

# 文化財試料の化学発光測定における S/N 比の検討

佐野 千絵・米山 めぐ美\*・三浦 定俊

## 1. はじめに

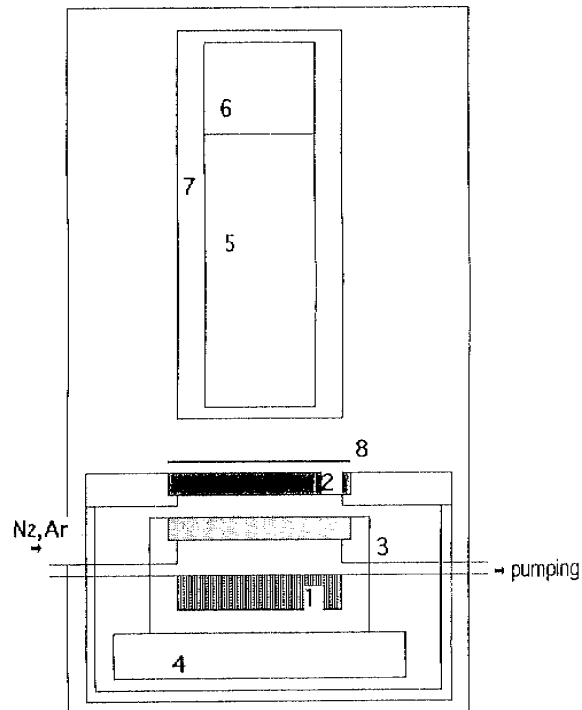
化学発光法（ケミルミネッセンス法とも呼ばれる）は、化学反応に伴って検出される微弱な光を検出する方法である。そのうち、蛍の光のような生体物質由来で、かつ発光強度の大きな現象は生物発光と呼ばれている。有機化合物については、自動酸化の過程で極微弱発光が観察されることが報告されており、酸化を受けやすいアルキン類、アルデヒド類、アミン類および熱分解を受け易い過酸化物に強い発光が認められることが報告されている<sup>1)</sup>。発光の機構については定説はまだないが、過酸化ラジカル等を経由して生成する励起カルボニルあるいは一重項酸素に起因するものと考えられている。発光強度はラジカルの濃度に依存するので、発光強度を計測して自動酸化等で劣化する物質の状態評価も行なわれており、すでにポリプロピレン、ポリスチレン、ゴムなどの高分子化合物の劣化評価が行われている<sup>2-9)</sup>。近年では、化学発光スペクトルも測定できるようになり、発光種の同定もいくつか行われている<sup>9)</sup>。

当研究所保存科学部物理研究室では機器分析による有機質文化財の劣化評価の研究を行っており、特に、全く試料に触れることなく非破壊で計測できる化学発光法の導入に関する基礎研究を行っている。本報は有機質文化財への化学発光計測の導入のために行った S/N 比の検討結果について述べる。

## 2. 装置の構成

測定は、東北電子産業㈱製 CLD-100 システムで行った。化学発光計数装置は基本的には単一光子計数法のフォトンカウンターであり、発光強度が  $10^{-14}$  W 以下のような極微弱な光を検出するため、フォトマルチプライヤー (PMT) を電子冷却で  $-20^{\circ}\text{C}$  まで冷却して熱雑音を減少させる方式を取っている。特に定電圧電源等は装着されていない状態でも可動である。検出可能波長領域は 300–650 nm であり、発光種の特定を目的として波長帯ごとの計測が必要な場合には、シャープカットオフ特性の色ガラスフィルターを用いる形式である。試料室はステンレス製のセルであり

(図 1)、試料室内雰囲気窒素ガスなどに置換するための導入口が設けられている。温度と発光量の相関を検討するために、セル内の



Chemiluminescence counting system CLD-100

- 1: sample 2: filter 3: cell 4: heater
- 5: photomultiplier tube
- 6: pre-amplifier
- 7: cooler 8: shutter

