

# Photon Systems アプリケーションノート

## 低コストの深紫外線ラマンおよび蛍光分光計と方法

### 概要

深紫外線励起ラマン分光法、蛍光分光法、または両者を組み合わせた分光法を使用した材料の検出と分類には、大きな利点があることが実証されています。

近紫外線、可視光線、近赤外線と比較した深紫外線励起の主な利点は次の 4 つです。

- 1) サンプルが 220 ~ 250 nm で励起されると、ラマン発光はスペクトルの蛍光のない領域で発生するため、励起ボリューム内のターゲットまたは周囲の材料からの蛍光によって弱いラマン信号が不明瞭になることはありません。
- 2) ラマンと蛍光は別々のスペクトル領域を占めるため、検出を同時に行うことができ、ターゲットに関するより広範な情報が得られます。
- 3) レイリーの法則と共鳴効果により、ラマン信号の強度と検出感度が向上します。
- 4) 深紫外線では多くの材料への浸透深度が非常に短いため、ターゲット材料を背景または基板から分離できます。

Photon Systems は、顧客が安価な深紫外線分光計とシステムを組み立てられるように、224.3 nm と 248.6 nm で発光する小型で低コスト、狭線幅の深紫外線レーザーと関連コンポーネントを開発してきました。

このアプリケーション ノートでは、深紫外線ラマンおよび蛍光検出法の利点について説明し、この機能を独自の研究室で実現するためのさまざまな方法の青写真を示します。

### 1. 深紫外線ラマン分光法とレーザー誘起自然蛍光法

ラマンと天然蛍光スペクトル領域の広い視点は、一般的なレーザーの発光波長とそれらのラマン範囲のスペクトル範囲とともに、図1 に示されています。

照射体積内のターゲット分子または周囲の材料からの蛍光を避けるために、近赤外に移動することが一般的に受け入れられている方法ですが、830 nm という高い励起でも、調査された材料の大部分がラマン発光を完全に隠すほどの大きな蛍光干渉[1]を示すことが示されています。

