OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	光分析における高精度情報抽出に関する研究
Author(s)	千賀, 康弘
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3089976
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

光分析における高精度情報抽出に関する研究

1991年

千賀康弘

(1)

光分析における高精度情報抽出に関する研究

1991年

千 賀 康 弘

目次

序論 --1

第１章　微弱光分光データの専用処理装置の開発
１．１　序 --4
１．２　装置の構成 --4
１．３　装置の機能 --8
１．４　結言 --12

第２章　新しいディコンボリューション手法の提案と分光データの処理
２．１　序 --13
２．２　ケプストラムを用いたスリット関数推定 --14
２．３　ホモモルフィック・フィルタリングによるブラインド・ディコンボリューション --21
２．４　適応平滑化ディコンボリューション --25
２．５　結言 --28

第３章　非線形パラメータ推定法による高効率ピーク分離処理
３．１　序 --29
３．２　曲線適合の原理 --30
３．３　初期値の決定 --30
３．４　非線形最適化プログラムの開発 --34
３．５　波形分割とデータ点数削減による高速化 --40
３．６　実験結果 --44
３．７　結言 --47

第４章　クロマトグラフィ高度化のための２次元展開分光システムの試作
４．１　序 --48
４．２　白色光励起蛍光発光スペクトル測定システムの開発 --49
４．３　吸収・蛍光同時スペクトル測定システムの開発 --57
４．４　マルチチャネル蛍光励起スペクトル測定システムの開発 --63
４．５　結言 --65

第５章　蛍光励起・発光マトリックス展開分光システムの試作と２次元データ解析
５．１　序 --66
５．２　回転型干渉フィルタ分光受光系を用いたEEM測定システムの開発 --67
５．３　偏波面分割型フーリエ分光受光系を用いたEEM測定システムの開発 -72
５．４　成分分離処理への応用 --75
５．５　結言 --77

第６章　光干渉パターン検出型光熱分光システムの試作と
　　高精度情報の抽出
　６．１　序　--78
　６．２　光干渉パターン検出型光熱分光法の原理　--79
　６．３　Mach-Zehnder干渉計を用いた光熱分光システムの開発　--81
　６．４　Talbot干渉計を用いた光熱分光システムの開発　--87
　６．５　結言　--91

総括　--92

参考文献　--94

謝辞　--99

序論

物質の持つ光吸収・発光等の現象に基ずく各種の光スペクトルは，物質を構成している原子・分子に関する情報を含み，物質固有の形をとることから，定性・定量分析の重要な手段の一つとなっている。特に複数の成分からなる混合物試料の分析においては，連続または多波長の光スペクトルを測定することにより，化学変化を伴う分離手段を用いずに簡単な数学的解析のみから各成分を存在状態のままで分析できることから，医学，生物学，食品分析，水質分析など様々な分野で利用されている。ただし，多成分数から成る複雑な混合物を分析する場合には，各成分のスペクトル波形が互いに重なり合うため，高い波長分解能と高感度な検出が可能な大型の分光装置が必要となる。最近では波長可変レーザを利用した装置も報告されている。しかしこれらはいずれも高価であり，ルーチンワーク的な分析には不向きである。

これに対し，近年，高速化・高性能化と共に低価格化が急速に進んでいるマイクロコンピュータ／パーソナルコンピュータを積極的に利用して，従来の分光装置からの出力スペクトル波形をオンラインで数学的に処理・解析して分解能の向上，物質情報の抽出を行なえば，汎用の分光装置から大型分光装置に匹敵する性能を得ることが可能である。このようなコンピュータとの結合による性能向上のための重要な処理法として，ディコンボリューション処理とピークパラメータ推定処理がある。これらの処理はいずれも従来，中型以上の計算機によってオフライン演算により実行されてきた。これらが分光装置側でオンライン処理できれば，分析結果の確認，走査パラメータの再検討などが容易に行なえ，分析効率は飛躍的に向上する。しかし，次の点において，オンライン化が困難となっている。

(1) ディコンボリューション処理は，分光機器によって測定されたスペクトル波形に含まれる機器固有の分光特性や電気系の伝達特性など，いわゆる装置関数による歪を除去して，物質自体の持つ真のスペクトル波形を抽出する処理である。この装置関数は，機種，測定条件(スリット幅，電気系の時定数など)によって異なるため，異機種間または測定条件の異なるデータ間でのデータの比較や，高精度な物質分析を行なうためには，必ず除去しておく必要がある。この処理アルゴリズムは既に1932年より種々開発されている[6)-10)]が，いずれも正確な装置関数の形が既知である必要がある。しかし実際の測定に際して装置関数を実測することは極めて煩雑であり，装置パラメータ不明の状態で測定されたデータの解析を要求される場合もある。この問題を解決するためには，測定データのみから使用した分光機器の装置関数を推定することが必要となる。また，処理アルゴリズムにおいては，測定波形に含まれる雑音成分の影響を抑えるための効果的な方法がまだない。

(2) ピークパラメータ推定は，スペクトル波形の中からピーク位置，強度，半値幅等のパラメータを抽出する処理であり，これにより物質自体の原子・分子レベルでの成分構成，状態などの情報を得ることができる。この処理はピーク波形自体が非線形関数となることから，従来は非線形パラメータ推定演算により実行されてきた[22)]。種々のアルゴリズムが利用されているが，いずれも演算量が多く，パーソナルコンピュータ上でそのまま実行するのは演算時間の点で困難であり，専用アルゴリズムを開発することが必要となる。

一方，従来の１次元的なスペクトル波形上で幅の広いバンド構造を持つ複数の成分からなる混合物では成分毎のスペクトルの重なりが大きくなり，もはやピークパラメータ推定処理の適用は不可能となる。これを解決する一つの方法として，観測時の走査パラメータを複数化して，スペクトル波形を２次元パターンとして展開する方法が考えられる。展開したパラメータ軸に対して各成分スペクトルが互いに直交すれば，各成分固有の情報を明確に抽出することができ，分析の信頼性は向上する。

既に，高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により物理的に(時間軸方向に)展開すると同時に吸収スペクトルを１次元アレイセンサを用いてマルチチャネル測定する時間-波長の２次元スペクトルパターン測定装置が実用化されている[52]。しかし吸収測定よりも検出感度の高い蛍光測定においては，分析対象成分によって最適励起波長が異なること，および微弱な蛍光を高速に測定するための高感度なセンサが必要であることなど，問題点が多く，マルチチャネル検出法は未だに開発されていない。

また，蛍光現象における発光スペクトルと励起スペクトルの直交性を利用して，蛍光発光波長と励起波長を２次元的に走査して測定する２次元蛍光スペクトルパターン，蛍光励起・発光マトリックス(EEM)についても既にいくつかの装置が開発され，多成分混合物分析に対する有効性も指摘されている[44)-55)]。しかし現時点ではいずれも感度が低く，低濃度試料に対するデータ解析は困難な状況にある。このため，より高感度かつ再現性の高い装置開発が望まれる。

このような測定データの２次元パターン化は，従来点検出方式が用いられてきた光熱分光法のような測定法に適用した場合，測定データ中に含まれる誤差要因(例えば熱拡散や対流現象など)に関する情報検出につながり，さらに感度を向上させることが可能となると考えられる。

本研究ではこのような観点より，光分析機器からの情報抽出を，高精度にかつ安価に実現することを目的として，機器にオンライン結合したマイクロコンピュータ／パーソナルコンピュータによる数学的データ解析アルゴリズムを開発し，さらに，光スペクトルを２次元パターン展開する新しい高感度な分光システムの開発を行なった。本論文はこれらの研究成果をまとめたものであり，以下に示す各章で構成されている。

第１章では，従来からあるアナログ出力形式の分光機器に直接結合して，数学的解析処理を実現するために新たに開発したデータ収集・処理専用装置[a)]について述べる。従来からの機器の多くはアナログ出力形式であり，これらの機器からの出力に対するデータ処理を効率的に行なうためには，波長走査機能を含むデータ収集・処理装置を結合するのが有効である。ここで開発した装置は特にラマン散乱分光，蛍光分光等の微弱光測定を対象としており，高い波長走査精度と高感度検出機能を持っている。この装置の詳細と有効性を実際の測定結果と共に示す。

第２章では，分光機器により測定したスペクトル波形のディコンボリューション処理において最も重要な装置関数，すなわちスリット関数の形状を，測定波形自体から推定する手法[b)]を提案する。同時にスリット関数が未知のままでも実行可能なディコンボリューション法を提案する。また，分光機器のスリット関数は一般に三角状関数となることから，三角状スリット関数の場合に特に有効な雑音成分の平滑化を考慮したディコンボリューション法についても提案し，実測データに適用してこの有効性を示す。

第３章では，観測波形に含まれるピーク・パラメータを分析機器に結合したパーソナルコンピュータでオンライン解析するために開発した，BASIC言語による高速アルゴリズム[c,d)]について述べる。本アルゴリズムは，従来大型計算機用に用いられてきたアルゴリズムを基礎とし，パーソナルコンピュータの特徴を活かすと共にその演算能力を補うために，実験者との対話形式を取り入れている。本アルゴリズムを実測データに適用した結果より，この有効性と適用限界について考察する。

第４章では，高速液体クロマトグラフィ(HPLC)と蛍光スペクトル測定を結合して分光スペクトルの２次元展開を実現した新しいシステムの開発結果について述べる。ここでは試料を連続光(白色光)で励起し，蛍光をマルチチャネル分光測定するシステム[e)]，および試料を空間的に分光励起して蛍光測定を行なうマルチチャネル蛍光励起スペクトル測定システムを考案・試作し，HPLCと結合した。また，白色光励起蛍光測定システムとマルチチャネル吸収測定システムを結合した時間-蛍光-吸光の３次元測定も試みた。これらの測定結果より各々の有用性を評価する。

第５章では，蛍光測定を２次元パターン化した蛍光励起・発光マトリックス(EEM)を，高速かつ高感度で測定するために開発した２種類の専用システムについて述べる。EEMは特に未知成分を含む多成分系試料の分析に対し，各成分の波長選択性に依存せずに分析できることから，極めて有効であるが，従来の蛍光分光光度計では膨大な測定時間を必要とする。そこで回転型干渉フィルタ分光受光系[f)]および偏波面分割型フーリエ分光受光系を持つシステムを開発し，高速データ収集を達成した。さらに測定されたEEMに対して，固有値解析に基づくスペクトル分離手法を適用し，開発したシステムおよびデータ解析法の有用性を示す。

第６章では，高感度検出法として注目されている光熱分光法に２次元パターン検出法を適用して，熱変化より生ずる屈折率変化を光干渉法によって空間的に測定する新しい測定システムを開発した結果について述べるとともに，その有効性を示す。

最後に本研究の研究成果を概説し，今後の研究課題について考察する。

第１章　微弱光分光データの専用処理装置の開発

1.1　序

分光機器の自動化はマイクロプロセッサの普及と共に急速に進み[1)-4)]，最近では多くの分光機器がマイクロプロセッサを内蔵し，これによって分光器の波長走査，スリット幅制御，チャートレコーダの制御等のプログラム化を実現している。さらに平滑化，ピーク検出など種々のデータ処理機能を含むものもある。このような高機能分光機器は価格も高く，小規模な実験室・研究室では未だにモノクロメータのみを用いて種々の分光分析を行なっている場合も少なくない。しかし再現性の高い高精度な定性・定量分析を行なうためにはコンピュータの補助が不可欠であり，コンピュータへのデータ入力とデータ処理機能を持った装置[4)]が必要である。

この目的を満たすためには，次のような機能を備えたモノクロメータ付属装置があれば効果的である。(1) 各種の検出器出力信号をディジタル化して入力できる。(2) 測定条件，データ処理パラメータの設定が容易に行なえる。(3) 定性分析，定量分析のいずれも考慮した多種のデータ処理機能を持つ。(4) データ収集・処理の過程および結果が監視できる。(5) データ保管機能を持つ。(6) プロッタ/レコーダへの出力が可能。(7) 小型で簡単に移動できる。

本研究ではこれらの点を考慮して，パルスモータによる波長または波数駆動可能なモノクロメータに接続して，特にラマン散乱，蛍光発光などの微弱光分光測光に有効な融通性の高い対話型汎用データ収集・処理装置を開発した。本装置は８ビットマイクロプロセッサを１個内蔵しており，異なる分光測光に適用する場合にはモノクロメータの制御プログラムを一部変更するだけでよく，データ処理機能は種々の分析に共通に利用できる。ここでは本装置をラマン散乱分光に適用し，この有用性を示す。

1.2　装置の構成

Fig.1.1 に装置全体の構成を示す。本装置は，パルスモータによる波長または波数駆動機構を持つモノクロメータと光電子増倍管などの検出器とを結合した簡単な分光測光装置に，直接接続して用いることを考慮して設計した。全体は大きく分けて４部分：検出器からの信号入力部，CRTへのデータ表示制御部，パラメータ設定用操作卓，およびデータ保存用ディジタルカセット(TEAC, MT-2)からなり，全体の制御は８ビットマイクロプロセッサ8085A（以下MPUと略す）が行なっている。

1.2.1 信号検出部

一般に可視・紫外域の分光測光には検出器として光電子増倍管が用いられ，この出力は直流測定法かまたは光子計数法（極微弱光の場合）により検出される。

本装置では出力信号がディジタル/アナログどちらでも同一回路で対応できるように計数型AD変換回路を採用した。

Fig.1.2 にこの回路のブロック図を示す。この回路は信号パルスを計数するためのカウンタ部，正確な計数時間幅を発生するためのタイマ部，およびこれらを制御するI/Oポートからなる。入力信号は，光子計数法では光電子増倍管からの出力電流をディスクリミネータに通してディジタルパルス列とし，直流測定法では検出器（通常はロックインアンプ）からの出力電圧を電圧-周波数(VF)変換器(Analog Devices, AD537) によりパルス列として，１６ビットカウンタで一定時間計数する。入力信号のディジタル/アナログ選択はスイッチSWにより手動切り替えする。

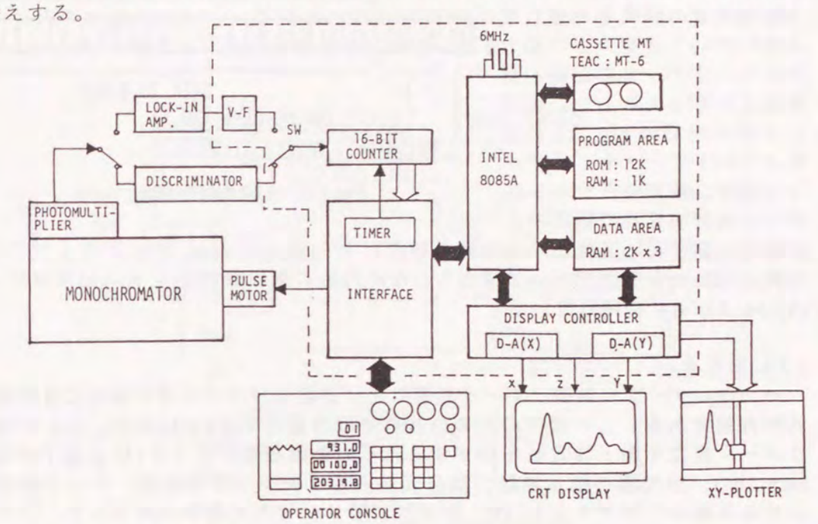


Fig.1.1. Schematic diagram of the microprocessor-based data acquisition and processing system.

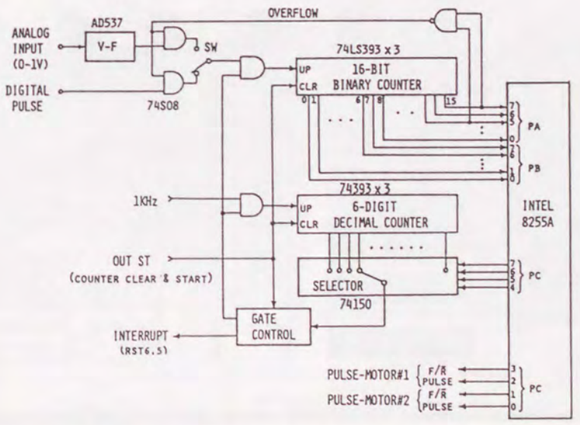


Fig.1.2. Block diagram of the data acquisition circuit.

タイマ部では1KHzのクロックを基準として，信号計数時間幅を8255A からの指定により11段階 (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200sec) のうちの一つに設定する。

1.2.2 データ形式

信号強度は時間幅 t での計数値pより単位時間当たりの計数値 p/t に変換して保存する。この有効桁数は後のデータ処理演算の制度を考慮してもせいぜい１３ビットで充分であり，生データの記録・保存は１３ビットとした。ただしメモリ内では Fig.1.3 に示すように１データを１６ビットで表す。残りの３ビットはデータ処理演算時に特定の点を輝度変調によって指定するための輝点ビット(Brightness, 1bit)，およびデータ収集と同時に実時間でピーク検出を行なうための微係数符号(+, 0, -)記憶用ビット(Slope, 2bits)に使用している。

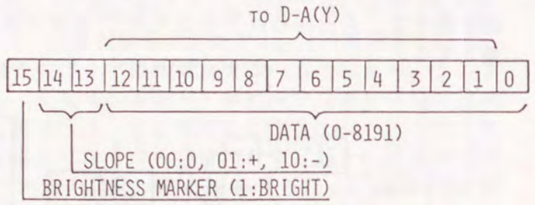


Fig.1.3. 16 bit data format.

1.2.3 操作卓

モノクロメータの制御，データ処理などに必要なパラメータの設定には対話形式が有効である。この操作のための操作卓の外観を Fig.1.4 に示す。ここにはパラメータ設定手順・設定値を印字するための小型放電プリンタ(松下電子部品，EUY-10E)，分光器の指示波数，励起光からのラマンシフト波数，データ値を表示する３組の７セグメントLED，およびパラメータ入力用キースイッチ，パラメータ設定用ロータリースイッチを持つ。

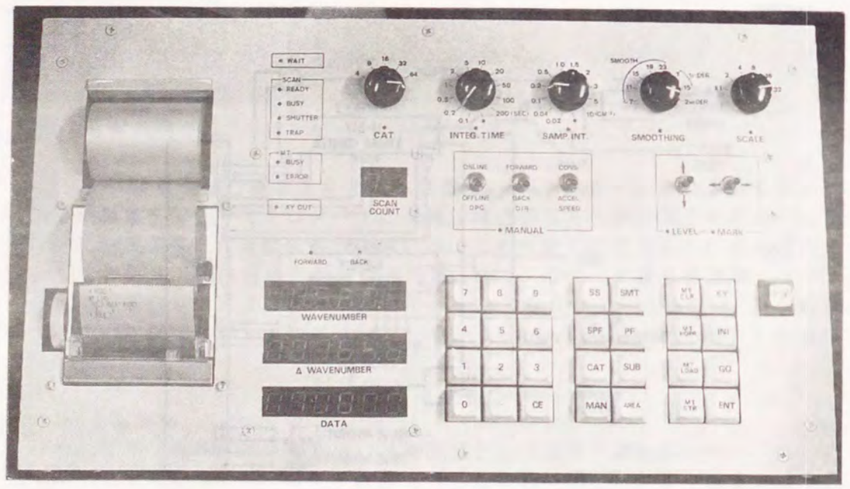


Fig.1.4. A picture of the operator console.

1.2.4 実時間CRT表示回路

測定パラメータの調整，データ処理演算結果の評価には，測定波形および演算処理結果がCRTに実時間で表示されることが望ましい。また演算処理過程では，２個の波形の比較，差スペクトルの同時表示も必要である。これらの機能を実現するために，Fig.1.5に示す３波形の同時表示が可能な実時間CRT表示回路を作製した。この回路は，データ表示用RAM，CRT出力用DA変換器，およびRAMへのアドレス発生器で構成されている。データ表示用RAMは１波形を1024点(2Kbyte)として３波形分の容量を持つ。このRAMはMPUから直接書き込み/読み出しが可能であるが，MPUからのアクセスがない時にはアドレス発生部の制御により連続的に内容が読み出されDA変換されてCRTのY軸に出力される。データの最上位ビットはCRTのZ軸に出力され輝度変調に用いられる。

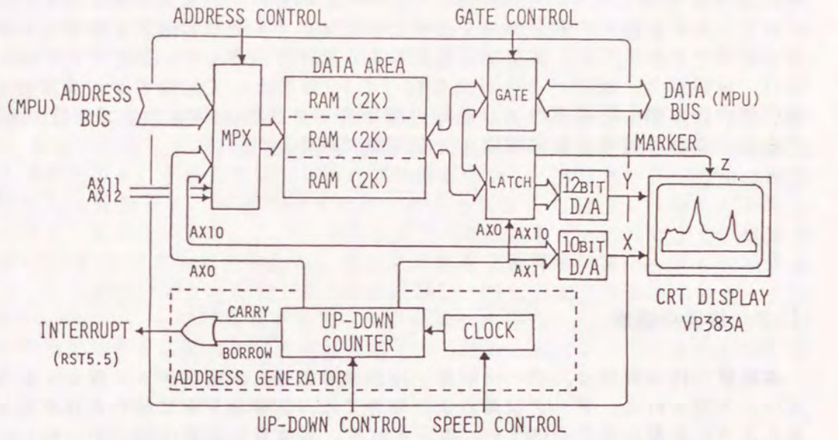


Fig.1.5. Block diagram of the real-time data-display circuit.

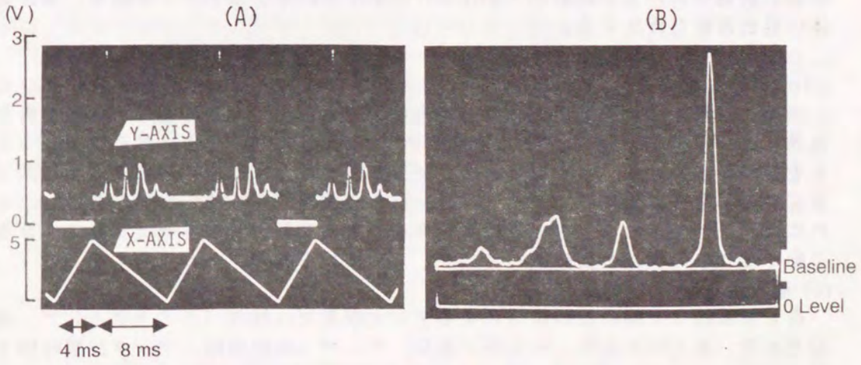


Fig.1.6. (A) Analog signals to the CRT for the vertical (Y) and the horizontal (X) axes control, and (B) the resultant image on CRT.

CRTのX軸にはアドレス発生部からの出力値が直接DA変換されて供給される。このX軸走査では，観測波形と共に０レベル線，しきい値線の表示を行なうため，往復走査法を採用した。すなわち，波形表示には低速水平走査(8msec/line)を行ない，続いて０またはしきい値レベル線表示を高速逆方向水平走査(4msec/line)により行なう。Fig.1.6は１波形と２レベル線を同時に表示した時のX軸およびY軸への出力波形と，CRT上での表示結果の例である。この時の表示速度は61画面/secで，画面のちらつきはほとんどない。表示波形の選択，レベル線の値は予め操作卓から任意に設定できる。

1.2.5 ディジタルカセット

収集したデータ波形の保管には安価で記憶容量の大きいディジタルカセット磁気テープ(以後CMTと略す)を利用した。データの読み出し時に測定内容を簡単に検索できるようにアクセスの容易なテープの先頭部分に各記録波形に対する測定パラメータを記録する索引部分を設けた。１本のテープには最大１０回の走査波形を記録できるように，索引部分も予め１０セクタ用意した。各セクタには，測定日，試料番号，測定パラメータを32バイト/波形として記録する。測定波形は索引部の後に順に記録される。記録可能なデータ点数は300ftテープで約10000点であり，これは通常の測定では充分な点数である。

1.3 装置の機能

本装置の持つ機能は，データ収集，波形演算処理，およびデータ保存・管理の３つに大別される。データ収集および処理では，実験者が常に動作過程を監視できるように必要な波形がCRT上に表示される。各演算で必要な特定点の指示には輝度マーカを利用する。処理結果はＸＹプロッタ(Graphtec, WX4671)にも出力できる。制御プログラムは全体で約10Kbyteから成り，すべてROM内に格納されている。装置内にはこの他に約１Kbyteの簡単なモニタプログラムを持ち，装置全体の自己診断も行なえる。

1.3.1 データ収集

データ収集では，通常用いる単一走査法のほか，実時間での定性・定量分析に有効なピーク検出走査法，SN比改善のための積算平均走査法，およびマニュアル走査が可能である。各走査に必要なパラメータは，操作卓を用いて対話形式で設定する。走査に先立ってモノクロメータとの波長校正をする必要があるが，これにはレーザや水銀ランプなどの輝線スペクトルを利用して，モノクロメータを手動でこれらの輝線波長位置に合わせ，この波長を操作卓より入力する。

(a) 単一走査

最も基本的な１回の波数走査によるデータ収集では操作パラメータとして，励起光波数，測定開始波数，測定終了波数，サンプル波数間隔，データ計数時間を設定する。この後MPUはモノクロメータを測定開始波数の手前10cm^{-1}まで高速に進め，続いて10cm^{-1}だけ低速に進めて測定を開始する。この操作によりパルスモータのバックラッシュによる波数設定誤差を除去する。測定は測定開始波数より

順次サンプル間隔づつ離れた波数にモノクロメータを固定し，各点で予め指定した時間間隔の間光電子パルスまたはVF変換器からのパルスを計数する。

測定波形は測定期間中常時CRT上に表示される。ただしメモリの制限から１度に表示できるデータ点数は1024点であり，これを越えた場合には，以後メモリ内先頭部分の64点のデータをCMTに転送してメモリから消去し，メモリの内容を64点分移動させて測定を続ける。この操作によりデータ点数をメモリ容量に制限されることなく取ることができる。

(b) 実時間ピーク検出走査

試料についての予備的な分析を行なう際には，分光器を高速に走査してピーク位置とピーク強度のみを測定すれば充分な場合も多い。これを簡単に実現するため，データを収集しつつ実時間でピーク検出を行ない，この位置とデータ値をプリントし，CRT上には輝度マーカによって表示する機能を搭載した。ピーク検出には雑音除去を考慮して，まず７点の２次多項式適合平滑化１次微分法[5]により各測定点の微係数符号を求め，この符号が＋から－に変化する点を検出し，この強度値が予め設定したしきい値以上の時信号ピークとして出力する。

(c) 積算平均

雑音を多く含む低SN比の信号に対しては，繰り返し走査による積算平均化がSN比向上に有効である。積算回数の設定にはSN比の改善度と測定時間とを考慮する必要がある。本装置では対話形式の特徴を生かし，実験者が各走査毎に積算平均結果を監視でき，充分なSN比が得られたと判断した時点で走査を打ち切ることができるようにした。このため各走査での測定波形とその時点までの積算平均波形をCRT上に重ねて表示した。また全走査終了後再度異常データを監視するため，各走査毎のデータはすべてCMTに記録し，全走査終了後改めて各データをCRT上に表示し，この時点で異常データを発見した場合にはこの走査回のデータのみを積算結果から除去できる機能を加えた。積算走査はメモリ容量の制限から最大64回，データ点数1024点までとした。

1.3.2 データ読み出し機能

データ処理演算では，対象とする波形をCRT上に表示して実行するため，１度に扱えるデータ点数を1024点に制限した。しかしデータ収集ではデータ点数の制限はなく連続的にCMTの容量内で記録しているため，適当な波数領域を読み出す機能が必要になる。そのため，CMTに記録された全波数領域から任意の連続した1024点を読み出す方法(MODE 1)と，差スペクトル演算を考慮して，すでに読み出されている領域と全く同一の領域を読み出す方法(MODE 2)を備えた。Fig.1.7 に各方法の模式図を示す。MODE 0では，まず最初にCMTに記録されている先頭部分の1024点を読み出し，続いて実験者の判断で64点づつ先頭データを削除して新しいデータを読み出し加える。この操作を必要な領域が得られるまで繰り返す。MODE 1ではデータのサンプル間隔が既に読み出されているデータと一致する場合のみ，これと同一の波数範囲を読み出す。

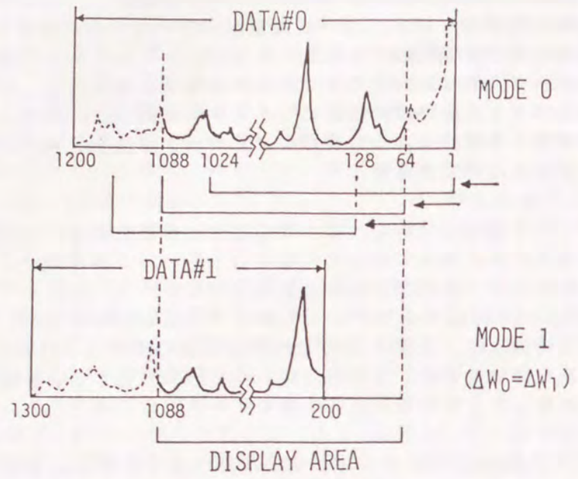


Fig.1.7. Explanatory illustration of two modes of CMT read-out formats: the sequential read-out from top of the file (MODE0), and the random read-out searching the coincidence area (MODE1).

1.3.3 データ処理演算

データ処理では雑音除去のための平滑化，定性・定量分析のためのピーク検出，差スペクトル計算，面積計算の各機能を持つ。

(a) 平滑化

雑音除去のための平滑化および平滑化１次微分，平滑化２次微分を２次３次多項式適合移動平均法[5]により計算する。各演算に必要な重みテーブルはROM内に用意し，実験者は操作卓上のロータリースイッチにより必要な演算を選択できる。

Fig.1.8 は１次微分演算結果のCRTへの表示例を示したものである。図の下はインデンのラマン散乱スペクトルを500 cm^{-1}から1523 cm^{-1}まで1cm^{-1}間隔で測定した結果であり，図の上はこの１次微分波形である。演算には，15点の平滑化微分を用いており，演算時間は約２秒であった。微分波形を表示する場合には図に示すように同一画面上に元の波形と共に０レベルの位置を変えて表示した。

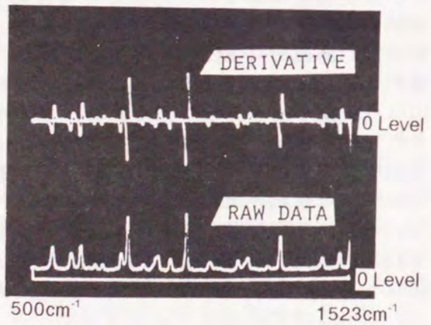


Fig.1.8. Experimental result of 1st derivative calculation. The Raman spectrum of Indene excited by Ar^+ laser between 500cm^{-1} and 1523cm^{-1} measured with 1cm^{-1} sampling interval (Lower). 1st derivative curve calculated by using 15 point curve-fitting (Upper).

(b) 差スペクトル

多成分からなる試料のスペクトルから，既知成分スペクトルを除去して残りの成分を同定する場合や，バックグランドを除去する場合には差スペクトル演算が有効である。この演算は対象となる２波形の波数範囲およびサンプル間隔が等しい時のみ有効となる。ここでは２種類の演算手法，すなわち，同一条件化で測定した２波形に対する直接減算法，および２波形間のゲインの違いを考慮したゲイン補正演算法を考案し，これらのプログラムを搭載した。後者では，２波形$D_A(k)$, $D_B(k)$に共通に含まれる単一ピークを実験者が指定すると，このピーク近傍５点の面積値S_A,S_Bを計算し，各波長kでの差スペクトルX(k)を次式より計算する。

$$X(k) = \{ (S_B / S_A)\, D_A(k) \} - D_B(k), \quad k = 1,2, \ldots, 1024 \qquad (1.1)$$

これにより指定したピーク高さが波形間で異なっていても差スペクトルでは完全に除去することができる。

Fig.1.9 にこの例を示す。(A)はFe-Ni-Cuホローカソードランプ(HCL)と水銀ランプを同時点灯したときの発光スペクトルであり，(B)はHCLのみの発光スペクトルである。この両波形から直接差スペクトルを求めた(C)では測定ゲインの差のため水銀ランプの特徴は現われていない。しかし(D)のゲイン補正演算では，両波形に共通に含まれる367.99ｎｍ近傍のピークを指定したことで水銀ランプのみの特徴(E)と同様の結果が得られている。

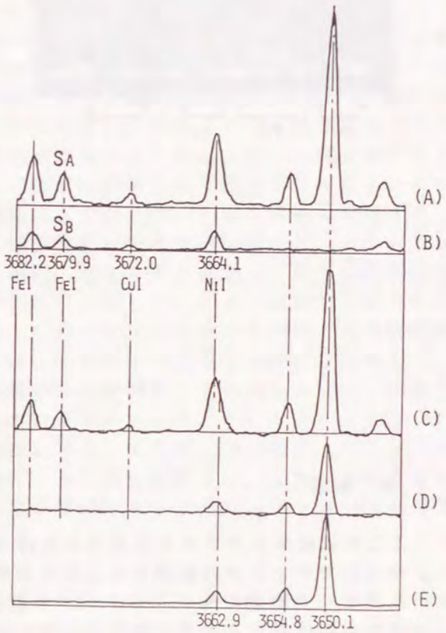
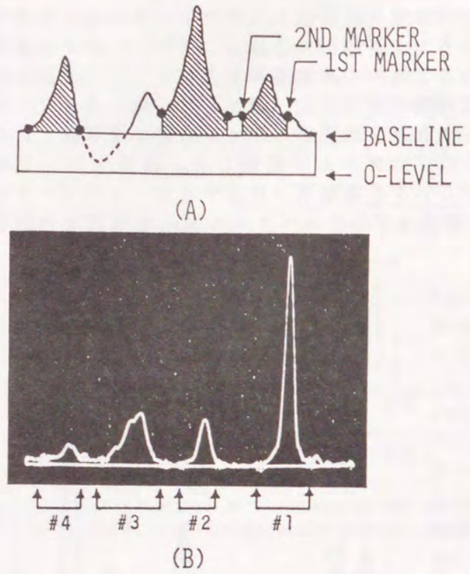


Fig.1.9. Experimental results of the spectral subtraction: (A) emission spectrum of two lamps: a Fe-Ni-Cu hollow cathode lamp and a Hg lamp; (B) emission spectrum of a HCL; (C) result of the direct subtraction of (B) from (A); (D)result of the subtraction of (B) from compensated (A) as multiplied by S_B / S_A (area ratio of two peaks at 367.99nm); (E) emission spectrum of a Hg lamp.

(c) 面積計算

混合物試料のスペクトル波形から各成分量を推定する場合，通常各成分固有のピーク波形の面積を用いる。この計算は，厳密には各ピークをガウス型関数やローレンツ型関数と仮定して分離しておく必要があるが，簡単な定量分析ではFig.1.10 に示すように適当なベースラインを減算した後，ピーク波形をその両側の谷部で切り取り，この面積を求めるだけでも充分な場合も多い。ここではこの原理に基づき，まずCRT上でベースラインを設定し，続いて輝度マーカを移動させて(B)に示すようにピークの両端２点を順に指定し，この間の面積を計算して(C)に示すようにプリンタに出力する。




```
* MODE ?
AREA CALCULATION
THRETHOLD LEVEL    2730
    AREA(/CM)        %
01003.6 - 01034.4   45.8    #1
01058.8 - 01080.0   11.4    #2
01091.2 - 01131.4   27.8    #3
01144.2 - 01169.8    8.8    #4
```

(C)

Fig.1.10. Experimental results of peak-area calculation: (A) explanatory illustration of peak-area calculation; (B) output on the CRT; (C) output on the printer.

