

# 透過ラマン散乱の集光とラマンスペクトル解析の検討

牧田 愛 Satoshi Makita, 池田 充彦 Michihiko Ikeda

## [要旨]

安心・安全な社会の構築にむけて、高度なセンシング技術が重要になっている。その中でも非接触、非破壊でセンシング可能な光計測技術の一つであるラマン分光について着目し、その高感度化とラマンスペクトルの解析手法について検討した。本稿では、物質内部の成分分析が行えるが、ラマン散乱光の集光効率が非常に低い透過ラマン分光器について、光ファイバへの結合効率および透過ラマン散乱強度を考察する。また、多変量解析の基本的な手法であるCLS(Classical Least Squares)およびMLR(Multiple Linear Regression)を用いたエタノール水溶液の定量を例として、ラマンスペクトルの解析法を紹介する。

## 1 まえがき

産業の高度化、生活の多様化が進むなか、安心・安全な社会の構築にむけて、信頼できる情報を正確に取得し、分析・対応するために、高度なセンシング技術が重要になっている。

センシング技術のなかでも、非接触・非破壊でセンシング可能な光計測技術は、ダークファイバの活用や構造物のモニタリングなどの光ファイバセンサ技術、レーザ光の干渉・回折・偏光・散乱などを利用した精密計測技術、分光を利用した各種物質の光学的評価技術、顕微鏡や光干渉断層計を始めとする生体計測技術、超短光パルスを応用した測定技術、光源や光計測用デバイスなど、応用範囲が広い。

光計測技術の重要な点は、光波の持つ波長、位相、振幅、偏光、非線形性等の物理現象を正確にとらえるための光学系の設計と、トレードオフの関係にある精度と測定速度のバランスの最適化である。

近年の半導体技術の進歩によりレーザ光源や検出器の高性能化、またそれらを使用したさまざまな光測定装置が登場してきているなかで、高いスペクトル分解能と空間分解能を併せ持ち適用市場の拡大が期待できるラマン分光に着目し検討を進めてきた。

本稿では、ラマン分光技術を使用したセンシングシステムの高感度化とラマンスペクトルの解析手法について検討したので紹介する。

## 2 ラマン分光

### 2.1 ラマン散乱とは

物質に光を照射すると、光と物質の相互作用により反射、透過、吸収、散乱などさまざまな現象が起こる。散乱は、光が粒子などに当たり、光の進行方向が不規則に変化する現象である。物質に単色光を照射して散乱する光のスペクトルを調べると、入射した光と同じ波長の光(レイリー散乱)だけではなく、入射した光と異なる波

長の光が観測される。この入射光と異なる波長の光がラマン散乱である。図1に示すように、ラマン散乱は入射光(励起光)に対して分子の振動エネルギーだけシフトした波長に現れる。励起光に対するシフト量をラマンシフトと呼び、波長の逆数である波数で表す。ラマン散乱には長波長側にシフトしたストークスラマン散乱と、短波長側にシフトしたアンチストークスラマン散乱がある。ラマン分光法では、一般にレベルの高いストークスラマン散乱を観測する。しかし、ストークスラマン散乱でもレイリー散乱に比べて $10^{-6}$ ほども微弱な光である。

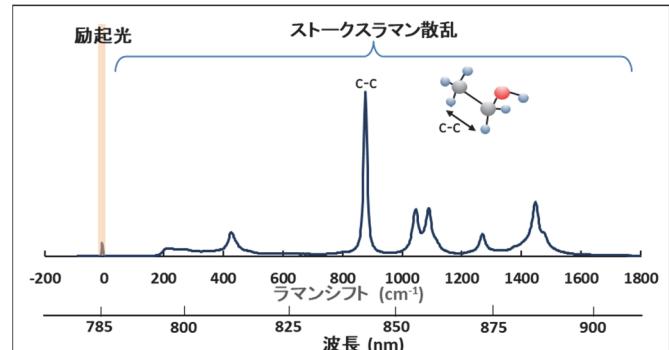


図1 エタノールのラマンスペクトル

### 2.2 ラマン散乱からわかること

ラマン散乱には、分子の構造に関するさまざまな情報が含まれており、ラマンスペクトルから詳細な分子構造を解析することができる。例として、図1にエタノール( $C_2H_6O$ )のラマンスペクトルを示す。ラマンシフト  $850\text{ cm}^{-1}$ 付近に大きなピークが見られる。これは C-C の振動に起因している。このように、ラマンスペクトルは、物質の分子構造に起因する固有の値を示すので、物質の同定や定量、成分分析に利用できる。他にも、図2に示すように、ラマンスペクトルの形から物質の濃度や結晶性物質の結晶化の程度、結晶格子の歪みなどさまざまな分子状態が解析できる。