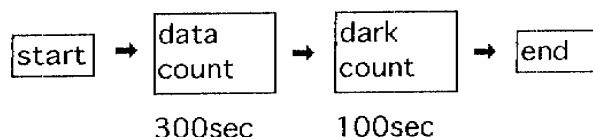
図 1 化学発光計測装置の構造

\* 東京学芸大学

温度が室温から 200°C まで制御できるようになっている。測定データの処理などはコンピューターで制御され、取り込み時間（ゲートタイム）の設定は 1, 10, 30, 60 秒の 4 種類が標準装備されている。測定はセル内に試料を置くだけであるが、試料サイズは図 1 中（3）セル枠よりも大きな試料が望ましい。標準としてセルの大きさは直径 5 cm のものが用意されている。

現在使用しているソフト上で測定条件として指定できるものは、ゲートタイム、1 ブロック内の計測回数、ブロックごとの繰り返し回数の 3 つである。計測の手順は、繰り返し回数が 1 ならばはじめにシャッターが開き、試料からの発光を計測した後シャッターを閉めて、PMT 本体のもつ熱雑音を計測する。2 ブロック以上繰り返して計測する場合には、計測開始時に熱雑音を計測した後シャッターを開けて、2 ブロックを連続して計測する形となる。熱雑音の計測方法は、光シャッターを閉じた状態で 10 回計測した値の平均値で示される。ゲートタイム 10 秒で 30 回計測する場合と、30 回測定を 2 ブロック繰り返す様子を図示すると図 2 のようになる。計測中の発光量の総計、熱雑音値の 10 回測定の平均値などが、測定上件と共にグラフ上に示される。機種によっては、発光量の平均値、標準偏差まで出力するものもある。

(a) 1 ブロック測定



(b) 2 ブロック測定

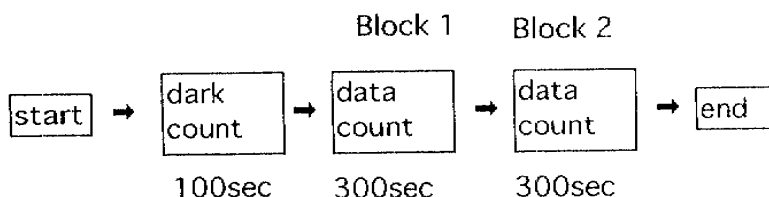


図 2 測定の手順の模式図

測定上の注意点としては、手指の油などからの極微弱な発光まで検出してしまうことから、試料セルを素手で触らないことが肝心である。また、PMT の安定に時間を要するので、測定前少なくとも 1 時間ほど前に電源をいれておくことが必要である。また本質的な問題であるが、試料の大きさや厚みなどに手を加えないでセル内に試料を置いただけで計測する場合、たとえ同一試料であっても、PMT が固定されている現行機では、PMT に対する試料の位置が各回ごとに異なり計測に関わる立体角が毎回変わることになるため、正確に言えば各測定間の比較ができないことに注意する必要がある。

### 3. S/N比の検討

試料室内に何もいれない状態で繰り返し計測を行い、装置系の安定性や繰り返し再現性およびデータの誤差について検討した。ゲートタイム10秒、1ブロックの測定回数30回、ブロック繰り返し回数1回を基本の形とし、これを10回行った結果を表1に示す。

何らかの汚れなどがセル内にある場合には、光シャッターが開の状態での計数は（熱雑音値+セル内バックグラウンド）となり、熱雑音値よりも大きな測定データとなると考えられる。空のセルからの発光量の30回計測を10回繰り返した場合の計数平均は、熱雑音10回の計測の平均値に比べて数値としては大きな差はなく、この時点で、セルからのノイズは十分無視できるほど小さく、セルの汚れなどは十分無視できる範囲であったと考えられる。また、空のセルの発光量の30回計測の標準偏差も熱雑音10回の計測の標準偏差もほぼ同じで、セルからのノイズのばらつきも十分無視できるほど小さく、いずれも平均値に対して約6%のばらつきをもつことがわかった。これは、現行機種での計測限界と考えられ、装置系全体として計測誤差を6%と考えてよいであろう。以上から、単独回の試行で装置の安定性を判断するのであれば、空のセルの状態ですら約30回測定し、シャッター閉の時の熱雑音値（10回計測値）と平均値で大きな差がなく、かつその計測値の標準偏差が平均値に対して約6%程度におさまっていれば、この装置としては十分に安定したと判断できることがわかった。

