

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550178

研究課題名(和文) 高含水バイオマス変換プロセスにおけるダブルビームレーザーラマン定量技術の開発

研究課題名(英文) Development of quantitative analysis method for biomass conversion technology by double beam laser Raman spectroscopy

研究代表者

沼田 靖 (NUMATA, Yasushi)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：10218266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン分光による定量分析法をもっと簡単に行うための装置の開発を行った。これまでの研究で基準試料に対する試料のラマン強度比は一定になることが見いだされている。しかし、この方法では基準物質を測定する必要があるため、基準物質を用いない定量法を開発を行った。レーザーを分波してパワーを測定することによりレーザーパワーに対する試料のラマン強度比(RI)を測定することで定量を行った。この方法をダブルビームレーザーラマン定量法と名付けた。この方法では濃度が一定の試料のラマンスペクトルを測定するとレーザーパワーが変化してもRIが一定になることがわかった。また、RIは試料濃度に対し非常に良い直線性が得られた。

研究成果の概要(英文)：New measurement methods were established to develop simple quantitative analysis methods using Raman spectroscopy. The Raman intensity ratio of the sample to the standard was found to be constant even when the laser power was changed. "Double laser Raman spectroscopy" was developed as a quantitative analysis method without a standard. The light-source laser beam was separated into two parts by a beam splitter. One part was used for monitoring the laser power and the other was used as excitation light for measuring the Raman spectrum. The Raman spectrum was measured while monitoring the laser power. The Raman intensity was corrected by dividing it by the monitored laser power. The ratio between the Raman intensity and the monitored laser power was constant even if the laser power was changed. This result shows that Raman intensity can be corrected by the monitored laser power. The relationship between the Raman intensity ratio and the concentration shows good linearity in this method.

研究分野：分光分析

キーワード：ラマン分光法 定量分析法

1. 研究開始当初の背景

ラマン分光法は分子の振動準位を測定することが可能であり、定量分析というよりも主に分子構造の知見を得ることに使われてきた。もし、この分光法が定量分析に適応できればさまざまな利点がある。

分子にレーザーのような強い光を照射すると分子は仮想的な状態に励起され、散乱が起こる。この散乱には二つのタイプの散乱光がある。一つは入射レーザー光と同じエネルギーをもつレイリー散乱であり、その低エネルギー側に現れる強度の弱い散乱光をラマン散乱という。これはちょうど分子の振動準位に相当するところにピークが現れる。レイリー散乱からラマン散乱までのエネルギー差（一般的に波数、 cm^{-1} の単位で表すことが多い）が基底電子状態の振動準位となる。

N 個の原子からなる分子の振動の自由度は $3N-6$ （直線分子では $3N-5$ ）となるので、ほとんどの分子でピークが現れる。IR スペクトルも振動状態間の遷移であるので、同じ情報が得られるが、選択則のため IR スペクトルには水素のような二原子分子は測定できない。しかし、ラマンスペクトルはそれら分子も測定可能である。

次の利点としては IR では水のピークが非常に大きく現れるがラマンスペクトルにはそのピークがあまり大きく現れないので、水溶液中の分子の定量も可能な点である。

また、分解能が良いので多成分系の定量にも利用可能である。

しかしながら、このような利点があるにも関わらず、ラマン分光法はこれまで定量分析にはあまり使われてこなかった。なぜなら、ラマン分光法は散乱現象を利用しているため、その散乱強度がレーザーパワーに大きく依存するからである。近年、レーザーパワーの影響を排除するために標準物質とのラマン強度比を用いる方法が行われるようになってきた。以前、我々の研究においても溶媒を内部標準に用いてフィットケミカルであるケルセチンの定量を行ったり、あらかじめ測定した物質を外部標準に用いて、水-アルコール混合溶液の定量分析を行ったりしてきた。

そこで、もっと簡単にラマン分光法による定量分析を開発することが次の課題である。前述したが、ラマン分光法がこれまで定量分析にあまり利用されてこなかった原因は、ラマン強度が入射するレーザーパワーに大きく依存しているからである。その影響を取り除くため、標準物質と試料のラマン強度のラマン強度比を用いる方法を行っている。一例として、レーザーパワーに対するラマン強度と標準物質とのラマン強度比をプロットした図を図1に示す。この図が示すように、ラマン強度はレーザーパワーの増加に対して増加しているが、強度比はほぼ一定した値をとっている。