Asher[2]、[3] は、天然材料は励起波長に関係なく、約 270nm 未満の波長では蛍光を発しないことを示しました。

これは、Nelson[4]、Sparrow[5]、Wu[6] などのその後の多くの出版物でさらに証明されました。

約 250nm 未満で励起が発生すると、ラマン スペクトルを観察できるレーザー波長より上の蛍光のない領域が存在します。

これは、より長い波長で励起するレーザーには当てはまりません。

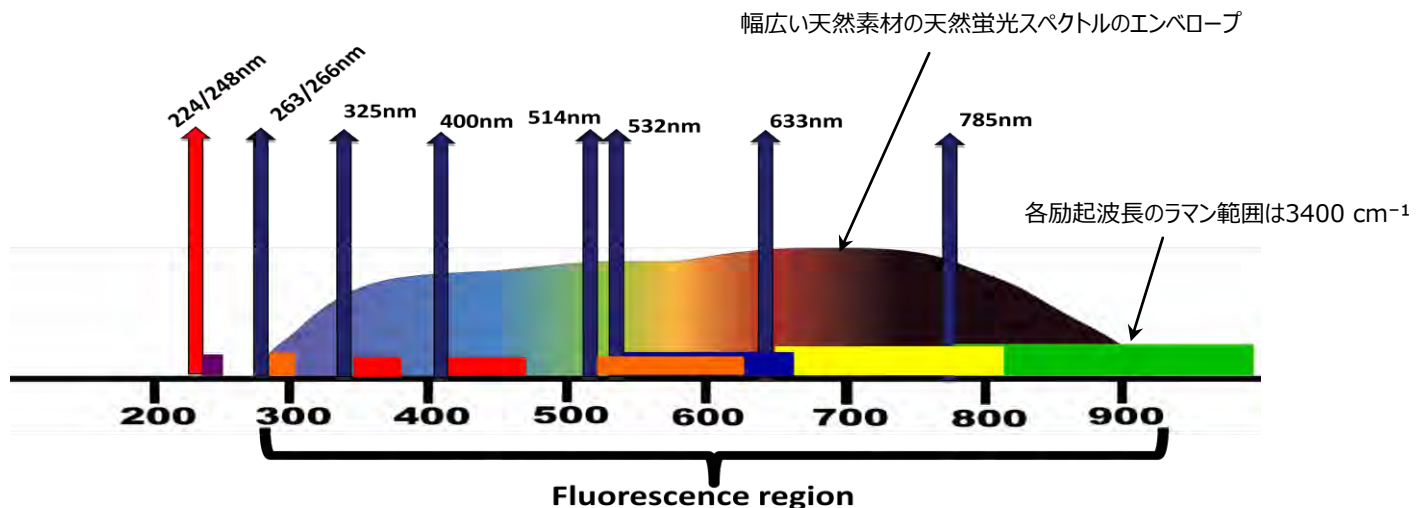


図 1. 典型的なレーザーの発光波長と 4000  $\text{cm}^{-1}$  ラマン範囲におけるラマンおよび天然蛍光スペクトル領域間の大まかな関係

CBE 材料を検出、分類、または識別するための深紫外線光センサー UV には、近紫外線、可視光線、または近赤外線で作動するセンサーに比べていくつかの利点があります。これらの利点は次のようにまとめられます。

1. 弱いラマン スペクトルが天然蛍光によって不明瞭になったり、主要な C-H および O-H ラマンバンドによって蛍光スペクトルが変化することもなく、明瞭なラマン スペクトルが得られます。ラマンと蛍光は、真に独立した直交測定です。
2. 対象物質からのラマンと天然蛍光の放出を同時に検出でき、スペクトル領域が重なって混乱が生じることはありません。
3. レイリーの法則と共鳴ラマン信号増強により感度が大幅に向上し、CBE 剤の検出限界が大幅に下がります。
4. 共鳴効果によりラマン スペクトルが簡素化され、ケモメトリック法でラマン マーカー バンドを使用することができます。
5. 対象物質への浸透深度が浅いため、背景物質との区別が可能です。
6. 動作波長が短いため、ラマン分光と蛍光の太陽光ブラインド検出が可能で、ゲート検出が可能
7. 非接触、非破壊、サンプル処理不要
8. 試薬不要
9. 眼への危険性が低減（単一データサンプルに基づく DHHS/CDRH クラス I、繰り返しサンプリングに基づくクラス IIIb）
10. センサーの焦点を合わせる必要がなく、焦点深度が長い

## 2. 安価な分光器と光子システムズ社製深紫外レーザーを用いた深紫外ラマンおよびネイティブ蛍光スペクトルの例

以下は、上記の利点を示す、さまざまな材料で取得した深紫外線励起ラマンおよび蛍光スペクトルの例です。

最初は、248.6 nm で励起したラマンおよび蛍光発光スペクトル領域の分離を示すために、いくつかの材料の同時ラマンおよび蛍光スペクトルの例です。これらの例では、蛍光発光は弱いですが、これはテスト対象の化学物質に含まれる微量の有機不純物が原因です。