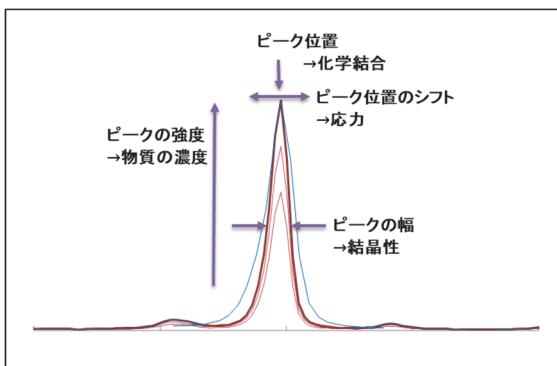


図 2 ラマンスペクトルからわかること

### 2.3 ラマン分光器

ラマン分光器の構成例を図 3 に示す。図 3(a)は、試料表面の微小部分のラマン散乱を測定するスポット分析の構成例、図 3(b)は、試料内部のラマン散乱を測定する透過ラマン分析の構成例である。光源から出射した励起光は、照射光学系を介して試料に照射される。励起光の照射により発生した散乱光は、集光光学系を介して分光器へ出力される。このとき、散乱光には、非常に強いレイリーセンターフィルタで励起光を減衰しラマン散乱光のみを分光器に出力する。ラマン散乱光は、分光器で分光され検出器で電気信号に変換される。この電気信号を処理してラマンスペクトルを取得する。

次にラマン分光器の構成要素について簡単に説明する。

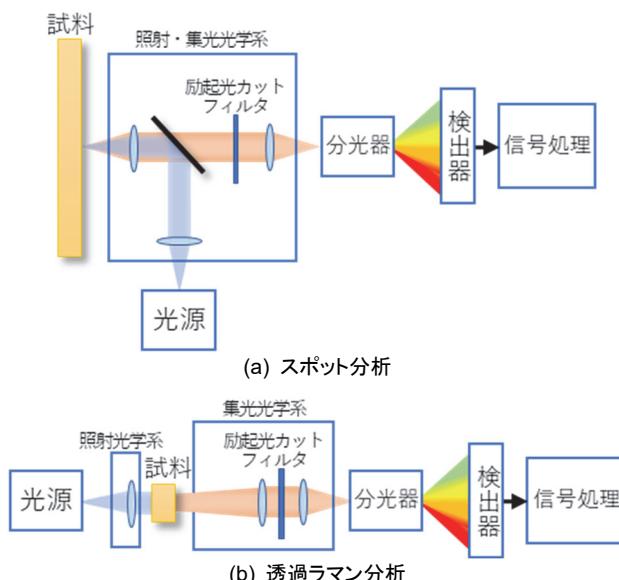


図 3 ラマン分光器の構成例

#### (1) 光源

ラマン分光器で必要な分解能を得るために、高スペクトル純度の励起光が必要である。また、ラマン散乱強度は、励起光パワーに比例するので高出力のレーザ光源が望まれる。

ラマン散乱強度は、励起光の角振動数の 4 乗に比例するため、励起光波長が短いほど強いラマン散乱光が得られる。しかし、ラマン分光分析の妨げとなる蛍光を発する試料を測定する場合には、蛍光の発生が少ない長波長の光源の方が有利である。他にも、検出器の感度やコストなどを総合的に考えて 405 nm/488 nm/532 nm/785 nm などの波長がよく使われている。最近では、蛍光の影響を抑えるため 1064 nm の近赤外レーザ光源が使われることもある。