1.4 結言

ここでは従来のアナログ出力のみを持つ分光機器に接続して，そのデータをオンラインでディジタル処理することを目的とした専用装置を開発した。本装置はパルスモータ駆動のモノクロメータを直接駆動可能であり，アナログ/ディジタルどちらの信号も入力が可能な汎用性の高い装置である。入力したデータに対する処理として，実時間での平滑化，ピーク検出，ピーク面積計算，差スペクトル計算等の機能を持ち，これにより，測定現場での定量・定性分析，測定条件の検討などが容易に行なえる。また，すべてのデータ収集・処理の過程はCRTに表示されるためデータの監視が可能であり，さらに対話形式によるパラメータの修正機能は信頼性の高いデータの収集・処理のために有効である。

本装置は，測定現場での実時間分析と共に，より複雑な演算を伴う高度なデータ処理のための前処理として，情報量の確認をする上でも有効である。

第2章　新しいディコンボリューション手法の提案と分光データの処理

2.1 序

分散型分光機器を用いて測定した分光波形は機器固有の応答関数の影響を受けて歪を受けたものとなっている。この応答関数を決定する最大の要因は分光器の入射スリットと射出スリットの幅である。両スリット幅がある程度狭くなると分散素子の有効領域による制限も受ける。また電気系の応答特性も制限要因となる。スリット幅が狭くなれば応答関数はデルタ関数に近ずき，観測波形の分解は向上する。しかし反面入射光量は減少し，信号対雑音比 (SNR) は低下する。このような応答関数の影響を取り除くため，特に赤外域の吸収スペクトル測定では演算処理によるディコンボリューション法が1932年 Burger & Citteri[8] 以来種々提案，実行されている[7)-10)]。これらのディコンボリューション法は一般にスリット幅の拡がりによる波形の歪みの回復を目的としており，正確なスリット幅が既知であれば，測定波形の分解能を向上させることができる。しかしスリット幅が未知または正確に推定できない場合には，正しい波形は回復されず誤差を含んだものとなる。例えば，遠隔操作に基ずく分光機器などではスリット幅を直接に測定することが不可能な場合もある。また過去の測定波形を使用する場合には，そのスリット幅が未知の場合もある。このような場合，測定波形自体から正確な装置関数を推定することが必要となる。従来，分光波形に対してこのような推定を試みた例はないが，音声・画像処理の分野では，信号のケプストラムを利用した装置関数推定法が提案されている[11)]。本研究ではこの方法を1次元分光波形に応用して，測定データのみから測定に用いた分光機器の装置関数，すなわちスリット関数の推定を試みた。さらにこれを応用したホモモルフィック・フィルタリング[12)-15)]に基づき，スリット関数の正確な形状がわからなくてもディコンボリューションが行なえるブラインド・ディコンボリューション法を提案する。また，求められたスリット関数の特徴を積極的に利用した平滑化ディコンボリューション法も提案しその効果を評価した。

2.2 ケプストラムを用いたスリット関数推定

2.2.1 観測波形と装置関数の関係

いま観測波形と装置関数の関係を，次の条件下で考える。

（1）全測定範囲内においてスリット幅は不変である。

（2）全測定範囲に比べてスリット幅は十分狭い。

これらの条件は通常の測定でも十分満足される。ここで波数をν，測定波形を$g(\nu)$，真の波形を$s(\nu)$，装置関数を$h(\nu)$とおくと，これらは次のコンボリューションで表現される。

$$g(\nu) = s(\nu) * h(\nu) + n(\nu) \tag{2.1}$$

ただし $n(\nu)$は加法的な雑音であり，* はコンボリューションを表す。両辺のフーリエ変換をとると，

$$G(x) = S(x)\,H(x) + N(x) \tag{2.2}$$

となる。ここで $x=1/\nu$ であり，$G(x), S(x), H(x), N(x)$ は各々$g(\nu), s(\nu), h(\nu), n(\nu)$のフーリエ変換を表す。

今雑音がなく，かつ$h(\nu)$または$H(x)$ が既知でかつ $H(x) \neq 0$ である場合，信号$s(\nu)$のフーリエ変換$S(x)$ は，

$$S(x) = G(x)F(x), \tag{2.3}$$

$$F(x) = 1 / H(x). \qquad H(x) \neq 0 \tag{2.4}$$

として与えられる。$F(x)$ はディコンボリューション・フィルタ関数である。雑音が含まれる場合の信号回復には種々の方法が提案されているが，もっとも一般的な方法は，ウィナーフィルタリング法であり，

$$F(x) = \frac{H^*(x)}{|H(x)|^2 + \Phi_n(x) / \Phi_s(x)} \tag{2.5}$$

なるフィルタが使われる。ただし$\Phi_n(x)$ と $\Phi_s(x)$ は各々雑音と信号のパワースペクトルを表し，$H^*(x)$ は$H(x)$ の複素共役関数を表す。

(2.4), (2.5)式から明らかなように，いずれの場合でも$h(\nu)$または$H(x)$の正確な値が必要である。

これに対してOppenheim[12]らにより提案された信号値の統計計算に基づくホモモルフィック・フィルタリング法ではこのような系の出力信号$g(\nu)$ から装置関数$h(\nu)$ を推定し，入力信号$s(\nu)$ を回復することができる。この手法は音声や画像解析の分野で利用されているが，分光波形に適用するためには，音声や画像信号に比べてデータ数が少ないため正確な統計量計算が困難であり，計算に工夫が必要である。

いま分光器の入射スリットと射出スリットが等しい場合を考えるとスリット関数は次式の三角状関数となる。

$$h(\nu) = (T-|\nu|) / T^2 \qquad |\nu| \le T \tag{2.6}$$

$$= 0 \qquad |\nu| > T$$

ただしTはスペクトルスリット幅である。$h(\nu)$のフーリエ変換は

$$H(x) = \left(\frac{\sin(\pi T x)}{\pi T x} \right)^2 \tag{2.7}$$

となり，フーリエ面において周期的にゼロ点を持つ。この特徴に注目してCannon

ら[3]の位相回復法を応用すれば，スリット幅Tが求められる。

まず全体の波形をN個の小区間に分割する。この時，雑音が無視できるとすれば各区間内では，

$$g_k(\nu) = s_k(\nu) * h(\nu) \tag{2.8}$$

となる。ただし$g_k(\nu), s_k(\nu)$ は各々測定波形と真の波形をN個の小区間に分割した時のk番目の区間の信号波形を，また記号* はコンボリューションを表す。これより各分割信号のフーリエ変換は，次のように表される。

$$G_k(x) = S_k(x)H(x) \tag{2.9}$$

ここで，$G_k(x), S_k(x)$ は $g_k(\nu), s_k(\nu)$ のフーリエ変換を表す。(2.9)式の対数をとって平均をとると

$$\frac{1}{N}\sum_{K=1}^{N} \mathrm{Log}|\,G_k(x)\,| \cong \frac{1}{N}\sum_{K=1}^{N} \mathrm{Log}|\,S_k(x)H(x)\,|$$

$$= \frac{1}{N}\{\sum_{K=1}^{N} \mathrm{Log}|\,S_k(x)\,|\} + \mathrm{Log}|\,H(x)\,| \tag{2.10}$$

となる。ここで(2.10) 式の両辺のフーリエ変換をとって対数フーリエ変換として定義されるケプストラムに変換すると，

$$C_g(q) = C_s(q) + C_h(q) \tag{2.11}$$

と表される。ただし，$C_g(q), C_s(q)$ は各々観測および真の信号の平均のケプストラム，$C_h(q)$ はスリット関数のケプストラムであり，q は ケフレンシ(1/x) を表す。ここで$C_h(q)$について考えると(2.7)式より，

$$\mathrm{Log}\,|H(x)| = \mathrm{Log}\left(\frac{\sin(\pi T x)}{\pi T x} \right)^2$$

$$= 2\,\mathrm{Log}\,|\sin(\pi T x)| - 2\,\mathrm{Log}(\pi T) - 2\,\mathrm{Log}\,|x| \tag{2.12}$$

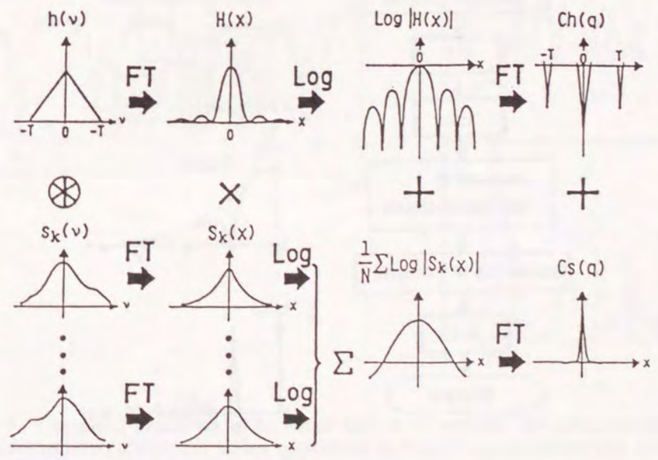


Fig.2.1. Process of generating the cepstrum of the slit function, Ch(q), and the cepstrum of the sections of the spectrum Cs(q).

を得る。(2.12)式右辺第１項は πTx =n π（n は整数）となる点において -∞となり，第２項は定数，第３項は対数関数となる。この結果，$C_h(q)$ は q =±T において負のピークを持つ。一方 $C_s(q)$ に関しては，一般に Log | $S_k(x)$ | が周期性を持たないことから，原点以外に大きなピークは持たない。したがって(2.11)式を計算することにより，そのピーク位置から q =±T の値，すなわち装置関数の幅が求められる。Fig.2.1 はこの計算式の関係を示したものである。

2.2.2 赤外吸収スペクトルへの適用アルゴリズム

(a) 計算アルゴリズム

分散型分光器を用いた赤外吸収スペクトル測定においては透過率波形がスリット関数によるコンボリューションを受ける。したがって，測定波数範囲内でスリット関数が一定である透過率波形に対してのみ上述の方法が適用できる。

実際のアルゴリズム上ではスリット幅推定精度を上げるため，バックグランドの除去，波形の分割におけるＳＮ比の高い部分の効果的な利用法についても考慮する必要がある。これらの点を含めたプログラムのフローチャートを Fig.2.2 に示す。

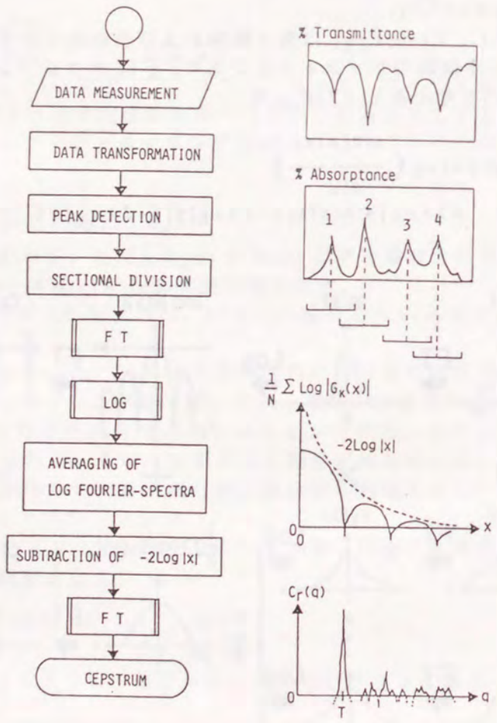


Fig.2.2. Flow chart of the spectral slit-width estimation.

まず，直流成分を除去するために透過率波形 T(v) を吸光率波形 S(v) =1 - T(v) に変換する。波形の分割は吸光率波形上でのピークを中心としてその両側一定幅を取ることでＳＮ比の高いデータを効率的に利用する。この後 (2.10) 式に基づき Log フーリエスペクトルの平均値を計算する。ここでさらに(2.12)式中に現われる - 2 Log | x | の項を除去して，符号を反転し，

$$C_r(q) = -C_s(q) + \mathbf{F}[2\,\mathrm{Log}\,|x|] \qquad (2.13)$$

としてケプストラムを計算する。ただし F はフーリエ変換を示す。このケプストラム上で原点とは異なる最大ピーク位置をさがし，これよりスペクトルスリット幅を決定する。

(b) シミュレーション実験

本手法の有効性を確認するため計算機により疑似赤外吸収スペクトル波形を発生させ，スリット幅推定精度について検討した。Fig.2.3 は波形の分割法について比較・検討した結果である。

Fig.2.3(a) は計算機により発生させた疑似赤外吸収スペクトル波形である。この波形は，10個の吸収ピークを合成した後三角状関数でコンボリューションし，さらに正規不規則雑音を重畳したものである。赤外吸収ピークは一般に吸光度波形においてローレンツ型関数となることから，直接観測される透過率波形 T(v) を次式のように表した。

$$T(v) = 1 - S(v) = 1 - \exp\left\{-bc\varepsilon_0 \frac{\Delta v^2}{(v - v_0)^2 + (\Delta v)^2}\right\} \qquad (2.14)$$

ただしｂは光路長，ｃは濃度，ε_0, v_0, Δv は各々吸収ピークの吸光係数，波数，半値

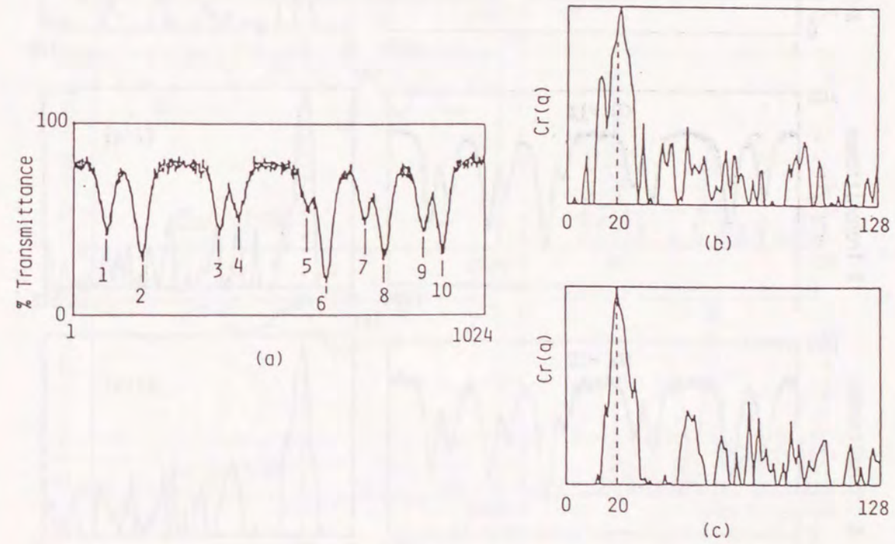


Fig.2.3. Computer simulation of slit-width estimation method: (a) computer-generated spectrum with ten absorption peaks, expressed as Eq.(2.14), convolved with a triangular slit function, and added the Gaussian noise, (b) the cepstrum Cr(q) of the averaged log-Fourier-spectrum of 7 sections regularly sampled, (c) same as (b) but sampled by 10 sections irregularly so that peaks center in the individual sections.

半幅を表す。波形全体のサンプル点数は1024点，スリット幅Tは20点とした。また正規不規則雑音の標準偏差は透過率に換算して2%とした。

Fig.2.3(b)は1分割を256点として隣り合う分割どうし50%ずつ重畳させながら，すなわち128点ずつシフトさせながら順に全体を7個に分割したときのケプストラム $C_r(q)$ である。この結果では最大ピーク位置は22となり，正しいスリット幅は得られない。一方，Fig.2.3(c)は同一の波形を用いて，各吸収ピーク位置が各分割の中心に来るように10区間に分割してケプストラムを計算した結果である。この場合には正確にスリット幅の値T=20が推定されている。Fig.2.3(b)でのスリット幅推定誤差の要因は雑音成分よりもむしろフーリエ変換での打ち切り演算に起因するものである。ただしこの実験では，(b),(c) いずれの場合にも，打ち切り演算誤差を最小化するためにハニング窓を使用した。

Fig.2.4 は雑音成分に対する影響を調べた結果である。吸収ピーク波形はFig.2.3と同一であり，雑音はすべて正規不規則雑音として，その標準偏差をFig.2.4(a)は0%，Fig.2.4(b)は1%，Fig.2.4(c) は2% とした。(a)から(c)いずれの場合にもスリット幅はケプストラム上で最大ピークをとる位置として正確に推定されている。ただし，ピークの形状は無雑音の場合が最も鋭くなっている。

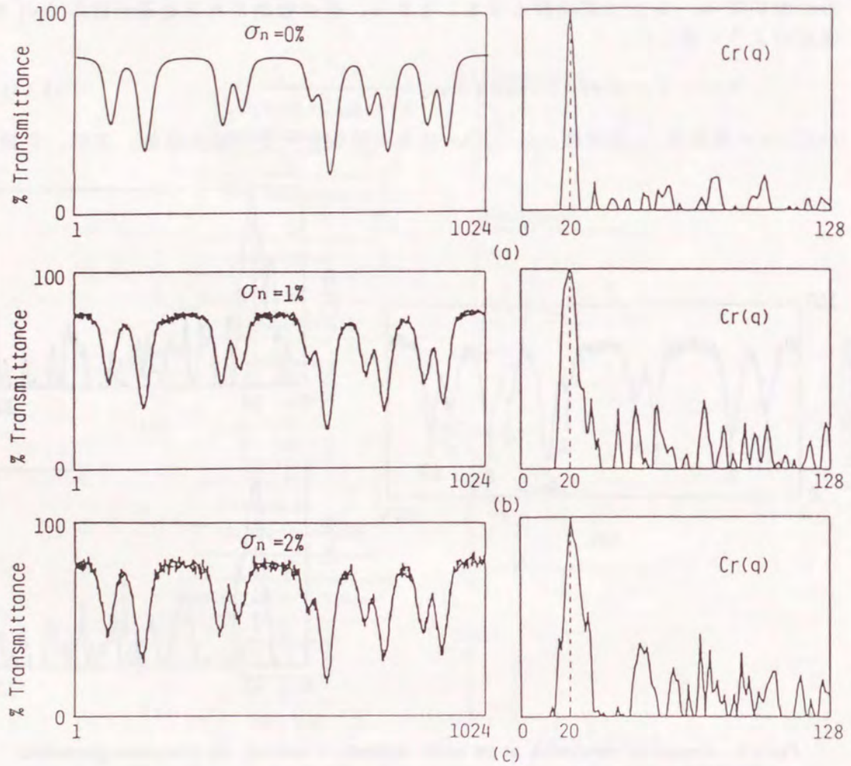


Fig.2.4. Computer simulation results of spectral slit-width estimation from the spectra with different noise level: (a) noise free spectrum and the cepstrum Cr(q); (b) noisy spectrum (σ_n=1% of transmittance) and the cepstrum; (c) same as (b) but σ_n=2%.

Fig.2.5 は異なるスリット幅 T=5, 20, 40, 80 に対するスリット幅推定結果を示したものである。雑音成分は加えていないが，実測値に近づけるためデータはすべて12ビットに量子化した。いずれの結果でも正確なスリット幅がケプストラム上での最大ピーク位置として推定されている。

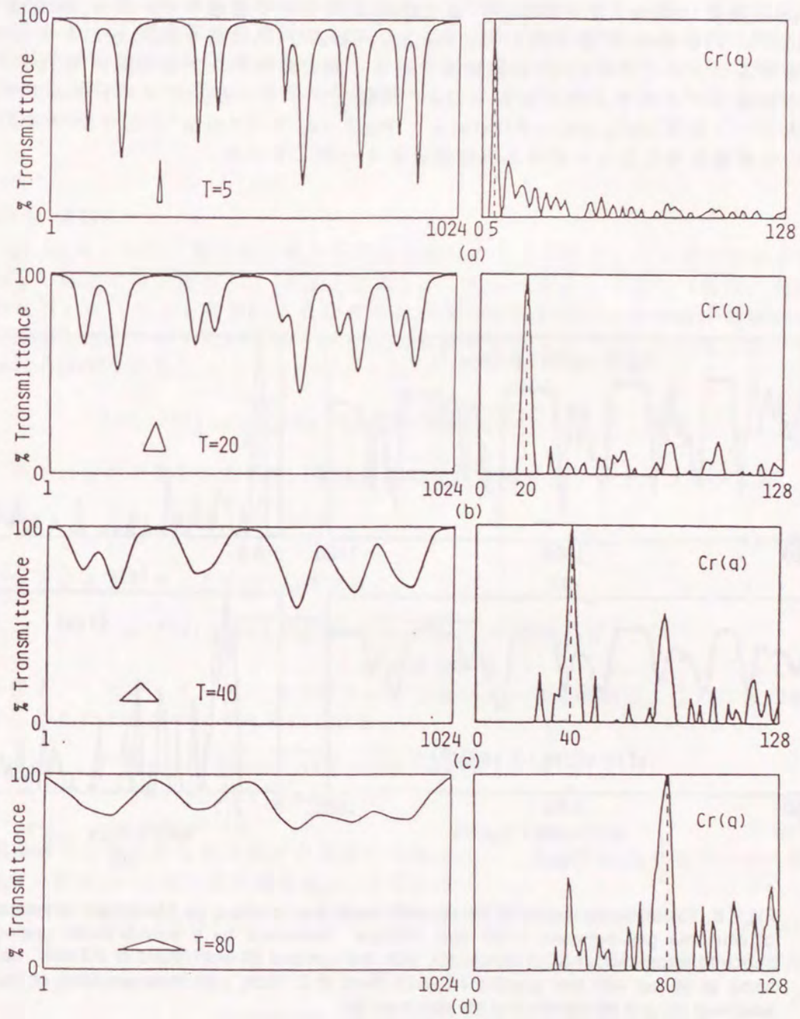


Fig.2.5. Computer simulation results of spectral slit-width estimation from spectra convolved with different slit-widths: (a) computer-generated spectrum convolved with the slit (the width T=5) and the cepstrum; (b) same as (b) but with the slit width T=20; (c) T=40; and (d) T=80, respectively.

(c) 実測した赤外吸収スペクトル波形への適用

赤外分光光度計による吸収スペクトル測定は，スリット関数をほぼ三角状関数として近似できることから，本手法の適用に適している。Fig.2.6(a)および(b)はアンモニアガスの吸収スペクトルを複光束回折格子分光光度計，JASCO model A3，を用いて測定した結果である。スペクトルスリット幅はFig.2.6(a)では0.8 cm^{-1}，Fig.2.6(b)では 2.16 cm^{-1} に固定して測定した。ただしこれらの値は，機械的なスリット幅と分光光度計のスペクトル分散より算出した。測定は，サンプル間隔0.1cm^{-1} 毎に1100cm^{-1} から1000cm^{-1}まで1000点について透過率 0% から 100% までを12ビット(0-4096)に量子化した。Fig.2.6(c)および(d)は各々Fig.2.6(a)および(b)に対するケプストラム $C_r(q)$ 計算結果である。測定時のサンプル間隔が 0.1cm^{-1} であるためケプストラムの分解も 0.1cm^{-1} 間隔となっている。ケプストラム上での最大ピーク位置はFig.2.6(c)では0.8cm^{-1}，Fig.2.6(d) では2.2cm^{-1}となりケプストラムの分解能を考えるといずれも実測値とよく一致している。

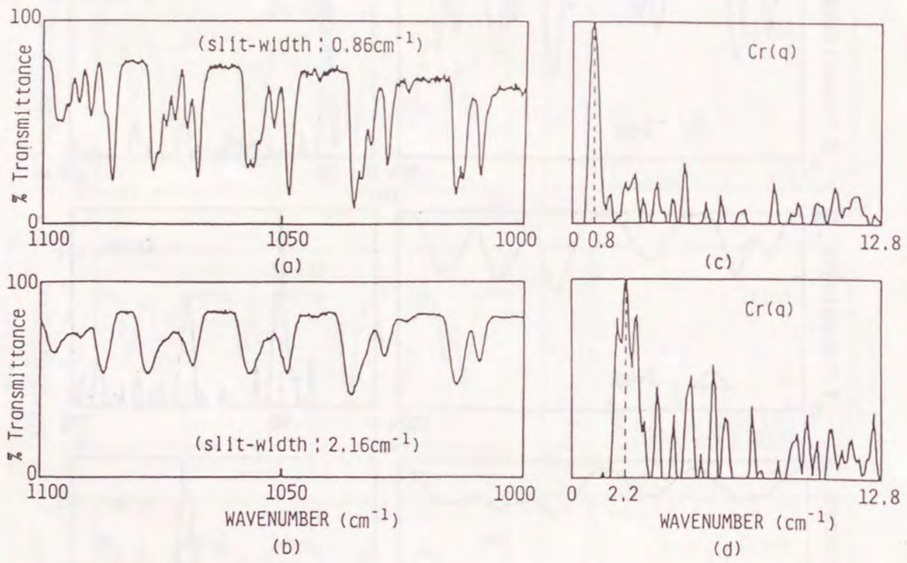


Fig.2.6. Experimental results of the slit-width estimation method: (a) Absorption spectrum of ammonia gas between 1100 and 1000cm^{-1} measured by a double-beam grating spectrophotometer, JASCO model A3, with the spectral slit-width fixed at 2.16cm^{-1}; (b) same as (a) but with the spectral slit width fixed at 2.16cm^{-1}; (c) cepstrum Cr(q) of the spectrum (a); and (d) cepstrum of the spectrum (b).

2.3 ホモモルフィック・フィルタリングによるブラインド・ディコンボリューション

上述の方法によりスリット幅が推定できればスリット関数が確定し，観測波形に対して既存のディコンボリューション法を適用することができる。しかしスリット関数が三角状関数にならない場合（例えばスリット幅が小さいときには回折光の影響によりガウス型関数になり，入射スリットと射出スリットの幅が異なるときには台形になる）または正確なスリット関数の形がわからない場合には，上述のスリット幅推定法は適用できない。ところが，信号波形の平均的な周波数特性が推定できれば以下のようにホモモルフィック・フィルタリング法に基づいてディコンボリューション（ブラインド・ディコンボリューション）を行なうことができる。

2.3.1 原理

(2.10)式において真の波形を小区間に分割してその対数フーリエスペクトルを平均した関数の母関数を Log | P(x) | とおく。これは対象とする波形（吸収，発光，散乱等）をスリット関数による歪みのない高分解の分光器で多種類の資料について測定したときの平均的関数であり，対象波形によって一定の形状をとると予想される。すなわち，

$$\mathrm{Log}\,|P(x)| \cong \frac{1}{N}\sum_{k=1}^{N}\mathrm{Log}\,|S_k(x)| = \overline{\mathrm{Log}\,|S_k(x)|} \qquad (2.15)$$

と表すことができる。ここで，観測波形の分割平均対数フーリエスペクトル

$$\frac{1}{N}\sum_{k=1}^{N}\mathrm{Log}\,|G_k(x)| = \overline{\mathrm{Log}\,|G_k(x)|} \qquad (2.16)$$

との差をとることにより(2.10)式より

$$\begin{aligned}\mathrm{Log}\,|P(x)| - \overline{\mathrm{Log}\,|G_k(x)|} &\cong \overline{\mathrm{Log}\,|S_k(x)|} - \overline{\mathrm{Log}\,|G_k(x)|} \\ &= -\mathrm{Log}\,|H(x)| \end{aligned} \qquad (2.17)$$

を得る。したがって，ディコンボリューションフィルタ関数は，この指数関数をとることにより次のように求められる。

$$\begin{aligned}F(x) &= \exp\{-[\,\overline{\mathrm{Log}\,|S_k(x)|} + \overline{\mathrm{Log}\,|G_k(x)|}\,]\} \\ &\cong \exp\{-\mathrm{Log}\,|H(x)|\} \\ &= 1/|H(x)| \end{aligned} \qquad (2.18)$$

観測波形に加法的な雑音成分が含まれる場合には，各分割区間でのフーリエ変換成分の関係 (2.9) 式に雑音成分 $N_k(x)$ が加わり，

$$G_k(x) = S_k(x)\,H(x) + N_k(x) \qquad (2.19)$$

と表される。この場合のディコンボリューションフィルタ関数は (2.17) 式と同様に次のように求められる。

$$\mathrm{Log}\,|P(x)| - \overline{\mathrm{Log}\,|G_k(x)|} \cong \overline{\mathrm{Log}\,|S_k(x)|} - \overline{\mathrm{Log}\,|S_k(x)H(x) + N_k|} \qquad (2.20)$$

ここで Log | P(x) | も分割平均から求められ，かつ対数平均操作に関して，

$$\overline{\mathrm{Log}\,|P_k(x)|} = \mathrm{Log}\,\overline{|P_k(x)|} - \gamma \qquad (2.21)$$

の関係（γ はEulerの定数）が (2.20) 式各項について成立することから，

$$\mathrm{Log}\,|F(x)| = \mathrm{Log}\,\left|\frac{P(x)}{G_k(x)}\right| \cong \mathrm{Log}\,\left|\frac{\overline{S_k(x)}}{S_k(x)H(x)+N_k(x)}\right| \qquad (2.22)$$

さらにここでは振幅成分のみを扱っており，位相成分は考慮していないため，次のように絶対値をとることができる。

$$|F(x)| = \left[\frac{\overline{S_k(x)}}{S_k(x)H(x)+N_k(x)}\right]\left[\frac{\overline{S_k(x)}}{S_k(x)H(x)+N_k(x)}\right]^{*}$$
$$= \left[\frac{\Phi s}{\Phi_s|H(x)|^2+\Phi_n}\right]^{1/2} \qquad (2.23)$$

ここで Φ_s, Φ_n は各々信号と雑音のパワースペクトル $|S_k(x)|^2$, $|N_k(x)|^2$ を表す。この(2.23)式がホモモルフィック・ディコンボリューション関数となる[13]。

波形回復演算においては $|F(x)|$ のデータ点数が観測波形 $g(v)$ に比べて充分少ないことから $|F(x)|$ を一旦逆フーリエ変換して観測面関数 $f(v)$ に戻してからコンボリューション演算を行なう。すなわち，

$$s(v) = g(v) * f(v) = g(v) * \mathbf{F}[F(x)] \qquad (2.24)$$

2.3.2 母関数 Log|P(x)| の推定

装置関数の影響を受けていないピーク波形の形状は対象となる物理現象によって異なる。ラマン散乱スペクトルでは各ピークは次のような ローレンツ型関数となる。

$$s_k(v) = \frac{a_k\sigma_k^{\,2}}{(v-v_k)^2+\sigma_k^{\,2}} \qquad (2.25)$$

ただし v_k はピーク位置，a_k はピーク高さ，σ_k は半値半幅を表す。この時 v_k を中心とした $s_k(v)$ の対数フーリエ変換は次のような直線となる。

$$\mathrm{Log}|S_k(x)| = \mathrm{Log}\,\left|\frac{a_k\sigma_k}{2}\exp\{-\sigma_k|x|\}\right|$$
$$= -\sigma_k|x| + C_k \qquad (C_k \text{ は定数}) \qquad (2.26)$$

したがって，半値半幅，ピーク高さの異なるローレンツ型ピーク波形の平均対数フーリエ変換 $\overline{\mathrm{Log}|S_k(x)|}$ もやはり直線となり，母関数は

$$\mathrm{Log}\,|P(x)| = -a_1|x| + a_0 \qquad (2.27)$$

として直線で与えられる。ガウス型ピークではそのフーリエ変換もガウス型関数となり，$\mathrm{Log}|P(x)|$ は二次式で表される。通常の光スペクトルピークはローレンツ型関数とガウス型関数の中間をとる場合が多く，したがって母関数 $\mathrm{Log}|P(x)|$ もたかだか2次の滑らかな関数となる。

赤外吸収ピークでは(2.14)式の形状を持つが，吸光度 « 1 の場合，$s(v)$ は近似的にローレンツ型関数になり，多数のピークの平均である$\mathrm{Log}|P(x)|$ は直線として近似できる。この直線の傾きは，スリット関数が(2.6)式の三角形で表され，雑音特性$N_k(x)$が白色であれば，X=0の点における$\mathrm{Log}|G_k(x)|$の傾きより求められる。すなわち(2.9)式において X=0 の近傍では，$N_k(x)$の傾きは0，$H(x)$の傾きも0であることから，$S_k(x)$の傾き，すなわち$|P(x)|$の傾きが得られる。

2.3.3 演算アルゴリズム

実際の計算アルゴリズムではFig.2.2と同様の手順で $\overline{\mathrm{Log}|G_k(x)|}$ まで求めた後 Fig.2.7 に示すように$\mathrm{Log}|P(x)|$ を推定する。これは雑音成分の存在を考慮して $\overline{\mathrm{Log}|G_k(x)|}$ の原点近傍5点を2次多項式に適合し，これより原点での接線の式を求める。続いて(2.21)式のフィルタ関数を計算し，この指数変換を逆フーリエ変換して，観測波形とのコンボリューションを計算することにより次のように元の波形を復元する。

$$s(v) = g(v) * f(v) \qquad (2.28)$$
$$f(v) = \mathbf{F}[\exp(\mathrm{Log}|F(x)|)] \qquad (2.29)$$

Fig.2.8 はFig.2.4(b) のシミュレーション波形について $\overline{|\mathrm{Log}\,S_k(x)|}$ と $\overline{\mathrm{Log}|G_k(x)|}$ を示したものである。図より $\overline{|\mathrm{Log}\,S_k(x)|}$ がほぼ直線で近似できることがわかる。また $\overline{|\mathrm{Log}\,G_k(x)|}$ の原点での傾きが $\mathrm{Log}|G_k(x)|$ と一致するのがわかる。

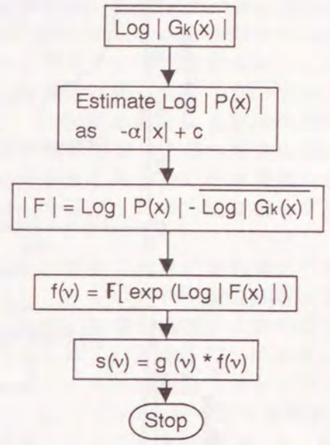


Fig.2.7. Flow chart of the blind-deconvolution method based on the homomorphic filtering.

Fig.2.9 はFig.2.6 の観測波形に対する$\mathrm{Log}|G_k(x)|$と推定された$\mathrm{Log}|P(x)|$ を示したものであり，Fig.2.10 はこれにより復元された波形である。図中の矢印で示したピーク位置は，Fig.2.5(a) の高分解スペクトル(スペクトルスリット幅 0.86cm^{-1}))の結果と比較すると±0.5cm^{-1}以内の誤差で一致しており，本手法により2倍以上の分解能の向上が達成されたことがわかる。

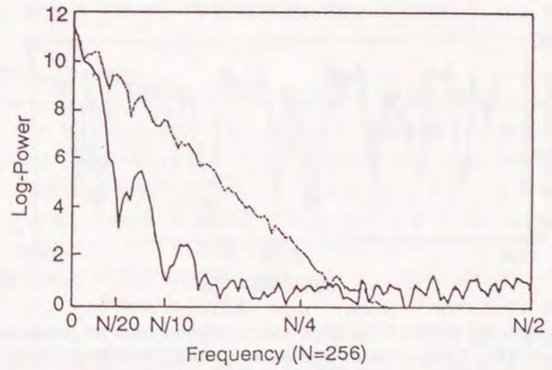


Fig.2.8. Averaged log-Fourier-spectra of a computer generated absorption waveform (doted line) and one which convoluted by a triangular slit function (solid line).

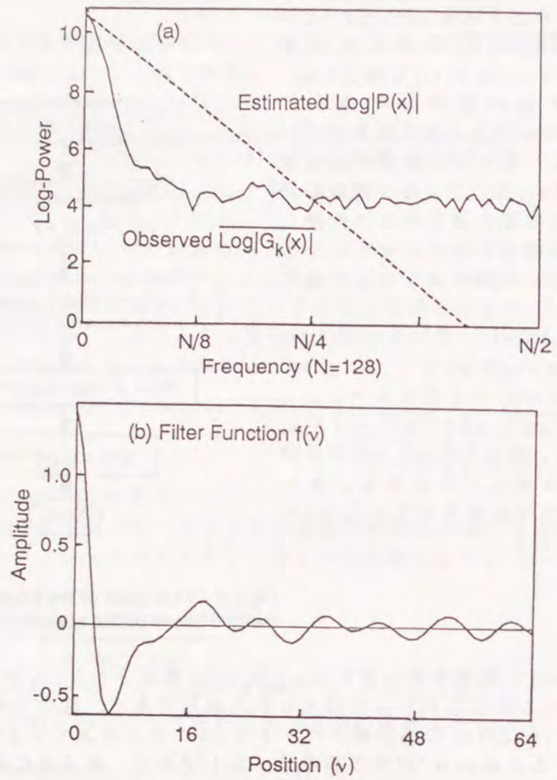


Fig.2.9. (a) An averaged log-Fourier-spectrum and an estimated prototype of the absorption spectrum of ammonia gas shown in Fig.2.6 (b). (b) A deconvolution function derived from (a).

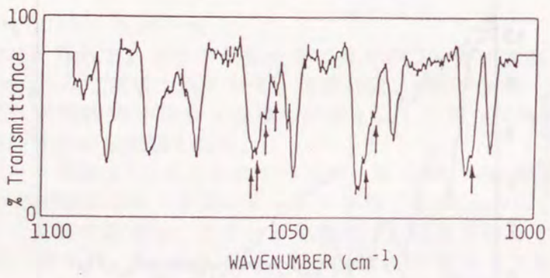


Fig.2.10. Experimental result of the blind deconvolution from an ammonia gas absorption spectrum shown in Fig.2.6 (b), measured with the spectral slit-width of 2.16cm^{-1}.

