技術報告

単一パルス励起による紫外共鳴ラマンスペクトルの 多重波長測定

三友 亨，一瀬光之尉[®]，小島 次雄^{*}

(1988 年 7 月 28 日受理)

水系試料中の有機化合物の高感度な定性手段として、紫外・極紫外レーザー励起の共鳴ラマン法が有用である。流れ分析などへの利用を考える場合、微少なサンプルで高速測定を行う必要がある。そこで、パルスレーザーによる共鳴ラマンスペクトルの多波長測定法について検討した。1 発のレーザーパルス (20 mJ, 347 nm, 12 ns) で試料を励起し、イメージインテンシファイヤーのゲインを最大にして、*m*-アゾベンゼン、*p*-アミノアゾベンゼン、*p*-アミノベンゾフェノンについて、 3000 cm^{-1} のシフト分を 1 フレームとする分解能 18 cm^{-1} の共鳴スペクトルを得ることができた。これらの実験結果と光学系の検討により、200 nm 前後の励起における 1 発のパルスによる計測のためには、エミッタンスゲイン 10^4 程度のイメージインテンシファイヤーと強度 10~20 mJ 程度のパルスエネルギーが必要であることを明らかにした。

1 緒 言

近年、生体関連分野で水系試料中の微量の有機物の化学計測の必要性が高まっているが、同定を目的にした高感度な計測に使える適当な手段が少ない。有機分子が一般に短い波長の光を吸収することに着目すると、紫外、極紫外レーザー励起の共鳴ラマンスペクトル法はこのような要求に答え得る計測法の一つと考えられる。この方法を使えば、水溶液試料系において、分子の振動同定情報を、吸収法と同程度に高感度にかつはん用的に取得可能になると考えられる。更に最終的には励起波長を可変にして高選択性を図ることも可能である。紫外、極紫外共鳴ラマンスペクトルの測定は既にペプチド、タンパク、核酸などの構造解析¹⁾や、多環芳香族分子の ppb レベルでの検出同定²⁾に利用されているし、可視励起による高感度 LC 検出も田中らにより試みられた³⁾。しかし、従来法では、数~十数万パルスの積算を要するため、①測定時間が長すぎる。又このため測定中の光分解の影響も考えねばならず、試料を循環させるため²⁾、②貴重な生体関連試料を大量に準備しなければならない。

この 2 点は、化学計測手段として考える場合大きな障害となる。もし紫外レーザーのパルス強度を非線形効果が生じない範囲で上げ、1 パルスによるマルチチャネルスペクトル測定を行えばこの二つの障害は除かれる。すなわち、①測定時間は短くなり、LC や FIA などの連続流れ分析系で現在欠けている高感度な定性型の検出器を実現できる。②極微量の試料で測定できる。なおレーザーパルス幅に等しい数十 ns 中でのみラマン散乱光は発生するため、この短時間内で生じる光分解反応はほとんど無視でき、スペクトルへの影響も避けられる。

本研究では、単一パルスによる紫外共鳴ラマンスペクトル測定の化学計測における重要性を特に指摘すると共に、その測定条件を技術的な面から検討した。

2 実験方法

試料系：試薬はすべて特級を、又、セルは、内径 0.3~0.7 mm、肉厚約 0.1 mm の石英キャピラリーを用いた。

光学系：紫外光源として、Qスイッチによるルビーレーザーのジャイアントパルス (JLS-R5, 日本電子) を角度チューニングの KDP 結晶 ($14 \times 14 \times 25\text{ mm}$, Lasermetrics 製) を通して得た第二高調波 347 nm, 12 ns のパルスを用いた。基本波成分はガラスフィルター (UV-D36C, 東芝) で除去した。励起用の集光レンズ

