

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6595204号
(P6595204)

(45) 発行日 令和1年10月23日 (2019. 10. 23)

(24) 登録日 令和1年10月4日 (2019. 10. 4)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 21/64 (2006. 01)	GO 1 N 21/64 Z
GO 1 N 21/17 (2006. 01)	GO 1 N 21/17 D
GO 1 N 21/27 (2006. 01)	GO 1 N 21/27 Z
GO 1 N 21/59 (2006. 01)	GO 1 N 21/59 Z

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2015-89287 (P2015-89287)	(73) 特許権者	000001993
(22) 出願日	平成27年4月24日 (2015. 4. 24)		株式会社島津製作所
(65) 公開番号	特開2016-206051 (P2016-206051A)		京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地
(43) 公開日	平成28年12月8日 (2016. 12. 8)	(74) 代理人	100098671
審査請求日	平成29年7月26日 (2017. 7. 26)		弁理士 喜多 俊文
審判番号	不服2018-14581 (P2018-14581/J1)	(74) 代理人	100102037
審判請求日	平成30年11月2日 (2018. 11. 2)		弁理士 江口 裕之
		(74) 代理人	100149962
			弁理士 阿久津 好二
		(74) 代理人	100170988
			弁理士 妹尾 明展
		(72) 発明者	長井 悠佑
			京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会 社島津製作所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 測定対象である試料に光を照射する、半導体発光素子を光源とした光照射部と、
b) 前記光照射部から前記試料に対して照射された光に対し該試料を透過した光を検出可能な位置に配置された光検出部と、
c) 点灯及び消灯を繰り返すように前記光源を駆動する光源駆動部と、
d) 前記光源が点灯及び消灯を繰り返しているときに前記光検出部で連続的に得られる検出信号の中で、前記光源が点灯するように駆動されている期間中の少なくとも一部の期間に得られた検出信号を前記試料による吸収を反映した吸光データとして抽出する動作と、前記光源が点灯するように駆動されている状態から消灯するように駆動された直後に得られた検出信号を前記試料からの蛍光を反映した蛍光データとして抽出する動作と、を繰り返し行うことで、同一の前記試料に対する吸光データと蛍光データとを取得する信号処理部と、

を備えることを特徴とする光学分析装置。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の光学分析装置であって、

前記光源として発光波長の相違する複数の半導体発光素子を用い、前記光源駆動部は、複数の光源を同時に点滅させるように又は複数の光源の一つを選択的に点滅させるようにそれら複数の光源を駆動することを特徴とする光学分析装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料に対する吸光度測定と蛍光測定とを並行して行う光学分析装置に関する。

【背景技術】

【0002】

液体クロマトグラフ（ＬＣ）により成分分離された液体試料中の成分を検出するために、紫外可視分光光度計やフォトダイオードアレイ（ＰＤＡ）検出器などを用いた吸光度測定がしばしば行われる。また、蛍光特性を有する成分や蛍光標識可能な成分については、
10 蛍光分光光度計を用いた蛍光測定が行われることがある。蛍光測定が可能である成分は限られるものの、一般に、蛍光測定は吸光度測定に比べて格段に高感度である。そのため、特に、ライフサイエンス、医薬品開発、環境測定といった微量分析の必要性が高い分野では、同じ試料に対して吸光度測定と蛍光測定とを並行して行いたいという要望も強い。

【0003】

ＬＣにより成分分離された液体試料に対し吸光度測定と蛍光測定とを並行して行うために、一般的には、ＬＣのカラム出口に、ＰＤＡ検出器等の吸光検出器と蛍光検出器とを直列に又は並列に接続する構成が採られている。吸光検出器と蛍光検出器とを直列に接続した構成では、前段の検出器を通過した液体試料が配管を通して後段の検出器に導入される。
20 このため、前段の検出器に比べて後段の検出器では、試料中の成分の時間方向への拡散の影響が大きくなり、例えばクロマトグラムのピークの幅が広がる、ピークトップの強度が低下する、といった問題がある。一方、吸光検出器と蛍光検出器とを並列に接続した構成では、ＬＣのカラム出口から溶出した液体試料を二つに分けて各検出器に導入する必要があるため、全く同一の液体試料を測定しているのではない（つまりは測定対象の液体試料中の成分の濃度が微妙に異なる）、また信号強度が低くなる、という問題がある。

