

## トレインマッピング機能：不規則な表面をもつ銅パティナ（腐食層）のラマンイメージング測定

### はじめに

トレインマッピング機能とは、ラマンイメージング技術のひとつで、顕微鏡ステージのZ位置を調整し、サンプル表面に焦点を合わせながら、不規則または傾斜したサンプル表面のデータを収集する技術です。各測定点の表面スポットに対して、レーザーを集光させることで、レーザー出力密度が高くなり、分析スポットからのラマン散乱強度が向上します。測定中もサンプル上を移動しながら各ポイントのレーザーの焦点をしっかりと合わせることで、空間分解能とラマン強度を確保できます。

ラマンイメージングの利点は、サンプル領域全体の成分または構成要素の空間分布を可視化できることです。イメージング中の各測定スポットの焦点ぼけは、ラマン散乱光の強度の変化と、サンプルそのものに由来する強度の変化の区別を困難にするため、ラマンスペクトルの解釈を複雑化します。ラマン強度や空間分解能が著しく低下すると、ラマンスペクトルの品質や、スペクトルデータの同定能力にも影響します。

一般的に、表面が平らなサンプルは、サンプル間を移動しても焦点が維持されるため、ラマンイメージング測定に最も理想的といえます。しかし、平らな試料を作製することは常にできるわけではなく、実用的には平らな表面が得られない場合もあります。コーティングの場合だと、平らな表面を作ろうとすると表面が損傷したり、コーティングそのものが剥がれたりしてしまいます。よって、サンプルをそのまま非破壊で測定できるのが理想です。サンプルの前処理が可能な場合でも、顕微鏡的に平らな表面を作製するための前処理は、複雑で時間がかかりすぎるため実用的ではありません。そのため、粗い表面のサンプル、傾斜したサンプル、凹凸のあるサンプルを非破壊でイメージング測定できる手法が効果的であり、トレインマッピング機能はこれらの測定を実現します。

図1は医薬品錠剤の表面測定において、トレインマッピング機能の効果を示した例です。錠剤は湾曲しており、表面に文字が刻印されています。トレインマッピング機能により、レーザーの焦点はサンプル表面全体で維持されます。この効果は可視モザイク画像を比較するとよくわかります。レーザーの焦点を良好に保つことは、MCR（多変量カーブ分解）のラマンイメージング結果にも影響します。トレインマッピング機能を用いて測定されたラマンイメージング画像は、サンプル成分の識別がはるかに優れていることがわかります。トレインマッピング機能なしのラマンイメージング画像では、構成粒子があまり判別されず、一部の成分が完全に欠落しています。

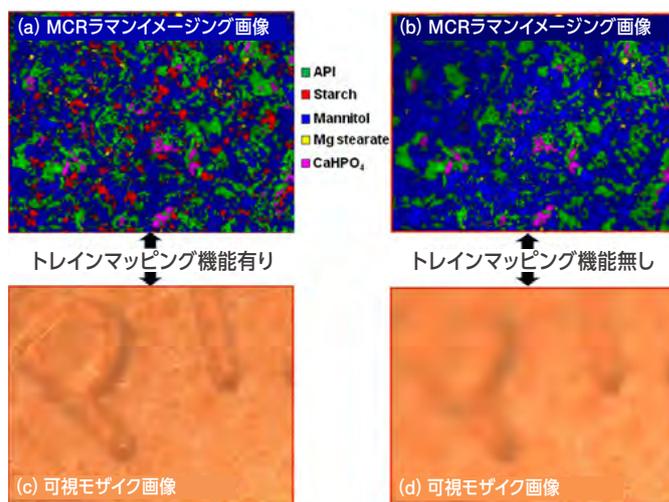


図1. トレインマッピングの有無による医薬品錠剤表面のラマンイメージング測定

a) トレインマッピングを使用して測定した多変量カーブ分解 (MCR) ラマンイメージング画像 b) トレインマッピングなしで測定したMCRラマンイメージング画像 c) トレインマッピングを使用した可視モザイク画像 d) トレインマッピングなしの可視モザイク画像