^{*} 京都大学工学部：606 京都府京都市左京区吉田本町

として、合成石英製の口径 12 mm, 焦点距離 120 mm のものを用いた。散乱光の観測を、励起光に対し直角方向で行った。口径 50 mm, 焦点距離 60 mm の合成石英製コンデンサーレンズ (ニコン) で散乱光を集光し、開口数を合わせるため、散乱光源の 4 倍の大きさにしてシングルモノクロメーター (焦点距離 25 cm, $F=5$, ユニオン技研) の入射スリット上に結像させた。スリットの長軸方向は、試料中の励起ビームの光軸方向に平行、偏光方向に直角に設定した。“シングルモノクロメーター”で測定するために、特に迷光の低いブレードホログラフィック (530-25, JOBIN YVON 製) のマスター回折格子を用いた。この回折格子の特性は 1200 本/mm, ブレード波長 250 nm である。多重波長検出には、160 nm から有効感度のある紫外用イメージインテンシファイヤー (以下 II と略記, V1830K, 浜松ホトニクス製) を用いた。II の出力蛍光面上の、 $300\text{ cm}^{-1}/\text{mm}$ の線分散のスペクトル像をコンピューターに取り込むためのインターフェースとして 512 チャンネルのリアレーを用いた。すなわち、高効率、高感度で、II の出力蛍光面上のスペクトルイメージを電気信号に変換するためファイバープレート窓に持つリニアホトダイオードアレー (512SF, RETICON 製) を、オプティカルマッチング用オイルを塗付した II の蛍光面に、アレーへの誘導を避けるため接地したネサ膜を介して圧着した。ここで構成した測定系により、計測用として必要と考えられるほぼ 3000 cm^{-1} の波数範囲を 1 フレームで検出できる。アレーのスタートパルス間隔を 15 ms (1 ビクセルの読み出し時間 $9\text{ }\mu\text{s}$, $9.6\text{ ms}/\text{フレーム}$) に設定した。II の内部ゲートの開閉、レーザー発振との同期、アレーと 12 ビットの AD コンバーター (HZ12BGC, Datel 製) の駆動、取得スペクトルのモニターディスプレイ上の表示と XY レコーダー上への記録など、すべての制御、及びバックグラウンドの減算などスペクトルデータの処理は、コンピューター (LSI-11, DEC 製) で行い、プログラムはすべて機械語で記述した。

3 結果と考察

3.1 S/N 比

強度 20 mJ, 半値幅 12 ns の 1 発のレーザーパルスによって得られたアセトニトリル溶媒のラマンスペクトルを Fig. 1a に、水-メタノール系のそれを同図 b に示した。主ピークの S/N 比は、a でほぼ 40, b で 25 であった。II のゲインは 15000 倍で、最高ゲインの 20000 倍にはまだ少し余裕を残した。各ピークは、期待した位置に現れた。又アセトニトリルの 2249 cm^{-1} と 2950 cm^{-1} のピーク比 I_{2249}/I_{2950} は 0.422 で、文献の値 0.425⁴⁾ と良く一致し、非線形効果は、この励起強度で生じていないことが分かった。3.3 で明らかにするように共鳴ピークは溶媒のピークと同程度の強度で出現するので、大 (2950 cm^{-1}), 中 (2249 cm^{-1}), 小 (1380 cm^{-1} , 920 cm^{-1}) のピークを持つアセトニトリルの通常のラマン

Fig. 1 Raman spectra of solvents

a : acetonitrile slit 23 μm ; b : methanol-water (50% v/v), slit 126 μm

測定は、共鳴実験を行うための分光・検出系の予備テストの試料として最適であった。

1 発パルスで得たアセトニトリルの 1400 cm^{-1} 近傍の小ピークの S/N 比は 5 であった。このシステムを仮に 200 nm 前後で作動させた場合、ラマン強度の波長 4 乗逆比例則を単純に適用すると、1 発パルスで S/N 比が 40 程度が達成できると考えられる。なお、12000 発、240 nm, 10 分で Asher²⁾ の得たスペクトル中の同一ピークの S/N 比は、同文献 Fig. 4 から数十程度に見受けられる。