#### (2) 照射・集光光学系

測定対象物や測定方法により、励起光の照射光学系とラマン散乱光の集光光学系の配置は異なる。また、ラマン散乱光は、非常に微弱なので、励起光を効率よく試料に照射し、そこで発生するラマン散乱光を効率よく集光するための光学系は、ラマン分光器の設計で重要となる。

ラマン分光器で一般的なのは、図 3(a)のように、励起光をスポットで照射して、発生するラマン散乱を後方散乱光学系で分光器に導く方法である。スポット分析は、数  $\mu\text{m}$  の微小物質のラマン分光が可能で、試料表面の成分分布を分析することもできる。励起光の照射とラマン散乱の集光を同一の光学系で行う場合が多い。

最近では、物質内部の成分分析が行える透過ラマン分析が注目されている。透過ラマン分光器は、図 3(b)のように、励起光を照射する光学系とラマン散乱を集光する光学系は別になる。ラマン散乱光は、試料を透過することにより減衰し、広がる。このため、透過ラマン分光器での集光効率は、スポット分析に比べて非常に低くなり、測定が難しくなる。詳細は、次章で述べる。

#### (3) 分光器

分光器の基本構成を図 4 に示す。光ファイバからの出射光は、入口スリットで絞られ、コリメート鏡で平行光になる。コリメート鏡からの平行光は、回折格子で分光され、カメラ鏡で CCD センサの位置に結像される。入口スリットの像が、CCD 検出器の各素子の位置に再結像されるので、入口スリットの幅が波長分解能と比例関係となる。波長分解能を高くするには、入口スリットを狭くする必要があるが、光量が減ってしまうので、ダイナミックレンジと波長分解能はトレードオフの関係となる。

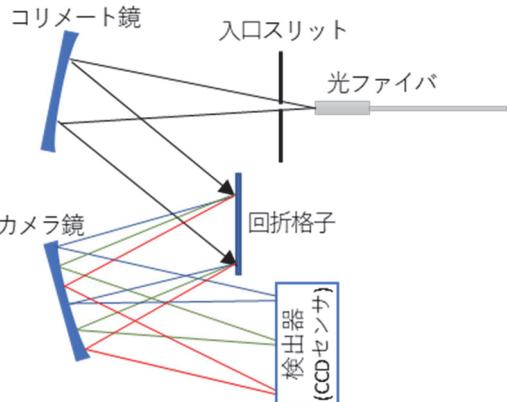


図 4 分光器の基本構成

#### (4) 検出器

ラマン分光器では、可視光で感度のよい Si(シリコン)受光素子を多数並べた CCD センサが使用される。CCD センサは、多数の波長を一度に測定できるため、測定時間が短くできる利点もある。一方、蛍光の影響を避けるために 1064 nm など長波長の励起光を使用する場合は、近赤外で感度のある InGaAs(インジウム・ガリウム・ヒ素)センサなどが使われる。

### 3 透過ラマン散乱の集光

本章では、物質内部の成分分析が行える透過ラマン分光器でのラマン散乱の集光について述べる。透過ラマン分光器では、試料を透過して減衰し、数 mm 程度に広がったラマン散乱を集光するため、集光効率が非常に低くなる。そのため、ラマン分光を高感度で行うためには、透過ラマン散乱の集光について検討することは重要である。

#### 3.1 光ファイバへの結合効率

光ファイバに光を効率よく入射させるためには、図 5 に示すように光の入射角 $\theta_{in}$ を最大入射角 $\theta_{in max}$ 以下にする必要がある。最大入射角は、光ファイバの開口数(NA:Numerical Aperture)により決まる。コアとクラッドの屈折率が一定であるステップインデクス型のマルチモード光ファイバの場合、NA はコアの屈折率 $n_{core}$ とクラッドの屈折率 $n_{clad}$ により(1)式で決まる。

$$NA = n \sin \theta_{in max} = \sqrt{n_{core}^2 - n_{clad}^2} \quad (1)$$

ここで、n は光ファイバの外部媒体の屈折率である。例えば、大気中( $n = 1$ )での NA=0.22 の光ファイバの最大入射角は、(1)式より 12.7° となる。つまり、NA=0.22 の光ファイバでは、入射角 12.7° 以上の光は、光ファイバ外に洩れてしまいコアを伝搬できない。光を効率よく光ファイバに入射したい場合、NA が大きく、コア径の大きい光ファイバを用いればよい。なお、このような光ファイバを使って