【0004】

上記のような問題を避けるために、一つの容器中に収容されている液体試料に対し吸光度測定と蛍光測定とを共に行うことができる装置も開発されている。例えば非特許文献１に記載の装置は、試料を透過した光を検出する吸光度測定用の光検出器と、試料から発せられた蛍光を検出するための、透過光が入射しない位置に設けられた蛍光測定用の光検出器と、
30 の二つの光検出器を備え、吸光スペクトルと蛍光スペクトルとを同時に測定することができるようになっている。また、特許文献１にも、非特許文献１と同様の構成で蛍光測定と吸光度測定とを同時に実行可能であることが記載されている。しかしながら、こうした構成では、光検出器が複数必要であり、光学系の構成が複雑になりコストが高くなる。

【0005】

一方、特許文献２には、試料と一つの光検出器との間にシャッター機構を設けるとともに、試料から入射光に直交する方向に放出される光を上記光検出器まで案内する光ガイドを設け、吸光度測定を行うときにはシャッターを開放して試料を透過した光を光検出器に到達させ、
40 蛍光測定を行うときにはシャッターを閉鎖して光ガイドを通した蛍光を光検出器に到達させることで、吸光度測定と蛍光測定とを共に行えるようにした装置が開示されている。この構成によれば、完全に同時ではないものの、シャッターによる光路の切替えを高速で行うことで、同一試料に対する吸光度測定と蛍光測定とを実質的に同時に行うようにすることができる。しかしながら、こうした構成でも光学系やシャッター機構などの構成が複雑になる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献１】特開２００５－１４７８２６号公報（段落〔００５１〕、図５）

【特許文献２】特表２００６－５０３２６７号公報（段落〔００２５〕－〔００２７〕、図２）

10

20

30

40

50

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】山内 進、「環境技術紹介 3次元蛍光測定装置による蛍光性溶存有機物の評価」、かんぎきょう、公益社団法人日本環境技術協会、2014年7月、p.18-19

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は上記課題を解決するためになされたものであり、その目的とするところは、同一の光検出器を使用し光学系を簡素にすることで、低コスト且つ小形で同一試料に対する吸光度測定と蛍光測定とを実質的に同時に行うことができる光学分析装置を提供すること

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するためになされた本発明に係る光学分析装置は、

- a)測定対象である試料に光を照射する、半導体発光素子を光源とした光照射部と、
- b)前記光照射部から前記試料に対して照射された光に対し該試料を透過した光を検出可能な位置に配置された光検出部と、
- c)点灯及び消灯を繰り返すように前記光源を駆動する光源駆動部と、
- d)前記光源が点灯及び消灯を繰り返しているときに前記光検出部で連続的に得られる検出信号の中で、前記光源が点灯するように駆動されている期間中の少なくとも一部の期間に得られた検出信号を前記試料による吸収を反映した吸光データとして抽出する動作と、前記光源が点灯するように駆動されている状態から消灯するように駆動された直後に得られた検出信号を前記試料からの蛍光を反映した蛍光データとして抽出する動作と、を繰り返し行うことで、前記試料に対する吸光データと蛍光データとを取得する信号処理部と、
を備えることを特徴としている。

20

【0010】

本発明に係る光学分析装置では、光源として、従来一般的に用いられている重水素ランプやキセノンフラッシュランプではなく、半導体発光素子が用いられる。ここでいう半導体発光素子は、発光ダイオード(LED)、スーパーリミネセンスダイオード(SLD)、レーザダイオード(LD)などである。こうした半導体発光素子の発光スペクトルのピーク幅は一般的に狭いため、高価な分光器による単色光化を行うことなく、そのまま測定光として利用することができる。

30

【0011】

半導体発光素子は供給された電気エネルギーが直接光エネルギーに変換されて発光するため、駆動電流のオン・オフに対する発光の立ち上がり・立ち下がりの追従がきわめて速い。そのため、 μsec オーダーでの高速なオン・オフ動作、つまりは点灯・消灯の繰り返し動作が可能である。そこで、本発明に係る光学分析装置において、光源駆動部は、所定の周波数で光源を点滅させるように該光源を駆動する。光源が点灯しているとき、該光源から発せられた光は測定光として試料に照射され、試料中を通過する間に該試料による吸収を受ける。そして、吸収を受けつつ透過して来た光が光検出部に到達する。そこで、信号処理部は、光源が点灯駆動されている期間中の少なくとも一部に光検出部で得られた検出信号を試料による吸収を反映した信号として所定の処理を行うことで、例えば試料による吸光度を算出する。