通常、蛍光発光は、特に有機材料では非常に強いため、ラマン部分は非常に弱く、蛍光のスペクトル領域以下で発生しない限り、通常は検出できません。

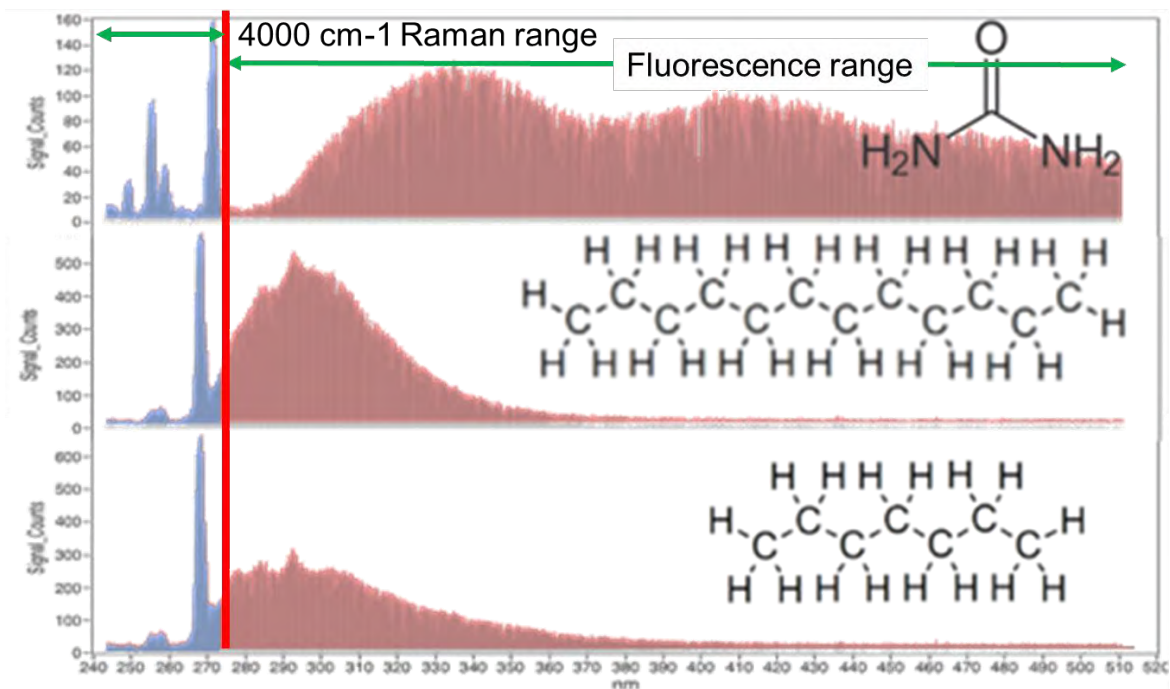


図2. 248.6 nm 励起によるラマン発光領域と蛍光発光領域の分離の例

もう一つの例は、以下に示すヒスチジンのスペクトルで、左側のスペクトルはラマンスペクトルと蛍光スペクトルの両方を示し、右側のスペクトルはラマンスペクトルのみを示しています。