2．4　適応平滑化ディコンボリューション

スリット関数が三角形であることが既に分かっている場合には従来より用いられているBurger & Cittertらの反復法に基づく疑似ディコンボリューション法，その改良法，および(2.5)式で示されるフーリエ変換を用いたウィナーフィルタ法等を用いることができる。しかし，いずれもSN比の高いデータには有効であるが，SN比の低いデータでは雑音の影響で疑似ピークを発生する可能性が高い。この解決法として，反復法を用いて反復回数を適当な回で打ち切ったり，ウィナーフィルタ 法により適当なSN比を設定して疑似ピークの出現を押さえる方法も用いられるが，いずれの場合も一つの波形の中でSN比の異なる部分を持つ場合には，最適な結果を得ることは不可能である。また，観測波形をあらかじめ平滑化した後にディコンボリューション処理を実行する場合もあるが，この方法で得られる結果は真の波形を平滑化したものとなる。

しかし，スリット関数が三角状関数であることが明確であれば情報量を欠落することのない特定の平滑化関数を用いて平滑化し，さらにこの平滑化関数を含めてディコンボリューションを行なうことにより雑音の影響を抑制して真の波形を回復できる。このSN比の低いデータにも適用可能な新しい手法を以下に示す。

数値計算上の取り扱いを容易にするため(2.1)式を一定時間間隔でサンプルした時系列離散波形として表現する。すなわち，$g(v), s(v), n(v)$ の各々から等間隔 Δv でN点サンプルした値，$g_i, s_i, n_i\ (i=1,2,..,N)$ を要素とするベクトルを $\mathbf{g}$，$\mathbf{s}$，$\mathbf{n}$ と置く。また装置関数 $h(v)$ については各サンプル点に対応して $h_{ij}=h(v_i-v_j)$ を要素とする行列 $\mathbf{H}$ で表す。これにより(2.1) 式は次のように表現できる。

$$\mathbf{g}=\mathbf{H}\,\mathbf{s}+\mathbf{n} \tag{2.30}$$

いま装置関数行列が既知であるとして，測定波形 $\mathbf{g}$ より真の波形 $\mathbf{s}$ を推定する場合を考える。$\mathbf{H}$ が正則であり，かつ雑音がない(すなわち $\mathbf{n}=\mathbf{0}$)時には，$\mathbf{s}$ の推定値 $\bar{\mathbf{s}}$ を，$\bar{\mathbf{s}}=\mathbf{H}^{-1}\mathbf{g}$ として求められるが，雑音を含む場合には雑音成分が強調されることになる。平滑化法ではこの雑音成分を軽減するために，平滑化のための行列 $\mathbf{Y}$ を導入し，観測ベクトル $\mathbf{g}$ を平滑化する。すなわち，

$$\mathbf{Yg}=\mathbf{YHs}+\mathbf{Yn} \tag{2.31}$$

ここで $\mathbf{Y}$ を適当に選択して $|\mathbf{YH}|\neq\mathbf{0}$ かつ $\mathbf{Yn}=\mathbf{0}$ となるようにとれば

$$\bar{\mathbf{s}}=(\mathbf{YH})^{-1}\mathbf{Yg} \tag{2.32}$$

より真の波形 $\mathbf{s}$ が求められる。実際の計算においては $|\mathbf{YH}|\approx 0$ となる位置で解が不安定となるため，

$$\bar{\mathbf{s}}=(\mathbf{YH}+\gamma\mathbf{I})^{-1}\mathbf{Yg} \tag{2.33}$$

として $\mathbf{YH}$ の対角要素に安定化のための定数 γ を加える手法が用いられる[9]。(2.32)式で$\mathbf{Y}$ として $\mathbf{H}^t$（$\mathbf{H}$ の転置行列）を用いれば線形最小２乗法と同一の形となる。また(2.34)式は $\gamma=\Phi_n/\Phi_s$ とおけばウィナーフィルタと同一の形となる。

いまスリット関数を(2.6)式で表される三角形 $h(v)$ として，これに対する最適な平滑関数$\mathbf{Y}$ を求める。$h(v)$の周波数特性は(2.7)式で表され，$x=n/T\ (n=\pm1,\pm2,...)$ において０点を持つ。フーリエ面でのディコンボリューションではこの０点での除算による雑音成分の増大の効果を抑えるため，(2.5) 式に示すウィナーフィルタ法が用いられる。しかしこの方法は $\Phi_s(x)/\Phi_n(x)$ すなわちSN比を波形全体に渡って一定であるとして扱っており，原子吸収，赤外吸収スペクトルなどピークの局在する波形への適用は不利である。これに対して平滑化法は波形全体に渡って均一な雑音分布を持つものと仮定して，この雑音を平滑化除去した後ディコンボリューションを行なうため，雑音による影響は極めて少なくなる。

測定波形**g**が**h**によって帯域制限を受けていることを考慮すると平滑化行列**Y**としては，(1) ローパスフィルタの特性を持つ，(2) **H**(x) と異なる0点を持たない，(3) 原点対象であり演算操作によって位相変化を生じない，(4) 波数面での演算が容易である，などの特性が要求される。これらの点を考慮すると**Yの周波数特性** $\mathbf{Y}(x)=\mathbf{H}(x/k),(k=1,2,..)$ を満たすものが有効である。ただしkが大きくなると通過帯域が広がり高周波域での雑音除去効果が低下する。したがってk=1または2が適当である。

Fig.2.11(a) の $\mathbf{Y}_1(x),\mathbf{Y}_2(x)$ は各々$\mathbf{H}(x),\mathbf{H}(x/2)$ を表したものであり，図には同時に**YH** の周波数特性，および波数面での形状 $h(\nu),y_1(\nu),y_2(\nu)$ を示した。$\mathbf{Y}_1(x)$ を用いた場合にはローパスフィルタとしての効果は大きいが低周波域が抑制される。これに対して $\mathbf{Y}_2(x)$ は信号成分の欠落もなく，かつローパスフィルタの効果も大きいことからディコンボリューションには最も効果的と考えられる。Fig.2.11(b)には比較のために矩形の平滑化関数 $\mathbf{S}_r(x)$ を用いた場合の周波数特性を示した。この場合$\mathbf{S}_r\mathbf{H}$は低周波数域で位相が反転することからディコンボリューションには不利である。また演算時間は一般的な反復法(Gauss-Seidel法や共役勾配法など)を利用する場合，**YH**の次元の2乗に比例する。この点からも$\mathbf{Y}_1(x)$よりも$\mathbf{Y}_2(x)$の方が有利である。

Fig.2.12はコンピュータ・シミュレーションにより平滑化ディコンボリューション法の効果を調べた結果である。プログラムはBASIC言語で作製し，パーソナルコンピュータ PC9801F (NEC) 上で実行した。ここでは(a)に示した2つのガウス型関数ピークより成る波形を三角状関数でコンボリューションし，さらにこの最大値の5%の標準偏差を持つ正規分布雑音を加えたものを疑似観測波形として用いた。

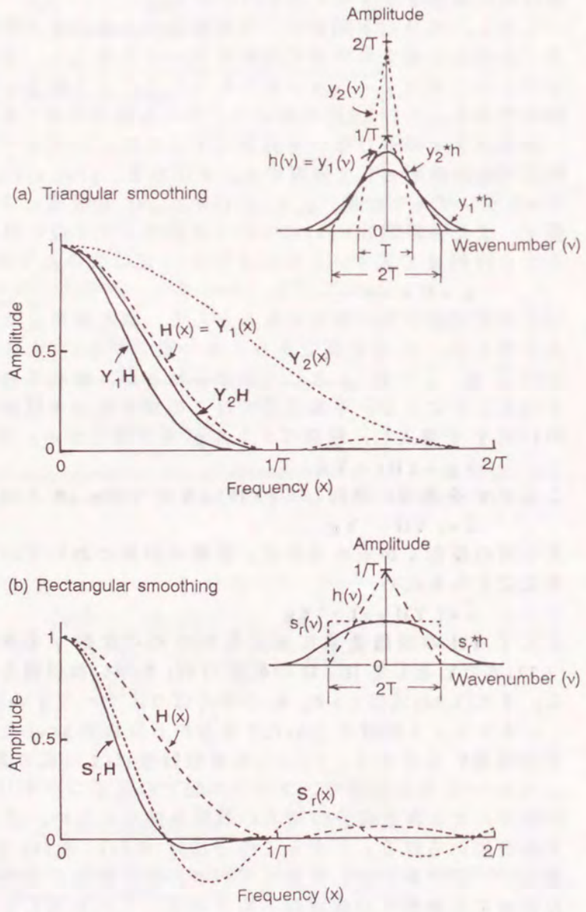


Fig.2.11. Spectral characteristics of the triangular slit-function and several smoothing functions: (a) Triangular smoothing functions; (b) rectangular smoothing functions.

ディコンボリューション演算には(2.33)式に基づきGauss-Seidel反復法を利用した。平滑化をしない場合には(b)に示すように雑音のために収束していない。また矩形関数による平滑化では，(c)～(e)に示すように平滑化幅を変えても正確な波形は回復できていない。これに対し，三角状関数による平滑化ではFig.2.11の$\mathbf{Y}_2(x),\mathbf{Y}_1(x)$に対応する(g),(h)において元のピークが回復されているのがわかる。ただし演算時間は(g)では52秒，(h)ではこの約4倍の205秒を要しており，実用上は(g)の平滑化が最も有効と考えられる。プログラム容量は，平滑化関数が異なってもほとんど変わらず全体で約5Kバイト，さらにデータ領域として(観測データ数≦60)バイト程度を要するのみである。

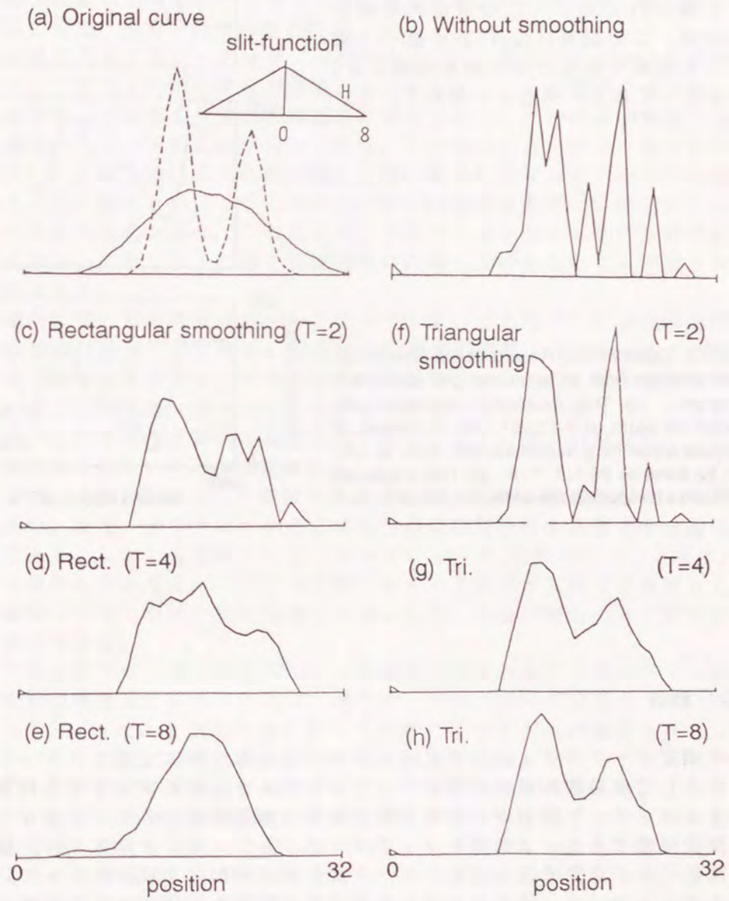


Fig.2.12. Results of computer simulation for the smoothing-deconvolution: (a) The original curve (dotted line) and convoluted curve by a triangular slit-function; (b) A result of deconvolution without smoothing; (c)~(e) Results of the rectangular smoothing-deconvolution with (c) T=2, (d) T=4, and (e) T=8, respectively; (f)~(h) Results of rectangular smoothing-deconvolution with (f) T=2, (g) T=4, and (h) T=8, respectively.

Fig.2.13はFig.2.6に示した赤外吸収スペクトルの一部(1040cm^{-1}～1025cm^{-1},データ点数150点))に平滑化ディコンボリューション法を適用した結果である。(a)の低分解測定データ(スペクトルスリット幅2.2cm^{-1})に対し，(b)はこのスリット幅の1/2の幅の三角状関数で平滑化した結果(演算時間5.4分)，(c)は最小二乗推定結果(演算時間14.6分)，(d)は高分解(スペクトルスリット幅0.9cm^{-1})の結果である。明らかに(b)では(d)に現われている各ピークが明確に現われており，この手法の有用性がわかる。この結果は(c)に示す最小二乗法よりも明確であると共に演算時間も1/3程度となっており，明らかに優れている。

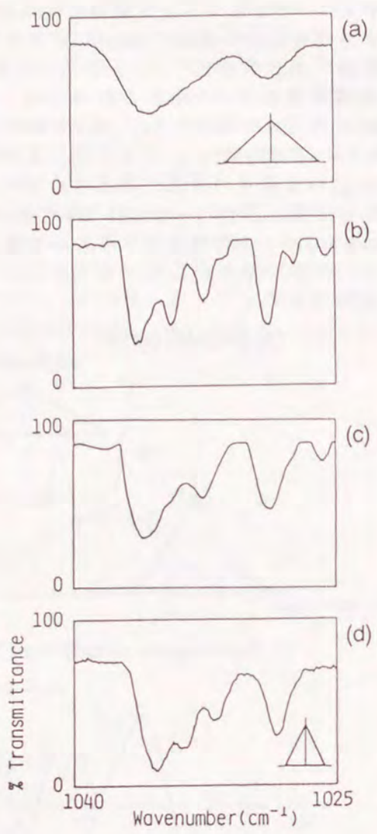


Fig.2.13. Experimental Results of the smoothing-deconvolution from an ammonia gas absorption spectrum: (a) The measured spectrum with spectral slit-width of 2.16cm^{-1}; (b) The result of triangular smoothing-deconvolution from (a) with T=4; (c) same as (b) but T=8; (d) The measured spectrum with spectral slit-width of 0.86cm^{-1}.

2.5 結言

分光測定データのディコンボリューションを行なう際に必要なスリット関数の推定法として直接観測波形を用いてケプストラムから解析する手法を提案した。この手法はスリット関数が三角状関数であれば観測波形のみから正確なスリット幅を推定可能である。またディコンボリューションにおいてはスリット幅，スリット関数の形が未知であっても，ピーク波形の平均的な形状がわかっていればホモモルフィック・フィルタリングの応用で真の波形を回復できることを示した。

一方，スリット関数が正確に三角状関数であるとわかっている場合には，スリット幅推定手法と合わせて平滑化ディコンボリューション法を適用することにより，高速かつ高精度なディコンボリューションを実現できることを確認した。

第3章　非線形パラメータ推定法による高効率ピーク分離処理

3.1 序

一次元の光スペクトル波形においてはピークに関する情報，すなわちピークの位置，高さ，形状などのパラメータに観測対象物質の原子または分子構造，成分量，存在状態などが反映されている。したがって，試料の発光，吸光等のスペクトル波形に含まれるピークのパラメータを推定することによって，試料中に含まれる物質の定性，定量分析が可能となる。

観測波形に含まれるピークパラメータの抽出には，通常，各ピークをガウス型やローレンツ型などの解析関数で表現できると仮定し，この関数に含まれるパラメータを調整して波形を合成し観測波形に適合させる，いわゆる曲線適合法に基づく非線形パラメータ推定法が用いられる。この推定においては，第2章のディコンボリューション法により装置関数の影響を除去してピークの重なりを減少させておくことが望ましい。しかしSN比の低い高雑音波形では，雑音による疑似ピークの出現可能性が高く，このためディコンボリューションを行なわずに観測波形を直接用いて各ピーク形状を装置関数の影響を受けたものとして取り扱う方が実用的である。

曲線適合には，波形合成専用ハードウェアを用いる方法[16),17)]と中型以上の計算機による数値計算法[18),19)]がある。前者は分析機器に直結して用いられ，CRT上に合成波形と観測波形を表示して対話形式で適合を行なうため，操作者の持つ観測波形に対する先験情報（例えばピーク個数，特定のピーク位置など）を容易に取り入れることができる実用性の高い方法である。しかし適合精度は低く，また一意的な解が得られないなどの問題がある。

後者はピーク波形関数として複雑な関数型(Voigt関数など)を利用でき[20)-22)]適合精度も高い。反面，オフライン利用となるため実時間分析を必要とする現場には不向きである。しかし現在のパーソナルコンピュータ(以後パソコンと略す)の発展と普及状況を考えると，パソコン上でパラメータ推定が実現できれば分光機器に直接接続してオンラインでの処理も可能となり，応用分野も大きく拡大できることが期待できる。

そこで本研究では一次元の光スペクトル波形に含まれるピークパラメータを実時間で簡単に精度よく求めるために，操作性，プログラムの容易さにおいて優れたパソコンBASICによる効率の高いピーク分離アルゴリズムの開発を行なった。ただしパソコンでは大型計算機に比べて演算速度が極端に落ちることから，従来の計算アルゴリズムをそのまま利用するだけでは実用は困難である。このためまずパソコン上で各種非線形最適化手法に基づくパラメータ推定プログラムを作製して収束速度・精度を比較して最も効率的な手法を選択した。また高精度の初期値を得るために実験者による対話形式でのピーク検出手法を導入した。さらに演算時間短縮のための波形分割演算法とデータ点数の削減法についても考案し，実測波形に適用してこの有効性を確認した。

3.2 曲線適合の原理

曲線適合に基づくピーク分離法では，観測波形に適合させるべきピークの関数型およびベースラインの型の決定が重要となる[22]。ここでは多くの分光分析の現場において共通して利用できることを考慮して次の２つの仮定を置いた。

(1) ピーク波形は次式で示すガウス型関数またはローレンツ型関数で表され，一つの観測波形中のピークはすべて同一の型からなる。

ガウス型関数　　：$g(j,h,p,w) = h\exp(-\ln 2(j-p)^2/w^2)$　(3.1)

ローレンツ型関数：$r(j,h,p,w) = h/\{1+(j-p)^2/w^2\}$　(3.2)

ただし，jは離散変数，hはピーク高さ，pはピーク位置，wは半値半幅を表し，この仮定により，各ピークはいずれも３個のパラメータ，h, p, wで決定できる。これらの形状は赤外，可視，紫外域での発光，散乱，吸収などの分光波形に対して良い近似を与える。

(2) 観測波形中にベースラインを含まない。通常の観測波形にはベースライン成分が含まれるがここでは予めこれを除去した波形を扱う。

曲線適合ではどちらかのピーク型を選択し，いくつかのピークを合成してモデル波形を作り，この中に含まれるパラメータを観測波形との残差二乗和が最小となるように推定する。今，N個の離散点 j(=1,2,..,N) で測定した観測波形 y_j が n 個のガウスピークを持つとすると，これに対するモデル波形は，

$$c_j(\mathbf{p}) = \sum_{i=1}^{N} g_i(j, h_i, p_i, w_i) \qquad (3.3)$$

と表される。ただし$\mathbf{p}$はパラメータベクトルを表し，3n(=L) 個の要素 $(h_1,p_1,w_1,\ldots,w_n) = (x_1,x_2,..,x_L)$からなる。この$\mathbf{p}$を

$$E(\mathbf{p}) = \sum_{j=1}^{N} \{c_j(\mathbf{p}) - y_j\}^2 \qquad (3.4)$$

が最小となるように非線形最適化法を用いて推定する。

3.3 初期値の決定

(3.4)式の最小化演算ではピーク個数nの最適値は求められず，nは予め別の方法で正確に推定しておく必要がある。また各ピークの初期パラメータの精度は収束時間に大きな影響を及ぼす。そこでまず観測波形の平滑化２次・３次微分波形よりピークの個数，各ピークの初期パラメータを決定し，続いてこれらの結果をグラフィック表示して操作者が対話形式で修正する，高精度で融通性の高い方式を開発した。

3.3.1 平滑化微分法による初期値決定

Fig.3.1 に平滑化２次・３次微分法[5]を用いたパラメータ設定法の原理を示す。各ピーク位置は２次微分波形上で通常負の極小点を取る。この点を検出するため，まず観測波形(a)の平滑化２次微分波形(b)を求め，さらにこれを微分して３次微分波形(c)を求める。いずれの計算でも２次・３次式適合平滑化法を用いる。この

３次微分波形の０点より２次微分波形の負の極小点 p_1, p_2 を求め，これらの点の内，雑音レベル(s_h)以上の強度を持つ点をピークと判断し，ピーク位置，ピーク個数を決定する。

雑音レベルは観測波形を９点２次・３次式適合により平滑化した波形$\bar{y}_j$(j=1,2,..,N)と観測波形との残差二乗和より次のように求めた。

$$s_h = 3\bar{\sigma}_n$$
$$\bar{\sigma}_n = \{\sum_{j=1}^{N}(y_j - \bar{y}_j)^2/(N-1)\}^{1/2} \qquad (3.5)$$

ピーク高さの初期値h_iは，各ピーク位置での平滑化波形の強度$\bar{y}_{pi}$とした。この強度はピークの重なりが大きくなると大きな誤差を含むため，後の対話処理において実験者が簡単に修正できるようにした。

半値半幅w_iは，２次微分波形上でピーク位置からこれに隣接する極大点(３次微分波形上では０点)までの距離 d_{i1}, d_{i2} より次のように決定した。

$$w_i = f\ \max(d_{i1}, d_{i2}) \qquad (3.6)$$

$$f = \begin{cases} 1 & \text{(for Gaussian)} \\ 0.68 & \text{(for Lorentzian)} \end{cases}$$

ただしfは独立した単一ピークに対して正確な半値半幅を与える係数である。

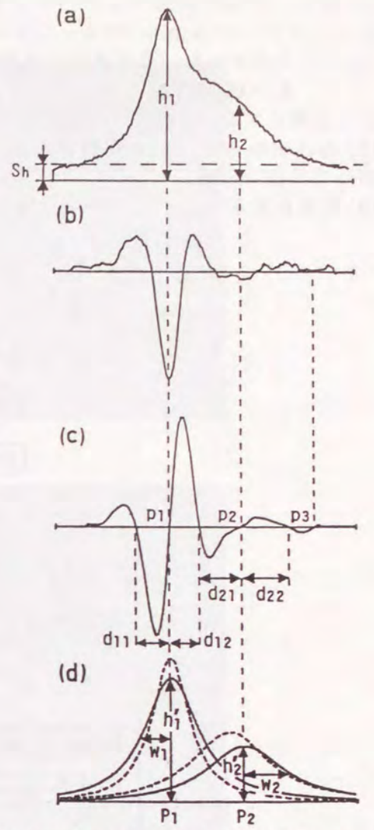


Fig.3.1. Explanatory illustrations of the peak-finding procedure based on the third derivative of the observed curve: (a) the observed curve; (b) the second derivative; (c) the third derivative; (d) estimated Lorentzian peaks (solid lines) and the original peaks (dotted lines).

3.3.2 対話形式による初期値修正

平滑化微分を用いる方法では平滑化の幅が適当でないと雑音による偽ピークの発生や信号ピークの欠落を生じる。実験者の持つ先験情報を取り入れることも不可能である。そこで，上で得られた結果を元に各ピーク波形をグラフィック表示し，実験者がこれを見ながら対話形式で必要なパラメータを修正する機能を加えた。この機能を含めた初期値決定アルゴリズム全体のフローチャートをFig.3.2に，ディスプレイへの表示例をFig.3.3に示す。まずディスプレイ上に観測波形①，平滑化２次微分波形④，上述の演算法に従って求めた各ピーク波形②を表示し，さらに全ピークの合成波形と観測波形との差波形③も表示する。平滑化２次微分演算における平滑化幅(Ws)は，実験者が観測波形を見て適宜入力する⑤。対話処理では実験者がこれらの結果を見て次の４機能のどれかを選択する。

(1) 各ピーク毎に採用するか否かを選択し，さらに必要ならば新たなピークを一組のパラメータ(h_i,p_i,w_i)によって与える⑥(S-mode)。
(2) ピーク高さh_iを，合成波形の面積S_cと観測波形の面積S_yが一致するように

$$h_i' = (S_y/S_c)\, h_i \qquad (3.7)$$

として補正する。この補正はピークの重なりが大きいときに有効となる(A-mode)。
(3) 現在求められている初期値をすべて棄却し，平滑化微分演算に戻って再計算を行なう(N-mode)。
(4) 初期値設定を完了する(Y-mode)。

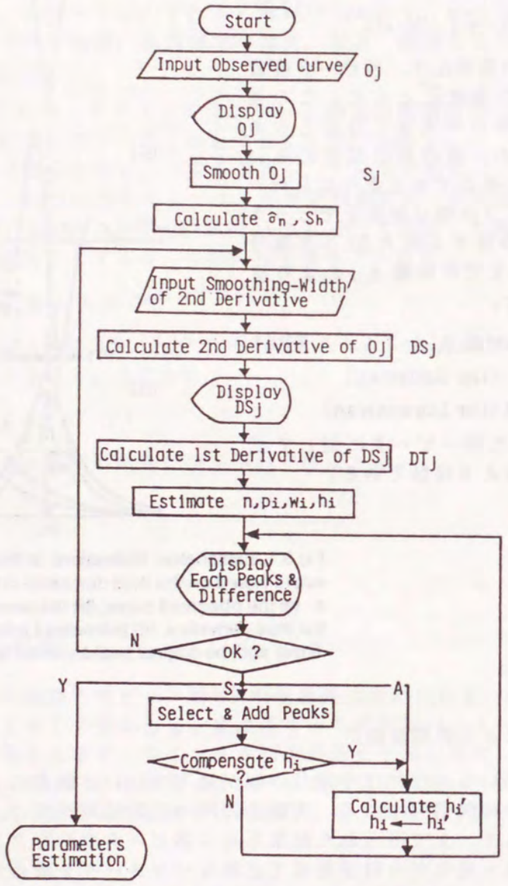
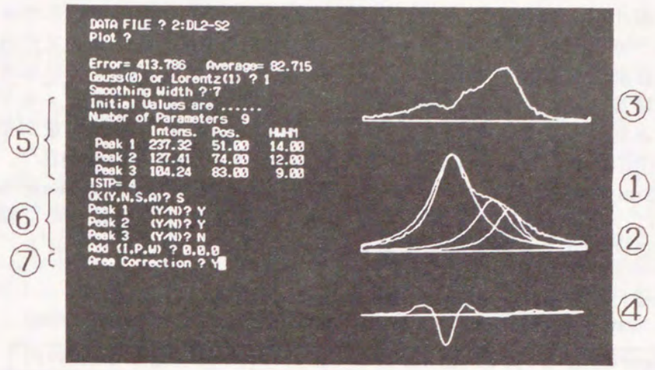


Fig.3.2. Flowchart of the peak-finding procedure.

Fig.3.3は微分演算による初期値(a)に対して対話処理により雑音ピークを除去し，ピーク高さの補正を行なった例(b)であり，差波形が③から⑧に明らかに減少して修正が有効に行なわれたことがわかる。

(a)



(b)

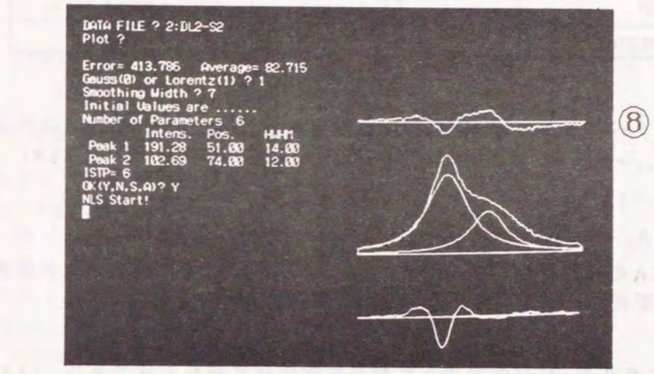


Fig.3.3. Photographs of the display at the man-machine interactive process for the parameter setting: (a) automatically calculated results; (b) manually adjusted results by rejecting a noise peak.

3.4 非線形最適化プログラムの開発

(3.4)式の最小化には反復法に基づく種々の非線形最適化法が用いられる。すでにJ. Pitheら[23]が赤外吸収スペクトルを対象に，FORTRANプログラムでの各種アルゴリズムの詳細な比較検討を行なっている。本研究では彼らの結果は参考となるが，初期値精度の違い，およびFORTRANとBASICでの演算法，使用メモリなどの違いが演算速度にも影響すると考えられる。そこで，必要メモリ容量が少なく演算の簡単なGN(Gauss-Newton)法[24]，DFP(Davidon-Fletcher-Powell)法[25]，直線探索に基づくSimplex法[26,27]，およびGN法を安定化したDLS(Damped-Least-Squares)法[28]の各々についてBASICプログラムを開発し，収束特性を比較した。開発したプログラムのメモリ占有量と演算領域容量はTable 1に示すとおりである。

Table 1. Memory occupation by the developed curve-fitting algorithms.
(P: number of parameters to be estimated, N: number of the observed data.)

Algorithm	Program area (Kbyte)	Working area (byte)
GN, DLS	5.5	$(2P^2 + PN + 2N) \times 4$
DFP	7.0	$(3P^2 + 8P) \times 4$
Simplex	6.2	$(P^2 + P + N) \times 4$

(a) GN法

パラメータベクトルのm+1回目の反復推定解 $\mathbf{p}_{m+1}=(x_1,..,x_L)^T$ を次式より求める。

$$\mathbf{p}_{m+1} = \mathbf{p}_m + \mathbf{e} \tag{3.8}$$

$$\mathbf{e} = -(\mathbf{A}^T\mathbf{A})^{-1}\mathbf{A}^T\mathbf{s}$$

$$A_{jk} = \partial c_j(\mathbf{p}_m)/\partial x_k, \quad s_j = c_j(\mathbf{p}_m) - y_j, \quad j=1,2,..,N, \quad k=1,2,..,L$$

ただし$\mathbf{A}^T$は$\mathbf{A}$の転置行列を表し，$\mathbf{e}=(e_1,..,e_L)$は各反復でのパラメータ修正量である。$\mathbf{A}$の各要素はピークの関数型より解析的に計算する。

(b) DLS法

GN法での修正量$\mathbf{e}$に制限を加えて収束を安定化させた方法であり，(3.8)式の代わりに$\mathbf{A}^T\mathbf{A}$の対角要素に次のように一定値を加える。

$$\mathbf{e} = -(\mathbf{A}^T\mathbf{A} + \gamma\mathbf{D})^{-1}\mathbf{A}^T\mathbf{s}, \qquad \gamma > 0 \tag{3.9}$$

$$\mathbf{e} = -(\mathbf{A}^T\mathbf{A} + \gamma\mathbf{I})^{-1}\mathbf{A}^T\mathbf{s}, \qquad \gamma > 0 \tag{3.10}$$

ただし$\mathbf{D}$は$\mathbf{A}^T\mathbf{A}$の対角要素のみをもつ対角行列，$\mathbf{I}$は単位行列を表す。ここでは便宜上(3.10)式をDLS-D法，(3.11)式をDLS-I法と呼ぶ。γはダンピング係数である。γを反復毎に最適化する方法も提案されているが，パソコンで実行する場合にはこの演算時間も無視できないため，ここでは一定値とした。

(c) DFP法

共役勾配法の一手法であり，$E(\mathbf{p})$に関する1次微分ベクトル $\mathbf{g}(g_k=\partial E(\mathbf{p})/\partial x_k;\ k=1,2,..,L)$ を用いて次式により反復計算を進める。

$$\mathbf{p}_{m+1} = \mathbf{p}_m + \mathbf{e}, \qquad \mathbf{e} = -\lambda\mathbf{H}_m\mathbf{g}_m \tag{3.11}$$

$$\mathbf{H}_{m+1} = \mathbf{H}_m + \frac{\mathbf{e}\mathbf{e}^T}{\mathbf{e}^T d\mathbf{g}_m} + \frac{\mathbf{H}_m d\mathbf{g}_m d\mathbf{g}_m^T \mathbf{H}_m^T}{d\mathbf{g}_m^T \mathbf{H}_m d\mathbf{g}_m}, \quad d\mathbf{g}_m = \mathbf{g}_{m+1} - \mathbf{g}_m$$

ただしλは定数であり，各反復毎に$E(\mathbf{p}_m-\lambda\mathbf{H}_m\mathbf{g}_m)$が最小となるように決定する必

要がある。これには3次多項式近似法[24]を用いた。また$\mathbf{H}_m$の初期値$\mathbf{H}_0$には本来単位行列が用いられるが，ここでは収束を速めるため$E(\mathbf{p})$の$\mathbf{p}$に関する2次差分値の逆数 $1/\{\Delta^2E(\mathbf{p})/\Delta x_k^2\}$ を要素とする対角行列を用いた。

(d) Simplex法

Nelderら[26]により提案された直線探索に基づく方法であり，最初にL+1個のパラメータ点(これをSimplexと呼ぶ) $\mathbf{p}_k$ (k=1,2,..,L+1) を作り，$E(\mathbf{p}_k)$の値を直接計算・比較して，この中で最も大きな値を取る点$\mathbf{p}_H$を次式により新しい点$\mathbf{p}_N$に移す。

$$\mathbf{p}_N = \mathbf{p}_H + \alpha(\mathbf{p}_G - \mathbf{p}_H) \tag{3.12}$$

ただし$\mathbf{p}_G$は$\mathbf{p}_H$のみを除いた残りL点の重心である。修正量を決定する係数αは2.0, 2.0+0.5m, 1.4, 0.5 の順に設定し，最初に$E(\mathbf{p}_N) < E(\mathbf{p}_H)$を満たす点$\mathbf{p}_N$を$\mathbf{p}_H$と交換する。ただしα=2.0+0.5m の場合のみm=1,2,.. と順に距離を延ばし，$E(\mathbf{p}_N)$が最小となる点を探索する。この方法では最初のL+1点(初期Simplex) が収束速度に大きく影響する。そこで前節の方法で求めた初期値$\mathbf{p}_0=(x_1,x_2,..,x_L)$を初期Simplexの重心点とする方法(重心法: Simplex-A)と，一つの頂点として用いる方法(端点法: Simplex-B)の2手法を比較検討した。各手法での初期Simplex点，$\mathbf{p}_1,..,\mathbf{p}_k,..,\mathbf{p}_{L+1}$の変分量$(\mathbf{p}_k - \mathbf{p}_0)=(\Delta h_{1,k},\Delta p_{1,k},\Delta w_{1,k},...,\Delta w_{L/3,k})$にはパラメータの種類毎に初期値精度が異なることを考慮して次のような相対変分量の上限β_h, β_p, β_wを設けた。

$$\Delta h_i/h_i < \beta_h, \quad \Delta p_i/p_i < \beta_p, \quad \Delta w_i/w_i < \beta_w \tag{3.13}$$

3.4.1 収束速度の比較

各アルゴリズムの収束速度を比較するためFig.3.4に示す2個のローレンツ型ピークからなる疑似観測波形を用いてシミュレーション実験を行なった。すべての演算はPC9801F(NEC, CPU8086)を用いてBASICインタプリタで実行した。

Fig.3.5にこの結果を示す。図中の縦軸は残差二乗和$E(\mathbf{p})$，横軸は演算時間を表す。初期値にはすべて同一の値を用いた。図中のεは収束の基準となる雑音分散の推定値であり，$\varepsilon = N\bar{\sigma}_n$とした。

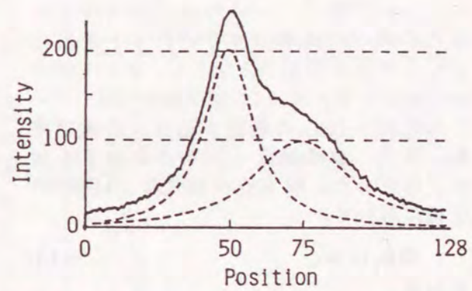


Fig.3.4. A computer generated curve synthesized from two Lorentzian peaks and white Gaussian noise (standard deviation, σ_n=4).