このアプリケーションノートでは、凹凸のある銅表面に形成された薄膜（パティナ）を分析するために、テレインマッピング機能をどのように利用できるかを紹介します。パティナは環境条件（空気、酸性雨、塩水など）により形成されますが、対象物に経年変化を与えたり、質感や色合いを出すために意図的に作られることもあります。銅のパティナは、露出した表面が酸化することによって形成されますが、形成される化合物の性質は、パティナの形成方法によって異なります。異なる銅の酸化物（ $\text{Cu}_2\text{O}$ と $\text{CuO}$ ）、水酸化物、炭酸塩、塩化物、硝酸塩、硫酸塩の存在によって、その形成メカニズムやパティナの発生源を知ることができます。

## 実験

この実験で使用するサンプルは、米国の1セント硬貨（ペニー）です（図2）。鑄造工程により、1セント硬貨の表面には数字と文字が浮き出ており、凹凸のある表面でテレインマッピング機能がどのように利用できるかを簡単に理解できる例といえます。現在の1セント硬貨は、内部の亜鉛に銅の層が重なっています。この実験では4枚のペニーを意図的に多様な条件にさらし、さまざまな種類のパティナを生成しました（表1）。これらのパティナは意図的に作られたものですが、自然界に存在するパティナと同様の成分が含まれています。



図2. 米国の1セント硬貨（ペニー）

Thermo Scientific™ DXR™3xiイメージング顕微ラマンを使用し、Thermo Scientific™ OMNICxiソフトウェアのテレインマッピング機能を用いて、ペニーの一部を画像化しました。励起レーザーは蛍光が少なく、ラマン強度が高い455 nmの波長を使用しました。

テレインマッピング測定のための最初のステップは、測定面内の最も低い点から最も高い点において、異なる焦点位置をもつサンプルの可視モザイク画像を収集することです。それぞれの焦点位置からの可視画像を合成して、テレインモザイク画像を作成します。これにより、全ての測定面内に対して正確な焦点位置をもつ合成の可視モザイク画像が完成します。そして、ラマンの測定時は各測定ポイントにおける焦点位置が採用されます。これにより、サンプル表面全体に焦点が合った状態でラマンスペクトルが収集できます。

即ち、焦点位置情報を保持することで、試料表面の可視の3Dイメージを表示することができ、さらに、その上にラマンイメージングデータを重ね合わせることができます。

## 結果

表1に、パティナを形成するために使用したサンプル処理条件と、テレインモザイク画像収集の条件を示します。焦点位置とは、ステージを最高点から最低点まで移動した垂直距離の合計で、対象領域内のサンプルの最高点と最低点に基づいています。インターバルは、ステージ位置が焦点範囲内を移動する際の間隔を示します。このインターバルは使用する対物レンズの被写界深度に基づいています。

表1. サンプル処理条件とテレインモザイク収集条件の詳細

| ペニー | サンプル処理条件                 | 焦点位置 (μm) | インターバル (μm) | 対物レンズ | 図番号 |
|-----|--------------------------|-----------|-------------|-------|-----|
| 1   | ソフト加熱 (150 °C, 30 min)   | 150       | 3           | 20倍   | 3   |
| 2   | 250 °Cまで加熱               | 95        | 0.7         | 50倍   | 6   |
| 3   | アンモニア蒸気への暴露 (室温)         | 74        | 0.7         | 50倍   | 8   |
| 4   | $\text{CO}_2$ への暴露 (空气中) | 31        | 3           | 20倍   | 10  |

表2に、ラマンイメージング測定に使用したパラメーターと同定された成分の詳細を示します。ステップサイズは、サンプル表面における水平方向の移動間隔であり、使用する目的と分析領域のサイズに基づいて設定しました。スペクトルデータから生成されたラマンイメージング画像は、図中のテレインモザイクの3D画像の上に重ねました。

表2. ラマンイメージング測定条件と同定された成分

| ペニー | 測定面 (μm)    | ステップサイズ (μm) | スペクトル数 | 成分   | 図番号 |
|-----|-------------|--------------|--------|--|-----|
| 1   | 3475 × 1535 | 10           | 53592  | $\text{Cu}_2\text{O}$                                | 4   |
| 2   | 940 × 630   | 5            | 24003  | $\text{Cu}_2\text{O}$ , $\text{CuO}$                 | 7   |
| 3   | 930 × 1040  | 5            | 39083  | $\text{Cu}_2\text{O}$ , $\text{Cu}(\text{OH})_2$     | 9   |
| 4   | 1515 × 1580 | 10           | 24168  | $\text{Cu}_2\text{O}$ , $\text{CuCO}_3(\text{OH})_2$ | 11  |