各試行間のばらつきを比較すると、10回試行での再現性は、30回測定の方では各回の標準偏差が平均値の1%以内におさまっているのに対し、10回測定では約1.5%のばらつきを示している。測定対象の発光量が大きな試料の場合、同時に得られる熱雑音の平均値との差が大きいため、測定回数10回で1.5%程度のばらつきがあっても、発光があると認めることができる。それに対し、発光効率の低い系を計測する際には、その時点でのS/N比の判断が重要であるため、あらかじめ

表1 繰り返し再現性の検討（ゲートタイム10秒、計測回数30回、ブロック数1で測定）

計測No.	セル内バックグラウンド			熱雑音		
	平均値 count/10sec	標準偏差 count/10sec	標準偏差/平均値 (%)	平均値 count/10sec	標準偏差 count/10sec	標準偏差/平均値 (%)
1	811.1	56.87	7.01	835.1	77.41	9.27
2	818.0	44.62	5.46	828.3	44.19	5.34
3	821.0	53.03	6.46	829.3	53.35	6.43
4	822.2	60.29	7.33	825.4	33.32	4.04
5	814.8	46.60	5.72	817.2	52.90	6.47
6	817.8	40.67	4.97	820.5	34.67	4.23
7	826.2	35.23	4.27	797.4	37.39	4.69
8	818.9	42.71	5.22	833.4	40.90	4.91
9	811.3	41.53	5.12	808.1	39.84	4.93
10	801.5	55.81	6.96	834.3	61.23	7.34
平均値(count/10sec)	816.28	47.736	5.852	822.9	47.52	5.765
標準偏差(count/10sec)	6.99314	8.26876		12.3512	13.8547	
標準偏差/平均値(%)	0.8567	17.32		1.5	29.15	

表2 測定回数を変えた場合のセル内バックグラウンドの変化 (ゲートタイム 10 秒, 温度 28°C, ブロック数 1 で測定)

測定回数	セル内バックグラウンド			熱雑音		
	平均値 count/10sec	標準偏差	標準偏差/平均値 (%)	平均値 count/10sec	標準偏差	標準偏差/平均値 (%)
30	828.4	46.55	5.6	820.7	56.66	6.9
60	838.7	52.91	6.3	810.4	44.88	5.5
120	836.0	51.87	6.2	843.9	30.40	3.6
180	818.9	46.70	5.7	815.9	69.78	8.6
240	819.6	47.44	5.8	823.9	58.96	7.2
	828.3	49.10	5.9	823.0	52.10	6.4

セル内発光まで含めて装置のバックグラウンドを繰り返し測定した上で、検出したい発光量の差を検出できるような計測回数を設定する必要があることがわかった。

熱雑音は本来は温度に依存してランダムに発生するはずであるため、放射線計測の場合のように計測回数を増やせば標準偏差は小さくなるはずである。計測回数を 240 回まで増やした場合の結果を表 2 に示す。単独の試行では、測定回数 30 回から 240 回を比較して、標準偏差に大きな差はないことがわかった。

以上の検討から、S/N 比を上げるためには、ブロックを多数回連続測定する方式(図 2-b)は、熱雑音値の計測の回数が減少して試行としての良否の判断が難しくなるため避けるべきであると考えられる。また計測の手順としては、計測開始時と終了時の双方で、装置系がその時点でもつ熱雑音(ベースラインにあたる)を測定するように変更することが必要と考えられる。また、熱雑音値に関しては PMT 自身の劣化や焼き付きなど、さまざまな原因で年々増加していることが実測されているため、特に計数の小さな測定を行う前には、装置の安定性を繰り返し確認する必要があると考えられる。