入射スリット上の散乱光源の像は現在かなり広がっている。使用したレーザービームの広がりが角 $5 \times 10^{-3}\text{ rad}$ (θ) と、集光レンズの焦点距離 120 mm (f) とから求めた試料の照射焦点直径 $2f\theta$ は 1.2 mm である。開口数の関係から試料の照射部分はスリット上では 4 倍になり、スリットの短軸方向に 4.8 mm の像となる。Fig. 1a では 23 μm のスリットを用いているため、光は 1.9 % しか利用していない勘定になる。この数値を上げることも S/N 比の改善につながる。現用の f 120 mm の励起用集光レンズを、より短焦点の 60 mm に替えれ

ば, 照射焦点径は $1/2$ になり, ピクセルの受光量を今の 2 倍に上げることができよう。

3.2 分解能

分解能は, Fig. 1a の図から約 $20\sim 25\text{ cm}^{-1}$ となった (同図, a は $23\text{ }\mu\text{m}$, 5.4 cm^{-1} 相当のスリットを用いて得たが, b は $126\text{ }\mu\text{m}$ による)。本分光系の分解能を, ペンレイランプの 253.7 nm の輝線で精密に測定したところ, アレーの 3 ピクセル分, $75\text{ }\mu\text{m}$ であった。このラマン観測域では 18 cm^{-1} に相当しており, 上記実測値はこの値に近い。使用したモノクロメーターには主鏡面の幾何誤差に基づく, 従って, 回折格子の本数に無関係な, 半値幅にして $40\text{ }\mu\text{m}$ の固有の誤差がある。上記 $75\text{ }\mu\text{m}$ の分解能は, この $40\text{ }\mu\text{m}$ の誤差が, II のマイクロチャクルプレート出力ファイバプレート (ファイバ径 $10\text{ }\mu\text{m}$), カプリング用ファイバプレート ($6\text{ }\mu\text{m}$), アレーのファイバ窓 ($6\text{ }\mu\text{m}$), 及びアレーピクセル (ピッチ $25\text{ }\mu\text{m}$) を経て, これら各径数が, 最悪の場合単純加算されて生じるクロストークのぼけ, $87\text{ }\mu\text{m}$ (3~4 ピクセル分) によって劣化したために生じたものと解釈できる。従って分解能を更に 2 倍程度上げて, 溶液のモニタ

Fig. 2 Raman spectra of solutions

a : $3 \times 10^{-3}\text{ M}$ *t*-azobenzene in acetonitrile, slit $126\text{ }\mu\text{m}$; b : $3 \times 10^{-3}\text{ M}$ *t*-azobenzene methanol-water (50%v/v) solution, slit $60\text{ }\mu\text{m}$

ー用として, より望ましい 10 cm^{-1} 程度にするには, 今の 2 倍の 2400 本/mm の回折格子に差し変えるだけで良く, 検出には現在入手できる, 2 倍の口径の II と 1024 チャンnelアレーを用いれば良いことになる。このとき各ピクセルの受光量は $1/2$ に落ちるが, 上記の理由により, $f60\text{ mm}$ の集光レンズ (現用は 120 mm) を用いれば回復できると考えられ, 今と同じ励起強度・検出ゲイン・検出結果を達成できよう。

3.3 アゾベンゼン類の共鳴ラマンスペクトル

Fig. 2 は *t*-アゾベンゼンの, Fig. 3 は *p*-アミノアゾベンゼンの, Fig. 4 は *p*-アミノベンゾフェノンの, それぞれ 1 発のパルスで得たラマンスペクトルである。Fig. 2b は水-メタノール溶媒, 他はアセトニトリル溶媒である。各溶質の添加によって新たに生じたピークに

Fig. 3 $1.5 \times 10^{-3}\text{ M}$ *p*-aminoazobenzene in acetonitrile (slit $126\text{ }\mu\text{m}$)

Fig. 4 $2 \times 10^{-3}\text{ M}$ *p*-aminobenzophenone in acetonitrile (slit $126\text{ }\mu\text{m}$)