ペニー1は、表面の色調にわずかな変化が観察されるまで穏やかに加熱されました。図3は、このペニーの数字（ペニーが製造された年）が浮き上がり、表面がわずかに傾いていることがわかります。図中 (b) のz軸は、試料の凹凸をより明確に示すために拡大しました。

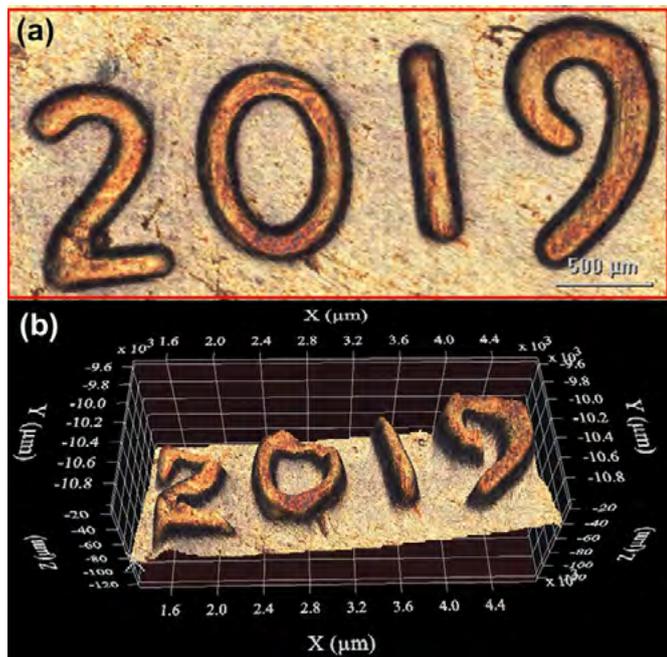


図3. ペニー1の可視テレインモザイク画像  
a) 2D画像 b) z軸を拡大した3D画像

図4に示すラマンイメージング画像は、 $\text{Cu}_2\text{O}$ に関連する $645\text{ cm}^{-1}$ のピーク面積強度から作成しました。このピークはサンプル表面全体にわたって検出されましたが、強度はさまざまで、図中の濃い青色の部分、薄い青色や白色の部分に比べて、数字の上部に高い濃度があることを示しています。銅そのものにはラマン活性がないため、酸化物の薄いコーティングが表面全体に存在していることを表しています。

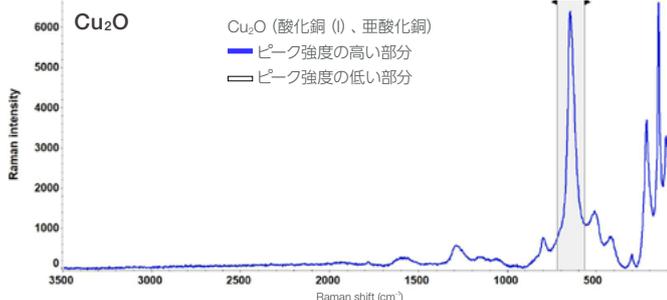
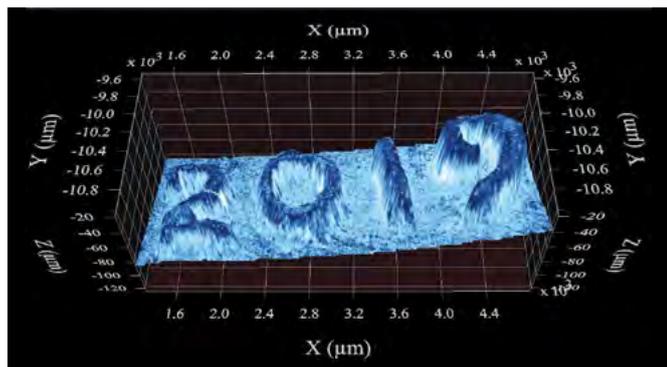