40

【0012】

試料が蛍光特性を有する成分を含み、光源からの照射光の波長が励起光として作用する波長を含む場合、照射光を受けた試料からは蛍光が様々な方向に発せられる。光源が消灯し励起光が無くなっても試料からの蛍光の放出は、短時間ではあるが、或る程度の時間持続する。そこで、信号処理部は、光源が点灯状態から消灯された直後の期間に光検出部で得られた検出信号を試料からの蛍光を反映した信号として所定の処理を行うことで、例えば試料からの蛍光の強度を算出する。

50

なお、光源が点灯しているときの検出信号にも試料から発せられた蛍光の成分が含まれる可能性があるが、通常、蛍光の強度は透過光の強度に比べると十分に小さいので、吸光度を算出する際に問題となることはない。

【 0 0 1 3 】

半導体発光素子の発光の波長帯域は狭いため、通常、光照射部と試料との間の光路上には波長帯域を制限するフィルタなどの光学素子を設ける必要はないが、必要に応じて、光学フィルタを設置して照射光の波長帯域を制限してもよい。また、試料と光検出部との間の光路上にも同様に、適宜の光学フィルタや偏光素子などを設置してもよい。

【 0 0 1 4 】

また、蛍光標識された成分を励起する励起光の波長は蛍光物質などによって異なるから、複数の異なる蛍光物質でそれぞれ蛍光標識された様々な成分を検出するには、異なる波長の励起光を試料に照射する必要がある場合があり、一つの半導体発光素子ではそうした複数の波長をカバーできないことがある。

そこで、本発明に係る光学分析装置では、前記光源として発光波長の相違する複数の半導体発光素子を用い、前記光源駆動部は、複数の光源を同時に点滅させるように又は複数の光源の一つを選択的に点滅させるようにそれら複数の光源を駆動する構成としてもよい。

【 0 0 1 5 】

この構成によれば、異なる波長の励起光を同時に又は選択的に試料に照射し、その光が消えた直後に、試料から発せられる蛍光を光検出部で検出することにより、異なる蛍光物質で標識された成分による蛍光をともに検出することができる。

【発明の効果】

【 0 0 1 6 】

本発明に係る光学分析装置によれば、一つの光検出部を使用し、且つ光ガイドなどの特別な光学部品や光学素子を用いることなく、一つの試料容器中に収容されている試料に対する吸光度測定と蛍光測定とを実質的に同時に実行することができる。それにより、吸光度と蛍光の同時測定が、低コストで且つ小形である装置を用いて行える。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】本発明の一実施例である吸光・蛍光検出器の概略構成図。

【図 2】本実施例の吸光・蛍光検出器における動作タイミング図。

【図 3】本発明の他の実施例である吸光・蛍光検出器の光学測定部の概略構成図。

【図 4】本発明の他の実施例である吸光・蛍光検出器の概略構成図。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 8 】

以下、本発明の一実施例である吸光・蛍光検出器について、添付図面を参照して説明する。

図 1 は本実施例の吸光・蛍光検出器の概略構成図、図 2 は本実施例の吸光・蛍光検出器における動作タイミング図である。測定対象である試料溶液が流通する試料セル 2 は、例えば LC のカラムの出口に接続され、カラムで時間的に分離された各種成分を含む試料溶液が試料セル 2 中に略一定流速で流れる。

【 0 0 1 9 】

図 1 において、単一の LED を光源とする光照射部 1 は LED 駆動部 5 から供給される駆動電流により駆動され発光する。この光照射部 1 から出射された光は、測定光及び励起光として試料セル 2 に照射される。測定光に対し試料セル 2 中を透過した光や励起光により試料セル 2 中の試料溶液から発せられた蛍光が光検出器 3 に到達する。光検出器 3 は光照射部 1 の発光波長及び試料から発せられる蛍光の波長に対して感度を有していさえすれば、その素子の種類は特に限定されない。また、光照射部 1 における LED は、測定対象である試料溶液中の蛍光特性を有する成分（蛍光標識されている場合にはその蛍光物質）に対する励起光の波長を含む発光スペクトルを示すものであればよい。

