

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04984

研究課題名（和文）表面増強近赤外マルチプレックス誘導ラマン分光計の開発と光化学系の動的構造解明

研究課題名（英文）Development of surface-enhanced near-infrared multiplex stimulated Raman spectrometer and its application to elucidation of dynamic structure of photosystem

研究代表者

高屋 智久（Takaya, Tomohisa）

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：70466796

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は、近赤外非線形ラマン分光の手法に表面増強ラマン効果を組み合わせた表面増強近赤外マルチプレックス非線形ラマン分光計を開発し、光合成タンパク質複合体の構造の動的変化と光合成機能との相関を明らかにすることを目的とした。金ナノ粒子による近赤外非線形ラマン散乱の顕著な増強効果は見られなかったが、本研究で開発した分光計で植物汁液の測定を行った結果、本分光計が植物中肥料成分濃度の非破壊分析に応用可能であることが見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、近赤外非線形ラマン分光計を用いて植物体内に存在する肥料成分の分光信号を非破壊的に直接計測できる可能性が示唆された。この成果を発展させることにより、品種や栽培環境等によらず、植物中の肥料成分の濃度を非破壊的に計測することが可能になると期待される。植物中の肥料濃度のリアルタイムモニタリングが可能になれば、農業の省力化やスマート化、農作物のブランド化に大きく貢献することとなる。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed at the development of a surface-enhanced near-IR multiplex nonlinear Raman spectrometer using the technique of near-IR nonlinear Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering and at the elucidation of the relationship of the functions and dynamic changes in the structures of photosynthetic protein complexes. In this study, the magnitude of the surface enhancement of the near-IR nonlinear Raman scattering by gold nanoparticles was below the sensitivity limit of the spectrometer. The results of near-IR nonlinear Raman measurements of plant juice suggested that the developed spectrometer can be applied to the nondestructive analysis of fertilizer concentrations in plants.

研究分野：分子分光学

キーワード：近赤外分光 コヒーレントアンチストークスラマン散乱 金ナノ粒子 非破壊分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現代および将来の科学においては、新しく作製された分子集合体や生きた状態の動植物組織などのきわめて複雑な試料を対象として、構造・物性・機能を高い感度で計測し、あるがままの状態で明らかにすることが求められる。分光測定は試料中の分子の構造・物性・機能に対して高い感度を有し、かつ試料に対して低侵襲で実行可能であるため、上記のような複雑な試料の分析における有用な手法である。しかしながら、可視光を用いた分光測定法が先行的に発展してきたために、可視光に対して敏感な試料への分光測定の応用が立ち遅れることとなった。本研究課題では、可視光に敏感な試料について、その構造・物性・機能を高い感度で非破壊的に計測し、分子レベルで理解するにはどうすればよいかを、学術的な問いに設定した。

(2) 試料によって光が散乱されるとき、光の波長がごくわずかな確率で元の波長から変化する(ラマン散乱)。この波長変化は、散乱の際に光のエネルギーの一部が試料中の分子に移る、あるいは試料中の分子のエネルギーが光のエネルギーに加増されることによって起こる。分子のとりうるエネルギーは分子の構造によって決まるため、ラマン散乱の波長特性(ラマンスペクトル)を計測すれば、試料中の分子の構造情報が豊富に得られる。ゆえに、ラマン分光法は本研究課題の学術的な問いに答えるための分析法のひとつになりうる。

(3) 試料分子が可視光(およそ 400~800 nm)に対して敏感な応答を示す場合、ラマン分光による試料の分析はきわめて困難であった。ラマン分光測定では微弱なラマン散乱光を測定する必要があり、十分な散乱信号強度を得るために照射する光の強度を十分に高くせざるを得ず、可視光に敏感な試料を損傷させやすい。また、試料が可視光に応答して発光を示す場合、ラマン散乱の測定は容易に妨害される。

(4) これらの問題は、1  $\mu\text{m}$  を超える波長の近赤外光を用いたラマン分光測定(近赤外ラマン分光)を行うことができれば回避されうると知られていた。しかし、近赤外ラマン分光の感度は可視光を用いたラマン分光に比べて大きく劣り、一般的な分析手法となるまでに至っていない。その理由の第一は、ラマン散乱が起こる確率がおおよそ散乱光の波長の 4 乗に反比例することにある。近赤外ラマン分光で観測される散乱光の波長は可視ラマン分光における散乱光波長のおおよそ 2 倍であるから、その強度は可視ラマン分光の場合の約 1/16 となる。理由の第二は、近赤外光検出器の感度が未だきわめて低いことにある。現在最高の性能を持つ近赤外光検出器を用いても、その感度は Si を用いた一般的な可視光検出器のおおよそ 10% に満たない [1]。全体として、近赤外ラマン分光の感度は可視ラマン分光に比べて 2 桁~3 桁程度低くなり、よほど高濃度で、かつ強いラマン散乱を起こす分子でなければラマンスペクトルを観測できない。

