



空間分解能について 赤外顕微鏡の基本性能を理解する

はじめに

空間分解能は「間隔の狭い物体を区別する解像能力」と定義できますが、空間分解能の意味は、分野、状況、アプリケーションによって異なります。赤外顕微鏡においても、空間分解能はさまざまな方法で定義されています。各アプローチの詳細やメリットについては、このアプリケーションノート範囲を超えているため、ここではこれ以上触れませんが、実用的な観点から、空間分解能に関する最も重要な検討事項は、対象物をどのように測定するかではなく、目的とするアプリケーションに対して十分な測定方法かどうかだといえます。

赤外顕微鏡の空間分解能を考える上で、考慮すべき基本的な事項があります。第一に回折限界は通常、どの程度の空間分解能の下限値まで達成できるのかということです。

$$\text{回折限界} = \frac{0.63 (\text{波長})}{(\text{屈折率}) (\text{対物鏡の開口数})}$$

実用的な観点において、実際の計算は、結果に至るまでの要素を理解することよりも重要ではありません。さらにATRを使用する場合は屈折率を考慮することが重要ですが、空気中で測定を行う場合は必要ありません。回折限界と空間分解能はどちらも波長依存性があり、赤外スペクトル範囲全体で変化します。

赤外顕微鏡では、ビームサイズが通常、目的の空間分解能に比べて大きいので、アレイ検出器のピクセルサイズに基づいたアパーチャー径、または、有効アパーチャー径を使用して得られた単一スペクトルによって表されるサンプル上の最小領域から空間分解能を定義します。小さなアパーチャーサイズ (有効アパーチャー径) の方が実際はより良い空間分解能を提供しますが、アパーチャーが小さくなるにつれて、検出器に到達する赤外光量が制限されるため信号が弱くなり、S/Nが低下します。S/Nの問題は空間分解能を議論する場合に無視されることが多い事柄の

1つとして挙げられます。分析の最終目標が生成されるスペクトル情報に依存し、スペクトルが同定や定量化に使用される単一点 (シングルポイント) 測定なのか、あるいは差異の検出に依存する赤外イメージングなのかによっても異なります。スペクトルデータの品質は、空間分解能を議論する際に考慮されなければならない要素といえます。

空間分解能には、もう一つ光の回折が関係します。先に述べた回折限界は試料との関係の話ですが、光の回折は、ビームパス内の光学部品 (アパーチャー、対物レンズなど) でも発生します。この追加の回折によって、空間分解能が限界にどれだけ近づけるかが制限されます。

このように、空間分解能には多くの要素が関係するため、空間分解能を計算するよりも実験的に測定の方がより一般的な値を示します。空間分解能の計算は、測定方法や定義によって異なるため、一筋縄ではありません。空間分解能の指標としてよく使用されるものとして、スペクトル純度が挙げられます。空間分解能の計算に理想的な状況は、サンプルからのスペクトルが周囲のマトリックス成分に影響なく取得できる場合ですが、その理想的な定義は実際には、小さなサンプルにおいて完全には達成されないため、注目すべき点はサンプルスペクトルにおいて、周囲のマトリックス成分の影響に対する許容レベルがどれくらい小さいかということです。赤外イメージ画は画像コントラストから成り立ち、多くの場合調整可能です。そのため、正しい結果を得るには、空間分解能がどのように定義されているかを理解することが重要です。これが特定の用途にとってどれほど重要かは、アプリケーションの目的によって異なります。

このアプリケーションノートでは、空間解像度が米国空軍 (USAF) 1951の解像度ターゲットから得られたイメージにどのように影響するかの事例と、実際のスペクトル例を示します。

実験の詳細

このアプリケーションノートのデータは、Thermo Scientific™ Nicolet™ RaptIR™ FT-IR顕微鏡を使用し、透過モードで測定しています。USAF1951ターゲットのイメージとポリスチレン球の断面は、5 μm x 5 μm アパーチャーとステップサイズ1 μmを使用して取得しています。1 μm ステップとオーバーサンプリングにより、イメージの解像度がさらに向上し、画像の細部まで再現されていますが、各スペクトルの空間解像度は、最終的には5 μm x 5 μm アパーチャーによって制限されます。多層ポリマーの複合材料の断面測定データは、同様のパラメーターを使用して取得しましたが、5 μm x 10 μm のアパーチャーを使用し、この長辺がポリマーの層に沿った方向になるように設定しました。また、このノートに掲載されているラマンイメージングデータは、532 nm レーザーと100倍または50倍の対物レンズを使用した Thermo Scientific™ DXR™ 3xi ラマンイメージング装置で取得したものです。