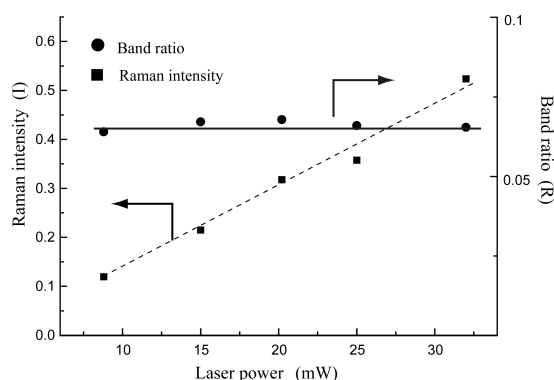


図1 Laser power Dependency of the Raman intensity and Raman ratio.

基準物質には溶媒のような内部標準を使ったり、外部標準物質を使ったりしている。しかし、水溶液では水を基準物質に用いることもできるが、水の振動バンドはブロードに現れるのでなかなかピーク高さを決めるのが難しい。また、外部標準では試料物質を測定する直前にあらかじめ基準物質を測定しておく必要があるため、測定回数が増えてしまうという欠点がある。

2. 研究の目的

現在考えているのは基準物質を必要としないラマン分光法による定量分析法の開発である。アイデアの一つは、レーザーパワーをモニターしながらラマンスペクトルを測定することによって、レーザーパワーの変動を補正する方法である。我々はこれを「ダブルビームレーザーラマン分光装置」と名付けた。通常の吸収スペクトルの測定の装置と同様に、励起光（レーザー光）を分波し、片方を試料に、もう片方をレーザーパワーモニターに用い、ラマン強度をレーザーパワーで規格化するという方法である。もし、補正された値がレーザーパワーに対して一定になれば、レーザーパワーの変動によるラマン強度を補正することができることを示している。この研究ではこの装置を立ち上げ、装置の健全性を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ダブルビームレーザーラマン分光装置の立ち上げ

ダブルビームレーザーラマン分光装置を立ち上げるため、自作のラマン分光装置を作成した。励起光源は 532 nm のダイオードレーザー (ELFORLIGHT G4 532 nm) を用いた。このレーザー光を石英ガラスで分波し、一方はレーザーパワーをモニターに用いた。レーザーパワーは OPHIR PD300 のパワーメータで測定した。分波した光の他方を試料に照射した。散乱光はノッチフィルターでレイリー散乱を除去した後、分光器 (SOL instrument MS 3504i) に導き、CCD 検出器 (Andor iDus DV420A) で検出した。図2に実際作成した Raman 分光装置を示す。

(2) ラマン強度解析

濃度一定の試料(メタノール)のラマンスペクトルを種々のレーザーパワーで測定を行った。レーザーパワーはNDフィルターで変化させた。レーザーパワーに対するラマン強度を計算した(式1)。

$$R_l = \frac{\text{Raman intensity}}{\text{Laser Power}} \quad (1)$$

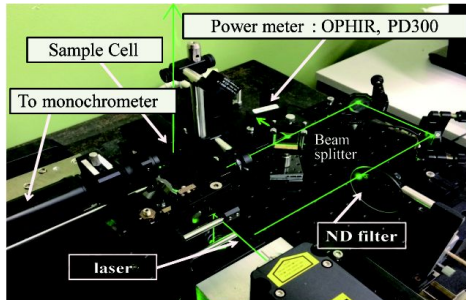


図2 Photograph of the double beam laser Raman spectroscopy.

(3) アラニンの検量線作成

同様の方法を用いて実試料の測定を行った。測定試料には今回アラニン水溶液を用いた。0.40 M から 0.02 M の濃度に調整し、ラマンスペクトルを測定した。

仕込み濃度に対する R_l をプロットし、検量線の作製を行った。

4. 研究成果

(1) ダブルビームレーザーラマン分光装置によるスペクトル測定

図3に種々のレーザーパワーで測定したメタノールのラマンスペクトルを示す。

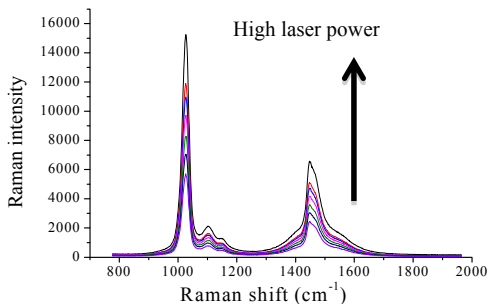


図3 Dependence of Raman spectra of methanol on the different laser powers.