#### 4. 文化財試料への応用の実例

##### 4-1. 漆塗膜の硬化時の発光

漆塗膜は硬化する際に過酸化物を經由することが知られている<sup>10)</sup>。実験に使用した漆塗膜試料は、修復技術部第一修復技術研究室長中里氏に依頼し、くろめた後にガラスプレート上で固化させたものである。塗布後 1 日経過して十分に乾燥固化した後計測を開始した(図 3-a)。熱雑音値は 816 で、標準偏差は 7.4%、この時点での装置系ノイズの平均値の各試行回のばらつきは、前述のとおり 1.5% であるから、バックグラウンドの平均値は  $816 \pm 12$  とみなせる。発光量総計は 306,091 で、10 秒あたりの発光量は 850 カウント、標準偏差は 10 秒あたり 46.45 カウントで平均値に対して 5.5% であった。測定回数 360 回の平均値の各試行回のばらつきは 1% と想定されるため、発光量の平均値は 10 秒あたり  $(850 \pm 9)$  である。発光量はわずかであるが、塗膜硬化時に発光していることは明らかである。22 日目まで発光量を図 4 に図示する。しかし、1 年半以上経過し十分安定した塗膜試料では、熱雑音値以上のシグナルは計測されなかった(図 3-b)。

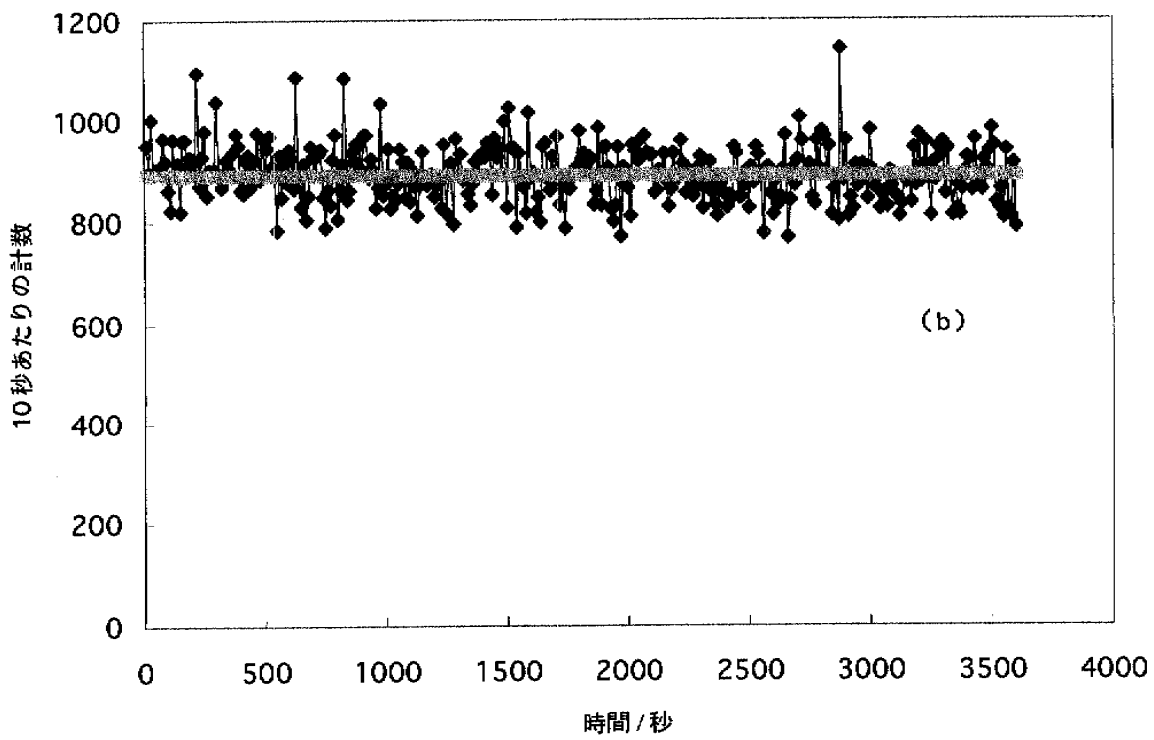
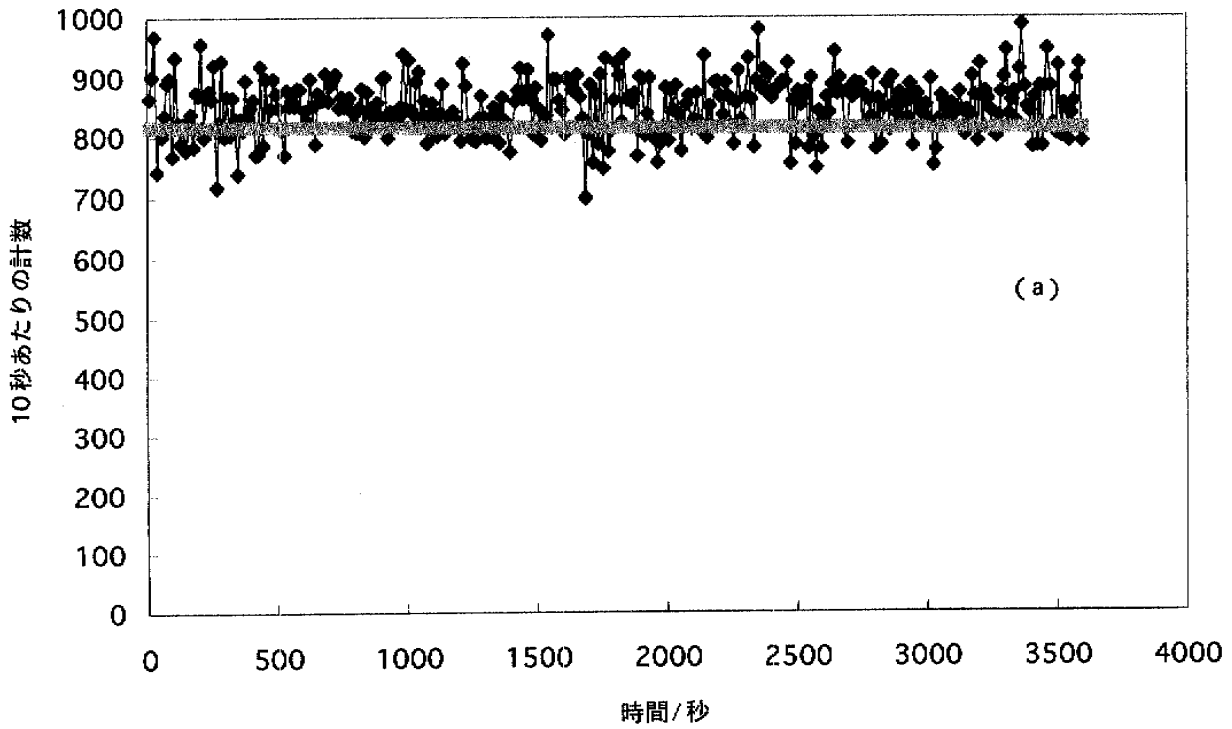