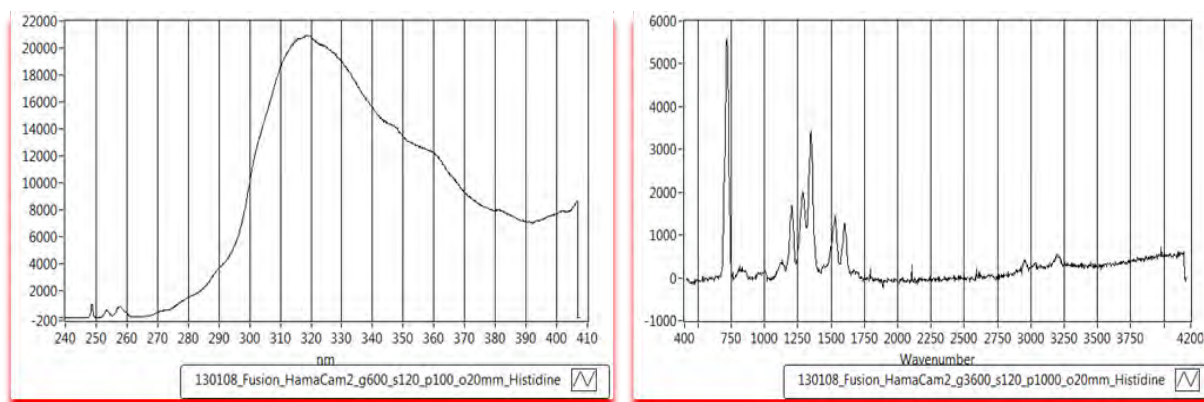


図3. 248.6 nm 励起によるヒスチジンのラマンと蛍光の組み合わせ (左) とラマン スペクトルのみ (右) の例

下に示すもう 1 つの例はグリシンで、左側のスペクトルはラマンと蛍光の両方のスペクトル領域を示し、右側のスペクトルはラマン領域のみを示しています。

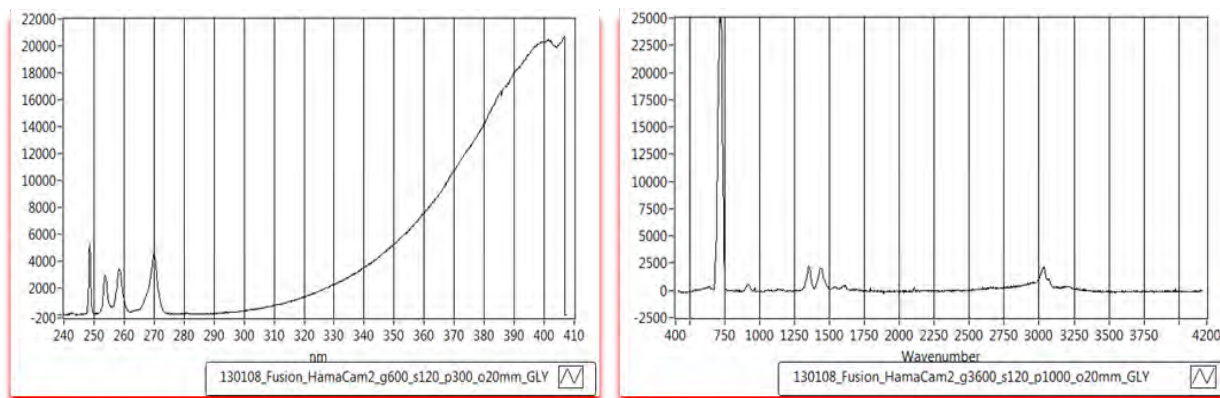


図4. 248.6 nm 励起によるグリシンのラマンと蛍光の組み合わせ (左) とラマン スペクトルのみ (右) の例

以下に示す最後の例はシクロヘキサンで、左側のスペクトルはラマンと蛍光の両方のスペクトル領域を示し、右側のスペクトルはラマン領域のみを示しています。

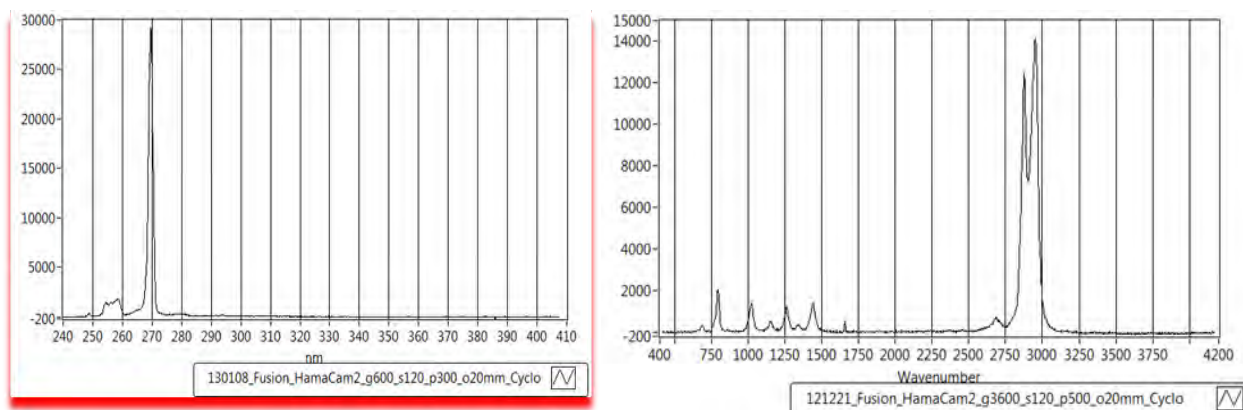


図5. 248.6 nm 励起によるシクロヘキサンのラマンスペクトルと蛍光スペクトルの組み合わせ (左) とラマンスペクトルのみ (右) の例

### 3. 安価な深紫外線ラマン分光・蛍光分光計システム

下の図6 は、上記の図2 から 図5 に示されているデータを取得するために使用されたラマンシステムの概略図です。

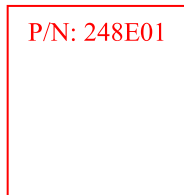


図6. 安価な深紫外線ラマン分光計と蛍光分光計の概略図

図6 のシステムの要素の説明は次のとおりです。

1. Photon Systems の 224.3nm (HeAg) または 248.6nm (NeCu) で発光する深紫外線レーザー
2. M1、M2、M3 = 深紫外線強化アルミミラー
3. EF1=EF2=EF3=レーザー ライン エッジ フィルター
4. L2=UV 顕微鏡対物レンズ
5. サンプルを保持するための XYZ 移動ステージ
6. L1=分光器集束レンズ
7. ES=分光器入口スリット (分光器内部に M4、M5、G あり)
8. CCD1= 深紫外線、背面薄型、背面照射型 CCD アレイ検出器 (2 段以上の TE クーラー付き)