も、前章 2.3(3)で述べたように、分光器の入口スリットにより検出器に導かれる光量は制限される。

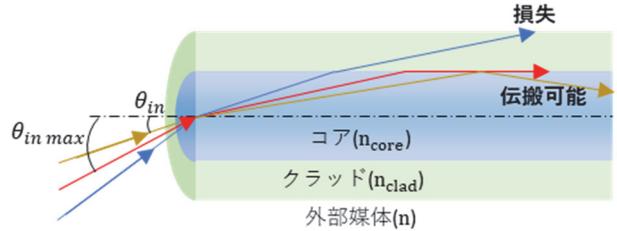


図 5 光ファイバの NA

#### 3.2 スポット時のラマン散乱の結合効率

励起光を試料の一点に照射したときに発生するラマン散乱は、等方的に放射すると考える。このとき、ラマン散乱が光ファイバに入射できる結合効率 $\eta$ は、(2)式のように光ファイバの入射角 $\theta_{in}$ の範囲内の立体角と全球の立体角の比で求められる。

$$\eta = \frac{2\pi L^2(1-\cos \theta_{in})}{4\pi L^2} \quad (2)$$

$$L \leq \frac{r}{NA} \text{ のとき} \quad \theta_{in} = \theta_{in max}$$

$$L > \frac{r}{NA} \text{ のとき} \quad \theta_{in} = \tan^{-1} \frac{r}{L}$$

ここで、L は励起光の照射点と光ファイバ端面の距離、r は光ファイバのコアの半径である。図 6 に示すように、L が小さいとき、光ファイバに結合可能な $\theta_{in}$ は、光ファイバの NA により決まる最大入射角となる。L が大きくなると、最大入射角で広がったラマン散乱光の一部しか光ファイバのコアに入らなくなるので、結合効率が下がる。よって、ラマン散乱光を効率よく入射するには、 $L \leq \frac{r}{NA}$  とする必要がある。

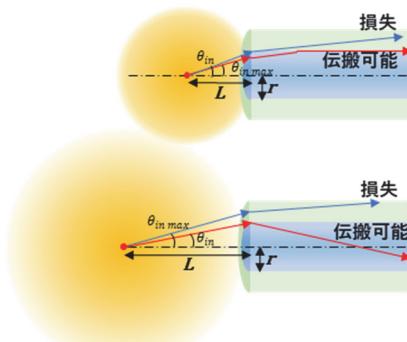


図 6 スポット時のラマン散乱の結合

#### 3.3 透過ラマン散乱の結合効率

試料を透過し広がったラマン散乱光を光ファイバに入射する場合の結合効率を考える。図 7(a)に示すように、点 P からのラマン散乱光が光ファイバに入射可能な入射角は、 $\theta_{in1} \sim \theta_{in2}$ となる。結合効率は、前節と同様に光ファイバの入射角の範囲内の立体角と全球の立体角の比で求められる。試料表面とファイバ端面の距離 L

が一定なら、点 P と光ファイバ中心軸との距離 x が、(3)式に示す  $x_{max}$  より大きくなると、 $\theta_{in2}$  が光ファイバの最大入射角  $\theta_{in max}$  より大きくなり結合効率が落ちていく(図 7(b))。

$$x_{max} = L \cdot \tan \theta_{in max} - r \quad (3)$$

半径 R の散乱光を受けるためには、(3)式より L を(4)式のようにする必要がある。

$$L = \frac{R+r}{\tan \theta_{in max}} \quad (4)$$

このとき、 $R \ll L$  より点 P の散乱光の結合効率は、 $\theta_{in} = \tan^{-1} \frac{r}{L}$  時の(2)式で近似できる。