このスペクトルにはふたつの特徴的なピークが現れている。それらは 1032 cm^{-1} と 1450 cm^{-1} であり、それぞれ伸縮振動と変角振動に帰属される。いずれのピークもレーザーパワーが大きくなるにつれてラマン強度も高まっていることが分かる。そこで、レーザーパワーに対する 1032 cm^{-1} のラマン強度比を計算した。図4にレーザーパワーに対するラマン強度とラマン強度比 (R_l) をプロットする。

レーザーパワーの増加に対して、ラマン強

度は単調に増加しているが、レーザーパワーに対するラマン強度比 (R_l) は一定の値をとっていることが分かる。この結果より、レーザーパワーを測ることにより、励起光強度の変動が補正されることが分かった。

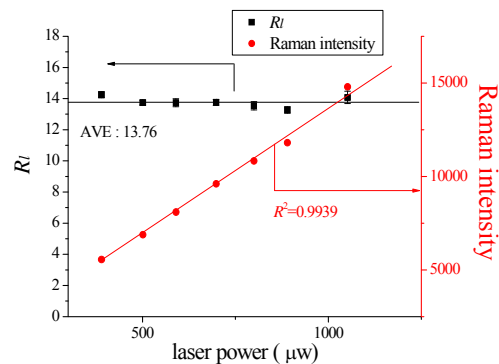


図4 Laser power dependency of Raman intensity and Raman intensity ratio.

(2) ダブルビームレーザーラマン分光装置を用いた検量線作成

次にこの方法を用いて、水溶液中の試料の定量分析が可能かどうかの実験を行った。今回は試料にアラニンを用いた。

種々の濃度のアラニン水溶液のラマンスペクトルを測定した。図5に種々の濃度のアラニン水溶液のラマンスペクトルを示す。

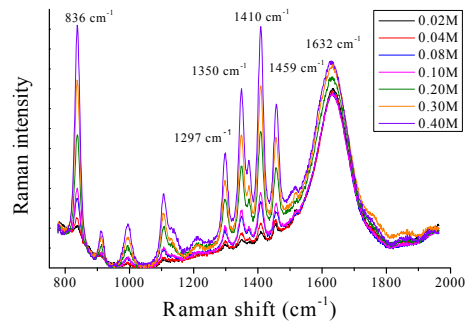


図5 Raman spectra of alanine.

アラニンに帰属されるシャープなピークの外に 1600 cm^{-1} 付近にブロードなバンドが観測された。このブロードなバンドは水の変角振動によるバンドと帰属される。溶質の濃度が変わっても溶媒として用いている水の濃度はほとんど影響がないため、水のバンド強度はほぼ一定に現れている。そこで、従来行っていた溶媒のラマン強度に対する試料のラマン強度比と今回提案しているレーザーパワーに対する試料のラマン強度比から得られる結果を比較した。図6にアラニンの濃度に対するふたつの方法で得られた検量線を示す。

赤丸で示した結果が溶媒のラマン強度に対する試料のラマン強度比であり、黒丸で示した結果がレーザーパワーで補正した試料のラマン強度比 R_l である。いずれの場合も、濃度に対して良い直線関係 (R^2 値は 0.999) 以

上)が得られた。この結果は、ラマン強度をレーザーパワーで除することによって励起光のパワーの変動を補正することができることを示している。

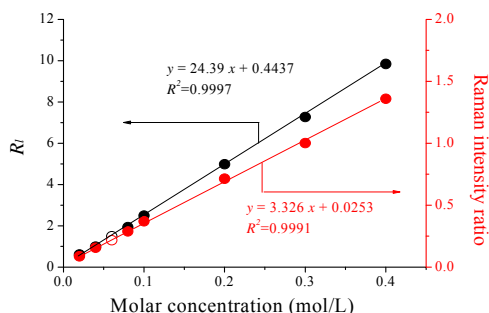


図6 Calibration curves of Alanine obtained by the double beam laser Raman spectroscopy and the conventionally used method.