図4.  $645\text{ cm}^{-1}$ の $\text{Cu}_2\text{O}$ ピークに基づくペニー1のラマンピーク面積強度イメージ

図5は、テレインマッピング機能の利点を示しています。単一焦点を用いた可視モザイク画像（図5B1~3）とラマンイメージング画像（図5B4）は、テレインマッピング機能の結果（図5A1~4）よりも著しく悪化しています。ラマンピークの強度が低下するのみならず、視覚的な詳細も失われています。図3および4で観察された試料の凹凸は、視覚的な可視テレインモザイク画像とラマンイメージング画像の両方に明らかに影響していることがわかります。図5の画像は、20倍の対物レンズを使用して収集されました。高倍率のレンズを利用する場合、試料形状の影響はさらに顕著になります。

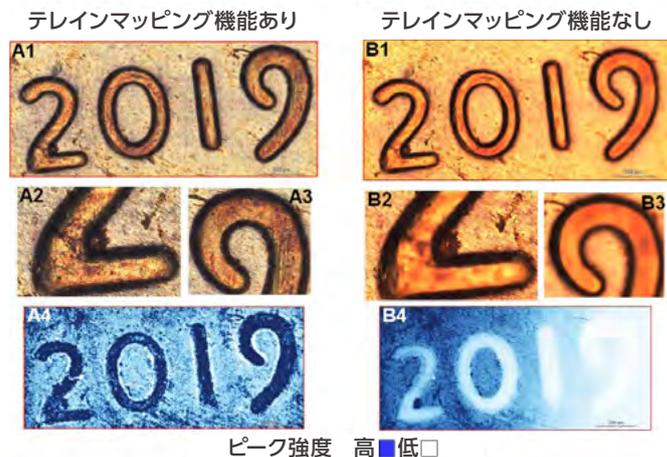


図5. テレインマッピング機能を用いて測定した結果 (A1~A4) と、テレインマッピング機能を用いずに単一焦点で測定した結果 (B1~B4) の比較  
A1~A3およびB1~B3は可視テレインモザイク画像。A4とB4は、 $645\text{ cm}^{-1}$ における $\text{Cu}_2\text{O}$ のピーク面積に基づくラマンイメージング画像であり、濃い青色はピーク強度が高く、白色はピーク強度が低いことを示す。

$\text{Cu}_2\text{O}$ に加え、酸化銅 ( $\text{CuO}$ ) も銅の酸化による生成物です。ペニー2を高温で加熱すると、 $\text{CuO}$ の生成と一致する濃い変色が生じました。図6は、ペニー2の「liberty」の「L」の文字の可視テレインモザイク画像です。この試料のラマン分析結果でも、 $\text{Cu}_2\text{O}$ と $\text{CuO}$ の両方が存在することが確認されました（図6）。

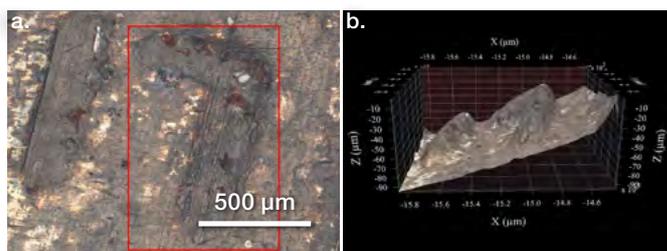


図6. ペニー2の可視テレインモザイク画像  
a) 2D画像 b) z軸を拡大した3D画像

図7に示すラマンイメージング画像は、ラマンスペクトルの多変量カーブ分解 (MCR) 解析から作成されました。カーボンのスポットもいくつか観察され、ペニー上の有機物が熱処理中に分解したものと考えられます。

銅や青銅の表面が塩基性溶液にさらされると、青色の水酸化銅(II) ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) が形成されることがあります。水酸化銅は両性の性質をもつため、いくつかの水溶液に溶解します。ペニー3はアンモニアを含んだ水蒸気に暴露され、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$  を含むパティナを生成しました。

