

2B01

ラマン信号増強のための垂直フロー装置の開発

(東北大院薬) ○平松弘嗣、齋藤隆寛、磯卓磨、中林孝和

Development of vertical flow apparatus for enhancement of Raman signal

(Grad. Sc. Pharm. Sci., Tohoku U.) ○Hirotsugu Hiramatsu, Takahiro Saito, Takuma Iso, Takakazu Nakabayashi

序 分光測定の結果の信頼性を確保するために、スペクトルの信号雑音(S/N)比を向上させることが重要である。ラマン分光においては分光計のスループット向上のために、集光系、回折格子、光学フィルター、検出器、などにおいて様々な改良が行われてきた。

液体試料を測定する場合、試料セル壁面での全反射を利用して励起光およびラマン散乱光の散逸を防止し、励起効率と信号光検出効率の増大を図る方法がある。例えば屈折率 1.2925 (460 nm) のフッ素樹脂を内壁に成膜した 95 cm のチューブを用い、試料水溶液 (水の屈折率 1.33) との界面での全反射を利用することで、ラマン信号強度を 122 倍増強した例がある。我々はフッ素樹脂よりも屈折率の小さい媒質として空気 (屈折率 1.00) を利用し、ラマンスペクトル測定のための S/N 比向上のための「垂直フロー装置(Vertical Flow Apparatus, VFA)」を開発した。

実験 自作した垂直フロー装置の概略図を図 1 に示す。垂直フロー装置はピンホールと試料導入穴を開けた真鍮板、カバーガラス、循環ポンプ、および液溜からなる。15 mm×15 mm×厚さ 0.3 mm の真鍮板の四隅に直径 1 mm の試料導入穴を開け、また中央に試料射出のためのピンホールを開けた。真鍮板の上面をカバーガラスで被い四辺を接着剤で固定した。また、真鍮板下面に試料導入チューブを接続した。循環ポンプにより、溶液試料を金属板とカバーガラスの間に導入し、ピンホールから下方に射出して層流液柱を形成した。ポンプ流量を調節することで、層流液柱の長さを 30 mm とした。20 倍対物レンズ(UMPlanFL, OLYMPUS, NA 0.46)を取り付けた 488 nm 励起顕微ラマン分光計 (NRS-3100、日本分光) に垂直フロー装置をセットし、露光時間 30 秒、積算 20 回の条件でラマンスペクトルの測定を行った。試料部での励起光強度を 12 mW とした。

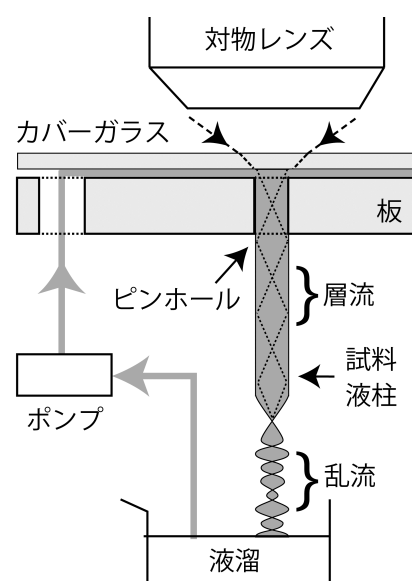


図 1 垂直フロー装置模式図

結果・考察 垂直フロー装置のピンホールに焦点を合わせることで、レーザー光 (ラマン励起光) を試料液柱に導入した。試料液柱のうち層流部分では、液柱を取り囲む空気との界面で、ラマン励起光が全反射する。空気と水の屈折率を考慮すると、(臨界角は 49° であることから) $<41^\circ$ の集光角度を持つ入射光は空気-水界面で全反射される。そのため、NA 0.46 の対物レンズ (集光角度 27°) を用いて液柱に導入した励起光は、液柱側面から外部に出ることはなく、液柱内に留まる。

その結果、層流液柱内部でラマン励起効率が增大する。ある点で全方位（立体角 4π ）に散乱されるラマン信号光のうち、一部（立体角 0.5π に相当する分）が全反射により液柱内部に留まって液柱上端に達する。空気に対する液柱の端面での NA (0.88) と対物レンズの NA (0.46) を考慮すると、液柱端面に達し外部に出るラマン信号光のうち 21% を検出器に導入できる。これに対し、NA 0.46 の対物レンズと