励起光パワーが同じなら照射面積によらず発生するラマン散乱光の総量は等しいと考えられ、ラマン散乱光の結合効率は、光ファイバの入射角により決まる。よって、試料表面の透過ラマン散乱が広がり R が大きくなるほど L を大きくする必要があり、光ファイバの結合効率は下がる。例えば NA=0.22、コア径 200 μm の光ファイバに R=5 mm の透過ラマン散乱光を入射する場合、L=22.6 mm となり、スポット時に比べ結合効率は 34 dB ほど低くなる。

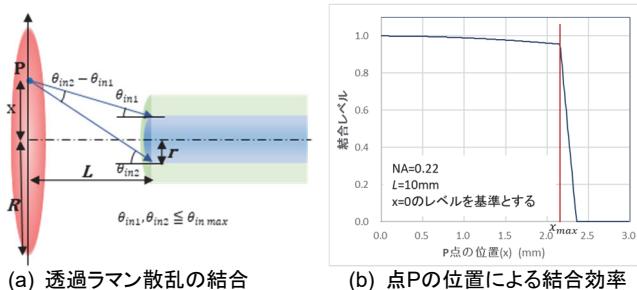


図 7 透過ラマン散乱の結合

### 3.4 不透明物質のラマン散乱強度

次に、試料を透過するラマン散乱光の減衰量について考える。不透明物質に照射した光は、透過・反射を繰り返して物質内部を伝搬する。そこで、薄い層が何重にも密に重なった単純なモデルで不透明物質を表し、ラマン散乱強度のシミュレーションを試みた。ラマン散乱は、物質内部で反射・透過を繰り返す励起光が分子に当たるたびに発生する。そこで、まず試料内部の任意の深さでの励起光強度をシミュレーションし、その結果から発生するラマン散乱強度を算出し、入射面に出てくる反射ラマン散乱強度、透過面に出てくる透過ラマン散乱強度をシミュレーションした。

#### 3.4.1 励起光のシミュレーション

図 8 に示すように、試料内部の任意の深さでの励起光強度を透過面方向と入射面方向の 2 方向に分けて考える。励起光は、各層で透過、反射を繰り返すので、任意の深さでの励起光強度は、それらの総和として求められ、各層の透過率 T、反射率 R、吸収率  $\alpha$  から求められる。

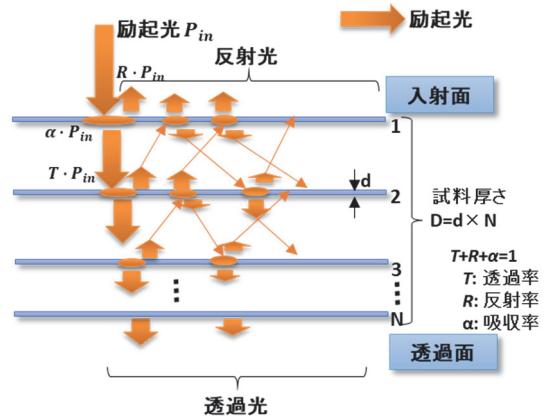


図 8 励起光の光強度算出モデル

厚さ 0.13 mm の紙を重ねサンプル厚を変えてシミュレーションの検証を行った。図 9 に励起光の透過率の実測値と反射率、透過率のシミュレーション結果を示す。サンプル厚 0.13 mm の透過率 8.4 dB と、サンプル厚 1 mm 以上の実測値の傾き 5.4 dB/mm から、厚さ 0.13 mm の紙 1 枚当たりの透過率 86.3%、反射率 13.5%、吸収率 0.2%を求めシミュレーションに適用した。透過率のシミュレーション値は、実測値と一致しており、このモデルで任意の深さでの励起光強度が算出できると考える。

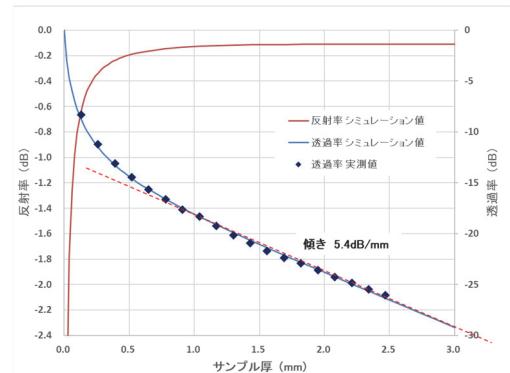


図 9 励起光の反射率・透過率

#### 3.4.2 ラマン散乱強度のシミュレーション

次に、図 10 に示すように、試料内部の励起光強度から発生するラマン散乱強度を求めた。層が薄ければ、ラマン散乱は入射面方向と透過面方向で同じ強度になると見える。そして、励起光と同様に各層で反射・透過を繰り返すラマン散乱光が入射面、透過面に出てくる総量を計算した。