(5) 近赤外ラマン分光の感度の問題を克服する方法がこれまでにいくつか報告されている。その第一は、非線形ラマン散乱を観測する方法である [2, 3]。この方法では、ラマン散乱光と同じ波長を持つ光を同時に試料に照射してラマン散乱を誘起する。得られるスペクトルは誘起の方法によって異なるが、いずれの場合も通常のラマン散乱(自発ラマン散乱)と同じ構造情報を与える。第二は、ラマン散乱の共鳴効果を用いる方法である。試料に照射する光のエネルギーが試料分子の電子遷移のエネルギーと一致する場合、ラマン散乱の強度が顕著に増大する。

研究代表者らはこれまでに非線形ラマン分光と共鳴ラマン効果を組み合わせた近赤外分光計の開発を進めてきた。この分光計を用いて、可視光に敏感な試料の電子励起状態や電荷移動状態などのラマンスペクトルを測定し、その構造とダイナミクスを観測して明らかにしてきた [4, 5]。

(6) 近赤外ラマン分光の感度の問題を克服する方法の第三は、金属微粒子に発生する表面プラズモンを利用してラマン散乱の確率を増大させる方法(表面増強ラマン分光法)である [6, 7]。表面プラズモンに由来する金属微粒子の光吸収の波長と、照射光あるいはラマン散乱の波長とが互いに近接しているとき、ラマン散乱の強度が顕著に増大する。しかし、本手法を用いても、波長 1  $\mu\text{m}$  を超える波長領域でラマン信号を得るには高強度の光を試料に照射する必要がある [7]。本研究課題では、これまで取り組んできた近赤外非線形ラマン分光に表面増強ラマン効果を組み合わせ、可視光に敏感な試料の構造を高い感度で分析可能にする研究を着想した。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究課題は、研究代表者がこれまでに開発してきた近赤外非線形ラマン分光計 [4, 5] に表面増強ラマン効果 [6, 7] を組み合わせた表面増強近赤外マルチプレックス非線形ラマン分光計を開発し、波長 > 1  $\mu\text{m}$  の光を用いる近赤外ラマン分光の超高感度化を達成することを第一の目的とした。

(2) 製作した分光計を用いて、手始めに光合成タンパク質複合体の構造の動的変化と光合成機

能との相関を明らかにすることを本研究課題の第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) サブナノ秒パルスレーザー（波長 1064 nm, パルス幅 1 ns, 平均出力 190 mW, 繰り返し周波数 19 kHz）を光源とする近赤外マルチプレックス非線形ラマン分光計を製作した。数種類の有機溶媒について非線形ラマンスペクトルの試験計測を行った。

(2) 表面増強近赤外自発ラマン分光に関する既報を出発条件とし、複数の方法で金ナノ粒子を作製した。粒子の形状は球状またはロッド状とした。作成した粒子の形状を透過型電子顕微鏡で記録した後、4,4'-ビピリジルを試料として、自発ラマン散乱および非線形ラマン散乱の表面増強効果を評価した。

(3) 光化学系 II タンパク質複合体を含む汁液をコマツナから採取し、通常の近赤外非線形ラマンスペクトルおよび表面増強近赤外非線形ラマンスペクトルを計測して、得られたバンドの帰属を行った。

### 4. 研究成果

(1) 図 1 の近赤外非線形ラマン分光計を製作した。サブナノ秒パルスレーザーの出力を 2 つに分け、一方をそのままラマン励起光（周波数:  $\omega_1$ ）として用いた。もう一方をフォトニック結晶ファイバーで広帯域白色光（1100 ~ 1600 nm）に変換し、プローブ光（周波数:  $\omega_2$ ）として用いた。これらに対物レンズ（20 倍, NA: 0.4）で試料に集光して非線形ラマン散乱を発生させ、分光器およびマルチチャンネル光検出器を用いて検出した。