いずれの手法でもほぼεに収束しており収束点での各パラメータの推定誤差はすべて1%以内であった。図より明らかなように収束速度はGN法が最も早く，DFP法の約1/3の時間でεに収束している。Simplex法では重心法，端点法ともに初期Simplex変分量の上限を変えて試みたが，いずれもGN法やDFP法より高速にはできなかった。

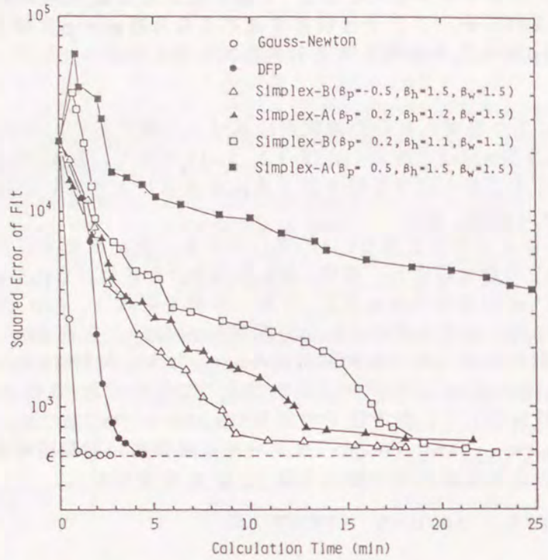


Fig.3.5. Convergence characteristics of three optimization methods, GN (Gauss-Newton), DFP (Davidon-Fletcher-Powell) and Simplex, applied to the curve fitting for the computer generated curve shown in Fig.3.4.

Fig.3.6は収束速度の速いGN法とDFP法について，多重ピークに対する収束時間の変化を調べた結果である。テスト波形はすべてデータ点数128点とし，2～10個のローレンツ型ピーク(半値半幅5～20，ピーク高さ80～200)の範囲を適当な間隔で重ね，さらに標準偏差 σ_n=1の正規雑音を加えて合成した。収束点の判定は，k回目の反復において，

$$E(\mathbf{p}_k) < N\bar{\sigma}_n \qquad (3.14)$$

または

$$|(E(\mathbf{p}_{k-1}) - E(\mathbf{p}_k)) / E(\mathbf{p}_k)| < 0.01 \qquad (3.15)$$

を満たす場合とした。図中の各点での数字は上の条件を満たすまでの反復回数であり，GN法ではいずれも4回，DFP法では共役勾配法の特長からほぼパラメータ数Lに近い回数で収束しいている。

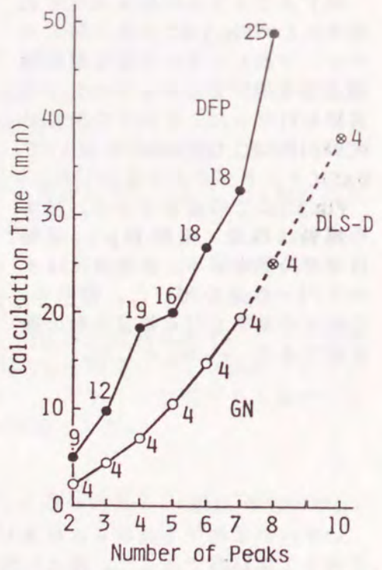


Fig.3.6. Calculation time of the curve fitting for various number of overlapped Gaussian peaks by using GN and DFP methods. The number written on each point indicates the iteration count to be converged. DLS-D method is used instead of GN method for cases over 8 peak curves.

両手法とも収束時間はピーク個数と共に急速に増加していくが，常にDFP法よりGN法の方が高速である。ただしピーク個数8個以上ではGN法は発散し，DFP法でも収束はするものの真値から大きく外れている。このピーク個数の増加に伴う発散は，ピークの重なりの増大による初期値精度の低下に起因すると考えられる。実際初期ピーク高さの真値に対する最大相対誤差は，ピーク個数2, 5, 8, 10に対して各々7.8%，21.4%，34.7%，37.5% となっている。図中，GN法での8および10ピーク時の演算はDLS法を用いたときの時間であり，この時はほぼ真値に収束している。

以上の結果よりGN法，DFP法，Simplex法の中ではGN法が最も効率がよく，さらにDLS法では安定性もあることがわかる。また一度に多数のピークを同時分離するよりも，観測波形を適当に分割して，一度に分離するピークの数をせいぜい6個程度とするのが有利であるといえる。

3.4.2 DLS法の収束特性

上の結果より最も効率的と考えられるDLS法についてその特性を調べるとともに，最適ダンピング係数をシミュレーション実験により求めた。

Fig.3.7はDLS法におけるダンピング係数γの効果を調べるためFig.3.4の波形に大きな雑音成分(標準偏差＝最大ピーク値の5%)を加えたものをテスト波形として，収束特性を調べた結果である。(a)にDLS-D法，(b)にDLS-I法を示す。初期値設定の誤差(真値との差)はピーク高さ，ピーク位置で40%，半値半幅で110%とかなり大きい。GN法(Fig.3.7(a)のγ=0の場合)では4回の反復で雑音分散和εの近傍に収束している。これに対してDLS-D法では0＜γ＜0.1では加速され，γ≧1では減速されている。一方DLS-I法では0＜γ＜1でGN法とほぼ一致し，γ=1ではやや減速されている。

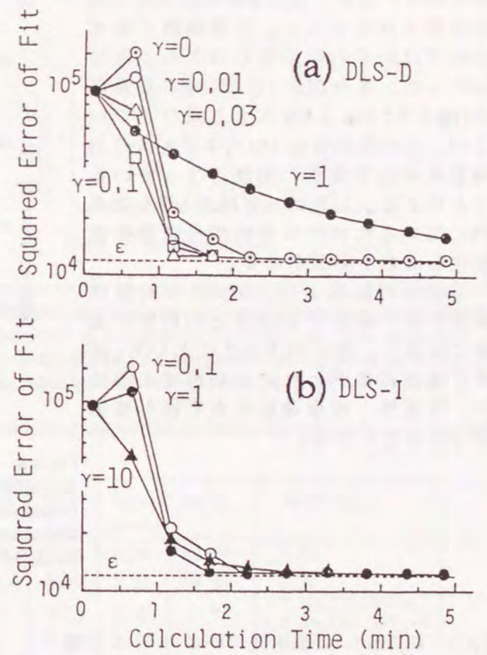


Fig.3.7. Convergence characteristics of DLS curve-fitting method for the computer generated curve same as shown in fig.3.4 except the noise, σ_n=10. g is the damping factor. (a) DLS-D method and GN method (γ=0). (b) DLS-I method.

Fig.3.8は同様のシミュレーションを(a)に示す8個のローレンツ型ピークを含む波形(雑音標準偏差＝最大ピーク強度の0.5%)に対して行なった結果である。(b)に

DLS-D法，(c)にDLS-I法を示す。初期値の最大誤差はピーク高さ30%，ピーク位置20%，半値半幅120%である。GN法では発散しているがDLS-D法では$\gamma > 0.001$，DLS-I法では$\gamma > 0.01$で収束している。ただしγが大きすぎると収束速度は極端に低下し，反復回数が増加している。

この結果ではγの最適値はDLS-D法で0.03，DLS-I法で0.1となった。しかしさらに高速にかつ安定に収束させるためには各反復毎に残差二乗和が最も急速に減少する値を選択するのが効果的と考えられる。Fig.3.8中のγ^*はこの考えに基づきγ値を反復毎に変更したときの結果である。k回目の反復に対するγ値γ_kはDLS-D法で$\gamma_0 = 0.1, \gamma_1 = 0.03, \gamma_i = 0.01$ $(i \geq 2)$，DLS-I法で$\gamma_0 = 10, \gamma_1 = 1, \gamma_i = 0.1$ $(i \geq 2)$とした。

DLS-D法では明らかに収束速度が加速されているが，DLS-I法では大きな利点は得られていない。反復演算に要する時間はいずれの手法もほとんど差はなかった。またDLS-I法ではγの最適値がFig.3.7とFig.3.8で大きく異なっているが，この原因は(3.10)式中の$\mathbf{A}^T\mathbf{A}$の対角要素が信号強度の関数となっていることによる。したがってDLS-I法を効果的に用いるためには予め信号強度を規格化しておく必要がある。

これらの結果より，DLS法は初期値精度が低い場合でもGN法と同程度の速度で収束し，特にDLS-D法においてγ値を反復毎に変更したγ^*を利用する方法が，安定性，収束速度の点で最も効果的であるといえる。

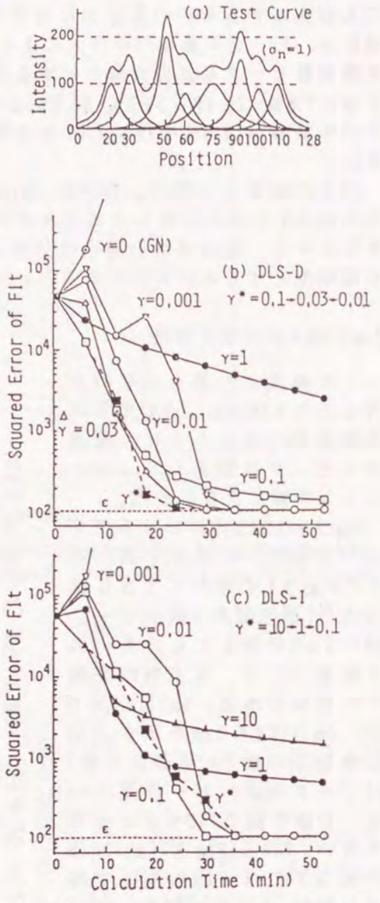


Fig.3.8. Convergence characteristics of DLS curve-fitting methods for the computer generated curve contained 8 Lorentzian peaks. (a) The computer generated curve. (b) DLS-D method. (c) DLS-I method.

3.4.3 DLS法による発光スペクトルの分離

Fig.3.9はDLS-D(γ^*)法を用いてNiホローカロードランプ(HCL)の発光スペクトルを分離した例である。観測波形(a)は分光器(島津，MAF)スペクトルスリット幅を0.1nmとして，サンプル間隔0.04nm毎に収集した260点のデータからなる。(b)は本手法によりこの波形を5個のガウス型ピークと1次式ベースラインに分離した結果である。ベースラインは波形の両端を結ぶ直線で近似した。(c)は収束時の残差波形である。また(d)は(b)の分離結果の精度を検討するため同一ランプをスペ

クトルスリット幅0.017nmとして高分解測定し，さらに本手法でピーク分離した結果である。

Table 2はこれらの分離結果を表にしたものである。(d)では分離されている231.366 nmと231.398 nmのピークが(b)では分離できていないが，他のピークについては+0.07nm～-0.02nmの範囲内でよく一致している。Table 2中のRatioおよびRatio(d)は231.097nmのピーク面積を1.0と規格化したときの各ピークの面積をそれぞれの分離結果について計算したものである。この結果でも(d)との差は，重なりの大きなピーク3でも10%，他のピークでは7%以内であり，この程度の誤差であれば通常の分光分析には充分利用できる。演算時間は，初期値決定までに約2分，DLS-D法の反復に約15.7分，合計17.7分であった。

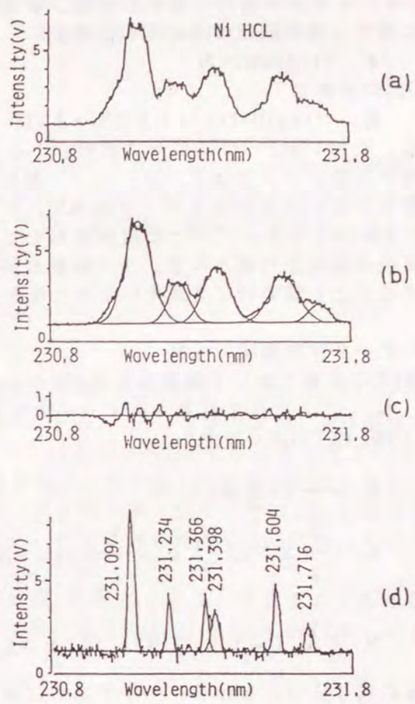


Fig.3.9. Results of the peak-separation for an emission spectra of Ni-HCL (Hollow-Cathod-Lamp). (a) Observed spectrum measured by the monochromator (Shimadzu, MAF) with the spectral slit-width of 0.1nm and sampled at intervals of 0.004nm. (b) The separated 5 Gaussian peaks. (c) The difference curve between the observed curve and the fitted one. (d) A high resolution spectrum of Ni-HCL measured with the spectral slit-width of 0.017nm.

Table 2. Estimated Gaussian-peak parameters of the Ni-HCL emission spectrum shown in Fig.3.9.

Peak	Intensity (V)	Position (nm)	HWHM (nm)	Area (nm·V)	Ratio	Ratio (d)
1	5.63	231.097	0.56	6.74	1.00	1.00
2	2.24	231.241	0.42	2.02	0.30	0.30
3	3.11	231.375	0.53	3.52	0.52	* 0.28(231.366nm) * 0.34(231.398nm)
4	2.57	231.602	0.57	3.12	0.46	0.43
5	0.97	231.722	0.39	0.80	0.12	0.19
Peak Shape = Gaussian , Baseline = 1.01(V) Number of Data = 260 , Convergence Time = 15 min 40 sec						

3.5 波形分割とデータ点数削減による高速化

DLS法による曲線適合に要する時間は乗算の回数によって評価できる。一回の反復に要する乗算回数は(3.4)式の計算で，

$$K_1 = (1/3)aNL + N \qquad (3.16)$$

(3.10)式の計算で

$$K_2 = \{(1/2)N+1)\,L^2 + \{(3/2)N + 3\}L \qquad (3.17)$$

となる。ただしaは一つのピーク波形の１点を計算するのに必要な乗算回数であり，ガウス型ピークでは７，ローレンツ型ピークでは４となる。したがってピーク個数の少ないときには全データ数Nが，ピーク個数が多いときにはパラメータ数Lが支配的となる。このため観測波形をピーク存在領域毎に分割して計算すれば演算の高速化が可能となる。また観測波形を一定間隔毎に間引いて演算点数を削減することも効率的な高速化の手段となる。

3.5.1 ピーク存在領域の分割

(3.9)式の計算において観測波形をr個の小領域に分割し，各区間内のデータ数を$N_1,..,N_r$，ここに含まれるパラメータ数を$L_1,..,L_r$とおくと，このときの乗算回数は(3.16),(3.17)式に対応して，

$$K_1' = \frac{1}{3}\,a\left(\sum_{i=1}^{r} N_iL_i\right) + N \qquad (3.18)$$

$$K_2' = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{r} N_iL_i^2 + \sum_{i=1}^{r} L_i^2 + \frac{3}{2}\sum_{i=1}^{r} N_iL_i + 3L \qquad (3.19)$$

と表される。ここで

$$N = \sum_{i=1}^{r} N_i,\ L = \sum_{i=1}^{r} L_i,\ \sum_{i=1}^{r} N_iL_i < NL,\ \sum_{i=1}^{r} N_iL_i^2 < NL^2,\ \sum_{i=1}^{r} L_i^2 \le L^2 \qquad (3.20)$$

の関係が成り立つことから，$r > 1$であれば演算時間の短縮が可能となる。この分割演算は結局，(3.9)式での行列$\mathbf{A}^T\mathbf{A}$の計算を，この対角要素にそった$L_1,..,L_r$次の小行列式に分解して計算することに対応し，対角要素から離れた要素に対する計算が省略されることになる。したがって各区間内にただ一つのピークを含むように分割したとき，すなわちr=ピーク個数となるときK_1', K_2'は最小値を取る。

実際の分割はFig.3.10に示すように行なう。まず初期値計算の過程で求めた雑音レベルS_nを３点以上連続して越える領域(図中のX_i)を抽出する。続いて初期値パラメータ$\mathbf{p}_0$より各ピーク(1,..,n)毎に強度がピーク値の20%以上となる領域Y_j(j=1,..,n)を求める。すなわち各ピーク位置，半値半幅の初期値p_j, w_jより，

$$Y_j = \{\, i : |i-p_j| < 2f\,w_j \,\},\quad j=1,..,n \qquad (3.21)$$

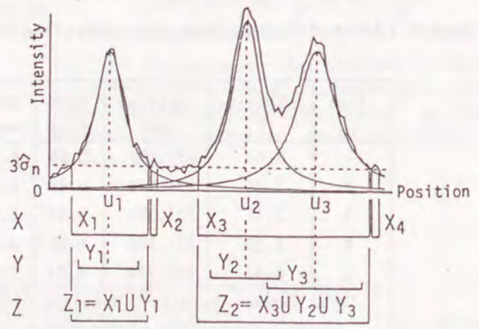


Fig.3.10. Explanatory illustrations of the principle of the peak-area selection. Xi, signal area with intensity over the threshold (noise) level; Yi, foot area of each peak; Zi, summed up area of Xi and Yi.

として計算する。ただしfは(3.6)式で与えられる定数である。

最後に領域X_iとY_iの和領域を求め，この中でピークの存在する領域$Z_1,..,Z_r$を抽出する。この操作によりピーク領域の分割と同時にピークの存在しない領域の削除も行なわれ，データ点数も減少して演算時間が効率的に短縮される。

3.5.2 演算点数の削減

曲線適合における演算時間を単純に短縮するためにはデータ数を等間隔で間引いて削減し，演算量を減少させればよい。すなわち目的関数として(3.4)式を直接には用いず，次式で示すようにデータを一定間隔d(整数)で間引いてデータ数で正規化した残差二乗和$E_d(\mathbf{p})$を用いる。

$$E_d(\mathbf{p}) = \frac{N}{M}\sum_{k=1}^{M}\{c_{kd+\alpha}(\mathbf{p}) - y_{kd+\alpha}\}^2 \qquad (3.22)$$

$$M = [(N-\alpha)/d]$$

ただし，ここでは簡単のため観測波形の分割は考えない。式中のα(=0～d-1)は演算に使用する先頭データ位置(通常α=0とする)，[ ]は整数化記号，Mは全演算点数(整数)を表す。この間引き演算により，(3.9)式のDLS法における行列Aの次元はM×Nに，ベクトル$\mathbf{s}$の次元はMに縮小される。したがって乗算回数は全体として約$M/N \cong 1/d$に減少する。しかし半面データ点数が減少することによって雑音の影響を受けやすくなり適合精度は低下する。そこで適合精度を一定に保つことのできるMの最小値をχ^2検定法に基づいて決定した。

今観測波形に含まれる雑音分散が位置(波長)によらず一定値σ_n^2であると仮定すると，$E_d(\mathbf{p})(M/N)(1/\sigma_n^2)$は次式で与えられる分散vをもつ自由度(M-L)の$\chi^2$分布に従う[29]。

$$v = \frac{E_d(\mathbf{p})\,M}{(M-N)\,N\,\sigma_n^2} \qquad (3.23)$$

自由度が大きくなればVは１に近づき適合精度は向上する。$v < 1.5$であれば通常の分光分析に応用する際の適合には充分であると考えられる。χ^2分布表[30]より95%の確率でこの条件を満たす自由度は25となり，これより最小演算点数M_{opt}を

$$M_{opt} = 25 + L \qquad (3.24)$$

とした。

またDLS法では通常初期３回程度の反復で急速に収束点に近づくことから，初期３回の反復は演算点数をM_{opt}以下に大幅に削減して大まかな解を求め，この解をもとにさらに演算点数をM_{opt}に切り替えて反復演算を行なう方式を取れば演算時間は大幅に短縮できる。この初期反復での演算点数M_1は，χ^2検定での誤差分散に関する制限を緩和して$v < 2.5$となる確率が95%となる自由度を基準として，

$$M_1 = 4 + L \qquad (3.25)$$

とした。M_1, M_{opt}に対応する整数間引き間隔d_1,d_{opt}は，$d_1=[N/M_1]$, $d_{opt} = [N/M_{opt}]$として求める。

さらに適合精度の向上には，信号強度が大きくSN比の高いピーク近傍の点を取るのが有利である。そこで(3.23)式同様，ピーク近傍でピーク強度の20%以上の強度を持つ範囲内で３点以上の演算点を確保できるようにdの最大値を決定した。これにより初期値中の最小半値半幅w_{min}に対して

$$d \le 1.33\,f\,w_{min} \qquad (3.26)$$

の制限を設けた。ただし，fは(3.6)式で用いたピーク関数型による係数を表す。

3.5.3 シミュレーション実験

(a) 演算点数削減法の安定性

演算点数決定の際に検討した適合誤差分散は，適合の安定性を示すものであり，これは同一観測波形に対して(3.22)式の先頭データ位置αを変えて演算点をシフトさせた時の収束点でのE(**p**)の変動範囲によって評価できる。演算が安定であればE(**p**)はαに依存せずほぼ$N\sigma_n^2$近傍の値を取るが，不安定ならばαによって大きく変化する。

Fig.3.11はFig.3.4に示す波形(σ_n=2.0)を用いて，d=14でのα=3およびα=10の場合の収束特性を示したものである。点線はE_d(**p**)，実線は各反復解**p**に基づき間引きせずに計算したE(**p**)の値を示す。E_d(**p**)は常にE(**p**)よりも小さな値をとっているが，いずれも3回の反復で急速に収束点に近づき，5回の反復ではほぼ収束点に達している。

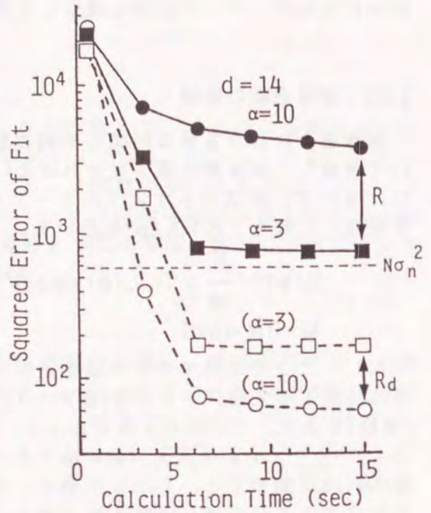


Fig.3.11. Convergence curves of data-reduced DLS curve-fitting method for the computer generated curve same as shown in Fig.3.4 with noise (standard deviation, σ_n=2). Solid lines represent the error calculated from whole data points, and dotted lines calculated from selected data points. d, the interval of data selection ; α, the offset position of the data selection procedure ; R, Rd, fluctuation extents of the final error at the convergence point caused by the change of α; N(=128), total number of data.

Fig.3.12はχ^2検定法に基づく間引き間隔と誤差分散の関係を確認するため，前記波形を対象として間引き間隔d毎にα値を0～d-1まで変化させた時の5回反復後のE_d(**p**)およびE(**p**)の変動範囲，R_d, Rを表したものである。χ^2分布から予測されるとおり，dの増加に従って自由度が減少しR_d, Rは共に広がっている。ただしRは常に雑音分散和$N\sigma_n^2$以上となるのに対して，R_dはほとんど$N\sigma_n^2$以下であり，これは演算点の減少による雑音成分への適合が生じているためと考えられる。

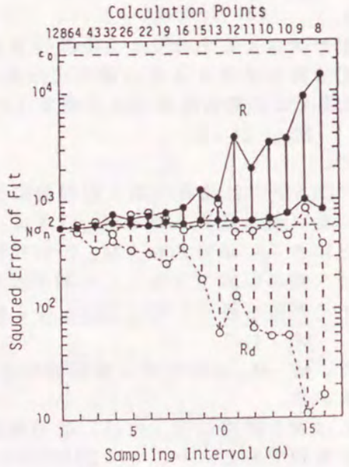


Fig.3.12. The variation of the fluctuation extent of the final fitting-error at the convergence point for the computer generated curve same as used in Fig.3.11 by using the data-reduced DLS method. R, Rd, errors calculated from whole and selected data points, respectively; $N\sigma_n^2$, noise level; ε_0, the initial fitting error.

この例ではパラメータ数L=6よりM_1=10 (d_1=14), M_{opt}=31 (d_{opt}=4) となり，図では d≤4ではR_d<1.5$N\sigma_n^2$，d≤14ではR_d< 6.5$N\sigma_n^2$となっており，前述のχ^2検定法に基づく解析結果と良く一致している。また間引き間隔d_1での収束点精度は初期残差二乗和ε_0に比べると1/5以下となっており，初期反復には充分効果があることがわかる。

(b) 演算点数切替DLSピーク分離プログラムの開発

上の結果に基づき演算点数の2段階切り替えを含むピーク分離BASICプログラムを作製した。このフローチャートをFig.3.13に示す。3.3節の方法により初期値$\mathbf{p}_0$を決定した後，初期間引き間隔d_1を，データ数N，パラメータ数L，$\mathbf{p}_0$中の最小半値半幅w_{min}より次式により求める。

$$d_1 = \max(\min([N/(L+4)], [1.33f\ w_{min}], 1) \quad (3.27)$$

ただしFig.3.13ではガウス型ピークを対象として1.33f = 1として表示した。このd_1間隔での間引きにより3回の反復を行ない，この後間引き間隔を，

$$d_{opt} = \max(\min([N/(L+25)], [1.33f\ w'_{min}], 1) \quad (3.28)$$

に変更して反復する。ここでw'_{min}は初期反復演算で得られた解の中の最小半値半幅である。DLS法におけるダンピング係数γは演算点数に関係なく第1回目の反復より順に0.1, 0.03, 0.01(以後すべて0.01)と縮小した。

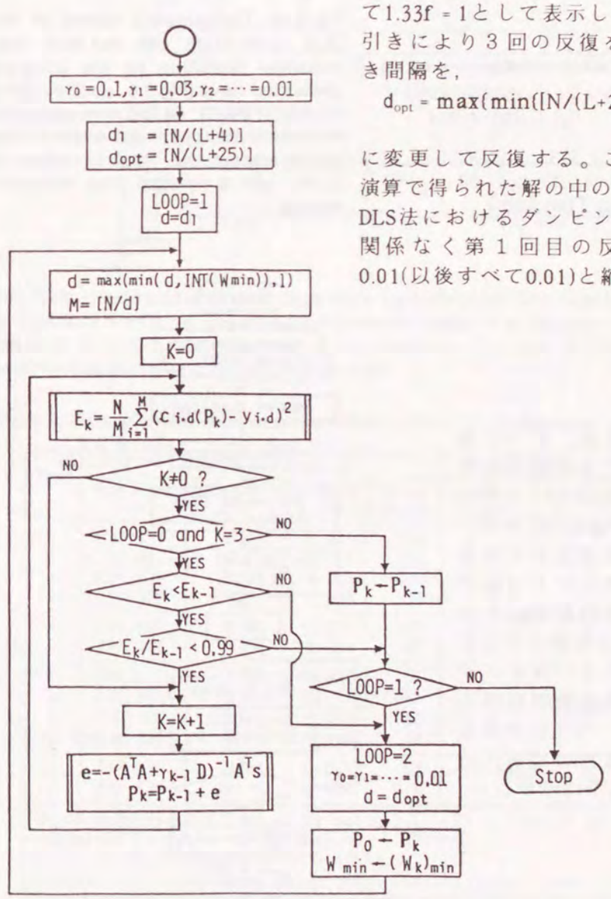


Fig.3.13. Flowchart of the DLS curve-fitting algorithm with two-step data reduction technique.

Fig.3.14はこのプログラムを用いてFig.3.4の波形の分離を行なったときの収束特性を示したものである。(a)はd_1=14, d_{opt}=3 としたときのE(**p**)の値，(b)は見かけの残差二乗和E_d(**p**)である。(b)の収束は不安定に見えるが，実際の残差二乗和は安定に収束している。一方(c)は演算点数の切り替えを行なわずにd=3として計算した時のE(**p**)の値であり，収束速度の点では(a)より劣っていることから演算点数の切り替えが有効であることがわかる。

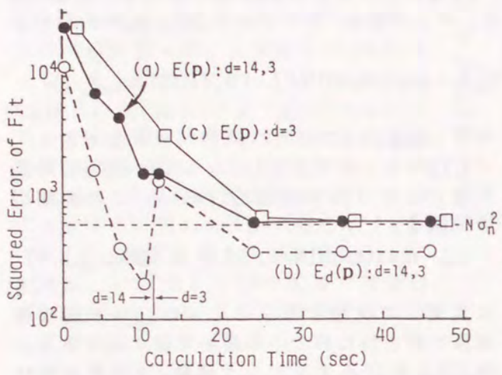


Fig.3.14. Convergence curves of the DLS curve-fitting with two-step data reduction technique for the compute generated curve (Fig.3.4, σ_n=2) by using PC-9801F(NEC). (a),(b)Errors calculated from whole data points and selected data points, respectively. (c) A convergence curve with a constant data- reduction interval.

3．6　実験結果

上で述べた初期値決定，ピーク領域の分割，演算点数の２段階切り替え間引きをすべて統合したプログラムのフローチャートをFig.3.15に示す。ベースライン成分は観測波形の両端付近の谷部を結ぶ一次式により近似して除去する。この後初期値$\mathbf{p}_0$を求め，r個のピーク領域に分割する。この各小領域内に含まれるパラメータ$\mathbf{p}_1$, $\mathbf{p}_2$,..,$\mathbf{p}_r$を順に演算点数切り替え法により計算する。このプログラムを用いて実際に観測波形のピーク分離を行なった結果を以下に示す。

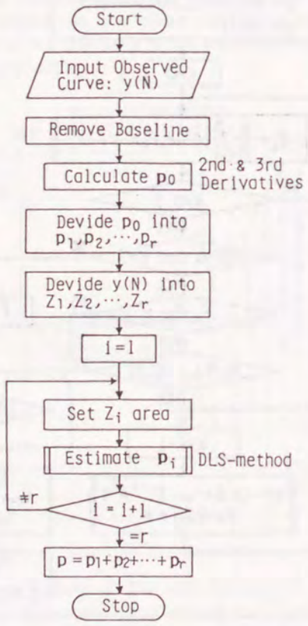


Fig.3.15. Flowchart of the developed curve-fitting algorithms.

3.6.1　Ni-HCL発光スペクトルの分離

Fig.3.16はFig.3.10と同様Ni-HCLの231nm近傍の発光スペクトルを12個のガウス型ピークに分離した結果である。観測波形(a)は分光器スペクトルスリット幅 0.007nm，サンプル間隔 0.004nm，データ点数495点からなる。(b)は分離した結果と観測波形との残差波形である。

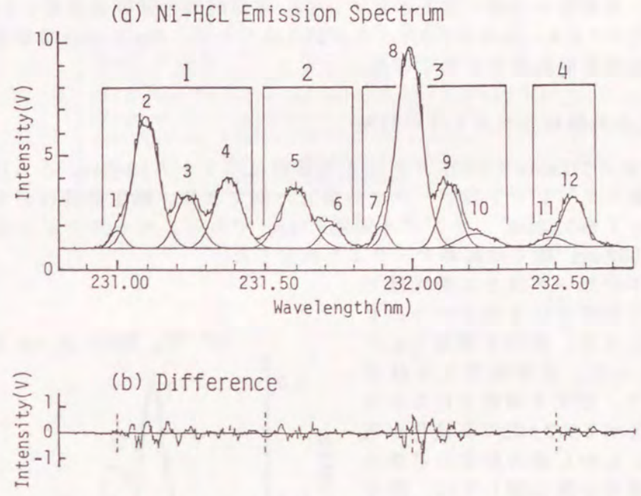


Fig.3.16. Results of the peak-separation by using the developed method for an emission spectrum of Ni-HCL. (a) The observed spectrum measured by the monochromator with the spectral slit-width of 0.007nm and sampled at the interval of 0.004nm. (b) The difference between the observed spectrum and the separated results.

Table 3. Estimated Gaussian peak parameters of the Ni-HCL emission spectrum shown in Fig.3.16.

Peak	Separated Results				Calculation		MIT Wavelength Table (nm)
	Position (nm)	Intensity (V)	HWHM (nm)	Area (nm·mV)	Limits (Data)	d_1,d_{opt}	
1	230.997	0.77	0.027	45	39-167 (129)	8, 3	231.002
2	*231.097	5.75	0.052	636			*231.097
3	231.239	2.32	0.046	229			231.234
4	231.375	3.11	0.054	355			231.366 + 231.398
5	231.601	2.65	0.061	342	176-253 (78)	7, 2	231.604
6	231.726	1.04	0.041	91			231.716
7	231.895	0.97	0.027	55	261-383 (123)	7, 3	231.848
8	231.993	8.69	0.051	951			232.003
9	232.128	2.76	0.042	245			232.138
10	232.219	0.63	0.070	94			232.196 + 232.268
11	232.480	0.44	0.053	50	408-458 (51)	5, 1	232.464
12	232.559	2.19	0.046	216			232.579

No.of Data(N) = 495 , No.of Parameters(L) = 36 , Average of Baseline = 0.94(V)
Estimated Deviation of Noise($\hat{\sigma}_n^2$) = 0.033(V^2)
Error of Fit(E(**p**)/(N-L)) = 0.014(V^2)
Calculation Time = 15 min 31 sec (Peak Finding: 5'52", DLS: 7'25", Display: 2'14")

Table 3はこの分離結果と，文献値[31]による対応ピーク波長を示したものである。波長値はピーク２を文献値231.097nmとして校正した結果であり，ピーク高さは出力電圧値，ピーク面積は半値半幅とピーク高さより計算で求めた値である。分離したピーク波長と文献値との誤差は，重なりの大きなピーク11, 12, および２個のピークの重なりを分離できていないピーク4, 10では最大.05nm程度であるが，その他の部分では0.01nm以下の誤差であり，サンプル間隔，スリット幅を考慮すると極めて高精度の分離が達成されている。演算時間は初期値決定に5.9分，パラメータ推定に7.4分，表示に2.2分，合計15.5分であり，Fig.3.10の演算結果と比較すると約４倍程度高速化されている。

3.6.2 NH_3赤外吸収スペクトルの分離

Fig.3.17およびTable 4はNH_3ガスの赤外吸収スペクトル1040cm^{-1}から1025cm^{-1}までを，４個のローレンツ型ピークに分離した例である。測定条件は分光器スペクトルスリット幅0.58cm^{-1}，サンプル間隔0.1cm^{-1}である。ベースライン成分は1100 cm^{-1}から1000 cm^{-1}間での観測データより決定した。

Table 4中のピーク高さは吸光度で示した。この例では全体が一つのピーク領域となり，間引き間隔はd_1=7, d_{opt}=3となった。演算時間は全体で3.7分であり，間引き演算を行なわないときに比べて約2.4倍の高速化が実現された。しかし適合精度の基準となる適合誤差分散に関しては，間引き演算の適用／非適用に関わらず，χ^2検定における有意棄却域に入る。これは適合関数が適当でないことに起因すると考えられる。同一観測波形に対して，ガウス型ピーク波形を適合した場合も誤差分散はほとんど変わらず，したがってこの場合には，Cauchy-Gauss和関数[20]，Voigt関数[21]等，より複雑な関数による適合が必要と考えられる。

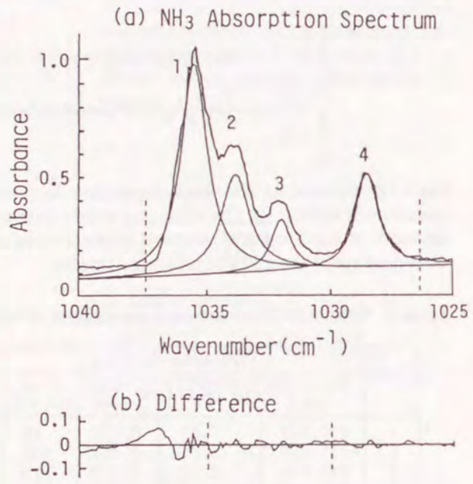


Fig.3.17. Results of the peak-separation for an IR absorption spectrum of ammonia gas. (a) The observed sprctrum measured by the spectrophotometer (JASCO, A3) with the spectral slit-width of 0.58cm^{-1} and sampled at the interval of 0.1cm^{-1}, and separated 4 Lorentzian peaks. (b) The difference curve between the observed spectrum and the separated results.

Table 4. Estimated Lorentzian-peak parameters of the NH3 absorption spectrum shown in Fig.3.17.