【 0 0 2 0 】

透過光や蛍光が光検出器 3 に入射することで該光検出器 3 で生成される検出信号は、アナログデジタル変換器 (A D C) 6 により所定のサンプリング間隔でデジタルデータに変換されてデータ処理部 7 に入力される。データ処理部 7 は、データ抽出部 7 1、吸光演算部 7 2、蛍光演算部 7 3 などの機能ブロックを含む。制御部 4 は後述する吸光度・蛍光同時測定を行うために L E D 駆動部 5 を制御するとともに、データ処理部 7 にタイミング制御信号を送る。

なお、制御部 4 及びデータ処理部 7 はマイクロコンピュータを含むハードウェア回路によって構成することも可能であるが、一般的には、汎用のパーソナルコンピュータにインストールされた専用の制御・処理用のソフトウェアを該コンピュータ上で動作させることで、制御部 4 及びデータ処理部 7 の機能の全て又は一部を達成するようにすることができる。

10

【 0 0 2 1 】

次に、本実施例の吸光・蛍光検出器における典型的な動作の一例を説明する。

制御部 4 は図 2 (a) に示すような矩形波状の制御信号を L E D 駆動部 5 及びデータ処理部 7 に送る。この矩形波状制御信号の周波数は例えば数 Hz ~ 数 kHz 程度とすればよい。L E D 駆動部 5 は、制御信号が H レベルであるときに光照射部 1 に所定の駆動電流を供給し、制御信号が L レベルであるときに該駆動電流の供給を停止する。L E D 駆動部 5 は定電流回路を含み、駆動電流の電流値は常に一定に維持される。光照射部 1 において L E D の点灯・消灯は高速に行われるため、制御信号が H レベルであるときに L E D は点灯し、該制御信号が L レベルであるときに L E D は消灯する。つまり、上記矩形波状制御信号の周期で光照射部 1 における L E D は点滅する。

20

【 0 0 2 2 】

L E D が点灯しているとき、光照射部 1 から発した光は試料セル 2 に照射され、該試料セル 2 中を通過する。そのとき、試料セル 2 中の試料溶液による吸収を受けるから、その光量が減衰して光検出器 3 に到達する。光検出器 3 は入射した光の強度 (光量) に応じた検出信号を出力するから、上記制御信号が H レベルであるときに光検出器 3 から出力される検出信号は、試料セル 2 中の試料溶液による吸収の度合を反映した信号となる。なお、試料溶液中に蛍光特性を有する成分が存在する場合、該成分は光を受けて蛍光を放出する。蛍光はあらゆる方向に発せられるため、一部は光検出器 3 に到達するが、通常、蛍光の強度は透過光の強度に比べると低いため、この蛍光の影響は殆ど問題とならない。

30

【 0 0 2 3 】

点灯している L E D が消灯すると、当然のことながら、測定光に対して試料溶液中を透過して来る光は無くなるが、消灯直前に試料溶液に照射されていた光を励起光として該試料溶液中の成分から発せられる蛍光は、短い時間 (通常、サブナノ秒 ~ 100 ナノ秒程度) ではあるものの、励起光が無くなったあとも暫く放出され続ける。そのため、上記制御信号が H レベルから L レベルに変化した直後の所定期間の間に光検出器 3 から出力される検出信号は、試料溶液に含まれる成分から放出される蛍光のみを反映した信号となる。

【 0 0 2 4 】

そこで、データ処理部 7 においてデータ抽出部 7 1 は、制御部 4 から与えられる制御信号に基づいて、時系列的に連続するデータから、試料溶液による吸光を反映したデータと試料溶液からの蛍光のみを反映したデータとをそれぞれ抽出する。

40

具体的には、データ抽出部 7 1 は、図 2 (b) に示すように、制御信号が H レベルである期間中に得られたデータを試料溶液による吸光を反映したデータ (吸光データ) として抽出する。一方、図 2 (c) に示すように、制御信号が H レベルから L レベルに変化した直後の所定期間中に得られたデータを蛍光を反映したデータ (蛍光データ) として抽出する。これにより、一つの光検出器 3 により得られた検出信号をデジタル化したデータから、実質的に同一の試料溶液に対する吸光データと蛍光データとを取得することができる。