非線形ラマン散乱は、ラマン励起光とプローブ光の周波数差  $\omega_1 - \omega_2$  が分子振動の振動数  $\omega_M$  に一致する場合のみ発生する。まず、本装置を用いて、非線形ラマン散乱のひとつである誘導ラマン散乱の検出を試みた。誘導ラマン散乱では、プローブ光のうち条件  $\omega_M = \omega_1 - \omega_2$  を満たす周波数成分の強度が増大する。ラマン散乱確率が高いトルエンを試料とし、近赤外領域において高い感度を持つ InGaAs 検出器を用いて誘導ラマン散乱の検出を試みたが、検出器の雑音を有意に上回る誘導ラマン散乱信号は観測されなかった。

次に、別の非線形ラマン散乱現象である、コヒーレントアンチストークスラマン散乱（CARS）の検出を試みた。CARS の場合、 $\omega_M = \omega_1 - \omega_2$  が満足される条件において、新たに周波数  $2\omega_1 - \omega_2$  の光が発生する。本装置に CCD 検出器を取り付けてトルエン、シクロヘキサン、アセトン、エタノールの CARS スペクトル測定を試みたところ、いずれの溶媒についても露光時間 1 s 以内で良好な信号雑音比のスペクトルが観測された（図 2）。以上から、本装置による誘導ラマン散乱の検出は困難であり、CARS の検出は可能と分かった。

(2) 文献 7, 8 の方法にしたがって球状金ナノ粒子を、文献 7, 9 の方法にしたがってロッド状金ナノ粒子をそれぞれ作製した。作製したロッド状金ナノ粒子を透過型電子顕微鏡で観察し、平均ロッド長 56 nm のロッド状金ナノ粒子の生成を確認した（図 3）。

これらの金ナノ粒子の紫外・可視吸収スペクトルを図 4 に示す。球状金ナノ粒子では波長 520 nm に、ロッド状金ナノ粒子では波長 505 nm および 800 nm に、表面プラズモン共鳴に由来する吸収極大が観測された。文献 7-9 で報告された作製条件を変えながら金ナノ粒子を作製したが、吸収極大波長を大きく長波長シフトさせることはできなかった。そこで、文献の作製条件を最適条件として金ナノ粒子を作製することとし、非線形ラマン散乱の増強効果の観測を試みた。

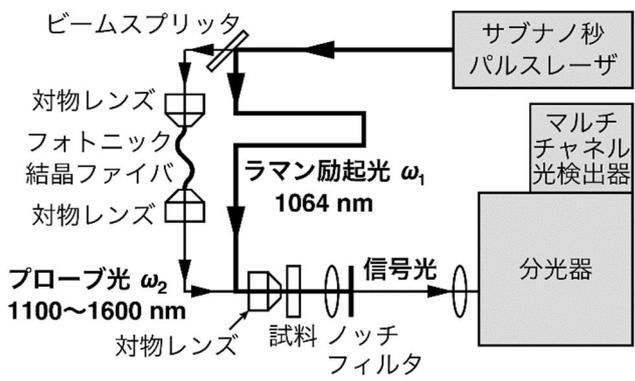


図 1 本研究で製作した近赤外非線形ラマン分光計のブロック図。

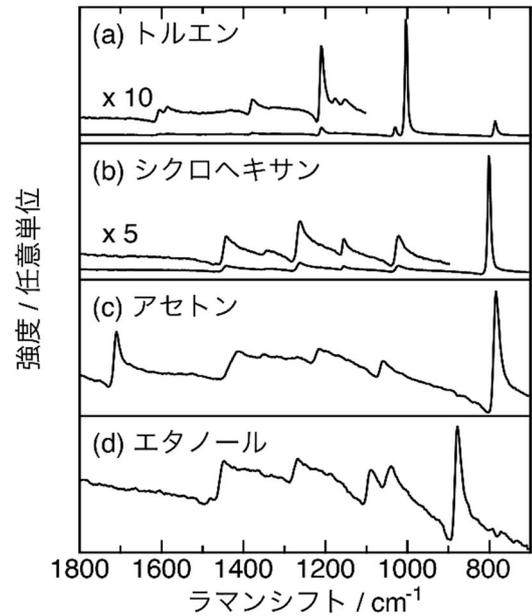


図 2 近赤外非線形ラマン分光計を用いて測定した、有機溶媒の CARS スペクトル。(a) トルエン（露光時間 100 ms）、(b) シクロヘキサン（露光時間 300 ms）、(c) アセトン（露光時間 1 s）、(d) エタノール（露光時間 1 s）。