つについては次のように説明できる。

まず *t*-アゾベンゼンと *p*-アミノアゾベンゼンについては、励起はアゾ基の $n \rightarrow \pi^*$ 遷移である 326 nm の吸収帯で行っており、両溶液ともに、アゾ基の 1450 cm^{-1} 近傍の伸縮振動 $\nu(\text{N}=\text{N})^{5)}$ と考えられるピークが、 $1400 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ 付近に増強されて現れ、これらが共鳴ラマンピークであることを示唆する。又 1143 cm^{-1} にも溶媒にないピークが現れたが (*p*-アミノアゾベンゼンの Fig. 3 でははっきりしない)、 $\nu(\text{Ph}-\text{N})$ の $1140 \sim 1150 \text{ cm}^{-1}$ ⁶⁾ が増強された共鳴ピークと見られる。 $2540 \sim 2620 \text{ cm}^{-1}$ にいずれの場合にも現れた二つの小ピークの帰属は不明である。

p-アミノベンゾフェノンについては、励起はカルボニル基の $n \rightarrow \pi^*$ の 337 nm の吸収帯内で行っており、カルボニル基の 1670 cm^{-1} 近傍の伸縮振動 $\nu(\text{C}=\text{O})$ が増強されたとみられる共鳴ピークが 1672 cm^{-1} に得られた。

溶質に起因するこれら共鳴主ピークは、溶質濃度が mM にもかかわらず、このように溶媒のラマンピークと同程度の高さまで増強されたが、いずれのスペクトル測定も 3.1 の場合と異なって II のゲインを最大にする必要があった。励起光及び共鳴・非共鳴の散乱光が共に溶質に吸収（自己吸収⁷⁾）されて全体にピーク強度が下がったため、この結果、縦軸のスケールは 3.1 の場合に比べて小さくなった。20 mJ 弱の 1 発パルスで共鳴ラマンスペクトルを得るためには、現在入手できる II の性能ではそのゲインを最大（エミッタンスゲイン $2 \times 10^4 \text{ W/W}$ ）に設定しなければならないことが明らかになった。

電子吸収ピークの波長 (326 nm) が励起波長からかなり外れている *t*-アゾベンゼンにおいても強い共鳴増強が得られたが、このことは両波長の厳密な一致（真正共鳴）の条件が必要でないことを示している。励起波長変化に対して共鳴増強が起きる度合いがほぼ電子吸収スペクトルの波形に近い対応を示しているため、レーザー励起波長が固定であっても、その近傍に電子吸収ピークを持つ試料の計測に、共鳴法を広く適用できると言えよう。

3.4 濃度依存性

共鳴ピークの高さの濃度依存性については、濃度が低くなると、例えば $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ 以下の *t*-アゾベンゼンのアセトニトリル溶液では、ほとんどアセトニトリルのピークのみが濃度に無関係に一定の強さで見られた。一方、濃度が高くなると自己吸収のため溶媒、溶質のピー

ク信号は共に弱くなった。例えば比較的高濃度の $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ の *t*-アゾベンゼンの水-メタノール溶液の 1 発パルスによるスペクトルでは $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ の場合に比べて全体にピーク強度が一層下がり溶媒の主ピークの S/N 比も 20 から 3 に下がった。溶媒のピークは共鳴ピークに比べて相対的に低く観測された。4 発のレーザーパルスによる積算によって S/N 比が 2 倍の 6 に改善されたことから、ノイズは検出系に由来するものであることが分かる。濃度が更に高く ($3 \times 10^{-2} \text{ M}$) になると、自己吸収は一層顕著になり、溶媒、溶質両ピークとも完全に消失し、平坦なスペクトルになった。後方散乱の集光を今後検討する必要がある。

3.5 検出限界

Asher ら²⁾の実験 (12000 発のパルス積算) では、アセトニトリル中のピレンの 1622 cm^{-1} の共鳴ピークは、 10^{-6} M において、溶媒の 1400 cm^{-1} 近傍の小ピークの $1/10$ になり、 10^{-6} M では共鳴ピークはスペクトル上では見えていない（ただし差スペクトルの積算測定法では検出されている）。1 パルスを用いる本実験では、*t*-アゾベンゼンの 1500 cm^{-1} 近傍の共鳴ピークの、上記溶媒ピークとの対比は、その $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ アセトニトリル溶液で Fig. 2 が得られ、 $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ 以下の溶液ではピークが見られなかった。通常のスペクトルの測定法（差スペクトルの積算によらない）では共鳴ピークの検出限界は Asher らの結果より二けた悪い。しかし、共鳴ピーク強度がモル吸光係数 ϵ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) の 2 乗に比例する（励起波長での ϵ はピレンで 10^5 、*t*-アゾベンゼンで 10^4 ）と考えると、スペクトルの見掛けのうえからは基本的性能が同等になっていると推定して良いと思われる。