結果

USAF1951ターゲットを使用して、一般的に実施されている空間分解能テストを実行しました。大きさの異なる等間隔の線がらせん状に配置されているサンプルです。各グループは6つの要素で構成され、各ライン間の解像度は次の式で与られます。

$$\text{解像度 (lp/mm)} = 2^{\text{グループ} + (\text{要素} - 1) / 6}$$

$$1 \text{ 線幅 } (\mu\text{m}) = [1/2 (\text{各ライン間の解像度 (lp/mm)})] \times 1000$$

これは一般的に使用されるテストサンプルですが、このターゲットが赤外顕微鏡サンプルを代表するものではないことを覚えておくことも重要です。各ラインは赤外線透過を遮断するだけで明確な赤外線スペクトルを持ちませんが、理想的な状態では、透過率100%と0%の両極端の間で変動します。より小さな線においては、これらの理想的な限界は完全には達成されず、山と谷の違いを定義することが重要な議論の一部となります。

図1は、USAFターゲットからのグループ6の(A)、(B)、(C)の赤外イメージ画像を示します。これらのイメージは、3,990 cm⁻¹での吸光度に基づいています。各赤外イメージ画像の下には、各ラインの間を二等分するポイントで垂直方向に観測した際の透過率のプロットを示しています。ライン間の幅が5 μm未満の場合でも、ラインが3本存在することを明確に判別できますが、山と谷を定義する値の範囲は、4.38 μm幅のラインではその範囲は大幅に小さくなっており、これらの実際の形状はあまり明確に定義できません。この例は、幅4.38 μmの個々のラインを「解像」できることを示していますが、イメージ画像では必ずしもラインの実際のサイズと形状を表していないことがわかります。

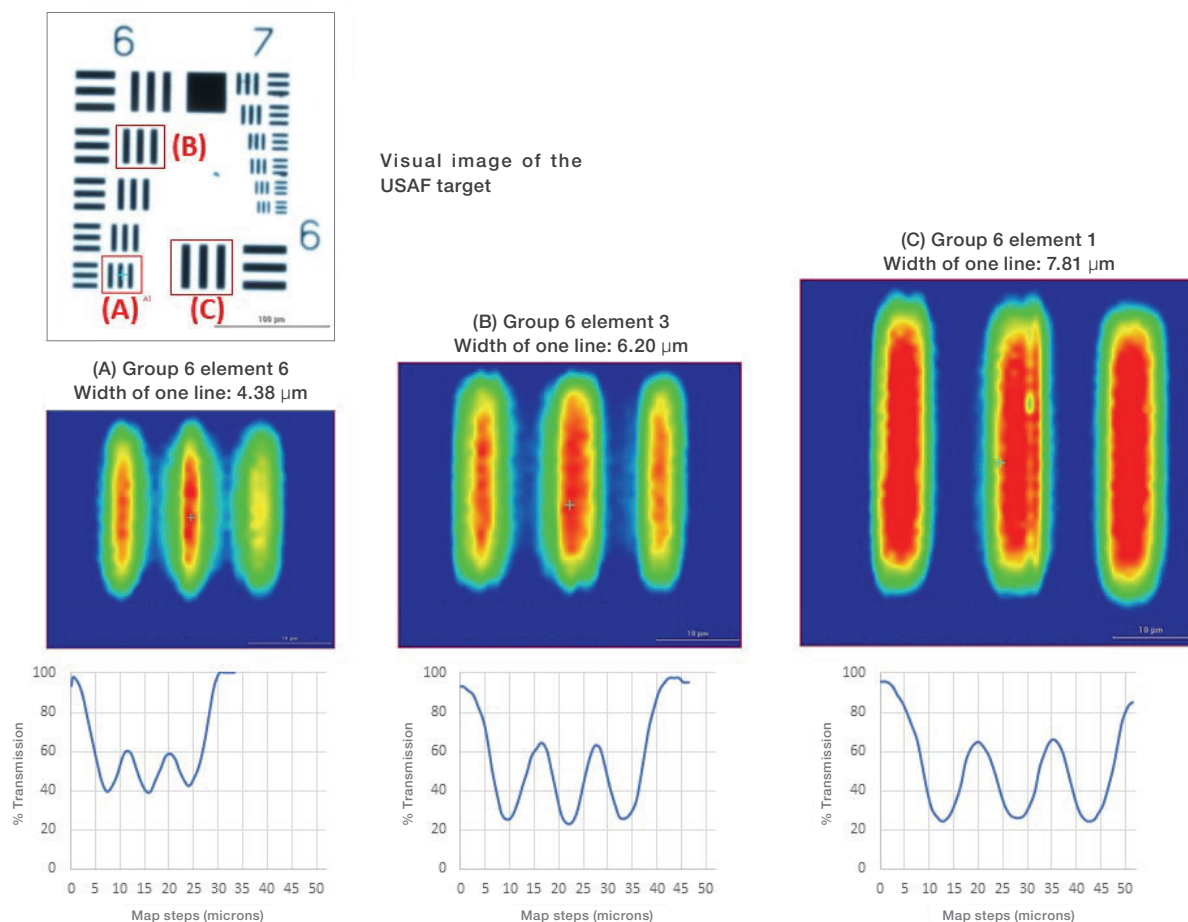


図1. (A) セクション6からの赤外イメージ画像 (線幅4.38 μm)、(B) セクション3 (線幅6.20 μm)、および (C) セクション1 (線幅7.81 μm) (USAFターゲットのグループ6)。赤外イメージ作成は、3,990 cm⁻¹での吸光度を使用、測定は5 μm x 5 μm アパーチャーを使用し、1 μm ステップで実施した。