図 6 に示すシステムでは、ほとんどの光学部品はいくつかのソースから市販されています。主要なコンポーネントは、深紫外線レーザー、深紫外線光学系と回折格子を備えた分光計、および深紫外線検出器です。

上記の図 2 から 5 に示されているデータでは、Photon Systems の 248.6 nm NeCu 深紫外線 (DUV) レーザーが使用されました。このレーザーの消費電力は約 5W です。

レーザー遷移は CW ですが、レーザーは、通常 50 マイクロ秒から 100 マイクロ秒のパルス幅の長いパルス モードで動作します。これにより、サンプル材料に柔らかいパルスが提供され、パルス幅が 1 ナノ秒の Q スイッチ レーザーと比較して、サンプルの損傷がほとんど発生しなくなります。通常、レーザーは 5 Hz から 20 Hz のパルス繰り返し率で動作します。ラマン スペクトルを取得するために使用されるパルス数は、サンプル材料のラマン散乱断面積、濃度、およびスペクトルの必要な信号対雑音比に応じて、1 パルスから多数のパルスまでの範囲です。

図6 のシステムで 2 番目に重要なコンポーネントは分光計です。図2 のデータでは、市販の Avantes 分光計を使用しました。図2 から図5のデータでは、ラマンデータ用に 3600 g/mm のグレーティングを、ラマンと蛍光の同時データ用に 600 g/mm のグレーティングを取り付けた ¼ m Oriel 分光計 (MS260i) を使用しました。どちらのグレーティングも 250 nm でブレースされています。市場には適切な市販の分光計が多数あります。お持ちの分光計があれば、それを使用してもかまいません。重要なのは、光学系が深紫外線での使用に適していることです。ミラーと格子の効率が高ければ高いほど、結果も良くなり、スペクトルあたりのレーザーパルス数が少なくなり、スペクトルの品質が向上します。

システムの 3 番目に重要なコンポーネントは検出器です。上記のスペクトルに使用された検出器は、S7032-1006 を搭載した、浜松ホトニクス の 2 段階冷却、背面薄化、背面照射の 1024 x 64 要素 CCD アレイ カメラ (C7042) です。これは、深紫外線で使用するための比較的安価なカメラと検出器です。より高価なカメラは、より低温で動作し、より高い信号対雑音比でより良い結果が得られます。私たちが取得した最良のスペクトルは、E2V、Andor、Horiba などの液体窒素または 4 段階 TE 冷却、背面薄化、背面照射検出器を使用しています。分光器をモノクロメータで使用し、スペクトルが各スペクトル増分に対して 1 つ以上の一連のレーザー パルスを使用して生成される場合は、単一のフォトダイオードまたは PMT 検出器も使用できます。

良好なラマンスペクトルを得るには、使用する光学部品が深紫外線で動作するように設計されていることが重要です。レーザーの出力端では、レーザーライン以外のレーザーからのすべての放射を除去するためにプラズマライン除去フィルター (PLRF) を採用しています。レーザーは、レーザー内で生成されるプラズマ光により低エネルギーの放射を放射するため、これは不可欠です。Photon Systems では、このフィルターをアクセサリとして低価格で販売しています。

エッジフィルター (EF3) は、レーザービームを光路に反射してサンプルに向かい、サンプルからのラマンおよび蛍光発光を収集し、レーザー波長でのサンプルからのレイリー散乱光をブロックするために使用されます。このフィルターは非常に重要で、通常は、入射レーザービームとサンプルから分光計の入口スリットまでの光軸と間の角度が浅くなるように使用されます。通常は 15 度未満ですが、10 度が望ましいです。これらのフィルターは、Photon Systems (248E01) または Semrock、またはその他のソースから入手できます。

最後の重要なコンポーネントは、ラマンおよび蛍光エネルギーを分光計 (L1) に集中させ、レーザービームをサンプルに集中させてサンプルから放出された放射線を収集する高品質のレンズです (L2)。図2 から図5 に示すデータでは、L2 に単純な 20 mm 焦点距離レンズ、L1 に 50 mm 焦点距離レンズを使用しました。どちらのレンズも単純な平凸型溶融シリカ レンズで、色収差と球面収差があるため、完璧とは程遠いものです。反射光学系を使用すると、はるかに優れたスペクトルが得られますが、UV に必要な高品質の表面仕上げと粗さを見つけるのは困難です。