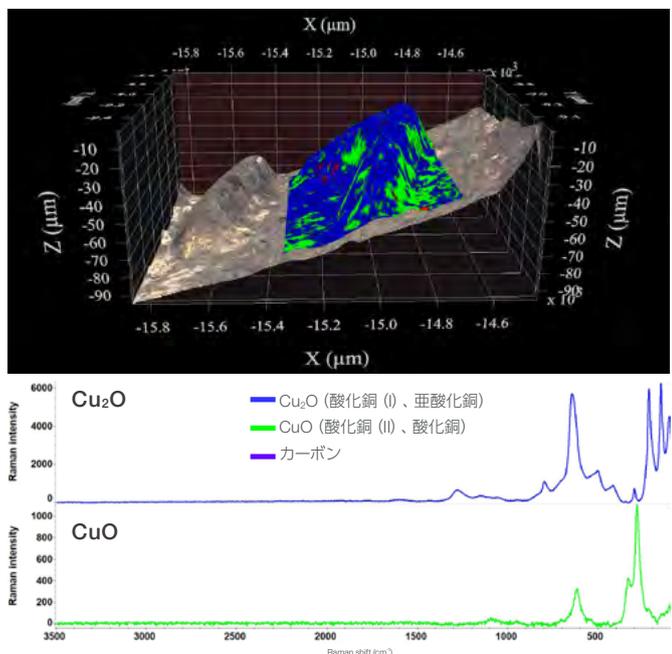


図7.  $\text{Cu}_2\text{O}$ を青で、 $\text{CuO}$ を緑で示したペニー2のMCRラマンイメージング画像

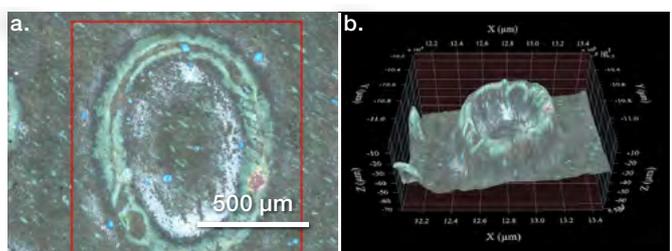


図8. ペニー3の可視レインモザイク画像  
a) 2D画像 b) z軸を拡大した3D画像

ラマン分析の結果、銅の表面に $\text{Cu}(\text{OH})_2$ が存在することが確認されました。図9のMCRラマンイメージング画像では、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ は水色部分に集中し、 $\text{Cu}_2\text{O}$ はオレンジ色の部分に存在し、紫色の部分は両方の成分の混合を示しています。

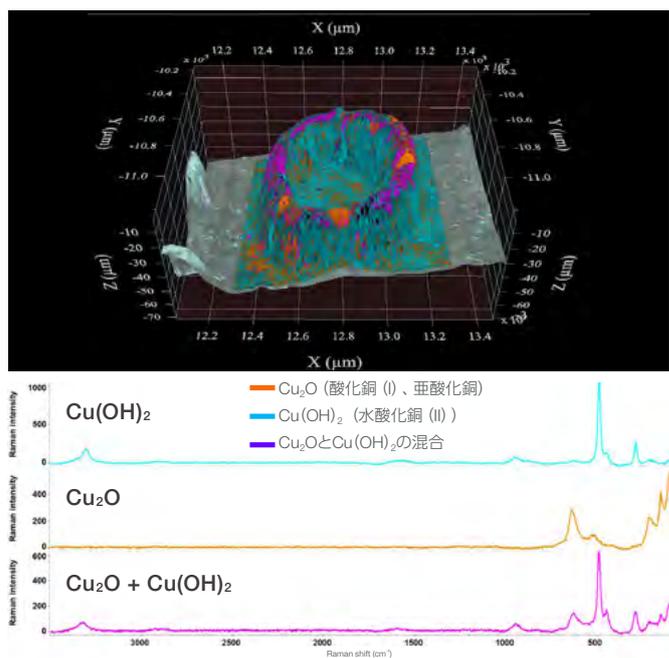


図9.  $\text{Cu}_2\text{O}$ をオレンジ色、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ をシアン色で示したペニー3のMCRラマンイメージング画像  
それぞれの混合物は紫色で示されている