Peak	Wavenumber (cm^{-1})	Absorbance (A)	HWHM (cm^{-1})	Area (cm^{-1}·A)
1	1035.29	0.93	0.61	1.78
2	1033.65	0.42	0.69	0.91
3	1031.82	0.22	0.47	0.34
4	1028.40	0.40	0.54	0.69

No.of Data(N) = 151 , No.of Parameters(L) = 12
Average of Baseline = 0.0099(A)
Estimated Deviation of Noise(σ_n^2) = 0.77X10^{-4}(A^2)
Error of Fit(E(**p**)/(N-L)) = 6.45X10^{-4}(A^2)
Calculation: Limits : 27-138(112 points)
d : d_1 = 7 , d_{opt} = 3
Time : 3 min 43 sec

3.7 結言

分光波形のピーク分離処理をパソコンBASIC言語を用いて手軽に実現することを目的として，高精度な初期値決定法の開発と各種パラメータ推定アルゴリズムの比較を行なった。初期値決定においてはパソコングラフィック機能を利用した対話型修正法を取り入れることで実験者の持つ観測波形に関する先験情報を導入することを可能とした。パラメータ推定アルゴリズムではGN法，DLS法，DFP法，Simplex法の比較を行ない，DLS法が演算速度，初期値精度の低いときの収束安定性の点で最も優れていることを確認した。しかしピーク個数の増加と共に演算時間は二次関数的に急速に増加することから，一度に分離するピーク個数を少なくするための観測波形の分割法と演算点数の等間隔間引き法を考案した。この手法は特に重なり合ったピークがいくつか局在するような波形に対しては極めて有効である。演算時間は全観測点数よりもむしろピークの数と重なりの程度によって決まり，従来の直接計算法に比べて数倍の高速化を実現した。また演算に必要なメモリ容量も大幅に縮小され，小規模なパソコンでも多数のピークの同時分離が可能である。

ここではピーク形状として演算量の少ないガウス型関数とローレンツ型関数のみを扱ったが，観測波形によってはより複雑なピーク型の適用も必要となることがχ^2検定法より確認された。複雑なピーク関数への適合は演算量の点で現時点のパソコンには適用困難であるが，将来パソコンの演算スピードが向上すれば充分実用可能となると考えられる。

第４章　クロマトグラフィ高度化のための２次元展開分光システムの試作

４．１　序

多成分系混合物試料を一次元の分光スペクトル波形によって分析する場合には各成分からの信号を分離することが必要であり，これには高分解測定とピーク分離等の演算処理が要求される。しかし分子スペクトルのように各成分からの信号が広いバンド構造を持ち相互の重なりが大きい場合にはたとえ高分解測定を行なっても成分分離は困難である。このような試料に対しては，クロマトグラフィ等の物理的分離手段と分光スペクトル測定を結合して２次元測定を行なって情報量を増大させることにより，構成成分の分離・定量が可能となる。

既に吸光測定ではポリクロメータとフォトダイオードアレイ(PDA)検出器を組み合わせたマルチチャネル検出に基づくスペクトロ・クロマトグラム測定専用装置が市販され，未知混合物試料の分析に広く利用されている[32][33]。一方，微量物質の検出には吸光測定よりも蛍光測定方の方が感度の点で優れており，蛍光スペクトル測定とクロマトグラフィを結合すれば，検出感度，定性能力の点でも非常に有効な分析手段となる[34]。しかし蛍光測定においては，一般に信号強度が微弱であり，さらに物質毎に最適励起波長および発光波長が異なることから，吸光測定のようなマルチチャネル検出には種々の工夫が必要となる。これまでに開発された研究報告では，励起波長を短波長側に固定して，蛍光分光にはポリクロメータを用いてその結像面上に複数の光電子増倍管を並べた装置[35]，インテンシファイアを付加したPDA検出器を用いて感度を向上させた装置[36][37]，SIT 検出器を使用した装置[38][39]，レーザ光源を使用して励起エネルギを増大させた装置[40]，２次元CCDアレイを用いて面積・時間積分によりSN比を向上させた装置[41]等がある。いずれの装置でも蛍光スペクトロ・クロマトグラムが得られているが，励起波長が固定されているため成分によっては全く検出されない場合も生じている。

ここでは蛍光測定法の持つ定性能力を有効に利用し，蛍光性を示すどのような物質に対しても蛍光スペクトル信号が得られる蛍光スペクトロ・クロマトグラムの新しい測定法の開発と検討を行なった。これらの測定法では，物質の持つ波長選択性よりもむしろ情報量の多い蛍光スペクトルの特長に注目し，物質分離はクロマトグラフィで行なうことで選択性，感度共に満足させるようにした。

本研究では(1)励起波長に対する選択性を除去した白色光励起蛍光発光スペクトル測定装置，(2)(1)と同時に吸光スペクトル測定を行なう吸光・蛍光同時測定装置，および(3)発光波長に対する選択性を除去した励起スペクトル測定装置を開発した。(1)ではどのような成分に対しても効率よく励起するため，連続スペクトル光源を分散させずに直接励起光として用い，蛍光スペクトルをポリクロメータとPDA のみでマルチチャネル検出する方式を考案し，装置を試作した。この方式では励起波長に対する選択性が無視されるため大部分の蛍光性物質に対して蛍光発光スペクトルが得られ，多成分からなる未知混合物試料に対しても定性・定量の両分析が可能となる。(2)では(1)で開発した装置にさらに１組のポリクロメータとPDAによるマルチチャネル検出器を付加して吸収スペクトル測定を行ない，非蛍光性物質の検出も可能とした。(3)では蛍光励起スペクトルをマルチチャネル測定するために，励起光を分散させた後にフローセルの流出方向に空間的に異なる波長の光で励起し，各位置からの蛍光発光をロッドレンズアレイを用いてPDA上に結像させ励起スペクトルを得た。

４．２　白色光励起蛍光発光スペクトル測定システムの開発

従来の蛍光発光スペクトル測定では，励起波長を適当に選択して固定し，発光波長をこの波長より長波長側で走査する。しかしHPLCに適用して多成分試料を連続的に分析する場合には，試料成分毎に最適励起波長が異なることから，同一励起波長ですべての成分を分析することは不可能である。この問題を解決し，多成分試料を一度のクロマトグラフ展開によりすべて分析するために，試料励起光源として可視・紫外域に連続スペクトルを持つ白色光を用いる手法を考案した。この手法では励起光に対する選択性を考慮する必要がなく，しかも光源エネルギーを効率良く利用して試料を励起できるため，検出感度も高く取れるなどの特徴を持つ。

信号検出においては試料の流量に合わせた高速性を満たすため，ポリクロメータとPDA を結合したマルチチャネル検出法を用いた。ただしPDA のダイナミックレンジはせいぜい 10^3 程度である[38][42]ため，蛍光測定方向にはできる限り散乱光の少ない方向を選び，さらに積算処理によるダイナミックレンジの拡大も行なった。

4.2.1 測定原理

本測定法の原理を説明するために，試料に対する励起方向と観測方向をFig.4.1に示すようにとる。光源自体のスペクトルをS(λ)とし，セル内に溶媒のみを流した時の観測スペクトルをR(λ)，試料を流した時の観測スペクトルをD(λ)とする。ただしλは波長を表す。R(λ)，D(λ)にはフローセル壁面からの散乱光とフローセル内部を通った光が含まれ，近似的に次のように表される。

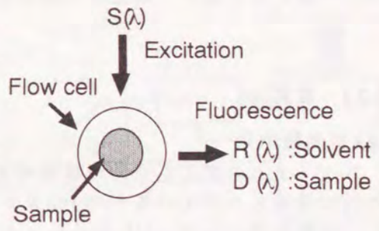


Fig.4.1. Geometry of the fluorescencespectrum detection with a flow cell. S(l), an emission spectrum of the excitation source; R(l), a scattering spectrum with solvent; D(l), a scattering spectrum with sample solution.

$$R(\lambda) = pS(\lambda) + qS(\lambda)10^{-Ar(\lambda)} \quad (4.1)$$

$$D(\lambda) = pS(\lambda) + qS(\lambda)10^{-Ar(\lambda)}10^{-Af(\lambda)} + f_d(\lambda) \quad (4.2)$$

p：試料に到達せずに観測される散乱光の割合
q：セル内の試料を通過して観測される散乱光の割合
$A_r(\lambda)$：溶媒の平均吸光度
$A_f(\lambda)$：試料の平均吸光度
$f_d(\lambda)$：試料からの蛍光発光強度の観測方向成分

ここで(4.1)式と(4.2)式の差 F(λ) をもとめると，

$$F(\lambda) = D(\lambda) - R(\lambda) = f_d(\lambda) + qS(\lambda)10^{-Ar(\lambda)}(10^{-Af(\lambda)} - 1) \quad (4.3)$$

となる。溶媒については通常 $A_r(\lambda) \cong 0$ であり，また希薄試料溶液では，$A_f(\lambda) \ll 1$ となることから，

$$F(\lambda) \cong f_d(\lambda) - A_f(\lambda)qS(\lambda) \quad (4.4)$$

と近似できる。したがって散乱光の少ない $q \ll 1$ となる方向で観測すれば

$$F(\lambda) \cong f_d(\lambda) \quad (4.5)$$

と近似できる。

一方，試料からの蛍光強度 $f_d(\lambda)$ は励起光スペクトル S(λ)に依存し，次のように表せる。

$$f_d(\lambda) = \alpha \int_{\lambda 0}^{\infty} S(\lambda')[1-10^{-Af(\lambda')}]\,\phi_\lambda(\lambda')d\lambda' \quad (4.6)$$

ただし，λ_0は励起光の短波長端であり，これは主に光学系の材質により決まる。またαは全蛍光発光強度のうちの観測方向への放射の割合，$\phi_\lambda(\lambda')$は吸収波長λ，発光波長λ'での量子収率を表す。ここで$A_f(\lambda) \ll 1$とみなせる希薄溶液では，

$$f(\lambda) = \int_{\lambda 0}^{\lambda} S(\lambda')A_f(\lambda')\,\phi_\lambda(\lambda')\,d\lambda' \quad (4.7)$$

となり，発光波長λでの蛍光強度はλより短波長域で吸収した光子の全積分値と量子収率 $\phi_\lambda(\lambda')$との積に比例する。したがって，この方式では励起光エネルギーの利用効率が高くレーザのような高エネルギー源を使用しなくても白色光源のみで大きな蛍光強度を得られ，しかも単純な減算のみで蛍光スペクトルが得られるという大きな特徴を持つ。ただしこの関係は希薄溶液に対しては成立するが，高濃度溶液では(4.4), (4.7)式の近似が成立せず，減算結果F(λ)は蛍光発光スペクトルと一致しなくなり，吸光度の補正処理が必要となる。

4.2.2 装置

(a) 蛍光検出系

本システムの測定系全体の構成を Fig.4.2に示す。試料励起用光源には可視・紫外域で連続スペクトルを持つ150Wキセノンランプ(L2175, 浜松ホトニクス) を用い，溶融石英レンズ L1(f=60mm, φ=30mm)，L2(f=45mm, φ=30mm) を使って円筒形の石英フローセル(外径 4mm, 内径1.5mm) に集光する。セル中での光源電極アーク像の大きさは1mm×3mmとなる。セルホルダ部には迷光を避けるため励起用(2mm×8mm)および発光測定用(1mm×8mm)の窓を設け，他の部分は遮蔽した。

セルからの蛍光発光は励起光に対して側面方向でレンズ L3(f=60mm, φ=45mm) を用いて集光し，凹面回折格子を持つポリクロメータ(F = 2.5, 逆分散20nm/mm, 日本分光)で分光する。スペクトル検出には512素子のPDA (S2301-512Q, 浜松ホトニクス) を用いてマルチチャネル検出した。PDAの１素子のアパーチャは 50 μm × 2.5 mm，チャネル分解能は1nmである。ポリクロメータの入射スリット幅は0.5 mmとし，入射スリットの直前には２次回析光を除去するため310 nmにカットオフを持つパイレックス製スライドガラス (厚さ1 mm) を挿入した。測定波長域は340 nm～620 nmに限定した。

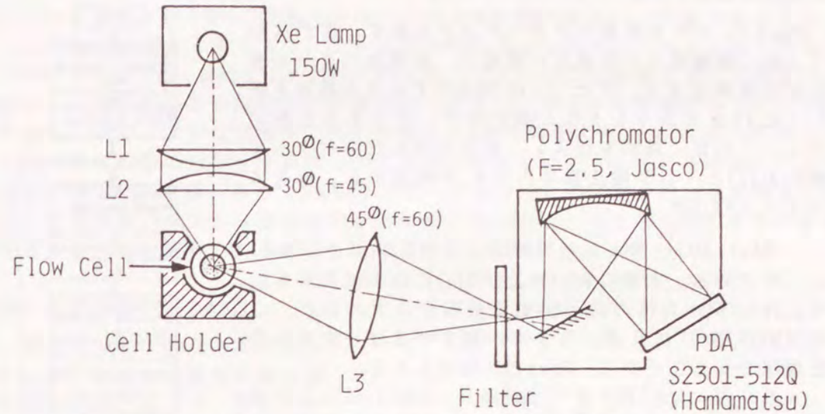


Fig.4.2. Block diagram of the optical system of the white-light excited multichannel fluorometer.

(b) 高速液体クロマトグラフ

試料送液系および信号検出用電気系の構成を Fig.4.3に示す。高速液体クロマトグラフ(HPLC)装置には LC-5A送液ポンプ(島津)を中心として，SIL-1A サンプルインジェクタ(島津)，CTO-1恒温槽(島津)を用いた。分離カラムには逆相の CLC-ODS(島津)を使用した。また，試作した蛍光検出システムと直列にＵＶ検出器 (UVD-1, 島津) を接続し，吸光度による試料のモニターも行なった。このＵＶ検出器は，非蛍光成分の検出にも有効である。

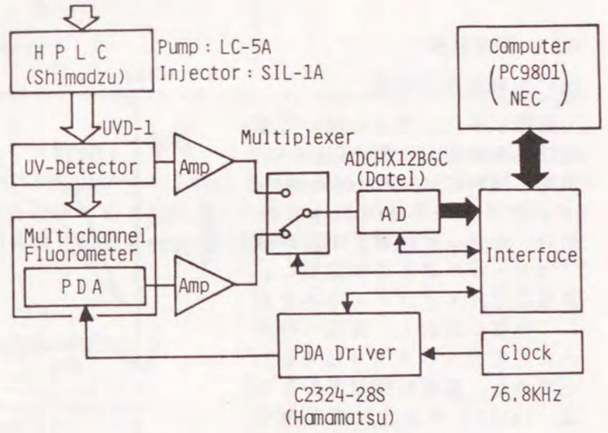


Fig.4.3. Block diagram of the data acquisition system.

(C) 信号検出系

PDA からの信号はマルチプレクサを通って12ビットAD変換され，パーソナルコンピュータ(PC9801, NEC)に転送される。PDAの駆動には専用駆動回路 (C2324-28S,浜松ホトニクス)を用いた。PDA の１チャンネル当りの信号読み取り時間は52 μsec，１回の露光時間は27.3 msecであり，蛍光強度が微弱な場合には最高32回まで積算可能である。モニター用として接続したＵＶ検出器からの信号はマルチプレクサにより PDA信号と交互に切り替えて読み取る。

PDAの走査開始，マルチプレクサの選択，AD変換の開始等の制御はすべてパーソナルコンピュータより機械語プログラムによって実行した。

(d) 信号処理アルゴリズム

Fig.4.4にデータ収集のフローチャートを示す。まず試料注入前に溶離液のみを流した状態で，参照スペクトル波形R(i)を測定する。ただしiはPDAのチャネル番号を表し，R(i)はクロマトグラム測定中，一定であると仮定する。この後，試料を注入し，蛍光を含んだスペクトル波形$D_t(i)$と，ＵＶ検出器の出力A_tを測定する。蛍光スペクトル$F_t(i)$は，

$$F_t(i) = D_t(i) - R(i), \qquad i=1,2,\ldots,512 \qquad (4.8)$$

として求める。実測のR(i)および$D_t(i)$にはスペクトル信号以外にPDA自体の持つ暗電流分布が含まれるが，これはR(i), $D_t(i)$に共通に含まれ，測定中ほぼ一定であると仮定できることから，$F_t(i)$では相殺される。

メモリ内には$F_t(i)$をすべて格納し，CRT上にはこの波形とともに，これを波長軸にそって積分した積分蛍光強度F_tを，ＵＶ出力信号とともにクロマトグラムとして表示する。この動作を一定時間(t_e)繰り返す。スペクトロ・クロマトグラフは全測定終了後，必要に応じて読み出し解析に用いる。

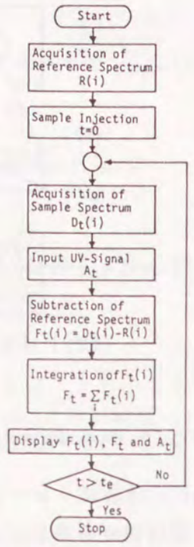


Fig.4.4. Flowchart of the data acquisition procedure.

4.2.3 測定結果

(a) 実測波形の特徴

実際に本システムを用いて蛍光試料を測定した例をFig.4.5に示す。試料には2-Phenylindoleのメタノール溶液(0.8mg/l)を用い，カラムには通さずに直接フロセールに流して測定した。参照信号はメタノールのみを流して同様に測定し，両信号の差として蛍光スペクトル信号$F_t(i)$を求めた。露光時間は１秒である。(a)に示すように蛍光信号は大きな散乱光の上に重なって現れるが，求められた蛍光スペクトル(b)は従来の分光蛍光光度計での測定結果とよく一致している。

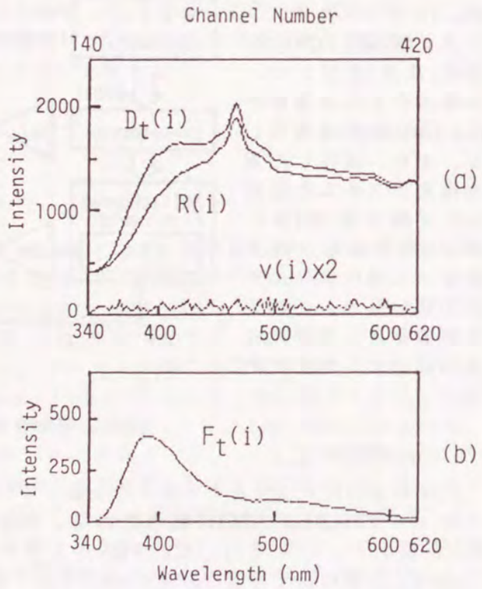


Fig.4.5. Examples of obtained spectra of 2-Phenylindole in methanol. (a) Raw data from the PDA; R(i), a reference spectrum filled with solvent (100% methanol); Dt(i), a spectrum with 2-Phenylindole; v(i), a variance of R(i) during 1 hour. (b) A calculated fluorescence spectrum of 2-Phenylindole.

本システムでは，参照スペクトルR(i)を測定期間中ほぼ一定であると仮定しているが，実際にはPDAの暗電流分布や光源強度の時間変動により多少変化する。この変動はそのまま蛍光スペクトル計算での誤差となるため，できる限り抑える必要がある。Fig.4.5(a)中のv(i)はこの参照スペクトルの安定度を調べた結果である。これは光源強度がほぼ安定状態になった後，メタノール溶媒のみを試料セルに流した状態で１時間連続的にR(i)を測定し(露光時間１秒)，この間の各チャネル毎の強度変動の分散を求めたものである。分散はチャネルに依らずほぼ一定であり，信号ピーク値に対して5%以下となっており，この程度であれば実用上はほとんど問題ない。しかし蛍光信号が特に弱い場合にはこの参照信号の変動の影響を受けるため，積算によってＳＮ比向上を計る必要がある。

(b) 最適観測方向の検討

散乱光強度は観測方向によって大きく異なり，蛍光の検出感度を上げるためには，散乱光が少なく，かつ大きな蛍光強度の得られる方向で観測するのが有利である。そこでFig.4.6に示すように励起光軸(Z軸)をフロセール(x軸)と直交する方向に固定し，観測方向のみを変更して散乱光強度を測定した。観測方向は励起光軸との角度αと，励起光軸を含みフローセルと直交する面(yz面)からの角度βをパラメータとして決定した。

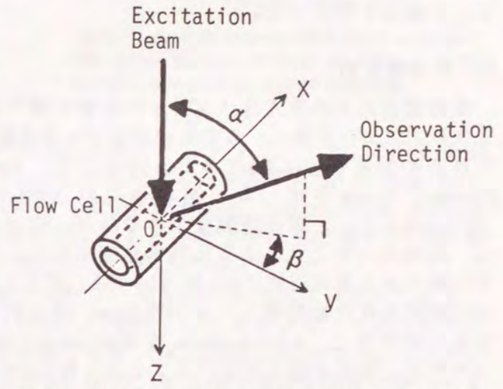


Fig.4.6. Geometry of the fluorescence detection angles.

Fig.4.7にこの結果を示す。縦軸はメタノールをフロセールに流し，露光時間１秒で連続100回測定した時の観測波形の平均値を，波長軸に沿って積分した積分散乱強度である。角度走査範囲は光学系配置上の制約から，85°≤α≤110°, 0°≤β≤28.5°とした。この結果，散乱光は角度αが100°近傍で最小となっている。

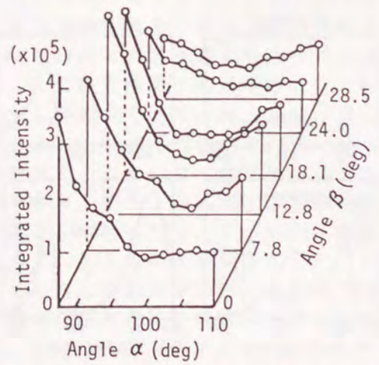


Fig.4.7. Plots of scattering intensity from the flow cell for observation angles.

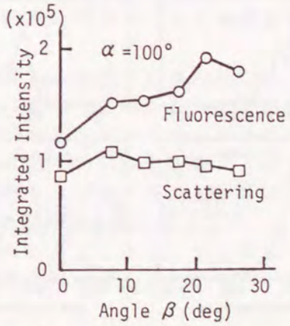


Fig.4.8. Plots of scattering and fluorescence intensity for the observation angle β.

Fig.4.7では，α=100°の場合，散乱強度の角度βに対する依存性はほとんど認められない。そこで，角度βの最適値については蛍光強度が最大値をとる角度として決定した。Fig.4.8は角度αを散乱光が最小となる100°に固定した状態で角度βのみを変えて蛍光強度の変化を調べた結果である。試料にはEosinのメタノール溶液を使用し，これを直接フロセールに流した。蛍光強度は前述の散乱強度の測定と同様に，露光時間１秒で100回測定した平均波形を求め，同様に測定したメタノールのみによる平均参照波形を減算し，この結果を波長軸にそって積分した積分蛍光強度を用いた。図中には参照波形を積分した積分散乱強度も示した。散乱強度はβに依存せずほぼ一定値となっているが，蛍光強度は21°で最大値をとっている。これはフロセール内で励起光が多重散乱し，試料励起体積が増加しているためと考えられる。これらの結果を考慮して以下では，α=100°, β=21°に固定して測定を行なった。

(C) 定常測定例

本励起方式での蛍光スペクトルの特徴を調べるため，種々の蛍光試料を本HPLCシステムにより展開し，各成分の溶出ピーク位置でのスペクトル波形を測定した。これらの結果をFig.4.9に示す。試料には，Anthracene, 2-Aminoanthracene, Pyrene, Eosinを用いた。溶離液には100%メタノール溶液を用い，流量は1ml/minとした。露光時間は１秒であり，図ではスペクトルの特徴を明示するため，面積が一定となるように規格化表示した。図の下段には比較のため同一試料を市販の分光蛍光光度計(日立, 650-10)で測定した結果も示した。分光蛍光光度計での測定条件は励起側スリット幅2nm，蛍光側スリット幅5nmとした。両測定結果を比較すると，Anthracene, 2-Aminoanthracene, Pyreneではよく一致したスペクトル波形が得られている。しかしEosinでは通常測定法における320nm励起時の波形とは一致するものの，280nm励起時に現れる350nm近傍のピークが本測定法では現れていない。これは本システムでの光源エネルギー分布が300nmより短波長域で急激に減少していることに起因している。しかし，多くの蛍光物質の分析には本システムでの励起波長域で充分有効である。また，必要ならば光源を短波長域で高エネルギーを持つものに交換すればさらに多くの物資分析が可能となる。

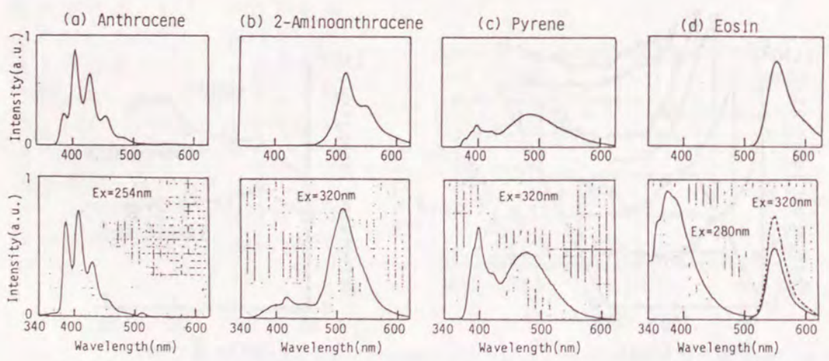


Fig.4.9. Results of fluorescence spectra of single-component samples obtained by the developed system (upper) and by the spectrofluorometer 650-10S (Hitachi) (lower). (a) Anthracene, (b) 2-Aminoanthracene, (c) Pyrene, and (d) Eosin in methanol.

Fig.4.10はEosinを用いて濃度に関する検量線を求めた結果である。測定には100%メタノール溶液を溶離液として用い，一定量の試料を注入，展開して積分蛍光強度クロマトグラム波形を測定し，このピーク位置での強度とこの時の濃度（セル容量，クロマトピーク波形および試料注入量より換算した値）をプロットしたものである。図より10～10^4 μg/lの範囲でよい直線性が認められる。検出限界は，溶離液のみ流したときの信号の標準偏差の３倍をとると，4 μg/lとなる。

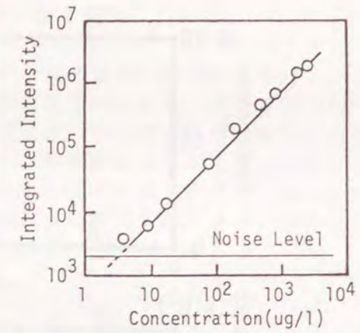


Fig.4.10. Analytical curve for Eosin in methanol. The noise level is defined as 3 times of the standard deviation of reference spectra.

(d) 液体クロマトグラフィ適用例

実際に本システムを用いて蛍光物質混合試料のスペトロ・クロマトグラムを測定した例をFig.4.11 に示す。溶離液には100%メタノール溶液を用い，流量 1ml/min，カラム温度 50℃とした。試料には 2-Phenylindole, Anthracene, Pyreneを含み，各々(1), (2), (3) の順に検出されている。各成分の溶出の様子は(b)の積分蛍光強度クロマトグラムによく現れている。また(c)のスペクトロ・クロマトグラムからは各成分の定性情報が明瞭に現れている。これらの結果は同時に検出した(a)のＵＶ吸収スペクトルともよく対応している。この結果より，試料の溶出ピークのモニターには積分蛍光強度が有効であり，成分同定にはスペクトロ・クロマトグラムが効果的であることがわかる。また，蛍光測定と吸収測定の併用も定性分析能力をさらに強化するものであることがわかる。

4.2.4 考察

本システムは液体クロマトグラフィにおける定性分析能力の強化を目的として，蛍光スペクトルの高速マルチチャネル測定を可能にしたものである。システム構成はきわめて簡単である上に，連続スペクトルを持つ白色光源を非分散で用いているため光源エネルギーを有効に利用でき，かつ最適励起波長の異なる物質も一様に励起できるため，多成分混合物の分析もきわめて効率的にできる。この方式では励起波長に対する選択性は失われるが，この点は発光スペクトル波形が得られることで定性情報は逆に増加している。

ただし問題点として，検出感度が従来の蛍光測定法に比べて多少低いことが挙げられる。これは蛍光信号が，強い散乱光の上に重なって現れるためであり，これを解決するためには，散乱光自体をもっと減少させるようなセル形状の工夫が必要である。また，本方式では展開時間が長くなるとデータ量が膨大となりデータの保管が困難となる。この点は，積分蛍光強度クロマトグラムとそのピーク部分でのスペクトルのみを保管するデータ圧縮法の開発が必要である。

これらの点を解決すれば，きわめて実用的なシステムとなる。また本システムでの蛍光測定とともに吸光スペクトル測定も同時に行えば，より効率的で信頼性の高い定性分析が実現できると考えられる。

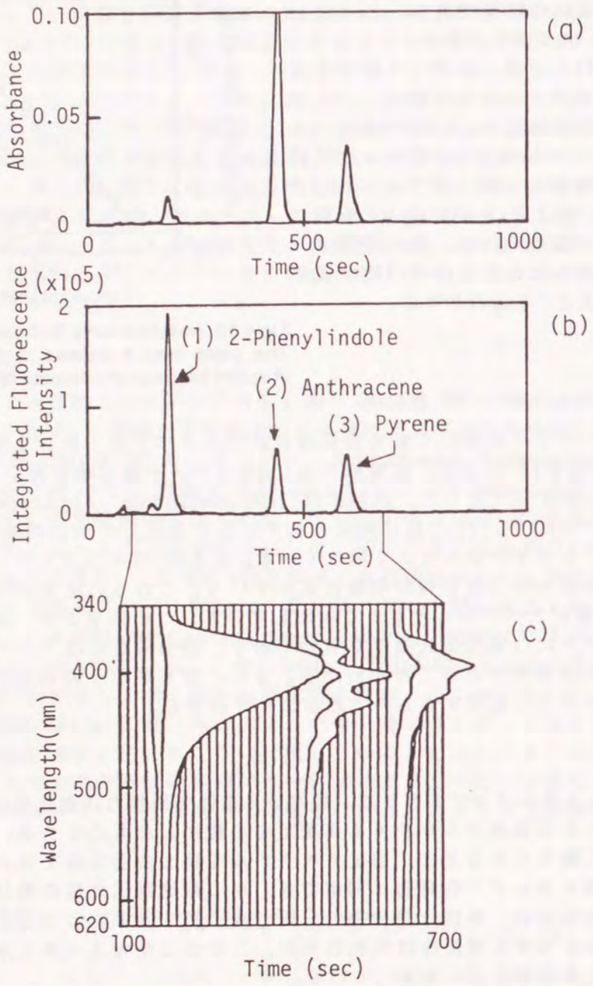


Fig.4.11. Chromatograms of three component mixture. (a) Absorption chromatogram detected at 254nm by UVD-1 (Shimadzu). (b) Integrated fluorescence chromatogram. (c) The fluorescence spectro-chromatogram.

4．3　吸収・蛍光同時スペクトル測定システムの開発

HPLCによる多成分混合物試料の分析においては多種類の検出器を直列に並べて使用することで分析効率，信頼性の向上を図ることができる。前節の蛍光スペクトル検出においても吸収スペクトル測定と組み合わせて用いれば分析可能物質数が増えるばかりでなく，蛍光と吸収の機構上の相補関係より定性能力は格段に向上し，さらに定量性の強化される。そこで前節で開発したシステムにさらにマルチチャネル吸収測定システムを付加し，吸収および蛍光スペクトルの同時マルチチャネル検出HPLCシステムを開発した。

4.3.1　測定原理

本システムではFig4.12に示すように，前節のマルチチャネル蛍光測定に加えて励起光透過方向でマルチチャネル吸収測定を行なう。いまフローセルに溶媒のみを流した時と試料を流した時の励起光透過方向での観測スペクトルを各々$R_a(\lambda)$, $D_a(\lambda)$とおくと，

$$R_a(\lambda) = p_a S(\lambda) + q_a S(\lambda) 10^{-Ar(\lambda)} \quad (4.9)$$

$$D_a(\lambda) = p_a S(\lambda) + q_a S(\lambda) 10^{-Ar(\lambda)} 10^{-Af(\lambda)} + f_a(\lambda) \quad (4.10)$$

p_a :透過方向で観測される励起光の割合

q_a :セル内試料ををを通過して観測される励起光の割合

$f_a(\lambda)$:試料からの蛍光発光強度の透過方向成分

$A_r(\lambda)$, $A_f(\lambda)$:試料および溶媒の平均光度

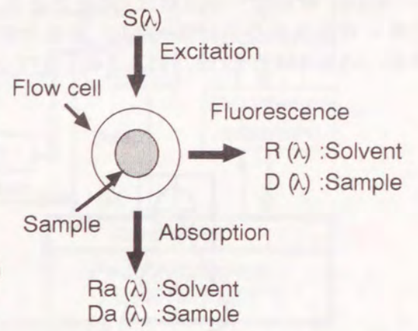


Fig.4.12. Geometry of the absorption-fluorescence simultaneous detection with a flow cell. S(l),R(l),D(l), same as Fig.4.1; Ra(l), a transmitted spectrum filled with solvent in the cell; Da(l), a transmitted spectrum with sample solution.

ここで$R_a(\lambda)$と$D_a(\lambda)$の比をとると，$A_r(\lambda) \ll 1$ の場合には

$$\frac{D_a(\lambda)}{R_a(\lambda)} = \frac{p_a + q_a\{1-A_r(\lambda)\}10^{-Af(\lambda)} + f_a(\lambda)/S(\lambda)}{p_a + q_a\{1-A_r(\lambda)\}} \quad (4.11)$$

さらに，セルホルダを工夫して観測方向への散乱光のもれを大部分遮蔽できれば $p_a \ll q_a$ となり，$A_r(\lambda) \cong 1$と近似できる溶媒では

$$\frac{D_a(\lambda)}{R_a(\lambda)} \cong 10^{-Af(\lambda)} + \frac{f_a(\lambda)}{q_a S(\lambda)} \quad (4.12)$$

と表される。一般に蛍光強度$f_a(\lambda)$は励起光強度$q_a S(\lambda)$に比べて充分小さいことからこの比の対数をとることにより次のように試料の吸光度を得る。

$$\mathrm{Log}_{10}(R_a(\lambda)/D_a(\lambda)) \cong A_f(\lambda) \quad (4.13)$$

4.3.2　システムの構成

(a)光学系

Fig4.13に本システムの構成を示す，このシステムは基本的にはFig.4.2のシステムに吸収測定用ポリクロメータを結合したものであり，励起光学系，フローセル

はFig4.2と同一のものを用いた。吸収スペクトル測定には蛍光測定用セルホルダを加工して透過方向にも観測窓(1×8mm)を開け，この窓から透過光をレンズL4(f=70mm, φ=40mm, 溶触石英製)を用いてポリクロメータ(日本分光; F2.5, 逆分散20nm/mm)の入射スリット上に結像させた。入射スリット幅は20μmに固定し，スペクトル検出には前システム同様512素子のフォトダイオードアレイ(PDA) S2301-512Q(浜松ホトニクス)を使用した。測定波長域は300～600nm，チャネル分解能は1nm，有効データ点数は300点である。一方，蛍光スペクトル測定は前システムと同一測定方向(α=100°, β=21°)でレンズL3(f=60mm, φ=40mm)により集光し，ポリクロメータ(USF-200, Jobin-Yvon; F3, 逆分散 24nm/mm)で分光して，吸収測定用と同一のPDA (S2301-512Q)で検出する。入射スリット幅は0.5mm，測定波長域は350～700nm，有効データ点数は300点である。両ポリクロメータの波長校正には光源位置に低圧水銀ランプ(L937-02, 浜松ホトニクス)を置いて，その輝線スペクトル波長(365.0, 404.7, 435.8, 545.8, 546.1, 577.0nm)より直線近似した。

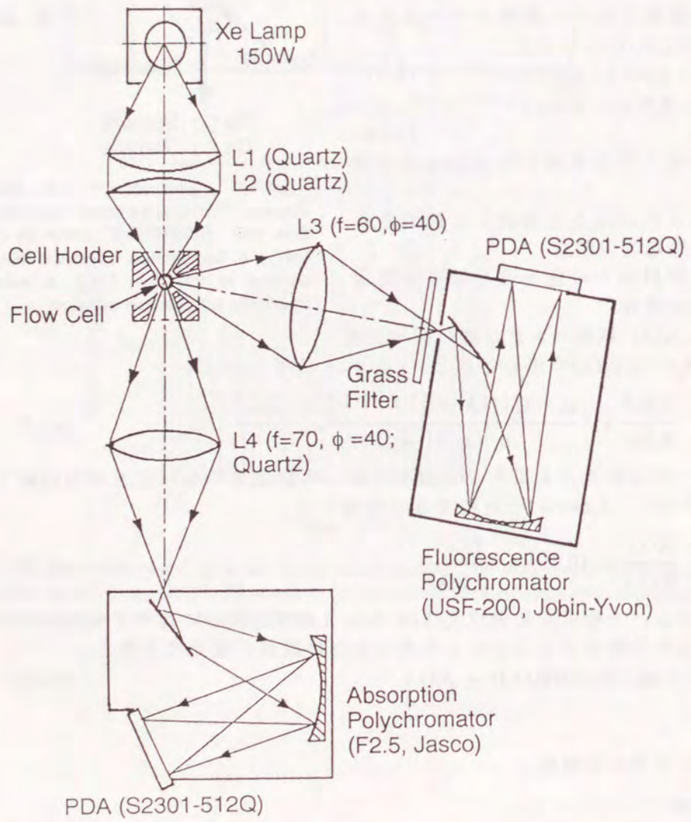


Fig.4.13. The optical system of the absorption-fluorescence simultaneous detection system.