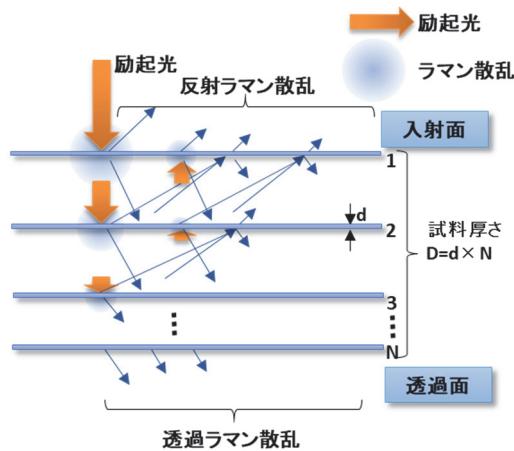


図 10 ラマン散乱強度の算出モデル

反射ラマン散乱強度と透過ラマン散乱強度を紙を重ねることでサンプル厚を変えて測定し、シミュレーションと比較した。セルロースを主成分とする紙のラマンスペクトルは、錠剤等で有効成分の濃度調整や一定の大きさに成形するために添加する賦形剤としても使われる結晶セルロースとよく似た波形を示す(図 11)。励起光波長 785 nm では、紙、結晶セルロースともに蛍光の影響が出るので、図の測定波形は、データ処理して蛍光の影響をできるだけ除いて表示している。

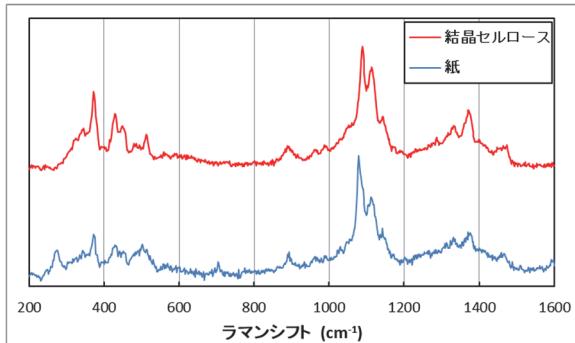


図 11 紙と結晶セルロースのラマンスペクトル

図 12 に反射ラマン散乱強度と透過ラマン散乱強度のシミュレーション結果と実測値を示す。縦軸の光強度は、サンプル厚が 0.1 mm 時の透過ラマン散乱強度を 1 とした。反射ラマン散乱強度と透過ラマン散乱強度とともに、シミュレーション値は実測値と一致した。図より、反射ラマン散乱強度は、試料の厚さと共に大きくなり、紙の場合 1.5 mm 以上で一定値となる。また、透過ラマン散乱強度は、厚さ 0.5 mm くらいまで増加した後、厚さと共に減少していく。試料が紙の場合、透過ラマン散乱強度は、試料厚 0.5 mm 時に最大となり、反射ラマン散乱強度に比べ 4 dB ほど低くなる。また、試料厚 2 mm では、12 dB ほど低くなる。

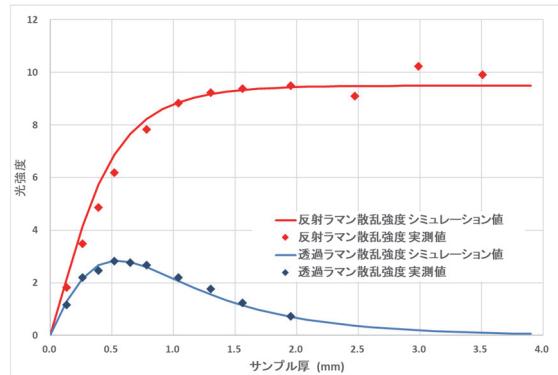


図 12 反射ラマン散乱強度と透過ラマン散乱強度

### 3.5 透過ラマン散乱の集光

以上より、透過ラマン散乱の集光は、スポット時に比べて 2 つの点で低下する。1 つ目は、ラマン散乱が広がるために、すべての位置でのラマン散乱光を入射するためには、試料とファイバ端面を離さなくてはならず、入射角が小さくなる。2 つ目は、反射ラマン散乱に比べ透過ラマン散乱は、試料の厚さにより減衰する。