図3 漆塗膜硬化時の化学発光 (ゲートタイム10秒, 測定回数360, 温度28°C, ブロック数1で測定)  
(a) 塗膜作成後1日  
(b) 約1年半後

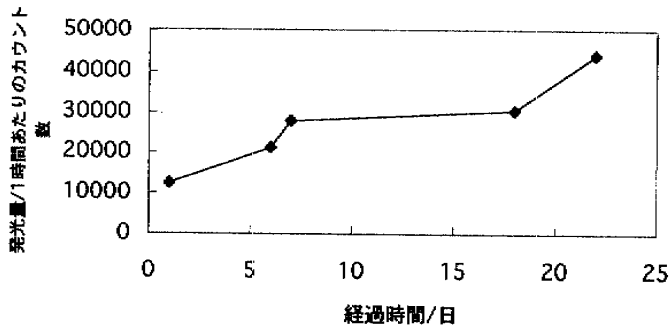


図4 漆塗膜硬化時の化学発光の経時変化  
(ゲートタイム10秒, 測定回数360, 温度28℃, ブロック数1で測定)

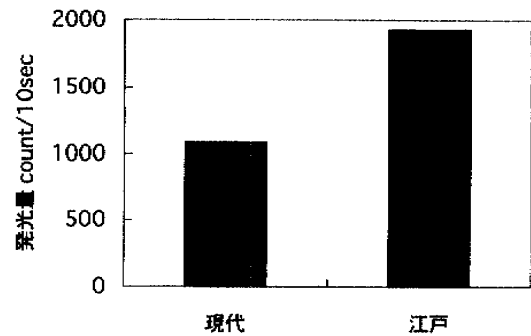


図5 現代の楮紙(石州半紙)と江戸時代末の版本から得た楮紙試料の化学発光量  
(ゲートタイム10秒, 測定回数60, 温度20℃, ブロック数1で測定)

計測中の注意事項としては、蛍光灯により試料表面の蛍光が励起されることから、極微量の光子計測を行う場合には、装置を暗室内に設置することが必要である。

#### 4-2. 紙の劣化の計測

紙の基体であるセルロースは加水分解による劣化が主であり、化学発光法での検出に有利な過酸化物を經由するタイプの劣化はほとんど起こらない。しかし、和紙にはリグニンなどの不純物が多く含まれ、これらは空气中で酸化反応にあずかる他、光等の影響を受けて分解する過程で多く発光すると予想される。現代の楮紙(石州半紙)と江戸時代末の版本から得た楮紙試料の化学発光量を図5に示す。江戸期の試料の方が発光量が明らかに多いが、もともとの試料中に含まれる不純物の量が同程度であったとすれば、これは経年変化で特にリグニンなど不純物の分解が促進されて発光量が増えているのであろう。

このようにリグニンなどの不純物の分解は起こりやすいため、化学発光法を利用して、さまざまな波長の光やエックス線によって受けた影響を評価することを試みた。透明の試料では、表面のみならず深さ方向で内部からの化学発光も観察されることから、最表面での劣化を考察するには、紙内部からの発光を抑えてバックグラウンドレベルを下げる必要がある。楮紙そのものの発光量(図5, 1086)よりも藍を塗った楮紙では計数が786まで減少し、楮紙内部からの発光が抑えられる(表3)ことから、現代の楮紙に藍を塗ったものを、さまざまな劣化方法で劣化処理した(表3)。測定は東北電子産業(株)仙台工場の研究室でおこない、CLC-100およびCLD-700システムを用いた。測定はいずれの試料も劣化促進後20日前後のクールダウン期間を置き、短寿命の励起種を検出しないよう注意した。

各試行のばらつきは平均値に対して約12%あり、各試行回の平均値のばらつきも、当所で所持している機器よりも大きくなっていると推察される。この計器の安定性についてはデータがないため評価が難しいが、いずれの発光量も小さいため、計数値のばらつきはほとんど測定系のノイズに由来するものと思われる。たとえば、計測回数30回での平均値のばらつきを大きめに見積もり約2%、10回でのばらつきを約3%とみなすと、それぞれの計数は表4のようになる。通常紙本のエックス線撮影に使われる条件のeでは、無処置のものとはほぼ同数の計数であり、まったく影

**表 3** 人工劣化促進処理した楮紙の化学発光量  
(ゲートタイム 10 秒, 測定回数 30, 24°C, ブロック数 1)

劣化方法	計測値			熱雑音
	平均値 count/10sec	標準偏差	標準偏差/平均値 (%)	平均値 count/10sec
a	785.8	101.2	13	706.8
b	785.1	82.7	11	729.3
c	770.4	74.6	10	770.4
d	825.9	82.6	10	766.8
e	769.7	83.1	11	693.3
f	789.7	110.9	14	763.4
			11.5	738.3

(ゲートタイム 10 秒, 測定回数 100 回, 80°C, ブロック数 1)

劣化方法	計測値	熱雑音
	平均値 count/10sec	平均値 count/10sec
a	1187.21	496.4
b	1264.46	567.8
c	1111.83	549.4
d	1116.78	557.5
e	1080.42	535.9
f	1083.60	538.8
		541