深紫外線における共鳴ラマン分光法にフォトンシステムズ社のレーザーが使用されている例は、いくつかの出版物で紹介されています。その最近の例を以下に示します。

以下の 2 つの図は、佐賀大学、埼玉県科学技術振興機構、横浜市の東京工業大学の海野正志氏らによる論文から引用したものです [7]

600

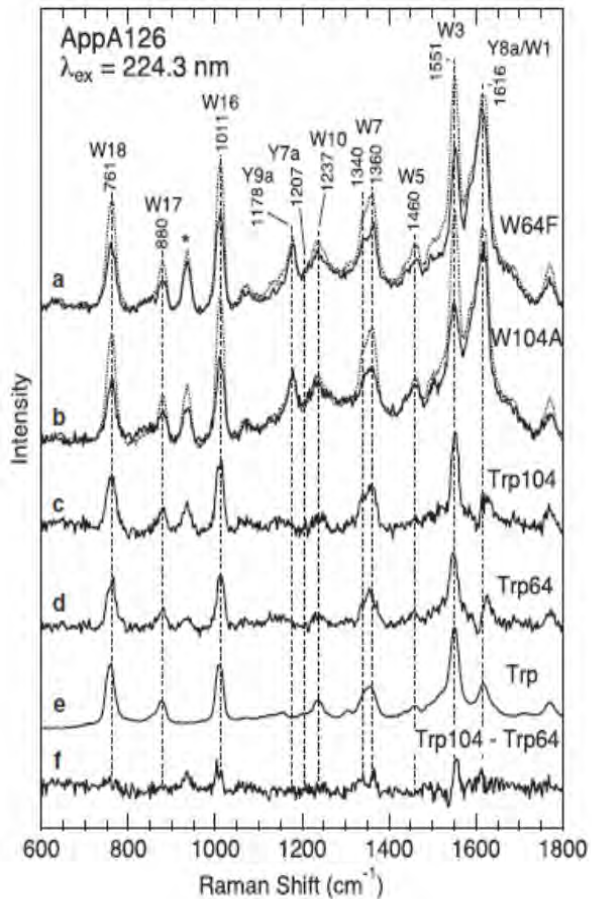


図7. WT AppA126のUV共鳴ラマンスペクトルと水性芳香族アミノ酸（左）および異なる変異体と水性芳香族アミノ酸（右）の比較[7]

ご不明な点がございましたら、弊社日本代理店のPneumまでお問い合わせください。

### 参考文献

- [1] Frosch, T., et.al. UV Raman Imaging, A promising tool. Anal. Chem. Vol.79, No.3, (Feb. 1, 2007)
- [2] Asher, S.A., and C.R. Johnson, "Raman Spectroscopy of a Coal Liquid Shows That Fluorescence Interference Is Minimized with Ultraviolet Excitation", Science, 225, 311-313, 20 July (1984).
- [3] Asher, S.A. and C.R. Johnson, "UV Resonance Raman Excitation Profile Through the <sup>1</sup>B<sub>2</sub> State of Benzene", J. Phys. Chem. Vol. 89, pp. 1375-1379 (1985).
- [4] Nelson, W.H., R. Manoharan and J.F. Sperry, "UV Resonance Raman Studies of Bacteria", App. Spect. Reviews, 27 (1), pp67-124, (1992)
- [5] Sparrow, M.C., J.F. Jackovitz, C.H. Munro, W.F. Hug, and S.A. Asher, "A New 224nm Hollow Cathode UV Laser Raman Spectrometer", App. Spect., Vol. 55, No. 1, Jan (2001).
- [6] Wu, M., M.Ray, K.H.Fung, M.W. Ruckman, D. Harder, and A.J. Sedlacek, "Stand-off Detection of Chemicals by UV Raman Spectroscopy", App. Spect., Vol.54, No.6, pp. 800-806 (2000).
- [7] Unno, M. et.al. Structural Refinement of a Key Tryptophan Residue in the BLUF Photoreceptor AppA by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy, Biophysical Journal, Vol. 98, pp 1949-1956, May 2010.

