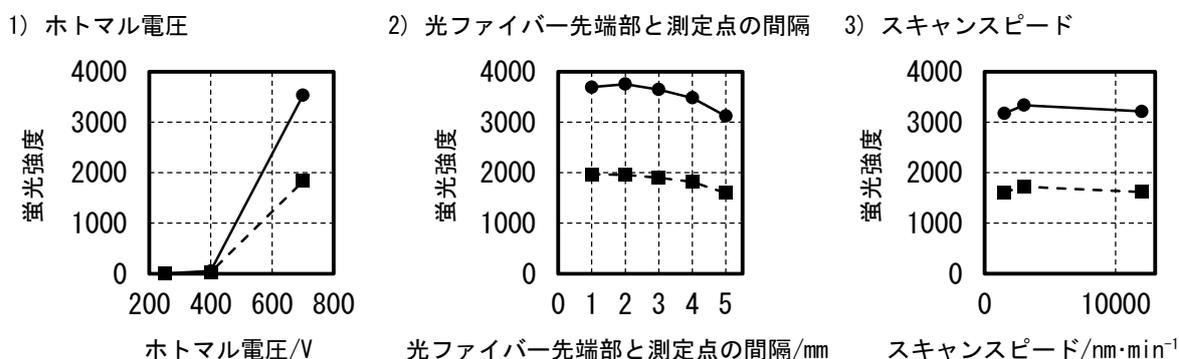


図3 蛍光強度に対するホトマル電圧、光ファイバー先端部と測定点の間隔、スキャンスピードの影響<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 表2の2)~4)の測定条件と蛍光強度。●は Ex/Em = 545nm/605nm、■は Ex/Em = 385nm/605nm の蛍光ピーク。

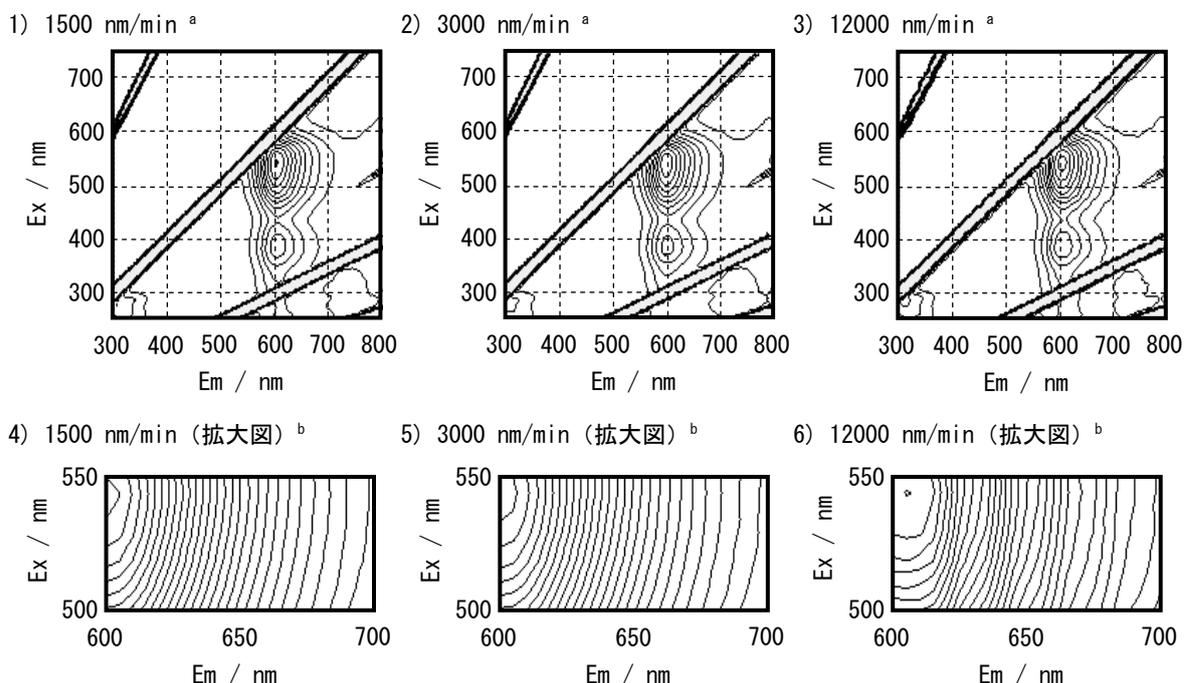


図4 蛍光指紋に対するスキンスピードの影響<sup>c</sup>

<sup>a</sup> 等高線間隔 300。 <sup>b</sup> 等高線間隔 100。 <sup>c</sup> 表 2 の 4) の測定条件。

## 文献

- 1) 下山進, 野田裕子: 分析化学, 41, pp. 243-250 (1992).
- 2) 下山進, 野田裕子: 分析化学, 43, pp. 475-480 (1994).
- 3) 下山進, 野田裕子: 分析化学, 46, pp. 571-578 (1997).
- 4) 下山進, 野田裕子: 分析化学, 46, pp. 791-799 (1997).
- 5) 下山進, 野田裕子: 分析化学, 47, pp. 295-301 (1998).
- 6) 下山進, 野田裕子, 勝原伸也: 分析化学, 47, pp. 93-100 (1998).
- 7) 杉山純一, 蔦瑞樹: 日本食品科学工学会誌, 60, pp. 457-465 (2013).
- 8) 蔦瑞樹, 杉山純一: 化学と生物, 53, pp. 285-292 (2015).
- 9) 杉山純一: 食品と容器, 54, pp. 308-315 (2013).
- 10) 杉山武裕, 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 柴田真理朗, 粉川美踏, 荒木徹也, 鍋谷浩志, 相良泰行: 日本食品科学工学会誌, 57, pp. 238-242 (2010).
- 11) 堀込純, 上妻道成, 白崎俊浩: 日立評論, 98, pp. 72-76 (2016).

所属: <sup>1</sup> 吉備国際大学 外国語学部 外国学科 (〒700-0931 岡山県岡山市北区奥田西町 5-5)

<sup>2</sup> 吉備国際大学 文化財総合研究センター (〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8)