**表 4** 劣化処置前後の紙からの化学発光量の誤差のみつもり

	計数値の平均と ばらつき(I)	バックグラウンドの 平均値とばら つき(II)	(I) - (II)
a. 無処置	786±16	707±21	79
b. 紫外線防護処置なし蛍光灯 (FLR 40 SW/M, 40 W, 390 lux) を 74 時間照射	785±16	729±22	56
c. 冬の太陽直射光を 1 時間照射, 21 日後	770±15	774±23	-4
d. 紫外線ランプ(PUV-1)を 0.5 m の距離から 20 分照射	826±17	767±23	59
e. 20 kV, 4 mA のエックス線を 1 m で 3 分照射	770±15	696±21	74
f. 200 kV, 3 mA のエックス線を, 錫フィルター (厚さ 3 mm), 1 m で 10 分照射	790±16	763±23	27

響を受けていないと言える。一方、cやfの劣化では、無処置の場合に比べても明らかに減少しており、表面積が変わる、あるいは光子の吸収の起こりやすい状況になっている等、表面の状態が変化したことを反映しているものと考えられる。b, dまで含め、見た目はまったく変わらなくても、ごく微細な部分ではやはり何らかの劣化を受けたことを検出しているものと考えられる。

## 5. まとめ

化学発光計測器は、微量の変化の検出に優れている高精度の計測機器である。しかし同時に、検出感度が高いためみかけの計数があらわれるため、バックグラウンド値をよく吟味するとともに、S/N比を確認し、評価することが肝要である。

## 引用文献

- 1) 佐藤秀昭, 水柿道直: 極微弱化学発光—薬学分野への応用, *ファルマシア*, **27**(12), 1259-1263 (1991)
- 2) Kazutoshi OHASHI, Kiyoshi NAKAI, Shin'ichiro KITAYAMA, Toshio KAWAGUCHI: Mechanism of Hydrogen Evolution and Stabilization of UV-Cured Urethane Acrylate Resin for Coating of Optical Fiber, *Polymer Degradation and Stability*, **22**, 223-232 (1988)
- 3) 大澤善次郎: 化学発光法による高分子の劣化評価, *防錆管理*, **33**(3), 1-7 (1989)
- 4) 大澤善次郎: 化学発光法の原理と高分子劣化への応用, *Material Life*, **3**(1), No.1, 32-39 (1991)
- 5) 木間富士子, 大澤善次郎: 種々の安定剤を含む光照射ポリプロピレンの化学発光, *東北電子産業レポート*, 48-52 (1988)
- 6) Zenjiro OSAWA, Fujiko KONOMA, Song WU, Jing-fen CEN: Photo-oxidative Degradation of Polystyrene—Comparison of Chemiluminescence with Other Analytical Methods, *Polymer Photochemistry*, **7**, 337-347 (1986)
- 7) Jing-fen CEN, Fujiko KONOMA, Zenjiro OSAWA: Chemiluminescence of Photo-irradiated Polypropylene Containing Various Additives, *Polymer Photochemistry*, **7**, 469-481 (1986)
- 8) 吉井文男: 化学発光法による照射したポリマーの酸化層の測定, *東北電子産業レポート*, 45-47 (1988)
- 9) 佐伯昭雄: ケミルミネッセンスアナライザーの開発とその応用, *東北工業大学紀要 I 理工学編* **10**, 77-92 (1990)
- 10) Ju KUMANOTANI: The Chemistry of Oriental Lacquer, "Urushi", Getty Conservation Institute, 243-251 (1988)



## An Estimation of S/N Ratio in Chemiluminescence Counting Method Applied to Cultural Property

Chie SANO, Megumi YONEYAMA\* and Sadatoshi MIURA

An accidental error in a measurement by chemiluminescence counting method (CLD-100 System, manufactured by Tohoku Denshi Sangyo Ltd.) was estimated to have a six percent-point margin of error. Reproducibility for an average of thirty-time countings was less than 1 percent.

Results of two experiments were showed briefly in the report. In the first experiment, chemiluminescence emitted from an *urushi* film in hardening process was measured. A few emittance of photon was confirmed from the film. Another experiment was done to evaluate a non-visible damage to Japanese paper by sun light, ultra-violet ray and X-ray. A little difference in counting was observed among them.

---

\* Tokyo Gakugei University