水酸化銅は銅のパティナの成分として見られることがあります。特にパティナがゆっくりと時間をかけて形成される場合に現れやすくなります。空気中の二酸化炭素は、炭酸塩を含む水酸化銅を形成します。こうした反応の例として、マラカイト ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ) やアズライト ( $\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$ ) といった鉱物の形成が挙げられます。図10は、ペニー4に浮き彫りにされた「A」の文字の可視レインモザイク画像で、MCRラマンイメージング画像は図11に示しました。 $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ が文字「A」の底面の周囲に検出されました。一方で、主に $\text{Cu}_2\text{O}$ が文字の上部に検出されました。また、ある種のアゾ染料または顔料と思われる小さな斑点 (画像の緑色の部分) がいくつか確認されました。これは本実験で予想していた結果ではありませんでしたが、この染料や顔料がペニーの表面に存在したことは興味深い結果といえます。

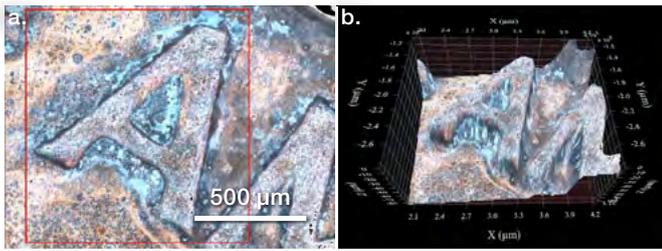


図10. ペニー4の可視レインモザイク画像  
a) 2D画像 b) z軸を拡大した3D画像

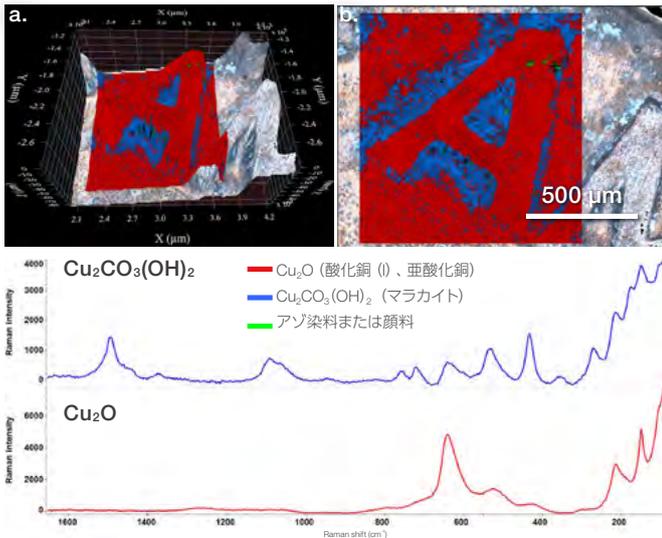


図11. ペニー4のMCRラマンイメージング画像  
Cu<sub>2</sub>Oを赤、Cu<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(OH)<sub>2</sub>を青で示す a) 3Dレインモザイク画像に重ねたラマンイメージング画像 b) 2Dモザイクに重ねたラマンイメージング画像

### まとめ

さまざまな理由から、イメージングラマン測定のために試料表面を平らにすることは、たとえ実現可能であっても、実用的ではない場合が少なからずあります。そのため、不規則な表面のラマンイメージング測定であっても、試料表面の焦点位置を維持することが重要です。それにより、ラマン強度が保たれ、空間分解能も維持されます。銅貨には製造時に形成された表面構造があるため、銅貨のパatinaの分析を通じてレインマッピング機能の性能を実証しました。本実験では、銅のパatinaは、多様な条件下での表面酸化によって生成されました。紹介したアイデアは、多くの材料のさまざまな薄膜の研究に応用できます。

レインマッピング機能の応用分野としては、美術品や文化遺産の研究、金属の腐食、不規則な表面上の薄膜などが挙げられますが、これらに限定されるものではなく幅広い用途でご使用いただけます。

詳細はこちらをご覧ください [thermofisher.com/raman](https://thermofisher.com/raman)

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。  
© 2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.  
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。  
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。  
標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://thermofisher.com/jp-tc) FTIR221-A23120B

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com