例として、厚さ 2 mm の試料を透過して、半径 5 mm に広がった透過ラマン散乱を NA=0.22、コア径 200 μm の光ファイバに入射する場合、スポット時と比べおよそ 46 dB もレベルが下がってしまう。現在、最もよく使われている顕微ラマン装置などのスポット分析に比べ、試料内部のラマン散乱を測定する透過ラマン装置は、検出するラマン散乱強度が非常に低く、測定が困難なことが分かる。

微少なラマン散乱を効率よく集光するために、試料近くにミラーを配置してラマン散乱強度を上げる方法<sup>2)</sup>や、複数の光ファイバでラマン散乱を集光する方法等が検討、実用化されている。今後、ラマン散乱光の結合効率を上げる方法を検討していく。

## 4 ラマンスペクトルによる定量

ラマンスペクトルに対して基本的な多変量解析であるCLS(Classical Least Squares)と MLR(Multiple Linear Regression)を用いた定量法の例として、エタノール水溶液の定量をとりあげる。いずれの方法も校正用試料を用いて検量校正を行った後、未知試料のラマンスペクトルから定量する。

### 4.1 CLS

CLS 回帰式は、(5)式で表される。

$$A = KC + R_C \quad (5)$$

ここで、A はスペクトル行列、C は濃度行列、K は純成分スペクトル行列、R<sub>C</sub> は残差である。スペクトル行列 A は、波数に対する散乱強度を試料数分並べたものである。濃度行列 C は、各試料に対する濃度成分比を表したものである。純成分スペクトル行列 K は、混

合されている各成分の単一スペクトルを成分数分並べたものである。定量の流れは、検量によりあらかじめ  $K$  を算出しておき、濃度未知のスペクトルよりその濃度を予測するものである。検量モデルの構築には、成分とその濃度が既知である必要があり、そこに含まれる誤差が予測濃度に反映される。誤差は濃度誤差や測定誤差である。検量により求まった純成分スペクトル行列を  $K_C$  とすると、未知濃度  $C_U$  は、

$$C_U = ((K_C^T K_C)^{-1} K_C^T) A_U \quad (6)$$

となる。ここで、 $A_U$  は未知試料のスペクトル行列である。CLS は、厳密なピーク波数に依らず、ピーク領域の広範囲のスペクトル測定値を用いて回帰分析を行えるため、次節で述べる MLR に比べ、推定値が測定誤差の影響を受けにくい。しかし、広範囲であるがゆえ未知成分が混入していた場合、そのスペクトルが加算され影響を受けてしまう。

## 4.2 MLR

一般的な回帰分析法である MLR は、(7)式で表される。

$$C = FA + R_M \quad (7)$$

ここで、 $C$  は濃度行列、 $A$  はスペクトル行列、 $F$  は係数行列、 $R_M$  は残差である。このモデルは、濃度を直接予測するモデルであり、係数  $F$  は校正用に準備した濃度既知試料のスペクトルより求められる。計算では以下 2 点の制約がある。1 つ目は、係数  $F$  の計算ができないなくなるため、説明変数の数は試料数を超えてはならないということである。本例では、説明変数の数はスペクトルの波数の数であり、試料数は濃度別エタノール水溶液の数である。2 つ目は、多重共線性を持つ説明変数を選択しないということである。多重共線性とは相関の高い説明変数が複数含まれることであり、回帰結果に悪影響を与える。このようにして(7)式から得られた係数  $F_C$  とすると、未知のスペクトル  $A_U$  の濃度  $C_U$  は(8)式となる。

$$C_U = F_C A_U = (CA^T(AA^T))^{-1} A^T A_U \quad (8)$$

MLR は、上記制約より試料数未満の少数スペクトルデータしか使えないため、誤差の影響が大きくなる。また、その選択されたデータが、濃度情報の特徴をうまく捉えていない場合、有用性の低いモデルになることがある。