(3) 金ナノ粒子に 4,4'-ピピリジルを結合させると、波長 785 nm のレーザーの照射によって 4,4'-ピピリジルのきわめて強い表面増強ラマン散乱が観測されることが報告されている [10]. 本研究で作製した球状およびロッド状の金ナノ粒子に 4,4'-ピピリジル水溶液を 0.1 ~ 5 mmol/L となるよう加え、表面増強 CARS スペクトルの測定を試みた。波長 1064 nm のレーザーをラマン励起光として CARS スペクトルを測定した場合、波長 910 nm 付近、935 nm 付近、および 960 nm 付近に 4,4'-ピピリジルの振動バンドが観測されると期待される。これらの波長はロッド状金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴波長に十分近いにも関わらず、4,4'-ピピリジルに由来する CARS 信号はいずれの金ナノ粒子においても、いずれの 4,4'-ピピリジル濃度においても観測されなかった。また、同じ試料について波長 1064 nm 励起の自発ラマンスペクトルの測定を試みたが、4,4'-ピピリジルの信号は得られなかった。

信号が観測されなかった原因を金ナノ粒子の構造別に分析すると、球状金ナノ粒子の場合はラマン励起光および信号光の波長が金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴波長から大きく離れているために増強効果がきわめて小さくなり、増強信号の観測に至らなかったと考えられる。一方、ロッド状金ナノ粒子の場合、作製時に界面活性剤を添加して金ナノ粒子の形状を制御するため、金ナノ粒子表面に界面活性剤が吸着する。この界面活性剤が 4,4'-ピピリジルの金ナノ粒子への吸着を阻害した可能性が考えられる。

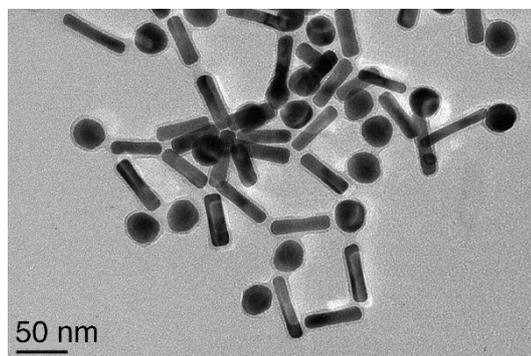


図3 本研究で作製したロッド状金ナノ粒子の透過型電子顕微鏡像。

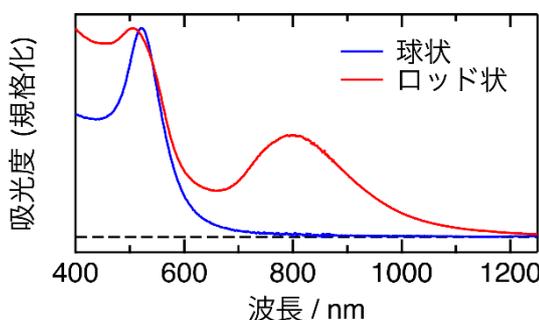


図4 球状金ナノ粒子およびロッド状金ナノ粒子の可視・近赤外吸収スペクトル。

(4) 光化学系 II 複合体の近赤外非線形ラマン分光計測の予備実験として、コマツナの本葉から採取した汁液を試料として近赤外 CARS スペクトルを測定した。得られたスペクトルについて、波数  $1050\text{ cm}^{-1}$  付近に分散形の信号が観測された(図5)。この信号は硝酸ナトリウム水溶液の信号と同じ位置に、同じ形状で現れたため、これを硝酸イオンの対称伸縮振動に帰属した。植物の本葉に含まれる硝酸イオンの濃度を計測する方法として、これまでに植物本葉の可視・近赤外吸収スペクトルと硝酸イオン濃度の真値を用いた統計的機械学習による推定法が研究されてきた。しかし、硝酸イオンは可視・近赤外領域に強い吸収帯を持たないため、当該推定法では植物中のクロロフィル等の色素濃度から間接的に硝酸イオン濃度を推定することとなる。ゆえに、植物の品種や栽培環境等が異なれば、そのたびに統計的機械学習をやり直さなければ硝酸イオンの精確な推定値を得られない。本研究の手法を用いると硝酸イオンの分光信号を直接計測できるため、品種や栽培環境等によらない植物中硝酸イオン濃度の非破壊計測が可能になると期待される。