なお、蛍光測定時に発生した長い寿命の蛍光が次の吸光測定の際に透過光として誤って検出されることを避けるために、制御信号の H レベルと L レベルとの切り替えの前又は後

50

の一方又は両方に、データを検出しない不検出期間を設けてもよい。

【0025】

吸光演算部72は上記吸光データを受け取り、従来と同様の既知のアルゴリズムに従って試料溶液による吸光度を算出する。一方、蛍光演算部73は上記蛍光データを受け取り、試料溶液中の成分から発せられた蛍光の強度値を算出する。光照射部1におけるLEDの点滅の周期に比べて試料セル2中の試料溶液の流れは遙かに遅い。したがって、LEDが複数回点灯・消灯する期間中に試料セル2中の試料溶液は同じである（つまりは成分が変化しない）とみなすことができる。そこで、吸光演算部72及び蛍光演算部73は、時間的に連続する多数回のLEDの点滅に対応して得られた吸光データ、蛍光データをそれぞれ積算したうえで、吸光度や蛍光強度を求めるようにすればよい。それによって、吸光度や蛍光強度の算出精度や感度を上げることができる。

10

【0026】

以上のようにして、本実施例の吸光・蛍光検出器では、一つの光検出器を使用し光学系の構成を簡素にしながら、一つの試料に対する吸光度測定と蛍光測定とを実質的に同時に行うことができる。これによって、例えばLCで分離された様々な成分に対する吸光度及び蛍光強度を、低コストで小形の検出器を用いて求めることができる。

【0027】

なお、蛍光の寿命は蛍光物質にも依存するから、目的成分を蛍光物質で標識する場合には、蛍光寿命ができるだけ長い物質を利用するほうが都合がよいことは言うまでもない。

【0028】

20

上記実施例では、光照射部1から発した光をそのまま試料セル2に照射し、該試料セル2を透過した及び該試料セル2から発した光をそのまま光検出器3に導入していたが、光照射部1と試料セル2との間の光路上、試料セル2と光検出器3との間の光路上のいずれか一方又は両方に、所定の透過特性を有する光学フィルタなどの別の光学素子を設置してもよい。図3は、それら両光路上にそれぞれ光学フィルタ8A、8Bを設けた場合の吸光・蛍光検出器の光路構成図である。

【0029】

光照射部1と試料セル2との間の光路上には、励起光として有効な波長 λ_1 を選択可能な透過特性を有する光学フィルタ8Aを設ける。また、試料セル2と光検出器3との間の光路上には、励起光として有効な波長 λ_1 と該励起光によって励起されて試料成分から発せられる蛍光の波長 λ_2 とを選択可能な透過特性を有する光学フィルタ8Bを設ける。LEDの発光スペクトルのピーク幅は一般的に狭いが、測定に使用する波長以外の波長の光がノイズとなって測定精度の低下の原因となることもある。これに対し、図3に示した構成によれば、測定に不要である波長の光が光検出器3に入射することを防止して、測定精度を向上させることができる。

30

【0030】

また、上記実施例では、或る特定の波長の光を測定光及び励起光として使用しているが、異なる蛍光特性を有する又は異なる蛍光物質で標識された複数の成分が含まれる試料をLCで分離して検出する場合、励起光として複数の波長の光を用いる必要がある場合がある。

40

こうした場合には、図4に示すように、発光スペクトルが相違する複数のLEDを光照射部1Bに用い、制御部4は複数のLEDを同時に点灯・消灯するようにLED駆動部5を制御するか、或いは、複数のLEDのうちの一つを選択的に点灯・消灯するようにLED駆動部5を制御する構成とするとよい。LEDを選択的に点灯・消灯する場合には、複数のLEDのそれぞれの点灯・消灯を順番に繰り返し行うという時分割的な動作としてもよい。

【0031】

複数のLEDを選択的に点滅させる場合には、例えば目的成分のLCでの保持時間に応じて点滅駆動するLEDを切り替えてもよいが、LEDの発光波長が相違すると吸光度の比較が困難になる。そこで、例えばLEDの発光波長の相違による同一成分の吸光度の相