(b)制御系

Fig4.14はPDA の制御と信号読み取りのための電気系ブロック図である，吸収測定，蛍光測定用の２つのPDAは同一制御回路によって制御され，交互に切り替えてAD変換(12ビット)されてパーソナルコンピュータ(PC9801M,NEC)に格納される，512素子の全データを入力するのに要する時間(露光時間と一致)は27msecであり，通常は両PDA出力ともにコンピュータ内で16回積算される。積算時の吸収，蛍光両スペクトル測定に要する時間は１点あたり0.87secである。

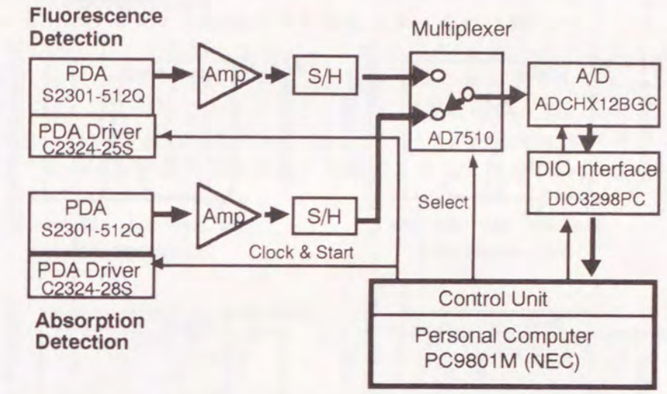


Fig.4.14. The electronic control system of the absorption-fluorescence simultaneous detection system.

4.3.3実験結果

(a)吸収・蛍光同時スペクトル

本システムを用いた吸収・蛍光同時スペクトル測定の結果をFig4.15に示す。ここではスペクトルの特徴を調べることを目的として，試料をカラムに通さず直接フローセルに流して16回積算測定を行なった。溶媒にはすべて100% メタノールを用いた。試料は，(a) Fluoresceine (240mg/l), (b) Uranine, (c) Eosin (3mg/l), (d) Anthracene(60mg/l), (e) 2-Phenylindole(30mg/l), (f) 2-Aminoanthracene, (g) Rhodamine-B, (h) Esculine (15mg/l), (i) Pylene, (j) Phenanthrene の10種類である。図の短波長側の実線(300～600nm)は吸光度スペクトル，点線(350～700nm)は蛍光発光スペクトルを示す。これらの結果は文献値[42]とよく一致しており各成分物質の特徴をよく表している。ただし吸光度が0近くで蛍光発光ピークを持つ場合(Fluoresceineの450nm近傍)では(4.12)または(4.4)式の第2項の影響で吸収または蛍光に負値が現われる。しかし定性分析においては大きな問題とはならない。

(b)検出限界

試料の注入絶対量に対する検出限界は，吸収または蛍光の全ピーク体積(時間・波長積分値)が溶媒のみを流した時の波長方向積分値の分散の３倍となる値として決定した。試料としてEosinを用いた時の検出限界は，吸収側で25ng, 蛍光側で10ngとなった。

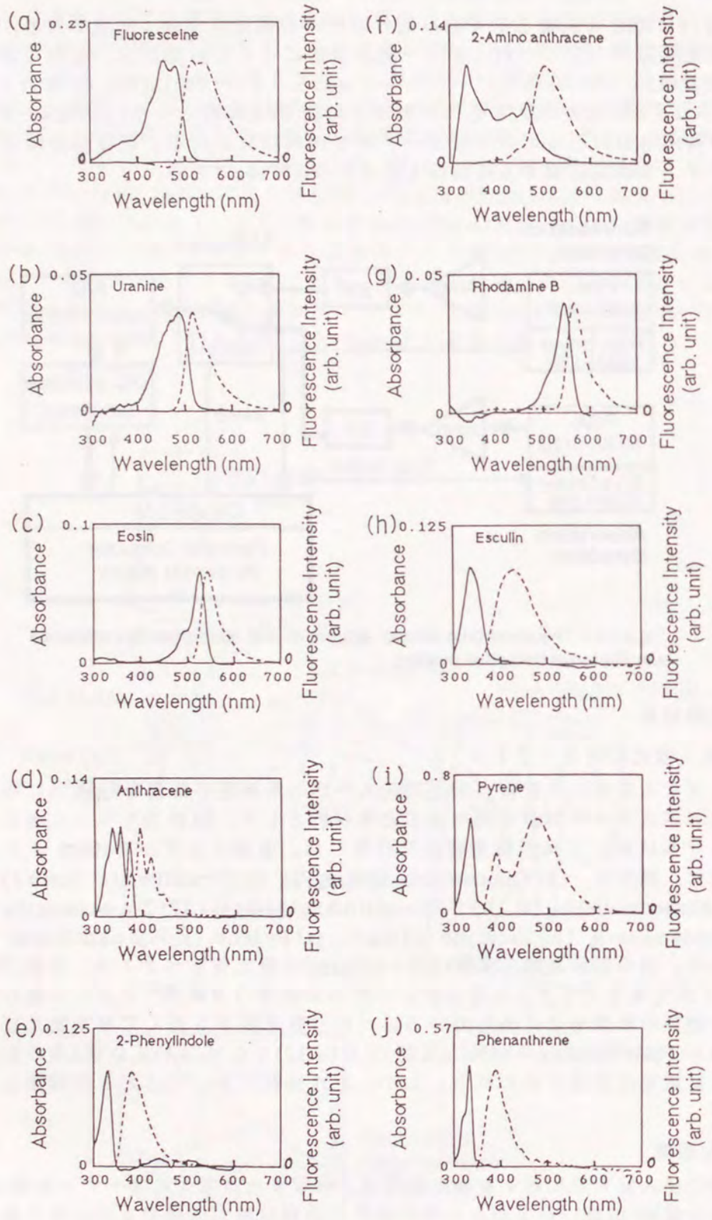


Fig.4.15. Results of absorption-fluorescence spectra. (a) Fluoresceine (240mg/l), (b) Uranine, (c) Eosin (3mg/l), (d) Anthracene (60mg/l), (e) 2-Phenylindole (20mg/l), (f) 2-Aminoanthracene, (g) Rhodamine-B, (h) Escurine (15mg/l), (i) Pylene, (j) Phenanthrene.

(c)クロマトグラム測定

Fig.4.16は本システムを前節のHPLCシステムに結合して，３成分(ヨウ素，2-Phenylindole，Anthracene)混合物試料を測定した結果である。移動相には100%メタノール，流量1.0ml/min，分離カラムにはCLC-ODS(島津)を使用し，カラム温度50℃の条件で測定した。(a)は吸収スペクトル・クロマトグラム，(b)は蛍光スペクトル・クロマトグラムである。各々の左側の図は波長軸方向積分吸光度および蛍光強度を示したものであり，ここでは分離されたピークが明確に表されている。Fig.4.17はこの２つのクロマトグラムを同一時間軸上に表したものである。両クロマトグラムピーク位置に約1sec程のずれがあるが，これは露光/サンプリングを交互に行なっていることに起因している。またピーク1は蛍光信号が負となっているが，これは大きな吸光度を持つ非蛍光性物質（ヨウ素）から生じている。

Fig.4.18はFig.4.17に現れているピーク1, 2, 3に対する吸収－蛍光スペクトルである。それぞれ，(a)ヨウ素，(b) 2-Phenylindole，(c) Anthracene の特徴が表れており，本システムが未知物質の定性分析に有効であることがわかる。

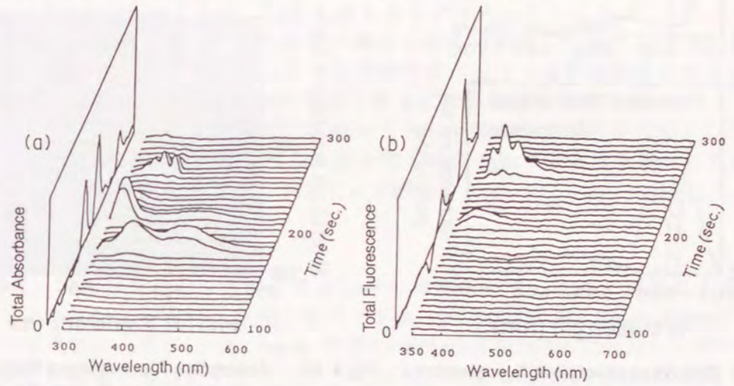


Fig.4.16. Results of spectro-chromatograms and integrated chromatograms: (a) absorbance, and (b) fluorescence.

(d)吸収・蛍光マトリックス

一般に蛍光物質の吸収スペクトルと蛍光スペクトルは物質に固有な相補関係をもつ。この関係を明確に表現して物質の同定手段とするために，Fig.4.19に示すように吸光度スペクトル**a**と蛍光発光スペクトル**f**のベクトル積として吸収・蛍光マトリックス(Absorbance - Emission Matrix ; AEM):

$$M = \mathbf{a}\,\mathbf{f}^{T} \qquad (4.14)$$

を定義した。

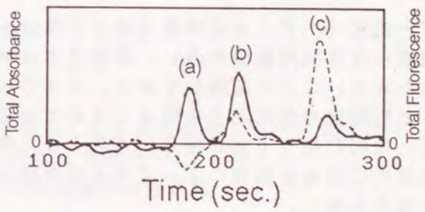


Fig.4.17. Results of integrated absorbance and fluorescence chromatograms same as Fig.4.16.

Fig.4.19はFig.4.18の(b), (c)の位置でのAEMであり，それぞれ２次元平面上で物質固有のピーク領域を持っており，容易に定性分析が行なえることがわかる。

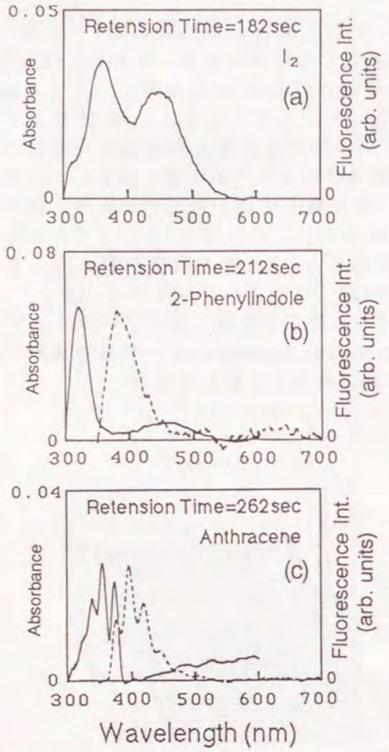


Fig.4.18. Results of absorption-fluorescence spectra of separated components shown in Fig.4.16: (a) Iodine, (b) 2-Phenylindole, and (c) Anthracene.

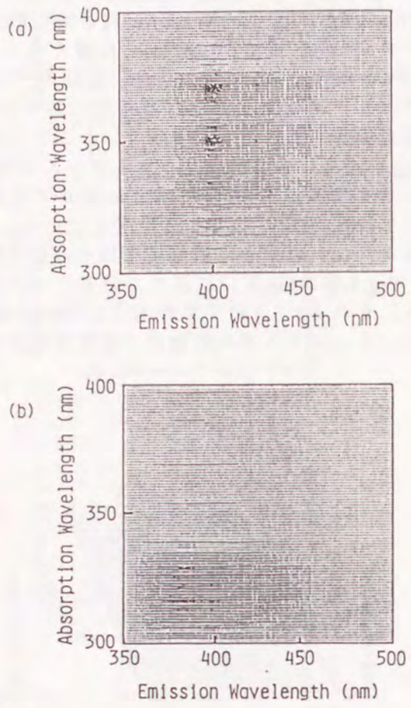


Fig.4.19. Absorption-Fluorescence Matrix fingerprints calculated from the results of Fig.4.18. (a) Anthracene. (b) 2-Phenylindole.

4.3.4考察

吸収・蛍光スペクトル同時測定法は定性分析手法として極めて有効であり，特にAEM表示法は利用価値が高い。現時点では検出感度がやや低いが，これは散乱光成分が大きいことに起因しており，セル形状，セルホルダーの工夫によりさらに１～２桁程度の感度向上を図ることができると考えられる。また高濃度試料では蛍光と吸収の相互干渉が生じ，どちらかに負のピークを生じることがある。これは原理的には補正演算によってある程度除去でき，定性分析にはさほど大きな問題とはならない。

4．4　マルチチャネル蛍光励起スペクトル測定システムの開発

蛍光を用いた定性分析では蛍光発光スペクトルとともに蛍光励起スペクトルも有効な分析手段としてよく用いられる。通常蛍光励起スペクトルは蛍光測定波長を適当に固定し，励起波長を短波長側で走査することにより得られる。測定結果は吸収スペクトルと類似のパターンを持つが，検出感度は吸収測定法よりはるかに高い。また生物光合成過程でみられるように，光エネルギーを吸収した色素がそのエネルギーを電子伝達系によりクロロフィルａに渡して，クロロフィルａからのみ蛍光を発するシステムでは蛍光励起スペクトル分析が最も重要な色素分析手法となる。

HPLC検出手段としても蛍光励起スペクトル測定は生物過程の解明，光合成色素の分析等に有力な方法である。ただしHPLCに適用する際には高速走査またはマルチチャネル検出が必須となり，励起スペクトル測定では励起側波長を高速走査またはマルチチャネル化する必要がある。従来，励起スペクトルのマルチチャネル検出システムに関する報告例はないが蛍光励起発光マトリックス(EEM)測定用のVideo-fluorometerとして，白色光源をポリクロメータで分光し，そのスペクトル結像面に試料セルをおいて空間的に異なる波長で励起し，さらに各励起波長からの蛍光スペクトルをポリクロメータで分光するシステム[44]が報告されている。このシステムでは出力強度が極めて弱く希薄試料の測定は困難である。

ここではマルチチャネル蛍光励起スペクトル測定を実現するために，励起にはVideo-fluorometer方式を採用し，出力蛍光は分光せず全蛍光を積分して検出感度を向上させる方式を考案し，システムを試作した。

4.4.1　システムの構成

Fig.4.20に開発したシステムの光学系の概略を示す。光源には前節と同じ150Wキセノンランプを用い，この光をポリクロメータ(USF-200, Jobin-Yvon)で分光して，石英フローセル(内径1.5mm, 外径4.0mm)の流出方向6.25mm上に300～450nmの波長を結像させる。ポリクロメータの入射スリット幅は0.5mmに固定した。各励起位置からの蛍光発光はロッドレンズアレイ(SLA12-TC32, 日本板硝子)により等倍でフォトダイオードアレイS2301-512Q(浜松ホトニクス)上の125素子分に結像される。理論上のスペクトル分解能は約12nmである。S2301-512Qからのデータは Fig.4.14の回路の片側チャネルのみを用いてコンピュータ上で積算した。

このシステムで得られる出力D(λ)は

$$D(\lambda) = S(\lambda)\{10^{-Ar(\lambda)\int_{\lambda_1}^{\lambda_2}\phi_\lambda(\lambda')d\lambda'} + \alpha\} \qquad (4.15)$$

$S(\lambda)$：光源の発光スペクトル
$A_r(\lambda)$：試料吸光度
$\phi_\lambda(\lambda')$：波長λの光を吸収しλ'で蛍光を発する時の量子効率
α　：測光側に入る散乱光の割合
λ_1, λ_2：検出可能な短波長端と長波長端

と表される。D(λ)には光源スペクトルと散乱光の影響を含む。これらは溶媒のみを試料とした時の測定スペクトル: $R(\lambda) = \alpha S(\lambda)$ より，

$$\frac{D(\lambda) - R(\lambda)}{R(\lambda)} = \frac{1}{\alpha}10^{-Ar(\lambda)\int_{\lambda_1}^{\lambda_2}\phi_\lambda(\lambda')d\lambda'} \qquad (4.16)$$

として除去できる。

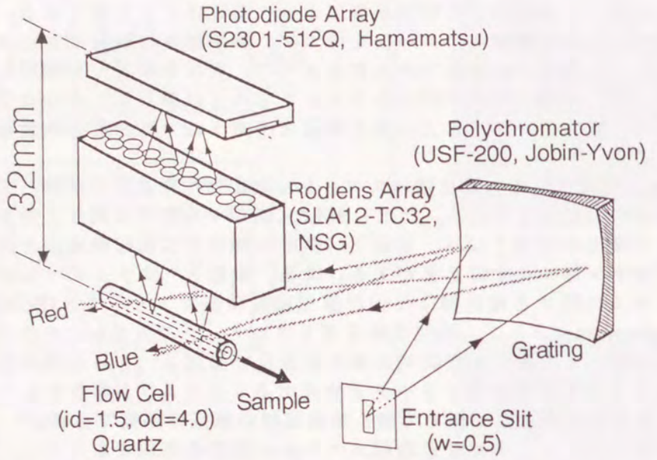


Fig.4.20. Optical arrangement of the multichannel fluorescence-excitation spectrometer.

4.4.2 出力結果

Fig4.21(a)は本システムを用いてAnthraceneのメタノール溶液を直接フローセルに循環させて，16回の積算(全露光時間0.87sec)で測定した結果である。Fig4.21(b)は比較のため蛍光分光度計(日立,650-10S)で測定した蛍光励起スペクトル(発光検出波長450nm，スペクトルスリット幅5nm)を示す。両スペクトルはピーク位置が大きくずれている。これは(4.16)式での量子効率の積分項に関係しており，Anthraceneのように発光スペクトルと励起スペクトルの重なり部分が大きいものではこのような大きな差が生じる。従ってこの方式では従来のスペクトルとの比較は困難であり独自のデータベースによる定性分析が必要となる。また現システムでは低濃度試料の分析が困難であり，光源強度の増大または，インテンシファイアの付加等による検出器感度の向上を図ることが必要である。

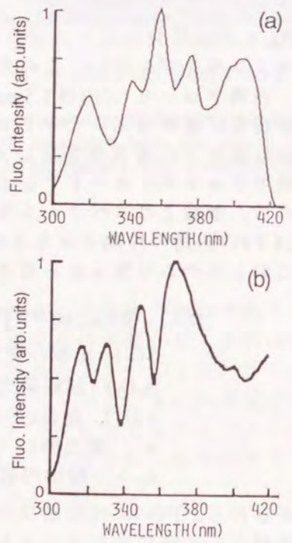


Fig.4.21. Results of the fluorescence excitation spectra of Anthracene in methanol measured by (a) the developed system, and (b) the spectro-fluorometer (650-10, Hitachi) detected at 450nm with spectral slit-width of 5nm.

実際にHPLCに適用する際にはFig.4.22に示すように試料流量に依存してスペクトロ・クロマトグラム上で傾斜したデータを測定することになる。いまフローセル容量をf ml，流量をv ml/secとすると，スペクトロ・クロマトグラム上での両波長端での測定時間差T(sec)はf/v(sec)となる。従って実用上はフローセル内励起部分で試料が均一と見做せる程度まで流量を下げるか，またはこの測定時間差を考慮したスペクトロ・クロマトグラムの再構成が必要となり，今後の検討を要する。

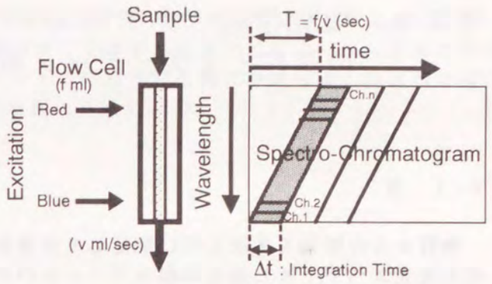


Fig.4.22. Explanatory illustration of time-wavelength relation for the multichannel fluorescence excitation spectrometer.

4.5 結言

多成分系混合物試料を対象とした定性分析の信頼性を向上させ，かつ高感度に検出するための手段として，HPLCによる物理的な分離と，マルチチャネル検出法に基づく蛍光発光スペクトル／蛍光励起スペクトル／吸収スペクトル測定のいずれかを組み合わせた多次元データ展開を実現したシステムを開発し，その有効性を示した。

特に白色光励起によるマルチチャネル蛍光発光スペクトル測定システムは励起効率が高く，定性能力にも優れている，またこのシステムに吸収スペクトル測定を加えると定性能力が大きく向上することも示された。制御コンピュータ側でのメモリ容量，制御能力が充分あれば，このようにマルチチャネル検出方式による多種類のスペクトルの同時測定は極めて有効である。マルチチャネル蛍光励起スペクトル測定方式については，まだスペクトル波形の解析の点で問題があるが，植物細胞の光合成色素分析のような特殊な用途には有用と考えられ，今後さらに検討する必要がある。

第５章　蛍光励起・発光マトリックス展開分光システムの試作と２次元データ解析

５．１　序

物質からの情報を多次元的に測定して情報量を増大させる手法の１つとして，蛍光発光スペクトルと蛍光励起スペクトルの持つ直交性に基づき，発光波長と励起波長を二次元的に走査して蛍光強度をマトリックス状にプロットする蛍光励起発光マトリック(Excitation-Emission Matrix; EEM) 測定法がある[45]。

いま１つの物質の蛍光発光スペクトルをベクトル $\mathbf{x}=(x_1,...,x_n)^T$，励起スペクトルを $\mathbf{y}=(y_1,...,y_m)^T$ とおくと，この物質のEEMは

$$\mathbf{M} = \mathbf{x}\,\mathbf{y}^T \tag{5.1}$$

と表わされ，複数(r種)の混合物では各物質のEEMパターンの線型和として

$$\mathbf{M} = \sum_{i=1}^{r} \mathbf{x}_i\,\mathbf{y}_i^T \tag{5.2}$$

と表現できる。したがって１次元の蛍光発光スペクトルでは，物質間でピーク位置の重なりが大きい場合でもEEM上では分離される可能性が高く，その有用性，特に混合物試料に対する定性，定量能力が注目されている。

(5.2)式の関係に基づく数学的なEEM解析手法の研究も進んでおり，標準となる物質のEEMパターンを利用して最小二乗法で定量する手法[45,46]，非負最小和に基づく定量法[47]，相関[48]およびフーリエ変換[49]を用いたパターン認識法，Rank-annihilation 法による特定成分の定量法[50,51]，Ratio法によるEEM分離法[52]等が報告されている。また未知物質の定性分析手法としても標準パターンを持たずに固有値解析から成分EEMパターンを推定する手法[53]も開発されている。このようにEEMは前章のクロマトグラム展開のような物理的分析手段を用いず，２次元走査によるスペクトル測定のみから数学的な分離同定が可能であるため例えば化学反応過程のモニタのような動的分析にも有効である[46]。

EEMは市販の蛍光分光光度計にコンピュータを結合すれば測定できるが，１回の測定に必要な走査回数が多いため測定時間，駆動部分への負荷が大きく実用的ではない。したがってEEM測定には蛍光測定の特徴を生かすための高感度検出と後のデータ処理のための高SN検出機能高速走査機能，および正確な波長同期を持った専用装置が必要となる。専用装置の開発例にはWarnerら[45]及びJohnsonら[54]による２台のポリクロメータとSITカメラを用いた駆動部分を全く持たないVideo Fluorometerがある。同様の装置がHPLC[40,44]およびりん光測定用[46]としても開発されている。しかしこれらは共通して感度，SN比が低く，波長分解も低い。さらに試料励起をポリクロメータの出力像面上の一次元空間で行なっているため，試料の均一性が要求される。

ここではこれらの問題点を解決した２種類の新しいEEM測定専用システムを開発した。１台は特に高感度なEEM測定を目的として蛍光受光光学系に回転型干渉フィルタを用いて光電子増倍管で検出する構造を持つ。もう一台はクロマトグラフィや顕微分析等，微小空間での応用を目的として，受光光学系に受光効率，耐迷光性に優れたフォトダイオードアレイ検出型フーリエ分光装置を採用した。EEM測定には励起波長か発光波長のどちらかを高速走査してラスタ走査方式を用

いる必要がある。しかし励起光には300nm近傍の短波長域を必要とすることから，励起光学系には分散型分光器を機械的に走査する方式をとり，受光光学系で高速走査を実現している。これらのシステムの有効性を特に多成分混合物試料の測定結果および固有値解析手法の適用結果より示す。

５．２　回転型干渉フィルタ分光受光系を用いたEEM測定システムの開発

蛍光受光系の高速走査手段として半円板型の波長可変薄膜干渉フィルタをステップ・モータにより回転走査する方式を考案し，ロックイン検出方式と結合して高速，高感度なEEM測定を目的としたシステムを開発した。

5.2.1　システムの構造

(a)　ハードウェア

Fig.5.1にシステム全体の構成を，Teble１には仕様を示す。光源には150Wキセノンランプを用い，レンズL1(石英, f=50mm)を通して小型分光器(H20-VIS, Jobin-Yvon)により分光してレンズL2 (石英, f=50mm)により石英製試料セル (10 × 10 × 50 mm)に結像させる。分光器スリット幅は2 mm(スペクトル幅 8 nm)に固定した。

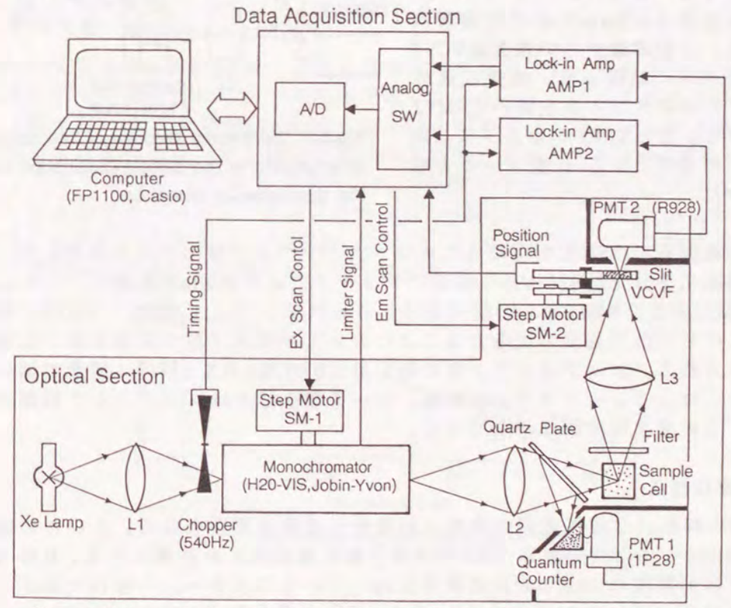


Fig.5.1. Schematic diagram of the EEM scanning spectrofluorometer by using a visible - circular - variable - interference filter (VCVF).

Table 1. Specifications of the optical system.

	Excitation	Emission
Monochromator	H20-VIS (Jobin-Yvon) f = 200 mm, F = 3.5	VCVF180-017 (Ocli)
Slit Width	0.5 mm	1 mm
Spectral Resolution	2 nm	17 nm
Scanning Area	330 nm - 550 nm	400 nm - 700 nm
Photomultiplier	1P28 (Hamamatsu)	R928 (Hamamatsu)
Sampling Number	26 (Max 91)	31 (Max 89)
Time Constant	0.03, 0.1, 0.3, 1.0 sec	

励起光強度はセルに入射する直前で石英スライドグラス(厚さ0.5mm)により一部を光量子計(Rhodamine-B エチレングリコール溶液 8g/lを封入した3角セル)に導き，光電子増倍管PMT1(1P28, 浜松ホトニクス)でモニタする。試料からの蛍光は励起散乱光を除去するため，390nmにカットオフを持つ色ガラスシャープカットフィルタ(L39, 東芝ガラス)を通して，レンズL3(BK7, f=50mm, φ=40mm)で回転型干渉フィルタ(VCVF; Ocli, 180-017)上に集光し，ここで分光して光電子増倍管PMT2(R928, 浜松ホトニクス)で検出する。

VCVFは半円板形状を持ち，角度方向に400～700nmまでを分解能17nm以下で連続的に分光する。Fig.5.2は試料励起・蛍光受光光学系の幾何学的関係を示したものである。励起分光器H20-VISは横置にして出口スリットを水平に設置し，試料セル内励起部分を厚さ0.5mmの水平な薄層状にする。この薄層からの蛍光はVCVFの直径方向に結像させ，直後に迷光を防ぐためのスリットを置いてPMT2で受ける。またVCVFのホルダには回転角度の基準となる 位置マーカを取り付けた。

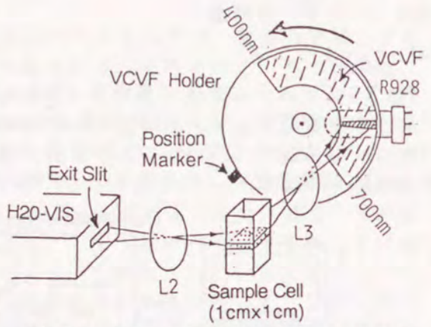


Fig.5.2 Schematic diagram of the optical arrangement of the sample illumination and the fluorescence detection.

信号処理系ではSN比を上げるためロックインアンプ検出方式を採用した。すなわち励起光を分光器H20-VISの直前でチョッパにより540Hzで断続し，これと同期してPMT1およびPMT2からの信号を各々ロックインアンプAMP1，AMP2で増幅する。この2つ信号強度の比をとることによって励起光子数の変動を除いた蛍光強度が得られる。ロックインアンプの時定数は0.03, 01, 0.3, 1秒の4段階で切り替えられる。コンピュータでのA/D変換，データ取り込みはプログラムで制御されており，この最高周波数は45Hzである。

(b) 波長校正

EEMの解析には波長走査の精度と再現性が重要な要素となる。このため励起側分光器H20-VISと受光側分光器VCVFの正確な波長校正が必要となる。H20-VISについては高精度のsine-bar走査機構を持っていることから，1波長で校正しておけば充分である。この校正にはFig.5.3に示す光源キセノンランプの450.1nmでの輝線スペクトルを用いて，次の手順で行なった。

(1) H20-VISを短波長端位置に設定する，(2) ここから445nm近傍まで一定のパルスを送って進める，(3) 長波長側に10nmゆっくり走査してキノセンランプの強度(AMP1の出力)を測定する，(4) 測定範囲内でのピーク位置を求め，これを450.1nmとおいて波長校正を完了する。測定開始時にはステップ・モータのバックラッシュを抑えるため，一旦290nmに設定した後，測定走査方向にゆっくり10nm進めてから測定を開始する。

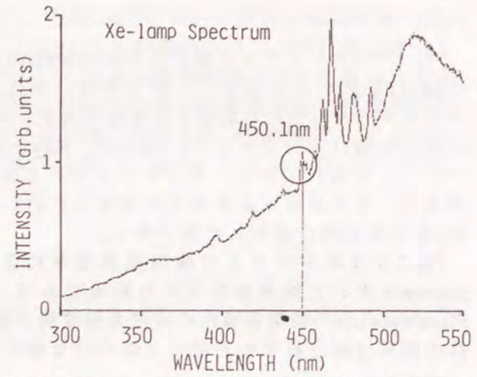


Fig.5.3 A xenon lamp spectrum acquired by the monitoring PMT. The peak at 450.1nm is used as the calibration wavelength.

一方，VCVFの校正については角度と透過波長との関係がほぼ2次式で表現できることから，校正済みのH20-VISを利用して，400nm, 550nm, 700nmの3点での散乱光を利用した。ここではセルホルダ内に拡散板(MgO板)を挿入して，H20-VISをまず400nmに設定する。ここでVCVFを一回転させ，PMT2の出力を測定して強度が最大となる回転角に対応したステップモータ駆動パルス数(位置マーカからの数)を記憶する。この動作を550nm, 700nmについても同様に行ない，得られた3点のパルス数と波長の関係から2次式を求める。

(c) EEM走査

EEMの収集は励起波長 λ_{ex} を一定波長間隔で順次変えながら発光波長 λ_{em} をVCVFの回転により高速走査してラスタ走査方式で行なう。サンプル点数は通常励起側26点，発光側31点(波長間隔10nm)とした。検出器側では光量子計による励起光学系の補正は行われるが，受光側光学系の分光特性，すなわちVCVFの透過率特性T(λ_{em})と光電子倍増管PMT2の量子効率 η(λ_{em})は補正されていない。これらの値は各メーカより与えられたデータ表より得られ，η(λ_{em}) × T(λ_{em})はFig.5.4に示す特性となる。したがって測定されたEEMの発光スペクトル軸方向にこの特性の逆数をかけて受光側光学系分光特性の補正を行なった。

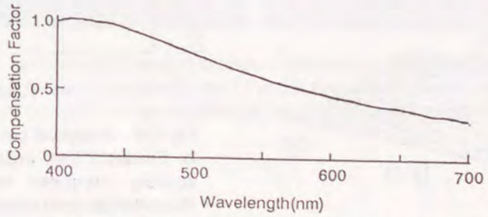
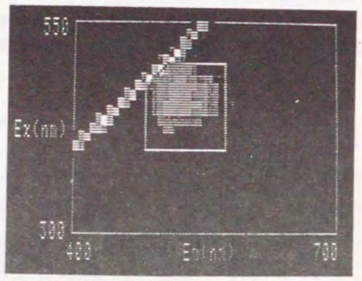


Fig.5.4 Sensitivity compensation function.

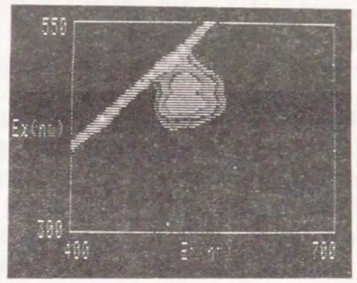
5.2.2 測定結果と考察

Fig.5.5はエタノール溶媒中のFluoresceine (20μg/l) を測定した結果である。(a)は26×31要素からなる生データであり，蛍光強度の最大値で正規化した後３ビットのグレー・レベルで表示したものである。ロックイン・アンプの時定数は0.1秒，全測定時間は４分であった。図には，Rayleigh散乱光が直線状にほぼ一定強度ピークとして現れており，本システムでの２次元波長走査が高精度であり，励起強度補正，受光系分光感度補正が効果的に行われていることがわかる。Fig.5.5(C)は(b)を３次元的に表示した例である。

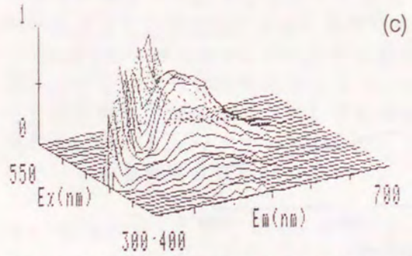
Fig.5.6 は本システムの検出限界を求めるため，エタノール溶媒中のFluoresceineを用いて検量線を求めた結果である。縦軸はFig.5.5(a)中に四角で囲ったFluoresceineの特徴領域内の全蛍光強度積分値を示す。線形比例範囲は約 3.5 桁，検出限界は雑音標準偏差値の３倍の信号強度に対する濃度より2μg/l を得た。



(a)



(b)



(c)

Fig.5.5. Acquired EEM for Eosine in Ethanol (20mg/l). (a) Displayed pattern on a CRT with 3 bit brightness resolution (26 x 31 elements) (b) Spatially interpolated pattern (200 x 240 elements). (c) 3-dimensional display interpolated along the emission axis.

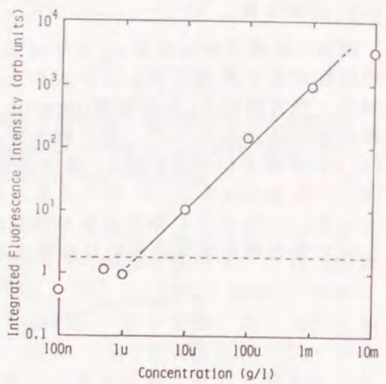


Fig.5.6. Analytical curve of Fluoresceine in Ethanol. The ordinate indicates the spatially integrated intensity within the characteristic area shown in Fig.5(a).

Fig.5.7(a)は３成分(Esculine, Eosine, 2-Aminoanthracene) からなる混合物試料を測定した結果である。Fig.5.7(b), (c), (d)は各々の純粋な成分のEEM測定結果である。これらの結果は前章(Fig.4.15)で示した吸収・蛍光同時スペクトルよりも明確に特徴を表しており，特に混合物試料に対してはその特徴領域から各成分の存在が簡単に把握できる。ただしこの例ではEEM上で構成成分の特徴ピークの重なりが少ないため，容易に成分同定が可能であるが，重なりが大きくなった場合には数学的な分離または識別演算処理が必要となる。

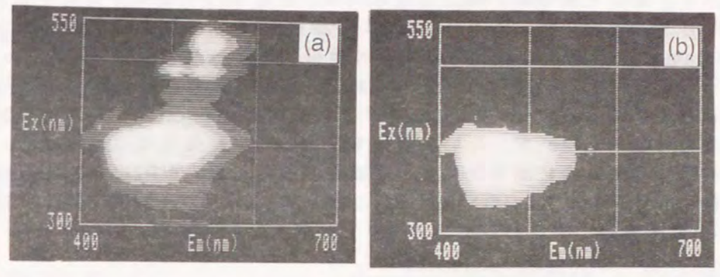


Fig.5.7. Acquired EEMs of fluorescent samples in Ethanol. (a) Mixture of Escurine(100mg/L), Eosine(20mg/L) and 2-Aminoanthracene(100mg/l), (b) Escurine(100mg/l), (c) Eosine(20mg/l), (d) 2-Aminoanthracene (100mg/l).