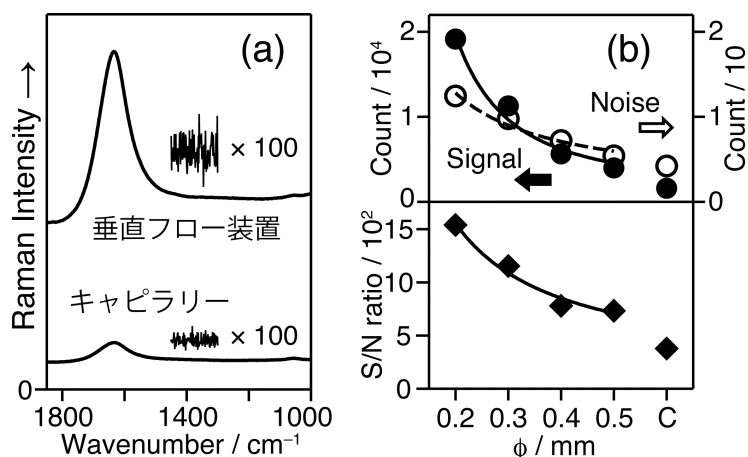


図2 H₂Oのラマンスペクトル測定結果 (a)垂直フロー装置（上）およびキャピラリー（下）を用いた場合。(b)信号強度（●）、雑音レベル（○）、および信号雑音比（◆）のピンホール直径依存性。Cはキャピラリーを用いた場合。

キャピラリーを用いた顕微ラマン測定の場合、焦点で生じた信号光の一部（立体角 0.2π に相当する分）が集光され検出器に到達する。

直径(ϕ) 0.2mm のピンホールを有する垂直フロー装置を用いた場合、従来法（キャピラリーに封入した試料の顕微ラマン測定）の結果と比較して、H₂O の非共鳴ラマンスペクトルの信号強度が 12 倍増大した（図 2 (a)）。上述の垂直フロー装置およびキャピラリーを使用した時の信号検出効率を考慮すると、ラマン励起効率は 25 倍増大したことになる。信号強度は ϕ^{-2} 、雑音レベルは ϕ^{-1} に、それぞれ比例した（図 2 (b)）。液柱の断面積が小さいほど信号強度が増大すると考えることで ϕ^{-2} 依存性が説明出来る。すなわち信号強度は試料液柱内部の光強度に比例する。雑音レベルは検出器入力信号の 1/2 乗に比例すると考えて説明出来る。信号雑音比は ϕ^{-1} に比例することが分かった。試料の量は十分にあるが濃度上限に制限が有る試料（ペプチドホルモンなど）のラマンスペクトル測定において、垂直フロー装置は有用であると考えられる。

垂直フロー装置を用いて、水溶性色素コンゴレッドの共鳴ラマンスペクトルを測定した結果を図 3 に示す。このとき信号強度増大率は 4.9 倍であり、H₂O の非共鳴ラマンスペクトル（図 2）の場合より低かった。試料が励起光およびラマン信号光を吸収したことによると考えられる。

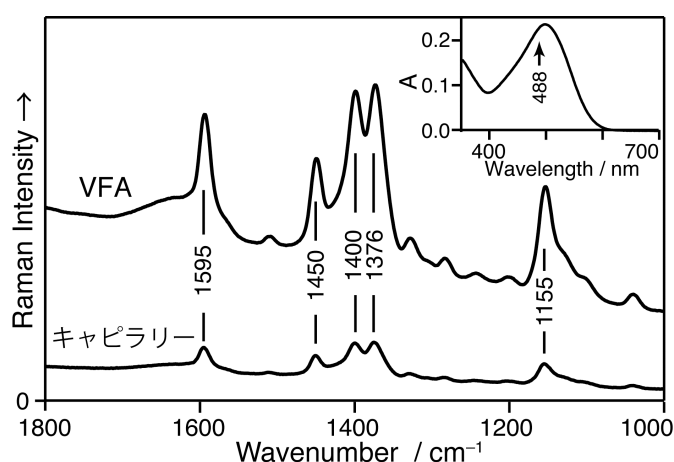


図3 コンゴレッドの共鳴ラマンスペクトル測定結果 垂直フロー装置（上）およびキャピラリー（下）を用いた場合。350-700 nm 範囲の紫外可視吸収スペクトルを右上に示した。

参考文献 Hiramatsu and Saito, *J. Raman Spectrosc.* **2014**, *45*, 208-210.