この検量線の再現性を確認するために、濃度既知の試料のラマンスペクトルをレーザーパワーをモニターしながら測定した。そのスペクトルから R_f を算出したところ、検量線に良く乗っていた。図5中の白抜きデータで示している。これはこの方法の再現性が良いことを示している。この値から求めた濃度は仕込み質量から求めた値とほぼ一致していたので、レーザーパワーをモニターすることでラマン強度を補正できることが分かった。また、確認のため同じ試料で水のラマン強度に対する試料のラマン強度比も検量線に乗っており、得られた濃度も R_f から求められたものと一致していた。

(3) 総括

このダブルビームレーザーラマン分光法により基準物質を必要としない新たな定量分析法を確立した。この方法を用いることにより、生体内やバイオガスのような基準となる物質が存在しない試料にもラマン分光法による定量分析の可能性を見いだせた。

<引用文献>

Y. Numata, H. Tanaka, Quantitative analysis of quercetin using Raman spectroscopy, *Food Chemistry*, 126, (2011) 751-755

Y. Numata, Y. Iida, H. Tanaka, Quantitative analysis of alcohol-water binary solutions using Raman spectroscopy, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiation Transfer*, 112 (2011) 1043-1049.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yasushi Numata, Yuta Shinohara, Tomoya Kitayama, Hiroyuki Tanaka, Rapid and accurate quantitative analysis of fermentation gases by Raman spectroscopy, *Process Biochemistry*, 48 (2013) 569-574.

doi:10.1016/j.procbio.2013.02.018

〔学会発表〕(計 46 件)

沼田 靖、進藤 嵩史、田中 裕之、ラマン分光法を用いた簡易定量分析法の開発、日本化学会春季年会、2015年3月26日、日本大学理工学部(千葉・船橋)

進藤 嵩史、沼田 靖、田中 裕之、ラマン分光法による固相アミノ酸の定量分析法の開発、新アミノ酸研究会第4回学術講演会、2014年11月17日、東京大学(東京・文京区)

月岡 聖也、進藤 嵩史、沼田 靖、田中 裕之、ラマン分光法によるシトルリンの定量分析法の開発、新アミノ酸研究会第4回学術講演会、2014年11月17日、東京大学(東京・文京区)

進藤 嵩史、沼田 靖、田中 裕之、ラマン分光法を用いた固体試料の簡易定量法の開発、日本分析化学会第63回年会2014年9月17日、広島大学(広島県・東広島市)

進藤 嵩史、沼田 靖、田中 裕之、ラマン分光法による固体試料の定量分析法の開発、第74回分析化学討論会、2014年5月25日、日本大学工学部(福島県・郡山市)

大塚 麻莉亜、沼田 靖、田中 裕之「ラマン分光法を用いたアミノ酸混合溶液の定量分析法の開発」第3回新アミノ酸分析研究会、2013年12月2日、東京大学(東京都・文京区)

大塚 麻莉亜、河澄 恭平、沼田 靖、山岸 賢治、田中 裕之「ラマン分光法による食品廃棄物中に含まれるタンパク質の定量分析法の開発」廃棄物資源循環学会、2013年11月3日、北海道大学(北海道・札幌市)

Maria Otsuka, Kyohei Kawasumi, Kenji Yamagishi, Yasushi Numata, Hiroyuki Tanaka “Development of method for quantitative analysis of amino acid with Raman spectroscopy.”, 平成25年度化学系学協会東北大会2013年9月30日、東北大学(宮城県・仙台)

大塚 麻莉亜、河澄 恭平、沼田 靖、山岸 賢治、田中 裕之「ラマン分光法を用いた2成分系アミノ酸混合溶液の定量分析法の開発」環境化学討論会、2013年8月1日、東京農工大(東京都・府中市)

大塚 麻莉亜、沼田 靖、田中 裕之「ラマン分光法による廃棄物中に含まれるアミノ酸の定量分析法の開発」廃棄物資源循環学会、2012年10月23日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

大塚 麻莉亜、沼田 靖、田中 裕之「ラマン分光法によるアミノ酸の定量分析法の開発」平成24年度化学系学協会東北大会、1P019、2012年9月15日、秋田大(秋田県・秋田市)

〔図書〕(計 1 件)

沼田 靖 他、技術情報協会、IR分析テクニ

ック事例集、2013年、第2部11章10節から
12節

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田 靖 (NUMATA Yasushi)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：10218266