5.3 偏波面分割型フーリエ分光受光系を用いたEEM測定システムの開発

前節のVCVFを用いたEEM測定システムでは高速波長走査は可能であるが高感度，高SN比測定を実現するためにはロックイン・アンプでの積分時間を長くとる必要があり，全体のデータ収集時間は長くなっている。この点を改善して，同程度の感度，SN比の測定をより短時間で行ないクロマトグラフィや顕微測定などの微小領域の分析への応用を可能にするために，受光分光系にフォトダイオード・アレイ検出型フーリエ分光装置を用いたシステムを試作し，その有用性を検討した。この目的には従来の分散型マルチチャネル分光器の適用も有効と考えられるが，ここでは特に対象蛍光が微弱であることから，明るさと耐迷光性に優れてかつ小型な偏波面分割型フーリエ分光装置を使用した。

5.3.1 システムの構成

Fig.5.8に本システムの構成を示す。試料励起には前節と同一の分散分光器H20-VISを用いているが，試料セルの照射は微小領域分析への適用を考え観測面より行なった。励起光量子数の補正は前節同様，励起光の一部を石英スライドグラスで分岐させ，光量子計，光電子増倍管(1P28)を通してモニターする。受光光学系には0kamotoら[55]により開発された偏波面分割型フーリエ分光装置を用いた。試料からの蛍光はレンズL3(f=30mm, φ=50mm)で集光され，偏光板P1により直線偏光にされてWollastonプリズムに入射する。このWollastonプリズムは入射した直線偏光を分離角θ_s=20'で，互いに直交する2つの直線偏光光束に分ける。この2平面波はプリズム内に局在化した干渉縞を生成し，偏光板P2によって再結合されて結像用カメラレンズL4(f=55mm, F2)により512素子PDA(S2301-512Q, 浜松ホトニクス)上に干渉縞，すなわちインターフェログラムを生ずる。

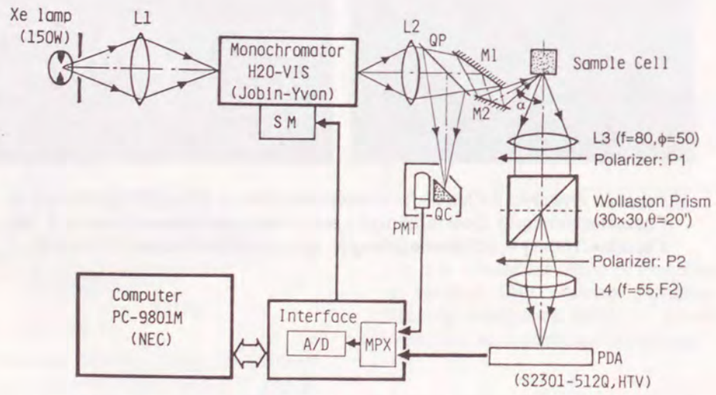


Fig.5.8. Schematic diagram of the EEM scanning spectrofluorometer by using a photodiode-array Fourier-transform spectrometer based on birefringent interferometer.

いま試料からの蛍光スペクトルをf(ν)とおくとPDA上に生じるインターフェログラムI(x)は次のように与えられる。

$$I(x) = \int f(\nu)(1 + \cos 2\pi\nu\theta x)\, d\nu \qquad (5.3)$$

ただし，ν: 波数，x: PDA上の位置，θ: 干渉する2光束の交差角 ($= \theta_s / M$)，M: 結像レンズL4の横倍率 ($\cong 1.5$) を表す。蛍光スペクトルf(ν)は得られた512点からなるインターフェログラムI(x)を離散的に複素フーリエ変換して，その絶対値をとることによりが求められる。これをさらに波長軸に変換してEEMとして配列する。求められるf(ν)の波数分解(隣合う素子間の波数差)δ_νは素子間隔 d(=50μm)より

$$\delta_\nu = 1/(512\,\theta\,d) \cong 100\ \mathrm{cm}^{-1} \qquad (5.4)$$

となる。測定波長領域は450～700nmとした。これより測定波長域での波長分解は約2～4nmとなる。

露光時間はPDAの暗電流による飽和時間(約6秒)以下で任意に設定する。波長校正は前節同様にH20-VISを校正した後，試料セルホルダ内に拡散板を挿入して500nmの散乱光を測定し，これより光学系横倍率Mを調整して波長を合わせる。システム全体の制御およびフーリエ変換演算はパーソナルコンピュータ(PC9801M, NEC)によって行なった。

5.3.2 測定結果

Fig.5.9は試料としてUranineのメタノール溶液(50mg/l)を用いた時のインターフェログラム(a)，それをフーリエ変換した結果(b)，さらに波数軸を波長軸に変換した結果(c)を示したものである。観測時間(センサでの露光時間)は1.6秒である。(d)は蛍光分光光度計(650-10，日立)を用いて同一試料を測定した結果である。本システムでの結果(c)は(d)に比べてSN比は低いが，測定時間は約1/80となっており，高速走査の必要なEEM測定には極めて有効であるといえる。

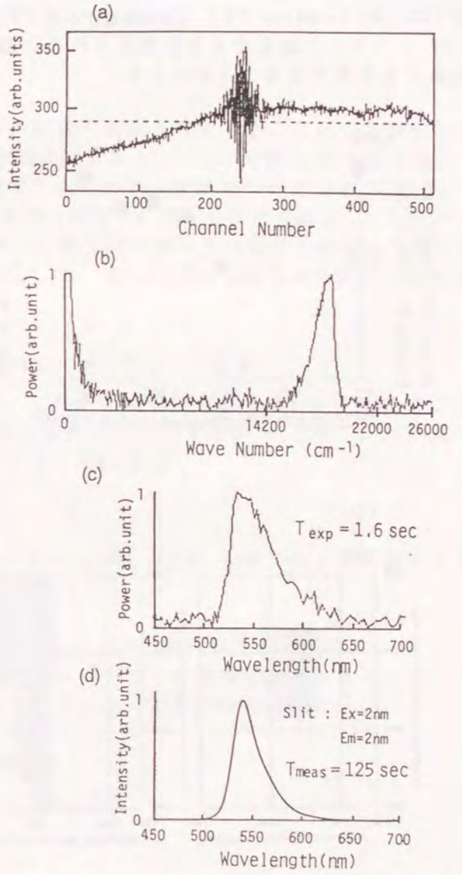


Fig.5.9 Results of Fluorescence emission spectra of Uranine in Ethanol (50mg/l) by using the photodiode-array Fourier-transform spectrometer based on birefringent interferometer. The excitation wavelength is 500nm and the exposing time is 1.6 sec; (a) the interferogram, (b) the power spectrum calculated from (a), (c) the power spectrum represented on wavelength axis. (d) The emission spectrum measured by a spectrofluorometer (650-10S, Hitachi).

Fig.5.10は試料セル励起光軸と蛍光観測光軸のなす角αと蛍光強度の関係を調べた結果である。試料にはEosin(50mg/l)を用い，励起波長を520nmに固定して，蛍光ピーク領域550nm～600nmの面積をプロットした。幾何学的な制約から90°～50°の範囲内でしか測定できなかったが，α=50°でほぼ側面測光方式と同程度の強度が得られ，以後α=50°に固定した。

Fig.5.11は本システムを用いてUranine(50mg/l), Rhodamine-B(33mg/l)および両成分の混合物のエタノール溶媒中でのEEMを測定した結果である。各EEMは最大強度値が一定値となるように正規化した後，16段階のドット・パターンで強度を表している。いずれも1励起波長当りの露光時間は4.2秒，励起側走査点数は22点，発光側サンプル点数は82点であり，全走査時間は約1.5分である。Fig.5.11(c)の混合物EEMには両成分の特徴がよく表れている。ただしRhodamine-Bの発光波長位置が純粋成分のパターンよりも短波長側に移動しているが，これは各純粋成分のpHがUranineで4.5，Rhodamine-Bで7.0であったのに対し，混合物ではpH=6.0にシフトした結果であると考えられる。EEMの解析ではこのような動的変化の解析にも応用できることがわかる。

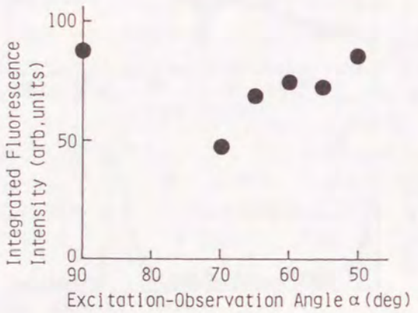


Fig.5.10 Plots of integrated fluorescence intensity of the Uranine in Ethanol (50mg/l) for the angle between the excitation and the observation axis.

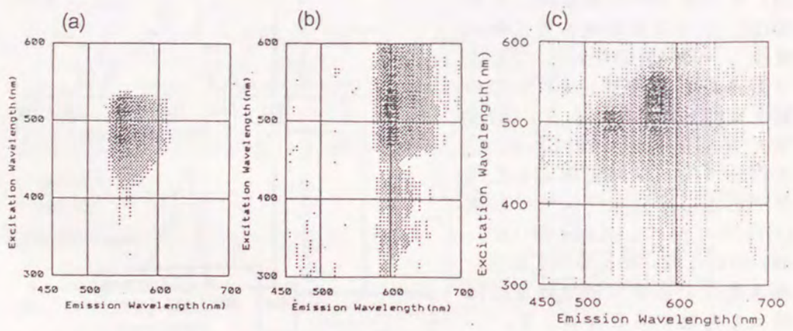


Fig.5.11 Acquired EEMs of fluorescent samples in Ethanol. (a) Uranine (50mg/l), (b) Rhodamine-B (33mg/l), (c) Mixture of Uranine and Rhodamine-B.

5.3.3 考察

本システムでは測定時間においてVCVF受光系システムの1/4程度まで短縮することが可能となった。また受光光学系は構造が簡単であるため一体化も可能であり，顕微分析等広い分野に適用できると考えられる。ただし検出限界はEosinのメタノール溶媒を用いた場合0.5mg/lであり，VCVF受光系システムでの同じ試料に対する値が10μg/lであると比較すると1桁以上低い。この点を解決して，より高感度化するためには，(1)PDAを冷却して暗電流を抑える。(2)励起光学系の励起角度を小さくして励起効率をかせぐ，等の工夫が必要と考えられる。

5.4 成分分離処理への応用

EEMの解析手法は前述のように種々提案・開発されている。これらの解析手法の中で特に未知多成分混合物試料のEEMに対するスペクトル分離-定性分析手法は，EEMの持つ情報量を最大限に引き出す手法であり，重要かつ利用価値の高いものである。この一つとしてWarnerら[53]は固有値解析に基づく手法を提案しているが，ここではLawtonら[56]による2成分系での混合比の異なる一連の1次元スペクトル波形からの成分分離手法をEEMに適用して，本システムで得られたデータの有用性について検討した。

5.4.1 SMCR(Self-Modeling Curve Resolution)手法[56]の原理

いま観測したEEMを行列$\mathbf{M}$として，これが2成分から成ると仮定する。ここでは$\mathbf{M}^T\mathbf{M}$の0でない2個の固有値に対応する固有ベクトルを$\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2$とおく。(5.2)式の線型関係が成立すれば各成分発光スペクトル$\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2$は

$$\mathbf{x}_1 = t_{11}\mathbf{v}_1 + t_{12}\mathbf{v}_2$$
$$\mathbf{x}_2 = t_{21}\mathbf{v}_1 + t_{22}\mathbf{v}_2 \qquad (5.5)$$

と表わされる。したがって$\mathbf{X}=(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2)$, $\mathbf{Y}=(\mathbf{y}_1, \mathbf{y}_2)$, $\mathbf{V}=(\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2)$, $\mathbf{T}=\{t_{ij}\}$と定義すると$\mathbf{M}=\mathbf{X}\mathbf{Y}^T$, $\mathbf{X}=\mathbf{V}\mathbf{T}^T$より，各成分励起スペクトル$\mathbf{Y}$も

$$\mathbf{Y} = \mathbf{M}^T\mathbf{V}\mathbf{T}^{-1} \qquad (5.6)$$

として求められる。ここで$\mathbf{T}$の各要素を次の二つの制約条件より求める。

(1)各成分の励起および発光スペクトルはすべての波長で非負となる。

(2)発光スペクトルは面積で規格化して，その形状のみを抽出する。

(1)の条件より

$$x_{ij}(T) \geq 0 \quad \text{for } i=1,2,\ j=1,..,n$$
$$y_{ik}(T) \geq 0 \quad \text{for } i=1,2,\ k=1,..,m \qquad (5.7)$$

(2)の条件より

$$\sum_{j=1}^{n} x_{ij}(T) = 1 \quad \text{for } i=1,2 \qquad (5.8)$$

が得られる。さらに得られたバンド幅を持った発光スペクトルの中から特定の1本のスペクトル波形を選択するためにSasakiら[57]の2次微分波形の情報エントロピー最小化による特徴強調規範を用いた。すなわち$\mathbf{x}_{ij}$に対する2次微分波形を$\mathbf{s}_{ij}$

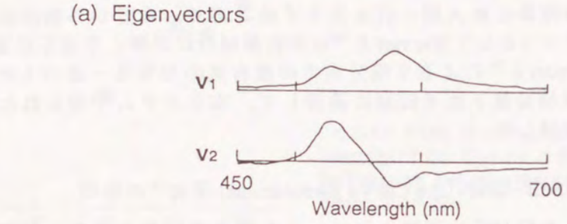
として，

$$H = \sum_{i=1}^{2} \{-\sum_{j=1}^{n} \frac{|s_{ij}|}{S_i} \ln \frac{|s_{ij}|}{S_i}\} \longrightarrow \min \qquad (5.9)$$

$$S_i = \sum_{j=1}^{n} |s_{ij}|$$

なる最適解 $\mathbf{x}_{ij}$ を求める。

Fig.5.12はFig.5.11(c)の２成分混合物EEMに本手法を適用した結果である。Fig.5.12(a)は２つの固有ベクトル $\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2$ であり，Fig.5.12(b), (c)は各々分離推定された第一成分と第二成分の発光ベクトルをバンド領域で示したもの(斜線の領域)と，その中から特徴強調規範により１本のスペクトルを選択した結果(太線)，とこれに対応する励起スペクトル(点線)を示したものである。明らかに(b)はRhodamine-B, (c)はUranineの特徴をよく明らかにしておりこの演算手法の有用性がわかる。ただしUranineの発光スペクトルについては570nm近傍に純粋成分にはないピークが現われており，これはデータ精度が低いために生じたものと考えられる。



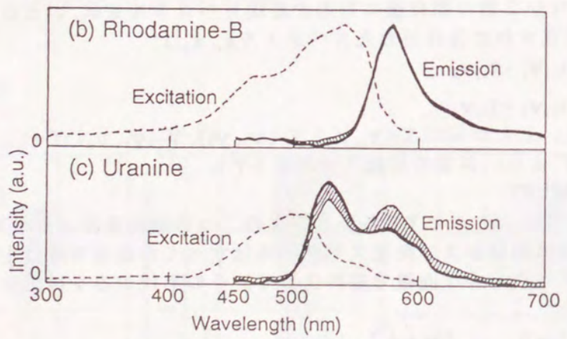


Fig.5.12 Results of the Self-Modeling Curve-Resolution (SMCR) analysis for the EEM of a mixture sample shown in Fig.5.11(c). (a) The first two eigenvectors of MTM, (b) the estimated emission spectral band (hatching), emission spectrum (bold line) and excitation spectrum (dotted line) for the first component: Rhodamine-B, (c) same as (b) for the second component: Uranine.

5.5 結言

蛍光分析法における蛍光発光スペクトルと蛍光励起スペクトルの直交関係を利用したEEM分析手法の有用性を生かすための専用装置の開発を行なった。EEMではデータ量が大きくなることから高速走査性，後のデータ解析演算のために高い波長再現性と高SN比検出が要求される。ここで開発した回転型干渉フィルタ分光受光系システムおよびフーリエ分光受光系システムは，ほぼこれらの条件を満たすことができた。前者は特に高感度な分析に後者は微小領域分析を目標としており，実用に際してはさらに適用分析に合わせて改良する必要がある。

またデータ解析手法として固有値解析手法に基づくスペクトル分離を試みEEMの持つ有用性を示した。とくにEEMでは物理的分離を行わずに数学的に成分分離が可能であることから，広い分野での応用が期待される。

第６章　光干渉パターン検出型光熱分光システムの試作と高精度情報の抽出

６．１　序

第５章，第６章においては多成分混合物試料分析を対象として，分光スペクトル測定での走査軸を２次元展開する新しい方式を考案し，従来問題となってきたスペクトル波形の重なりを減少させ，結果的に定性分析能力の飛躍的向上を実現したシステムを開発した。一方，単一成分試料の定量分析には，従来より光電子増倍管などの点検出器を用いた，単一波長での光学特性(吸収や発光など)測定法が用いられている。このような単一成分試料の定量分析に一次元または２次元検出法を採用すれば，時間積分のみによりSN比向上を実現してきた従来法に比べ，空間積分も利用でき，SN比の大幅な改善と高感度化が期待できる。ここでは特に高感度な分析手法として注目されている光熱分光法を取り上げ，一次元検出法を導入した新しいシステムを考案・試作し，安定かつ極めて高感度な吸収測定を実現した。

光熱分光法は試料の光吸収から生じる無放射遷移過程での熱によって引き起こされる赤外放射，屈折率変化等を測定して高感度に吸光度を求める方法[58]である。特に屈折率変化を利用する方法は光源強度に比例した感度が得られることから，レーザ光源を用いた超高感度な手法が種々開発され多方面に応用されている[59]。これらには，熱レンズ法[60)-65)]，光熱放射法[66]，光熱偏向法[67)-69)]，光熱回折法[70]，光熱干渉法[71)-75)]等がある。熱レンズ法は特に液体試料を対象として試料の屈折率変化による励起レーザビーム径の拡がりを測定するものであり，装置が簡単で感度が高いことから多くの応用が報告されている。通常は点測定法が用いられるが，ビーム径を一次元センサで測定する手法[64]も提案されている。光熱偏向法は励起レーザによって生じた屈折率変化を検出用レーザによってその偏向角度から測定する手法であり，特に固体試料の表面分析に有効である。光熱干渉法は試料内に生じた屈折率変化を干渉計を用いて位相検出する方法であり，微小な屈折率変化を測定できることから特に高感度な検出が可能である。この手法ではStone[72),73)]がJamin干渉計を用いて位相変化量を測定し，試料吸光度を求めている。

本研究では感度の点で最も高いと考えられるこの光熱干渉法において，レーザ励起によって生じた屈折率変化を一次元的に検出する手法を考察し，超高感度な吸収測定システムを開発し，そこ有用性を確認した。

６．２　光干渉パターン検出型光熱分光法の原理

高エネルギーのレーザビームにより試料を励起した場合，Fig.6.1に示すように試料セル内に光吸収量に比例した円筒状の屈折率分布を生じる。この円筒軸(Z軸)に垂直な平面(XY面)内での屈折率変化量と光吸収係数との関係を求める。ここでまず次の仮定をおく。

(1)励起レーザビームは軸対称の平行光束である。
(2)試料は希薄溶液であり励起レーザ光に対する吸収係数α(cm^{-1})は小さい。
(3)試料の屈折率の温度変化係数(dn/dT)は温度に依らず一定である。
(4)試料に吸収されたエネルギーはすべて熱に変換される。
(5)試料は均一で無限の広がりを持ちセルでの吸収は無視できる。

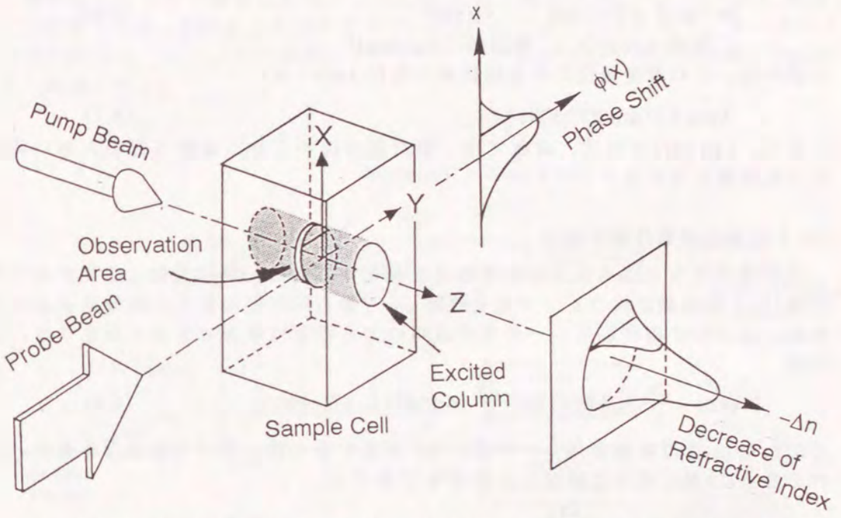


Fig.6.1. Explanatory illustration of the photothermal spectrometry based on the interferometric phase-shift detection.

(a) 光吸収量

いまセル中心部の励起光軸(Z軸)に垂直な面上で，Z軸からの距離 $r=(x^2+y^2)^{1/2}$ での励起光強度を$p(r,z)$とおくと，

$$\frac{d\,p(r,z)}{p(r,z)} = -\alpha\,dz \qquad (6.1)$$

と表される。セル入射直前の励起光強度分布を$p_0(r)$として，セル壁面から観測面(Z=0)までの距離をd(cm)とおくと，

$$p(r,z) = p_0(r)\,e^{-\alpha(z+d)} \qquad (6.2)$$

と表される。(2)の仮定: $\alpha \ll 1$より，Z=0においては

$$p(r,0) \cong p(r)(1-\alpha d) \qquad (6.3)$$

と近似できる。ここで，試料にτ時間励起光を照射した時の単位長さ当りの吸収エネルギQは，

$$Q = \alpha\tau \int_0^\infty p(r,0)\, r dr$$
$$= \alpha\tau(1-\alpha d) \int_0^\infty p(r,0)\, r dr$$
$$= \alpha\tau(1-\alpha d) P_0$$
$$\cong \alpha\tau P_0 \qquad (J/cm) \qquad (6.4)$$

$$P_0 = \int_0^\infty p(r,0)\, r dr \qquad (6.5)$$

と表される。ただしP_0は試料セル入射直前の励起光パワーである。

(b) 屈折率変化

一方，τ時間後の観測面内の温度変化量分布を$\Delta T(r)$とおくと，Z=0での単位長さ当りの吸収熱量Q_τは

$$Q_\tau = \rho c \int_0^\infty \Delta T(r)\, r dr \qquad (J/cm) \qquad (6.6)$$

ρ：密度(g/cm^3)，c：熱容量(J/(g deg))

と表され，この温度変化による屈折率の変化$\Delta n(r)$は

$$\Delta n(r) = (dn/dT)\, \Delta T(r) \qquad (6.7)$$

となる。(dn/dT)は気体，液体では一般に負の値をとり，温度上昇の大きい部分ほど屈折率は下がる。

(c) 干渉縞位相変化量の検出

(6.7)式のように得られる屈折率変化を測定するため，励起光軸と直交する方向(Y軸)から位相測定用のレーザ光を照射し，Y軸方向の位相変化の積分量$\phi(x)$を求める。ここで位相測定用レーザ光の試料による吸収は無視できると仮定する。この時

$$\phi(x) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_{Sx} \Delta n(r)\, ds = \frac{2\pi}{\lambda} (dn/dT) \int_{Sx} \Delta T(r) ds \qquad (6.8)$$

ただし$\int_{Sx} ds$は位相測定用レーザ光がxに到達する光路に沿った線積分を表す。これをさらにx軸に沿って積分した値をΦとおくと，

$$\Phi = \int_{-\infty}^{\infty} \phi(x) dx = \frac{2\pi}{\lambda} (dn/dT) \int_{-\infty}^{\infty} \int_{Sx} \Delta T(r) ds dx$$
$$= \frac{2\pi}{\lambda} (dn/dT) \int_0^\infty \Delta T(r)\, r dr \qquad (6.9)$$

(6.6)式と(6.9)式より，

$$Q_T = \frac{\lambda\rho c\Phi}{2\pi(dn/dT)} \qquad (6.10)$$

さらに仮定(4)より$Q=Q_T$となることから次式を得る。

$$\alpha = \frac{\lambda\rho c\Phi}{\tau P_0 (dn/dT)} \qquad (6.11)$$

すなわち，試料パラメータ ρ, c, (dn/dT)，励起光パワーP_0，励起時間τ，検出レーザ波長λが既知であれば，励起光軸と垂直な平面内での全位相変化量Φを測定することにより吸収係数αを求めることができる。

6.3 Mach-Zehnder干渉計を用いた光熱分光システムの開発

前節の理論に基づき，試料をレーザ励起した時に生ずる位相変化をMach-Zehnder干渉計により検出するシステムを試作した。

6.3.1 システムの構成

Fig.6.2にシステム全体の構成を示す。試料励起にはArイオンレーザ（最大出力1W)を用い，電磁シャッタにより励起時間を制御する。試料セル(溶触石英製，10×10×50 mm)はMach-Zehnder干渉計の一方の光路中に設置した。干渉計の光源にはHe-Neレーザ(632.8 nm，出力 5 mW)を用い，これを10倍に拡大して２光束に分割した。干渉縞の間隔は参照光路側ミラーM2をチルトさせて調整し，セル端面で位相変化を生じた干渉縞は結像レンズL3により１次元CCDセンサ(TCD104C，東芝)上に結像される。CCDセンサは１素子32μm×32μm，128素子より成る。センサからの信号読出し，シャッタの開閉はすべてパーソナルコンピュータ(PC9801，NEC)により制御した。

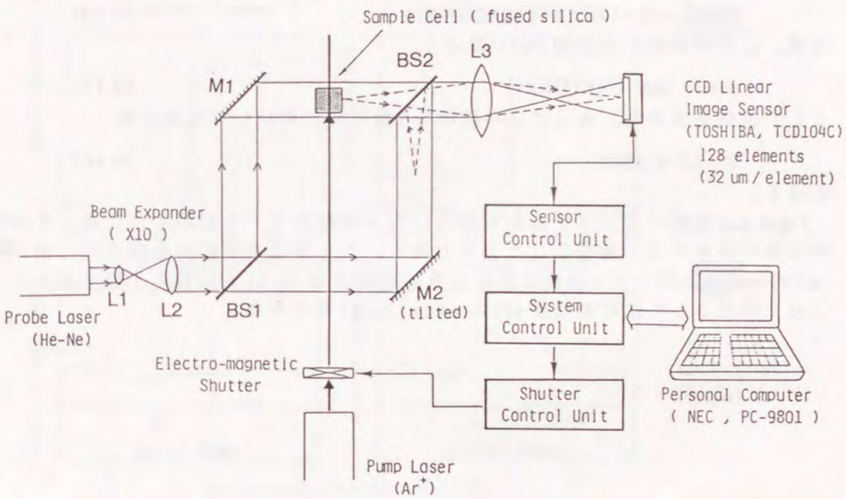


Fig.6.2. Schematic diagram of the photothermal spectrometer based on the interferometric-detection by using the Mach-Zehnder interferometer.

Fig.6.3は実際に本システムで得られたCCDセンサ面上での干渉縞の様子を示したものである。センサはこの像の中心部分を観測できるように設置した。

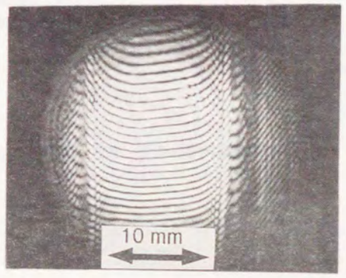


Fig.6.3. A fringe pattern detected at the sensor position.

6.3.2 位相解析

CCDセンサにより得られた干渉縞から位相変化量を求める手段には，演算が簡単でかつ高精度な，フーリエ変換サブフリンジ計測法[76]を用いた。いま干渉計のミラーM2を微小角度θだけ傾けて，空間周波数 $\omega_0=4\pi\tan(\theta/\lambda)$のキャリア信号を導入すると，次式で表される干渉縞が観測される。

$$g(x) = a(x) + b(x)\cos\{\omega_0 x + \phi(x)\}$$
$$= a(x) + c(x)\exp(j\omega_0 x) + c^*(x)\exp(-j\omega_0 x) \quad (6.12)$$
$$c(x) = (1/2)\,b(x)\exp(j\phi(x))$$

ただし$c^*(x)$は$c(x)$の複素共役を表し，$a(x), b(x)$は干渉計での照明むらやセンサ感度分布等である。ここで，(6.12)式をフーリエ変換すると，

$$G(\omega) = A(\omega) + C(\omega-\omega_0) + C^*(\omega+\omega_0) \quad (6.13)$$

となる。ただし$G(\omega), A(\omega), C(\omega)$は各々$g(x), a(x), c(x)$に対するフーリエ変換を表す。(6.13)式は位相変化$\phi(x)$の情報が$\pm\omega_0$のまわりに局在していることを表している。そこで，$C(\omega-\omega_0)$のみをフィルタリングにより残してω_0だけ周波数を移動させ，$\phi(x)$に関係する成分$C(\omega)$を抽出する。これを逆フーリエ変換して

$$F^{-1}\{C(\omega)\} = (1/2)b(x)\exp(j\phi(x)) \quad (6.14)$$

を得，この実部$R(x)$と虚部$I(x)$の比より

$$\phi(x) = \tan^{-1}\{I(x)/R(x)\} \quad (6.15)$$

として位相を求める。さらにこの位相をX軸方向に積分して光熱信号

$$\Phi = \int_{-\infty}^{\infty} \phi(x)dx \quad (6.16)$$

を得る。

Fig.6.4は実際に本システムから得られた干渉縞から，上記の手法に従って位相変化量を計算する手順を示したものである。ここではまず試料励起前の位相分布$\phi_0(x)$を求め，続いてt秒間試料励起後の位相分布$\phi_t(x)$を同様の手順で求める。これらの差として位相変化量$\phi(x) = \phi_t(x) - \phi_0(x)$を求める。

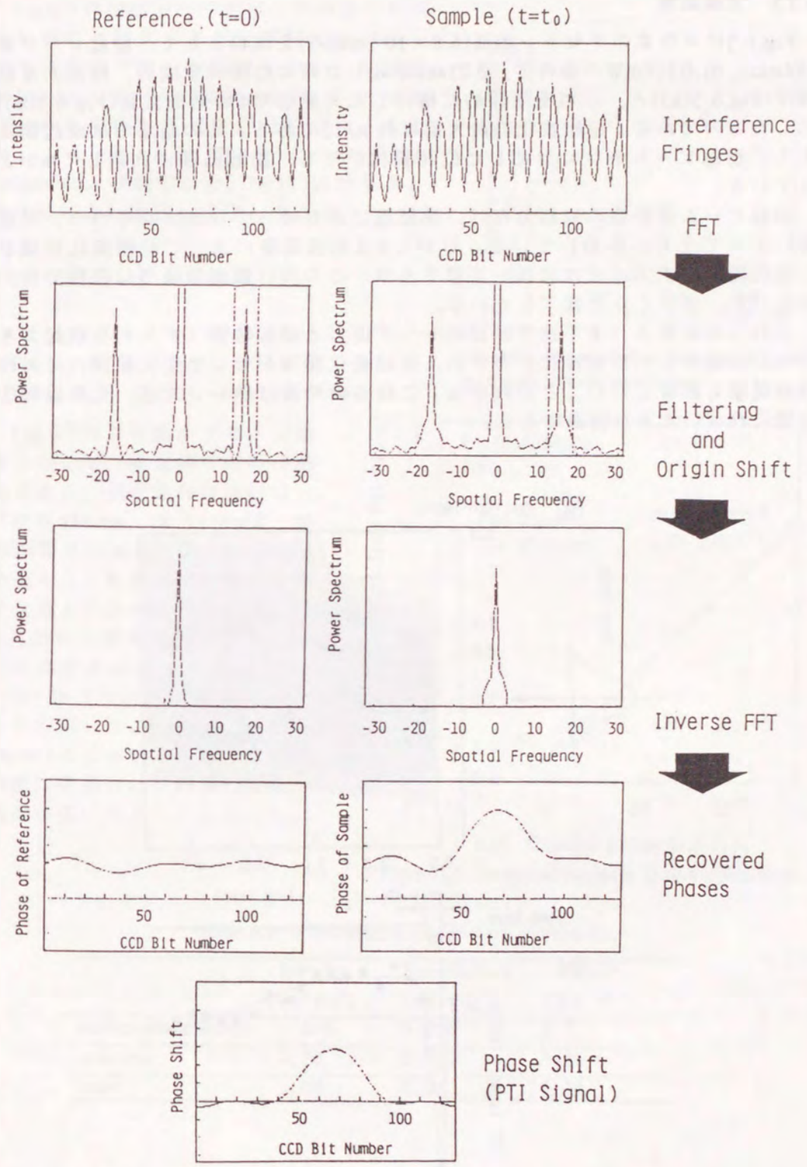


Fig.6.4. Procedures for the phase retrieval by using the Fourier-transform subfringe-analysis method.

6.3.3 実験結果

Fig.6.5はヨウ素のアセトン溶液(6.8×10^{-5} mol/l)を試料として，励起レーザ波長488nm，出力310mWの条件で，0.25sec励起した時の位相の空間的，時間的変動の様子(Fig.6.5(a))と，これを空間的に積分した光熱信号Φの時間変動(Fig.6.5(b))を示したものである。位相変化の最大値は約π/10である。この結果では励起開始とともに励起ビーム形状に対応した位相変化が生じ，励起時間に比例してΦが上昇している。

励起ビーム遮断後の位相分布は，熱拡散によりゆっくりと広がりつつ，対流現象によって上方に移動している。しかしΦは対流現象によって位相変化領域がセンサの端に達するまではほぼ一定値をとり，この後は観測領域外に位相分布が広がるため，ゆっくりと低下している。

これらの結果より本手法では励起レーザ出力と励起時間（すなわち励起エネルギー）に比例した位相変化が得られ，位相変化領域がセンサ受光範囲内にあれば対流現象も影響しないことがわかる。これらの特徴は熱レンズ法，光熱偏向法では得られない大きな特徴である。

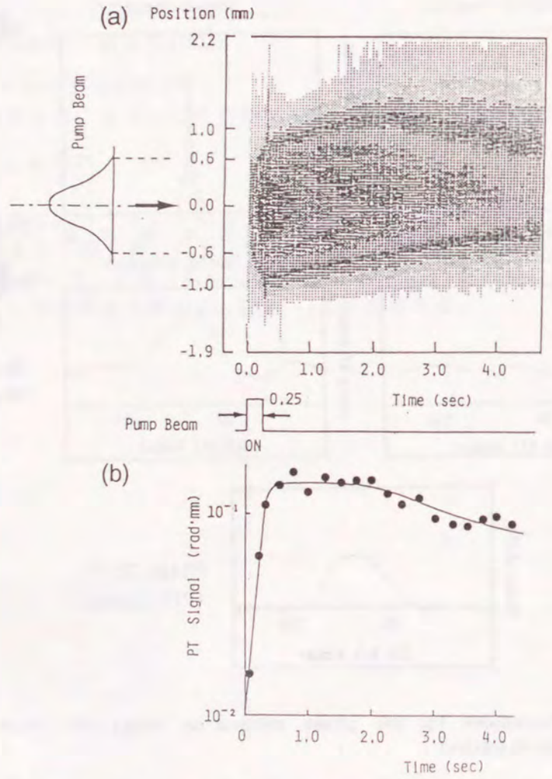


Fig.6.5. Temporal changes of the phase pattern during and after the pulsed (0.25sec) excitation. The sample is Iodine in Acetone. (a) Spatial patterns, (b) spatially integrated signals: Φ.

Fig.6.6は励起レーザ出力と光熱信号の関係を調べた結果である。試料は前述同一のヨウ素のアセトン溶液を用い，励起波長488nm，励起時間0.25secで，レーザ出力のみを変更して光熱信号をプロットした。レーザ出力はパワーメータ(Ophir Optics)により測定した。(6.11)式で予測される様によい直線が成立している。

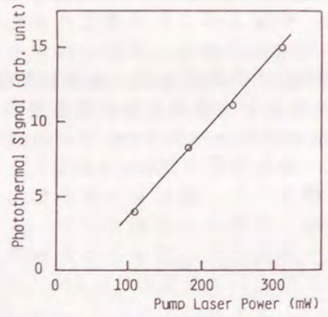


Fig.6.6. Plots of photothermal signals, Φ for the excitation laser power.