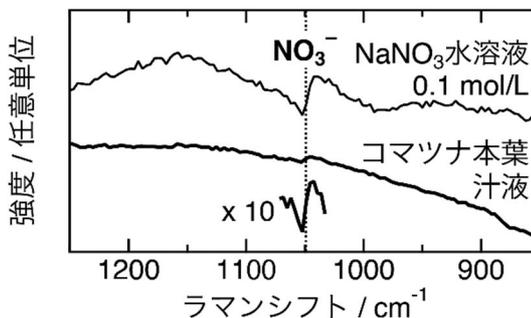


図5 コマツナ本葉から採取した汁液の近赤外 CARS スペクトル(a)および硝酸ナトリウム水溶液の近赤外 CARS スペクトル(b)。

(5) 本研究の目的である近赤外非線形ラマン分光計の超高感度化には多くの課題を残す結果となったが、近赤外非線形ラマン分光を植物中肥料成分濃度の非破壊分析に応用する新しい研究への糸口が見いだされた。今後は、近赤外領域において強い表面増強効果を得るためのナノ粒子作製について、使用する金属あるいは化合物から見直して再検討するとともに、近赤外非線形ラマン分光計による植物の非破壊分析について研究を進める。

< 謝辞 >

可視・近赤外分光光度計による金ナノ粒子の吸収スペクトル測定にあたり、富山県産業技術開発センターの升方康智氏に機器の使用についてご指導いただいた。透過型電子顕微鏡による金ナノ粒子の観察にあたり、富山県産業技術開発センターの山岸英樹氏に試料調製および機器の使用についてご指導いただいた。この場を借りて感謝申し上げます。

<引用文献>

M. Ando, M. Sugiura, H. Hayashi, and H. Hamaguchi, 1064 nm Deep near-infrared (NIR) excited Raman microspectroscopy for studying photolabile organisms, *Appl. Spectrosc.*, Vol. 65, No. 5, 2011, pp. 488–492.

H. Kano and H. Hamaguchi, Femtosecond coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy using supercontinuum generated from a photonic crystal fiber, *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 85, No. 19, 2004, pp. 4298–4300.

M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H. Hamaguchi, Ultrabroadband ( $>2000\text{ cm}^{-1}$ ) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy using a subnanosecond supercontinuum light source, *Opt. Lett.*, Vol. 32, No. 20, 2007, pp. 3050–3052.

T. Takaya and K. Iwata, Relaxation mechanism of  $\beta$ -carotene from  $S_2$  ( $1B_u^+$ ) state to  $S_1$  ( $2A_g^-$ ) state: Femtosecond time-resolved near-IR absorption and stimulated Raman studies in 900–1550 nm region, *J. Phys. Chem. A*, Vol. 118, No. 23, 2014, pp. 4071–4078.

T. Takaya and K. Iwata, Development of a femtosecond time-resolved near-IR multiplex stimulated Raman spectrometer in resonance with transitions in the 900–1550 nm region, *Analyst*, Vol. 141, No. 14, 2016, pp. 4283–4292.

瀧口宏夫・岩田耕一 編著, 「分光法シリーズ 1 ラマン分光法」, 講談社, 2015, p. 23.

B. Moll, T. Tichelkamp, S. Wegner, B. Francis, T. J. J. Müller, and C. Janiak, Near-infrared (NIR) surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) study of novel functional phenothiazines for potential use in dye sensitized solar cells (DSSC), *RSC Adv.*, Vol. 9, No. 64, 2019, pp. 37365–37375.

S. Becht, S. Ernst, R. Bappert, and C. Feldmann, Nanomaterialien zum Anfassen. Do-it-yourself!, *Chem. Unserer Zeit*, Vol. 44, No. 1, 2010, pp. 14–23.

A. Liopo, S. Wang, P. J. Derry, A. A. Oraevsky, and E. R. Zubarev, Seedless synthesis of gold nanorods using dopamine as a reducing agent, *RSC Adv.*, Vol. 5, No. 111, 2015, pp. 91587–91593.

T. C. Strekas and P. S. Diamandopoulos, Surface-enhanced Raman spectroscopy of bipyridines and phenylpyridines, *J. Phys. Chem.*, Vol. 94, No. 5, 1990, pp. 1986–1991.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomohisa Takaya, Masanori Shinohara, Koichi Iwata	4. 巻 802
2. 論文標題 Torsional relaxation dynamics of vinylene groups in photoexcited MEH-PPV as studied by time-resolved resonance stimulated Raman spectroscopy in the 900-1500 nm region	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 139779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cplett.2022.139779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomohisa Takaya, Koichi Iwata	4. 巻 127
2. 論文標題 Conformational Relaxation Dynamics of Poly(3-hexylthiophene) Photoexcited in Solution as Studied by Femtosecond Time-Resolved Stimulated Raman Spectroscopy in 1190-1550 nm Region	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7542 ~ 7552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.3c02118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohisa Takaya
2. 発表標題 Structural dynamics of conjugated polymers studied by femtosecond time-resolved near-infrared stimulated Raman spectroscopy
3. 学会等名 The 8th Asian Spectroscopy Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------