以上まとめると、まず単一パルス励起による紫外共鳴ラマンスペクトルの測定が化学計測上重要であることを指摘した。そして、繰り返しパルスレートが低いため最近では使われないが、パルス当たりのパワーが強いルビ-レーザーをあえて選び、その第二高調波の紫外光を励起源として単一パルス計測を試み、この実験を基に、光学系、分解能、照射強度、パルス数、励起波長などの実験条件、及びそれらが変わった場合について種々考察した。その結果、単一パルス計測のためには、基本的に、ゲイン (radiant emittance gain w/w) $1 \sim 2 \times 10^4$ 程度の II と、数～十数 mJ 程度のパルス強度を持ったレーザー光源があれば良いことが明らかになった。

II に関しては現在既に 160 nm の極紫外域からこの

ような条件を満足する II が手に入る。又上記の強度を持った紫外・極紫外光源についても、狭帯域化した Ar-F エキシマレーザーや、計測用の簡単な新固体 (YLF 系) レーザーが現在基本的に利用可能な技術になっている。

本研究を行うに当たり、種々御教示頂いた、東京大学薬学部、西村善文先生に厚く感謝致します。

(1986 年 10 月, 日本分析化学)
会 35 年会において一部発表)

文 献

- 1) M. Tsuboi, Y. Nishimura, A. Y. Hirakawa, W. Peticolas: "*Biological Application of Spectroscopy*", Vol. 2, p. 109 (1987), (J. Wiley & Sons, New York); 北川禎三, 小倉尚志: 分光研究, **36**, 147 (1987).
- 2) S. A. Asher: *Anal. Chem.*, **56**, 720 (1984).
- 3) 斉藤貞二, 寺前紀夫, 田中誠之: 日化, **1980**, 1363.
- 4) F. R. Dolish, W. G. Fatel, F. F. Bentley: "*Characteristic Raman frequencies of organic compound*" (1974), (J. Wiley & Sons, Inc., New York).
- 5) J. Brandmuller, H. Hacker: *Z. Phys.*, **184**, 14 (1965).
- 6) H. Hacker: *Spectrochimica Acta*, **21**, 1989 (1965).
- 7) T. C. Sreakas, D. H. Adams, A. Packer, T. G. Spiro: *Appl. Spectrosc.*, **28**, 324 (1974).

☆

Multichannel detection of resonance Raman spectroscopy with single UV pulse excitation.

Toru Muro, Mitsunjo Ichise and Tsugio Kojima
(Department of Industrial Chemistry, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606)

UV-excited resonance Raman spectroscopy has a potential as a method for highly sensitive and quantitative analysis of organic molecules in aqueous solution. In its application to flow analysis and liquid chromatography, a "rapid measurement" and a "very small sample size" are essential. In this paper, multichannel detection of the single UV pulse-excited resonance Raman spectra was investigated. Excitation by a single laser pulse (347 nm, 22 ns, 20 mJ) gave well-resolved resonance Raman spectra of *t*-azobenzene, *p*-aminoazobenzene and *p*-aminobenzophenone, which showed 3000 cm⁻¹ shift with resolution of 18 cm⁻¹. The emittance gain of image intensifier should be at least 2 × 10⁴ w/w for these measurements. Considering from the characteristics of optical systems and the above results, measuring conditions for a single pulse excitation of at 200 nm were discussed.

(Received July 28, 1988)

Keyword phrases

UV resonance Raman spectroscopy; pulsed laser; image intensifier; multichannel detection of Raman spectra.