Fig.6.7はヨウ素のアセトン溶液を用いて，検量線を求めた結果である。測定条件は励起レーザ波長488nm，出力310mW，励起時間0.25secとし，励起終了直後から1秒後までの平均位相変化量より(6.11)式を用いて1cmあたりの吸光度に換算した。この換算に必要な溶媒(アセトン)の熱パラメータは文献(72)より引用した。これらの値はTable 6.1のとおりである。ここには後に使用した，四塩化炭素，純水の各パラメータも示した。

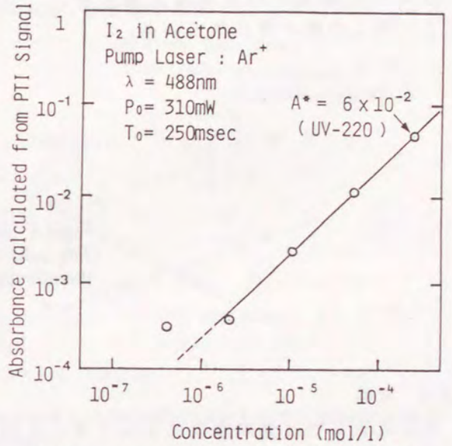


Fig.6.7. Analytical curve for Iodine in Acetone.

Table 6.1. Photothermal parameters of solvents.

	Density (g/cm^3)	Specific heat (cal/g°C)	$-dn/dT$ ($104\,°C^{-1}$)
carbon tetrachloride	1.575	0.206	5.7
acetone	0.78	0.519	1.36
water	1.00	1.00	1.04

図中のA点は分光光度計(UV-220, 島津)によって測定した吸光度であり，この値は本システムでの測定値とほぼ一致している。4.8×10^{-4} mol/lの点では直線から外れているが，これは溶媒として用いたアセトン自体の吸光度(2.2×10^{-4})の影響である。このアセトンの吸光度を差し引けばヨウ素の吸光度は9×10^{-5}となり，この値は求めた校正直線上に乗る。

Fig.6.8は励起レーザの発振波長を変えて，吸収スペクトル測定への応用を試みた結果である。試料にはアセトン溶媒中のヨウ素(6.8×10^{-5} mol/l)を用い，Arイオンレーザの4本の発振波長(476.5nm, 488.0nm, 496.5nm, 514.5nm)において，励起時間0.25secで測定し，吸光度に換算した。励起レーザの出力は各波長毎に試料セル直前でパワーメータにより測定した。図中には比較のため同一試料を分光光度計UV-220で測定したスペクトル波形も示した。UV-220での測定結果は試料濃度が装置の検出限界に近いためSN比が低いが，本システムでは充分な感度で分光光度計測定値とよく一致した値が得られている。

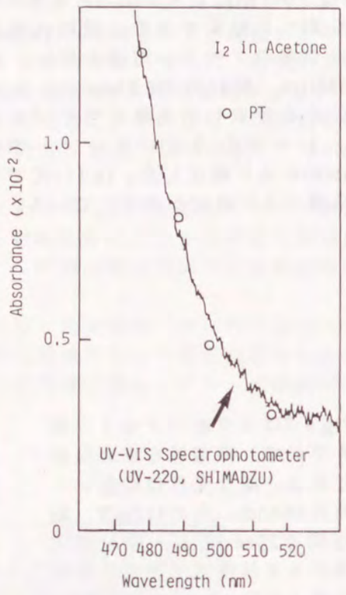


Fig.6.8. Photothermal spectrum for Iodine in Acetone. The solid line represents the spectrum measured by the spectrophotometer (UV-220, Shimadzu).

6.3.4 考察

本システムでは光熱効果によって生じた屈折率変化を干渉計を用いて空間的な位相変化量として測定することで高感度な吸収測定を達成した。特に従来の光熱分光法の大部分が点検出方式であり，レーザ出力に比例した感度を得ていたのに対し，本方式では1次元検出法を用いたことにより，空間的な熱変動があっても測定でき，励起時間の延長によっても感度を上げることが可能となった。さらに本測定法は励起レーザビームの形状に依存せず，試料吸光度と信号出力との理論的対応も明確である。ただし検出用干渉計が外乱を受けやすく安定性を維持することが困難であり，この点を改善することで感度はさらに向上すると考えられる。

6.4 Talbot干渉計を用いた光熱分光システムの開発

光熱効果によって生じる屈折率変化を干渉計を用いて1次元空間的に測定する方式を安定に動作させるために，Mach-Zehnder干渉計をTalbot干渉計[77]に置き換えたシステムを試作し，その性能を評価した。本光学系は構成が簡単で直線状に全光学素子を配置でき，ほぼコモンパスの干渉計であることから外乱の影響を受けにくく，安定性は大きく改善された。

6.4.1 システムの構成

Fig.6.9に本システムの光学系の模式図を，Fig.6.10にシステム全体の構成を示す。試料の励起は前節同様Arイオンレーザを電磁シャッタで制御してパルス照射する。この励起によって生じた屈折率変化は励起光軸と直交する光軸を持つ回折格子干渉光学系，いわゆるTalbot干渉計により検出する。この光学系は試料セル(10×10×50mm)の手前に置かれた透過型回折格子(格子定数d=0.1mm, 30×30mm)のフーリエ像を1次元CCDアレイセンサ(μPD795D, NEC)で検出するだけの簡単な構成である。

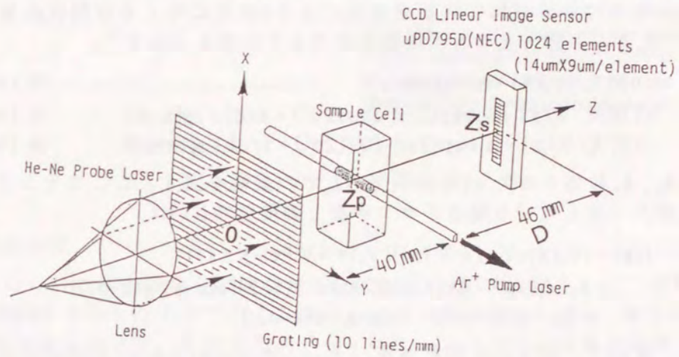


Fig.6.9. Optical system of thephotothermal spectrometer based on the interferometric-detection by using the Talbot interferometer.

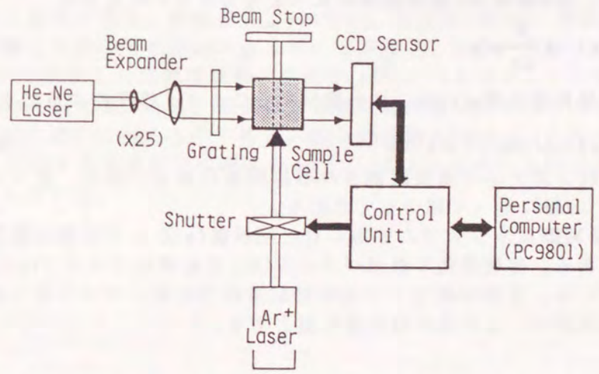


Fig.6.10. Block diagram of the Talbot interferometric photothermal spectrometer.

CCDセンサは素子数1024, 1 素子14μm×9μm, 有効長14.336mm から成り，前節で使用したセンサよりも有効長を長くして観測領域の拡大を図った。回折格子の照明にはHe-Neレーザ(出力1mW)のビームを25倍に拡大して用いた。シャッタの制御，CCDセンサからの信号の読み取りはすべてパーソナルコンピュータ(PC9801, NEC)より行なった。

6.4.2 回折格子像の解析

Fig.6.9に示した光学系において回折格子からの回折光が理想的に0次, +1次, -1次光のみから成ると仮定する。このとき，照明レーザ光波長をλとおくと，回折角はλ/dとなり，格子の後方 $2md^2/\lambda$ (ただしmは整数) の位置に原格子と同一のフーリエ像を生ずる。検出光学系の光軸をZ軸にとり，センサ位置をZ_s，励起位置をZ_pとおくと，センサ位置での回折光のshear量 aは

$$a = (Z_s - Z_p)\lambda/d = D\lambda/d \tag{6.17}$$

$$D = Z_s - Z_p \tag{6.18}$$

となる。ここでいま試料の屈折率変化により0次光に生じる位相変化量を$\phi(x)$とおくと，Z_sでの各回折光の複素振幅は次のように与えられる[78]。

$$0\text{次光: } V_0(x) = A_0\exp\{i\phi(x)\} \tag{6.19a}$$

$$+1\text{次光: } V_+(x) = A_1\exp\{2\pi i[-D\lambda/(2d^2) + x/d] + i\phi(x-a)\} \tag{6.19b}$$

$$-1\text{次光: } V_-(x) = A_1\exp\{2\pi i[-D\lambda/(2d^2) - x/d] + i\phi(x+a)\} \tag{6.19c}$$

ただしA_0, A_1は各々 0次, ±1次回折光のZ_pでの振幅を表す。ここでセンサ面がフーリエ像面と一致している場合のセンサ面上強度分布I(x)は，

$$\begin{aligned} I(x) &= \{V_0(x)+V_+(x)+V_-(x)\}\{V_0(x)+V_+(x)+V_-(x)\}^* \\ &= A_0^2 + 2A_1^2 + 4A_0A_1\cos[2\pi x/d - (1/2)\{\phi(x+a)-\phi(x-a)\}] \\ &\quad + 2A_1^2\cos[4\pi x/d - \{\phi(x+a)-\phi(x-a)\}] \end{aligned} \tag{6.20}$$

となる。従って，得られた回折強度パターンから$\cos(2\pi x/d)$ の周波数の近傍の信号成分を前節同様フーリエ変換サブフリンジ法で抽出することにより位相変化の差分パターン

$$\varphi(x) = (1/2)\{\phi(x+a)-\phi(x-a)\} \tag{6.21}$$

が得られる。shear量 aは観測範囲に比べて充分小さいことから，

$$\varphi(x) = a\,\frac{d}{dx}\phi(x) \tag{6.22}$$

と表され，位相変化量$\phi(x)$はこれを積分することにより次のように求められる。

$$\phi(x) = d/(D\lambda)\int_{-\infty}^{x}\varphi(x')dx' \tag{6.23}$$

この$\phi(x)$は前システムで直接観測される位相変化量と一致し，従って光熱信号はこれをさらにx軸に沿って積分して求める。

Fig.6.11は実際に本システムで得られた回折像(a)からの位相回復計算の手順を示した例である。位相変化の微分パターン(b), 位相変化パターン(c)ともに明瞭に抽出されている。実際の測定では試料励起直前の位相パターンと一定時間励起後のパターンを求め，この差を位相変化量とする。

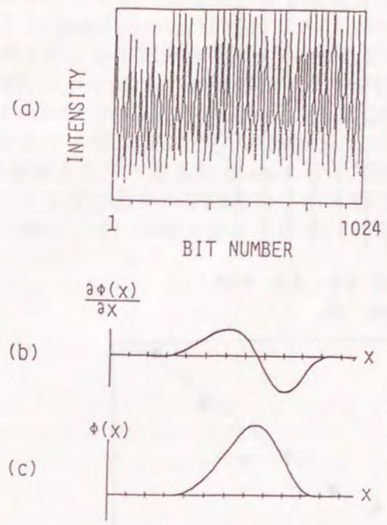


Fig.6.11. Procedures for the phase recovery from the Fourier image of the grating. (a) A Fourier image of the grating, (b) the recovered derivative-phase pattern, (c) the inherent phase pattern; integration pattern of (b).

6.4.3 実験結果

Fig.6.12はヨウ素の四塩化炭素溶液(吸光度2.8×10^{-2})を試料として，励起後の位相変化の様子を示したものである。励起レーザの波長は514.6nm，出力は143mWで10秒間照射を続けた。位相分布パターンは前システムでの結果と同様，励起時間の経過と共に拡散が生じ，上方に移動しているが，光熱信号は線形的に上昇している。本システムは観測領域が長いため，励起時間と光熱信号が比例する線形領域が広がっている。

Fig.6.13はヨウ素を３種類の溶媒(四塩化炭素，アセトン，純水)に溶かして，検量線を求めた結果である。励起波長は514.6nm，出力約140mW，励起時間1～10秒とした。縦軸は光熱信号を励起エネルギーで正規化した値，横軸は分光光度計(UV-220，島津)で測定した高濃度試料の吸光度(1.7×10^{-1})を基準にして希釈倍率より換算して求めた吸光度である。溶媒による検量線の違いはそれぞれの熱パラメータρc/(dn/dt)の違いによるものである。図中の点線はTable 6.1の各パラメータから吸光度に対応する光熱信号の理論値を(6.11)式より求めたものであり，実測点と良く一致している。

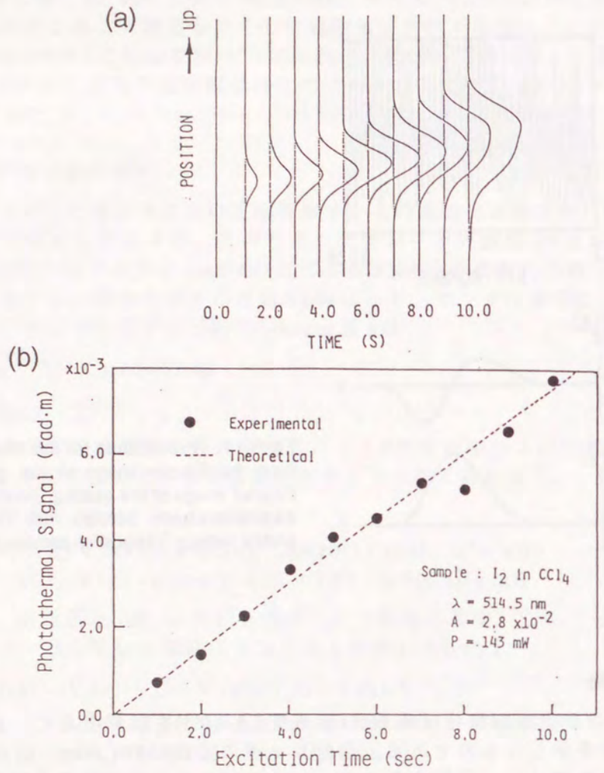


Fig.6.12. Temporal changes of the phase pattern during the excitation. The sample is Iodine in CCl_4. (a) Spatial patterns, (b) spatially integrated signals:Φ.

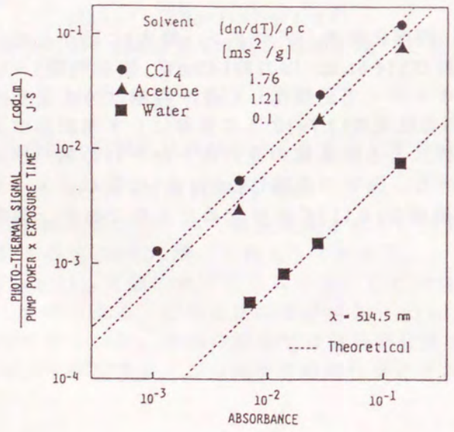


Fig.6.13. Analytical curves for Iodine in three solvents; Acetone, CCl_4, and pure water.

6.4.4 考察

本システムでの検出限界は吸光度1×10^{-3}程度であり，レーザ出力の違いを考慮してもMach-Zehnder干渉計システムより約0.5桁ほど悪い。この原因は，実際に観測される値が回折格子によるshear量aによって決定される位相変化の空間差分値である点にある。aが小さければ空間分解能が向上する反面，出力値は低下し，いずれにしてもMach-Zehnder型のような直接位相測定法に比べて感度は落ちる。現システムではCCDの素子の大きさとほぼ等しく，かつ出力値が最も大きくなるshear量として，波長514.6nmに対してD=46mm, a=23.7μmとした。

しかし本システムでは光学系が大幅に簡略化・安定化され，構成上は熱レンズ法と変わらない程度に簡単であり，実用的には極めて有用である。

6.5 結言

従来主として点検出法が用いられてきた光熱分光法において，1次元空間検出法を用いた干渉計測技術に基づく新しい検出システムを開発し，その有用性を示した。この空間検出法の導入により，励起レーザのパワーとともに照射時間にも比例した出力信号が得られ，低出力レーザでも高感度な検出が実現できた。特にTalbot干渉計システムでは光学系が熱レンズ法に匹敵する程度に簡単であり，実用性の高いシステムである。

総括

本研究では分光スペクトル波形を用いた物質分析，とくに多元素，多成分からなる混合物試料の分析における信頼性の向上を目的として，１次元スペクトル波形を対象とした数学的な情報抽出手法の開発と，分光スペクトルを多次元に展開して情報量の拡大を図った新しい測定システムの開発を行なった。これらの開発では，計測機器との接続が容易でコスト・パフォーマンスの高いパーソナル・コンピュータを積極的に利用し，主としてBASIC言語を用いて，数学的な演算処理を前提としたシステムの制御，データ収集を行なった。以下に具体的成果を列挙する。

(1) １次元スペクトル波形からの情報抽出

１次元的な分光スペクトル波形を用いた分析では，大型分光器を使用して高分解・高精度測定を行なうよりも，むしろ低分解でも高SN比で測定した波形を数学的にディコンボリューション，ピーク分離することで高速に，高精度の情報を得られることを示した。

このような数学的な処理を行う際には，測定装置に高い走査精度と高SN比が要求される。これを従来のコンピュータ化されていない分光器で実現するため，分光器に直接接続して使用できるデータ収集装置を開発した。

ディコンボリューション処理では従来装置関数の形状が既知でないと実行不能であったが，新たに測定波形のみから装置関数を推定する手法を開発し，さらにこれを拡張して，装置関数が未知のままでもディコンボリューションを行なえる手法を開発した。これらの手法を赤外吸収スペクトル波形に適用して良好な結果を得た。

ピーク分離処理では計測機器との接続を考慮して，パーソナルコンピュータ上でオンライン処理するための専用アルゴリズムを開発し，ほぼ実時間での処理を実現した。

(2) 分光スペクトル測定の多次元化

情報量の拡大を目的とした分光スペクトル測定の多次元化では，展開する座標軸を互いに直交させることで情報の重畳・縮退を解くことができる。本研究では２次元展開スペクトル測定のための２種類の専用システムを開発した。一つはクロマトグラフィによる時間軸と吸収または蛍光スペクトル測定での波長軸で展開したスペクトロ・クロマトグラム，もう一つは蛍光測定での励起波長軸と発光波長軸で展開した蛍光励起・発光マトリックス(EEM)である。

クロマトグラフィと蛍光スペクトル測定の結合では測定領域が微小で，かつ高速測定が要求されることから，新たに白色光励起を用いたマルチチャネル発光スペクトル検出方式と，分光励起を用いたマルチチャネル励起スペクトル測定方式を考案・開発した。これらはEEM上において蛍光強度を各々発光波長軸と励起波長軸に投影・積分した出力となることから，測定効率が高く，クロマトグラフィの検出手段としては極めて有用である。さらに，蛍光スペクトルと吸収スペクトルを同時に測定するクロマトシステムも試作した。このシステムでは情報量が大幅に増え，強力な定性分析能力を持つことも示した。

EEM測定においては，蛍光受光光学系として特に高感度測定に重点をおいた回転型干渉フィルタを使用したシステムと，微小領域測定への応用を目的とした偏波面分割型フーリエ分光装置を使用したシステムの２種類を開発した。いずれのシステムでも良好なEEMを得た。またEEMからの情報抽出手段として，固有値解析法に基づくスペクトル分離法を適用し，この手法の有用性とともに本システムで得られたデータの有用性も確認した。

(3) 超高感度分析における検出次元の拡大

従来，点検出方式が主であった超高感度な光熱分光法に１次元検出法を採用することで，測定データの中に含まれる誤差要因に関する情報を検出し，分析精度を向上させた。ここでは光熱効果によって生じた屈折率変化をMach-Zehnder干渉計又はTalbot干渉計で，干渉縞の位相変化として１次元的に検出することにより，熱拡散，対流現象を検知し，従来法にはない励起エネルギーに比例した出力を得る方式を開発した。特にTalbot干渉計を用いたシステムは装置が小型で安定性が高く実用的である。

(4) 今後の展開

物質分析におけるスペクトル測定にはコンピュータでの演算処理による情報抽出が不可欠であり，システム開発においてもコンピュータの演算能力，負荷を考慮した設計が必要である。特にスペクトル測定の多次元化においては，各展開軸の走査分解を上げるよりも直交軸を多くとり，コンピュータで数学的に情報を抽出するほうが価格，構造の点で有利となることも多い。この様な多次元測定技術は今後ますます発展すると考えられる。

参考文献

発表論文

(a) 千賀康弘, 南茂夫, "分光測光用データ収集・処理装置," 分光研究, **33**, 92-101(1984).

(b) Y.Senga, K.Minami, S.Kawata, and S.Minami, " Estimation of spectral slit width and blind deconvolution of spectroscopic data by homomorphic filtering, " *Appl. Opt.* **23**, 1601-1608 (1984).

(c) 千賀康弘, 南茂夫, " パーソナルコンピュータによる高効率ピーク分離法 I. 高精度ピーク検出および非線形最適化手法の比較," 分光研究, **35**, 142-153 (1986).

(d) 千賀康弘, 南茂夫, "パーソナルコンピュータによる高効率ピーク分離法 II. 波形分割とデータ削減," 分光研究, **35**, 289-298 (1986).

(e) 千賀康弘, 下川原正博, 波多野洋, 南茂夫, "白色光励起マルチチャネル蛍光分光装置," 分光研究, **37**, 439-445 (1988).

(f) Y.Senga and S.Minami, " Excitation-Emission Matrix Scanning Spectrofluorometer ", *Appl. Spectrosc.* **45**, (1991).

第 1 章

(1) J.F.Holland, R.E.Teets, and A.Timnick, " A unique computer centered instrument for simultaneous absorbance and fluorescence measurements, " *Anal.Chem.* **45**, 145-153 (1973).

(2) K.L.Ratziaff, F.S.Chuang, D.F.S.Natusch, and K.R.O' Keefe, " Computer-controlled dual wavelength spectrophotometer," *Anal.Chem.* **50**, 1799-1804 (1978).

(3) T.M.Niemczyk and D.G.Ettinger, " A computer-controlled photon counting spectrometer for rapidly scanning low light level spectra," *Appl.Spectrosc.* **32**, 450-453 (1978).

(4) J.D.Defreese, K.M.Walczak, and H.V.Malmstadt, " Microcomputer-controlled monochromator accessory module for dual wavelength spectrochemical procedures," *Anal.Chem.* **50**, 2042-2046 (1978).

(5) A.Savitzky and M.J.E.Golay, " Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures," *Anal. Chem.* **36**, 1627-1639 (1964).

第 2 章

(6) H.C.Burger and P.H. von Cittert, " Wahre und scheinbare intensitatsverteilung in spektrallinien," *Z.Phys.* **79**, 722-730 (1932); **81**, 428-434 (1933).

(7) R.N.Jones and A.Nadeau, *Can.J.Spectrosc.* **20**, 33 (1975).

(8) P.A.Jansson, R.H.Hunt, and E.K.Plyler," Resolution enhancement of spectra," *J.Opt.Soc.Am.* **60**, 596-599 (1970).

(9) C.W.Helstrom, " Image restoration by the method of least squares," *J.Opt. Soc.Am.* **57**, 297-303 (1967).

(10) S.Kawata and Y.Ichioka, " Iterative image restration for linearly degraded images," *J.Opt.Soc.Am.* **70**, 762-768 (1980); **70**, 768-772(1980).

(11) T.G.Stockham, Jr., T.M.Cannon, and R.B.Ingebretsen, " Blind Deconvolution through digital signal processing," *Proc.IEEE* **63**, 678-692 (1975).

(12) A.V.Oppenheim, R.W.Schafer, and T.G.Stockham,Jr., " Nonlinear filtering of multiplied and convolved signals," *Proc.IEEE* **56**, 1264-1291 (1968).

(13) E.R.Cole, " The removal of unknown image blurs by homomorphic filtering," *ARPA Technical Report UTEC-CSC-74-029* , Department of Computer Science, U.Utah (1973).

(14) T.M.Cannon," Digital image deblurring by nonlinear homomorphic filtering," *ARPA Technical Report UTEC-CSC-74-091* , Department of Computer Science, U.Utah (1974).

(15) T.M.Cannon, " Blind deconvolution of spatially invariant image blurs with phase," *IEEE Trans. Acoust. Speech Signal Process.* **ASSP-24**, 58-63 (1976).

第 3 章

(16) F.Zenitani and S.Minami, " An interactive minicomputer system for resolving overlapped peaks in experimental curves," *Jap.J.Appl.Phys.* **13**, 875 (1974).

(17) J.W.Akitt, " Visual and automatic spectral analysis using a small digital computer," *Appl. Spectrosc.* **29**, 493-496 (1975).

(18) R.D.B.Frasher and E.Suzuki, " Resolution of overlapping absorption bands by least squares procedures," *Anal. Chem.* **38**, 1770-1773 (1966).

(19) H.Nomura, S.Koda, and Y.Miyahara, " On the digital computer method of spectral line analysis," *Appl. Spectrosc.* **33**, 248-253 (1978).

(20) L.J.Janik, "Modified sum Cauchy-Gauss function to fit nonsymmetrical bands to infrared internal-reflectance spectra," *Appl.Spectrosc.* **40**, 661-667 (1986).

(21) S.R.Drayson, " Rapid computation of the Voigt profile," *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* **16**, 611-614 (1976).

(22) W.F.Maddams, " The scope and limitations of curve fitting," *Appl. Spectrosc.* **34**, 245-267 (1980).

(23) J.Pitha and R.N.Jones, " A comparison of optimization methods for fitting curves to infrared band envelopes," *Can. J. Chem.* **44**, 3031-3050 (1966).

(24) L.C.W.Dixon, *Nonlinear Optimization* (Eng. Univ. Press, London, 1972).

(25) R.Fletcher and M.J.D.Powell, " A rapidly convergent descent method for minimization,"*Computer J.* **6**, 163-168 (1963).

(26) J.A.Nelder and R.Mead, " A simplex method for function minimization," *Computer J.* **7**, 308-313 (1965).

(27) S.N.Deming and S.L.Morgan, "Simplex optimization of variables in analytical chemistry," *Anal. Chem.* **45**, 278A-283A (1973).

(28) K.Levenberg, " A method for the solution of certain non-linear problems in least squares," *Quart. Appl. Math.* **2**, 164-168 (1944).

(29) 中川徹, 小柳義夫, "最小二乗法による実験データの解析," (東京大学出版会, 東京, 1982) p.40.

(30) 柴田義貞, "正規分布," (東京大学出版会, 東京, 1981) p.274.

(31) G.R.Harrison, *M.I.T. Wavelength Table* (The M.I.T. Press, Cambridge, 1969).

第 4 章

(32) A.E.McDowell and H.L.Pardue, " Performance of a silicon target vidicon tube as a multiwavelength detector for liquid chromatography," *Anal. Chem.* **49**, 1171-1176 (1977).

(33) T.Fell and B.Clark, " The pharmaceutical and biomedical applications of multichannel UV/vis and fluorescence spectroscopy," *Euor. Spectrosc. News*, **59**, 13-16 (1985).

(34) I.M.Warner, G.Patonay, and M.P.Thomas, " Multidimensional luminescence measurements," *Anal. Chem.* **57**, 463A-483A (1985).

(35) K.Tanabe, M.Glick, B.Smith, E.Voigtman, and J.D.Winefordner, "Development of sensitive multiwavelength fluorescence detector system for high-performance liquid chromatography," *Anal. Chem.* **59**, 1125-1129 (1987).
(36) M.A.Ryan, R.J.Miller, and J.D.Ingle,Jr. , " Intensified diode array detector for molecular fluorescence and chemiluminescence measurements," *Anal. Chem.* **50**, 1772-1777 (1978).
(37) J.C.Gluckmann, D.C.Shelly, and M.V.Novotny, " Miniature fluorometric photodiode array detection system for capillary chromatography," *Anal. Chem.* **57**, 1546-1552 (1985).
(38) Y.Talmi, D.C.Baker, J.R.Jadamec, and W.A.Saner, "Fluorescence spectrometry with optoelectronic image detectors," *Anal. Chem.* **50**, 936A-952A (1978).
(39) D.E.Goeringer and H.L.Pardue, " Time-resolved phosphorescence spectrometry with a silicon intensified target vidicon and regressin analysis methods," *Anal. Chem.* **51**, 1054-1060 (1979).
(40) D.B.Skoropinski, J.B.Callis, J.D.S.Danielson, and G.D.Christian, " Laser videofluorometer system for real-time characterization of high-performance liquid chromatographic eluate," *Anal. Chem.* **58**, 2831-2839 (1986).
(41) P.M.Epperson, R.D.Jalkian, and M.B.Denton, " Molecular fluorescence measurements with a charge-coupled device detector," *Anal. Chem.* **61**, 282-285 (1989).
(42) D.G.Jones, " Photodiode array detectors in UV/VIS spectroscopy: part I," *Anal. Chem.* **57**, 1057A-1073A (1985).
(43) I.B.Berlman, *Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules* (Academic Press, NY, 1971).
(44) L.W.Hershberger, J.B.Callis, and G.D.Christian, " Liquid chromatography with real-time video fluorometric monitoring of effluents," *Anal. Chem.* **53**, 971-975 (1981).

第５章

(45) I.M.Warner, J.B.Callis, E.R.Davidson, and G.D.Christian, " Multicomponent analysis in clinical chemistry by use of rapid scanning fluorescence spectroscopy, " *Clin.Chem.* **22**, 1483-1492 (1976).
(46) C.N.Ho and I.M.Warner, " Multicomponent mixture analysis by multi-dimensional phosphorimetry," *Anal. Chem.* **54**, 2486-2491 (1982).
(47) I.M.Warner, E.R.Davidson, and G.D.Christian, "Quantitative analyses of multicomponent fluorescence data by the methods of least squares and non-negative least sum of errors," *Anal.Chem.* **49**, 2155-2159 (1977).
(48) T.M.Rossi and I.M.Warner, "Pattern recognition of two-dimensional fluorescence data using cross-correlation analysis," *Appl.Spectrosc.* **39**, 949-959 (1987).
(49) C.P.Pau and I.M.Warner; " Evaluation of a Fourier-transform-based pattern-recognition algorithm for two-dimensional fluorescence data," *Appl.Spectrosc.* **41**, 496-502 (1987).
(50) C.N.Ho, E.D.Christian, and E.R.Davidson, " Application of the method of rank annihilation to quantitative analyses of multicomponent fluorescence data from the video fluorometer," *Anal.Chem.* **50**, 1108-1113 (1978).
(51) C.N.Ho, G.D.Chistian, and E.R.Davidson, " Application of the method of rank annihilation to fluorescent multicomponent mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons, " *Anal. Chem.* **52**, 1071-1079 (1980).
(52) M.P.Fogarty and I.M.Warner, " Ratio method for fluorescence spectral deconvolution, " *Anal. Chem.* **53**, 259-265 (1981).

(53) I.M.Warner, G.D.Christian, E.R.Davidson, and J.B.Callis, " Analysis of multicomponent fluorescence data," *Anal. Chem.* **49**, 564-573 (1977).
(54) D.M.Johnson, J.A.Gladden, J.B.Callis, and G.D.Christian, " Video fluoro-meter," *Rev.Sci. Instrum.* **50**, 118-126 (1979).
(55) T.Okamoto, S.Kawata, and S.Minami, " Photodiode array Fourier Transform Spectrometer based on birefringent interferometer," *Appl. Spectrosc.* **40**, 691 (1986).
(56) W.H.Lawton and E.A.Sylvestre, *Technometrics* **13**, 617 (1971).
(57) K.Sasaki, S.Kawata, and S.Minami, " Estimation of component spectral curves from unknown mixture spectra," *Appl. Opt.* **23**, 1955 (1984).

第６章

(58) J.P.Gordon, R.C.C.Leits, R.S.Moore, S.P.S.Porto, and J.R.Whinnery, " Long-transient effects in lasers with inserted liquid samples," *J. Appl. Phys.* **36**, 3-8 (1965).
(59) M.D.Morris and K.Peck, " Photothermal effects in chemical analysys," *Anal. Chem.* **58**, 811A-822A (1986).
(60) J.M.Harris and N.J.Dovichi, " Thermal lens calorimetry," *Anal.Chem.* **52**, 695A-706A (1980).
(61) Y.Yang, " Thermal lens spectrometry based on single-laser / dual-beam configuration," *Anal. Chem.* **56**, 2336-2338 (1984).
(62) K.L.Jansen and J.M.Harris, " Double-beam thermal lens spectrometry," *Anal. Chem.* **57**, 2434-2436 (1985).
(63) J.F.Power and E.D.Salin, " Mode-mismatched laser induced thermal lens effect detection via spatial Fourier analysis of beam profiles," *Anal.Chem.* **60**, 838-842 (1988).
(64) K.Miyaishi, T.Imasaka, and N.Ishibashi, " Thermal lens spectrophotometry based on image detection of a probe laser beam," *Anal.Chem.* **54**, 2039-2044 (1982).
(65) K.L.Jansen and J.M.Harris, " Thermal lens measurements by optical computation of the laser beam spot size," *Anal. Chem.* **57**, 1698-1703 (1985).
(66) P.E.Nordal and S.O.Kanstad, " Visible-light spectroscopy by photothermal radiometry using an incoherent source," *Appl.Phys.Lett.* **38**, 486-488 (1981).
(67) W.B.Jackson, N.M.Amer, A.C.Boccara, and D.Fournier, " Photothermal deflection spectroscopy and detection," *Appl.Opt.* **20**, 1333-1344 (1981).
(68) R.Vyas, B.Monson, Y.Nie, and R.Gupta, " Continuous wave photothermal deflection spectroscopy in a flowing medium," *Appl.Opt.* **27**, 3914-3920 (1988).
(69) J.D.Spear, R.E.Russo, and R.J.Silva, " Differential photothermal deflection spectroscopy using a single position sensor," *Appl.Spectrosc.* **42**, 1103-1105 (1988).
(70) M.J.Pelletier, H.R.Thorsheim, and J.M.Harris, " Laser-induced thermal diffraction for calorimetric absorption measurements," *Anal.Chem.* **54**, 239-242 (1982).
(71) L.C.Aamodt and J.C.Murphy, " Thermal effects in photothermal spectroscopy and photothermal imaging," *J.Appl.Phys.* **54**, 581-591 (1983).
(72) J.Stone, " Measurements of the absorption of light in low-loss liquids," *J. Opt. Soc. Am.* **62**, 327-333 (1972).
(73) J.Stone, " Thermooptical technique for the measurement of absorption loss spectrum in liquids," *Appl. Opt.* **12**, 1828-1830 (1973).
(74) M.Itoh and I.Ogura, " Absorption measurements of laser optical materials by interferometric calorimetry," *J.Appl.Phys.* **53**, 5140-5145 (1982).

(75) D.J.Kinzer and G.M.Morris, " Interferometric measurement of large thermal nonlinear index in MBBA," *Appl.Opt.* **25**, 1335-1338 (1986).
(76) M.Takada, H.Ina, and S.Kobayashi, " Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry," *J.Opt. Soc. Am.* **72**, 156-160 (1982).
(77) M.Takeda and S.Kobayashi, " Lateral aberration measurements with a digital Talbot interferometer," *Appl.Opt.* **23**, 1760-1764 (1984).
(78) S.Yokozeki and T.Suzuki, " Shearing interferometer using the grating as the beam splitter," *Appl.Opt.* **10**, 1575-1580 (1971); **10**, 1690-1693 (1971).

謝辞

本研究は1977年4月より1989年３月までの期間に渡り大阪大学工学部応用物理学科南研究室において，その後1989年４月より1991年11月までの期間東海大学海洋学部において行なったものである。終わりに臨み，終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜った大阪大学工学部南茂夫教授に深く感謝の意を表します。また本論文作成にあたり貴重なご示唆とご教示を賜わると共に細部に渡るご親切なご校閲を賜わりました大阪大学工学部一岡芳樹教授，同樹下行三教授，同増原宏教授に深く御礼申し上げます。
また本研究の遂行に当たり長い間常に貴重なご教示とご助言を賜りました大阪大学工学部内田照雄助教授，河田聡講師に厚く御礼申し上げます。本研究の遂行に当たり多大なご協力を賜りました大阪大学工学部南慶一郎助手，元南研究室学生伊藤真一氏，下川原正博氏，矢橋暁氏，波多野洋氏，藤田修一氏，藤田寛氏，竹本禎広氏，橋本守氏はじめ南研究室の方々に心より感謝いたします。
本論文のまとめにあたっては，東海大学海洋学部杉森康宏教授に多大なご支援をいただきました。慎んで御礼申し上げます。