50

違を予め調べておき、それに基づいて異なるＬＥＤの下で得られた吸光度測定結果を校正して比較可能であるようにするとよい。

【００３２】

また、図１、図３、図４では記載を省略しているが、一般にＬＥＤは発光光量の温度依存性を有するため、これを軽減するために、光照射部１、１ＢにおいてはＬＥＤの温度が略一定に維持されるように温度制御を行ったり、ＬＥＤから出射した光の一部をモニタしてそのモニタ光量が略一定になるようにＬＥＤの駆動電流を制御するフィードバック制御を行ったりすることが望ましい。本実施例の吸光・蛍光検出器をＬＣの検出器として使用する場合には、カラムを略一定温度に維持するカラムオープンの内部に本検出器を設置することで、そのカラムオープンによって光照射部１、１Ｂの温度調整も行うことができる。

10

【００３３】

また、上記各実施例では光源としてＬＥＤを用いていたが、スーパーluminescentダイオード（ＳＬＤ）やレーザダイオード（ＬＤ）などのＬＥＤ以外の半導体発光素子を光源として用いた光学分析装置でも同様の構成とすることができる。

【００３４】

さらにまた、上記各実施例や上述した各種変形例は本発明の一例にすぎず、本発明の趣旨の範囲で適宜変形、修正、追加を行っても本願特許請求の範囲に包含されることは当然である。

【符号の説明】

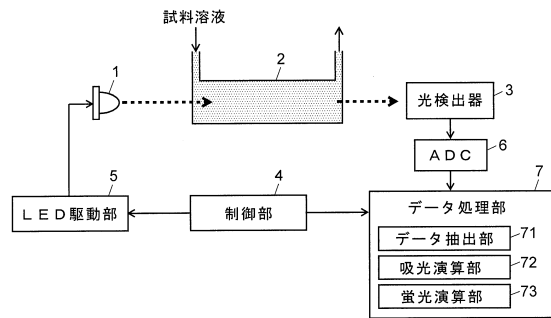
20

【００３５】

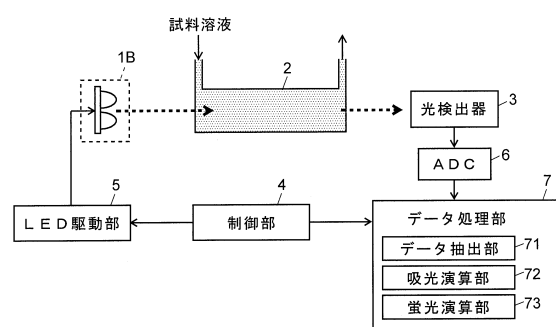
- １、１Ｂ ... 光照射部
- ２ ... 試料セル
- ３ ... 光検出器
- ４ ... 制御部
- ５ ... ＬＥＤ駆動部
- ７ ... データ処理部
- ７１ ... データ抽出部
- ７２ ... 吸光演算部
- ７３ ... 蛍光演算部
- ８Ａ、８Ｂ ... 光学フィルタ

30

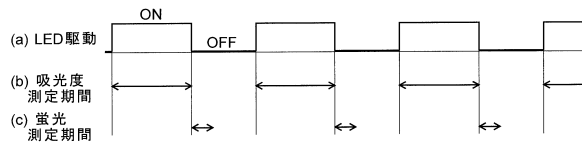
【図 1】



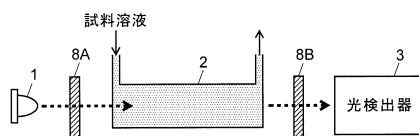
【図 4】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 小川 佳祐
京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 渡邊 真人
京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 神宮 句実子
京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 藤原 理悟
京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 山崎 智之
京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内

合議体

審判長 森 竜介
審判官 福島 浩司
審判官 渡戸 正義

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 7 3 4 0 7 (W O , A 1)
米国特許第 8 7 2 9 5 0 2 (U S , B 1)
特開平 1 0 - 1 6 0 6 6 6 (J P , A)
特開 2 0 0 6 - 2 2 6 9 6 9 (J P , A)
特表 2 0 0 1 - 5 0 4 2 1 9 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

IPC G01N 21/00 -21/01, G01N 21/17 -21/74, G01J 3/00 - 3/36, G01J 3/443