## 4.3 エタノール水溶液の定量

図 13 に、エタノール水溶液のラマンスペクトルを示す。測定対象はエタノール濃度が 0.4~20% の水溶液、および 0% の水である。スペクトルの各ピークに着目すると、それぞれ振幅が濃度に依存して変化していることが分かる。解析に用いるデータは、CLS と MLR いずれも最も振幅の大きいピーク領域を用いた。CLS は波数 850

~900 cm<sup>-1</sup> の範囲を、MLR は 870 cm<sup>-1</sup> のピーク付近のデータ 3 点を使用した。

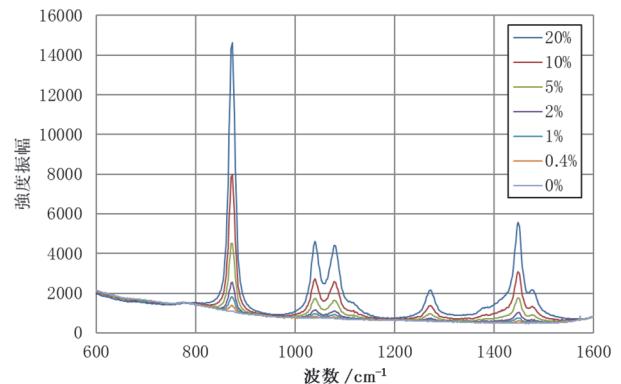


図 13 エタノール水溶液のラマンスペクトル

図 14 に、濃度校正結果を示す。CLS と MLR 間には大差はない、決定係数  $R^2$  は、それぞれ 0.9998 および 0.9992 と 1 に非常に近い値となり、両者とも予測値と実際の値とよく一致した結果であった。

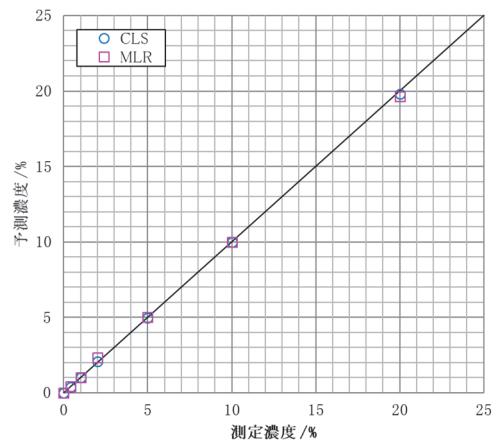


図 14 エタノール水溶液の濃度校正における CLS と MLR の比較

今後は、スペクトルデータ選択に伴う多重共線性問題や未知成分への強化対策として、主成分分析と MLR を組み合わせた PCR(Principal Component Regression) および応答変数を考慮した主成分を回帰に用いる PLS(Partial Least Squares)を検討していく。

## 5 むすび

本稿では、ラマン分光の高感度化に必要なラマン散乱光の集光について、光ファイバへの結合効率、透過ラマン散乱強度の定量化の検討を行った。また、基本的な多変量解析である CLS と MLR を用いたエタノール水溶液の定量を例に、ラマンスペクトル解析に使用される分析手法を紹介した。

今後は、ラマン散乱光の集光効率を上げる手法や光源や分光器等を含めたラマン分光器全体の最適化による高感度化や、ラマンスペクトル解析の検討を進め、高度なセンシング技術、解析技術を培っていく。

## 参考文献

- 1) 濱口宏夫, 岩田耕一(編著), “ラマン分光法”, 分光法シリーズ第1巻,  
日本分光学会 (2015)
- 2) Michael J. Pelletier, “Sensitivity-Enhanced Transmission Raman Spectroscopy”, APPLIED SPECTROSCOPY Volume 67,  
Number 8 (2013)

---

## 執筆者



牧田 聰  
先端技術研究所 技術企画部

池田 充彦  
先端技術研究所 技術企画部

公知