空間分解能を評価する別の方法として、ナイフエッジテストが挙げられます。この実験では、透過率100%から透過率0%の領域までスペクトルを取得し、完全透過から完全遮断への遷移における、遷移幅（空間分解能）を確認します。この実験結果を図2に示します。ここではマップ位置に対して透過率をプロットしています。遷移幅はシャープで、その幅は選択範囲に大きく依存しています。透過率10%と90%の領域では遷移幅は10 μm となり、透過率20%と80%における遷移幅は6 μm まで低下しています。ナイフエッジテストでは、結果をどのように定義するかが影響します。

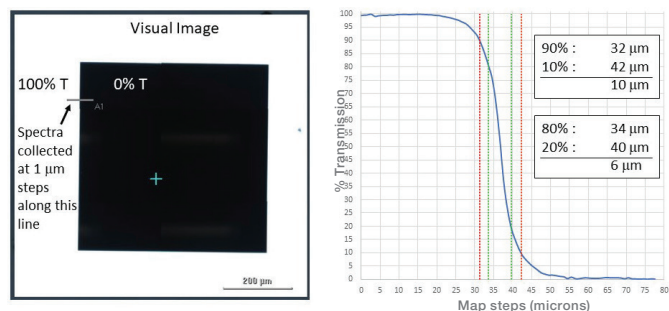


図2. USAF1951解像度ターゲットを使用したナイフエッジの測定例。5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ アパーチャー、1 μm ステップで実施。透過率とマップステップのプロット。赤線は90%と10%の透過率、緑線は20%と80%の透過率から得られるマップステップを示します。

これらのテストは、期待される空間分解能をある程度知ることができますが、実際のサンプルを例示するものではありません。空間分解能をさらに理解するために、2つの追加サンプルを分析しました。最初のサンプルは、小さなポリスチレン球（直径約10 μm ）をエポキシ樹脂に包埋し、マイクロトムを使用して薄片化しています。これはポリマーフィルムの欠陥や、異物分析に類似します。2番目の例は多層のポリマー複合材料であり、分析目的はそのサンプルの薄層を調べることに焦点を当てます。結果の二次チェックとして、これらのサンプルをラマン顕微鏡でも分析しました。

図3は、ポリスチレン球の断面から得られた可視画像と赤外吸収ピークの面積に基づくイメージ画像を示します。イメージ画像の生成は、ポリスチレンピークのピーク面積（3,013~3,034 cm^{-1} ）に基づいています（図6）。エポキシ樹脂とポリスチレンの赤外スペクトルは非常に似ています。このスペクトルを区別するために、赤外イメージングで高品質のスペクトルを取得することが重要となります。広いスペクトル範囲と高品質なデータの取得は、意味のある赤外イメージ像を構築するために使用できる、スペクトル上の違いを見つける上で重要です。球の断面のおおよその直径は画像から直接測定できますが（10 μm ）、球の断面を二等分する線に沿ったマップ位置に対してピーク面積値（最大値のパーセントとして報告）をプロットすることも有効な手法です（図5）。その結果、半値幅（FWHM）は約10 μm でした。より高い空間分解能を持つラマンイメージングを用いて二次チェックを実施したところ、図6のように赤外顕微鏡の結果とよく一致していることがわかります。

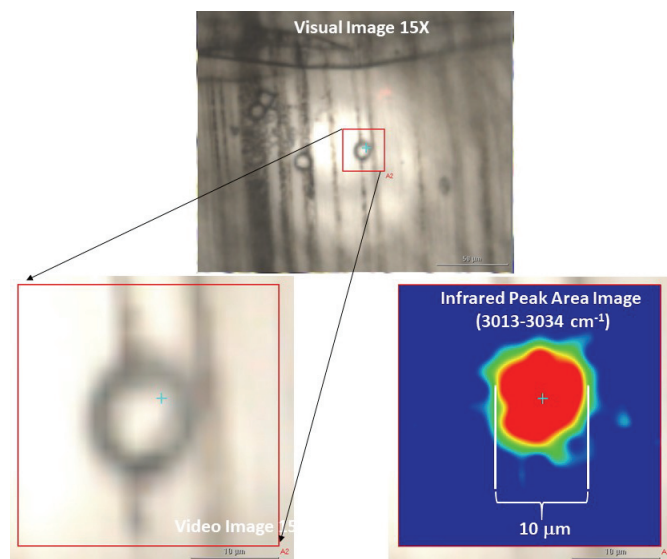


図3. 15倍の赤外対物レンズで収集されたエポキシに埋め込まれた直径約10 μm のポリスチレン球の断面の可視および赤外イメージ画像。ポリスチレンピークの面積（3,013~3,034 cm^{-1} ）に基づき、ピーク面積から赤外イメージを作成。5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ アパーチャーを使用し、1 μm ステップで実施した。

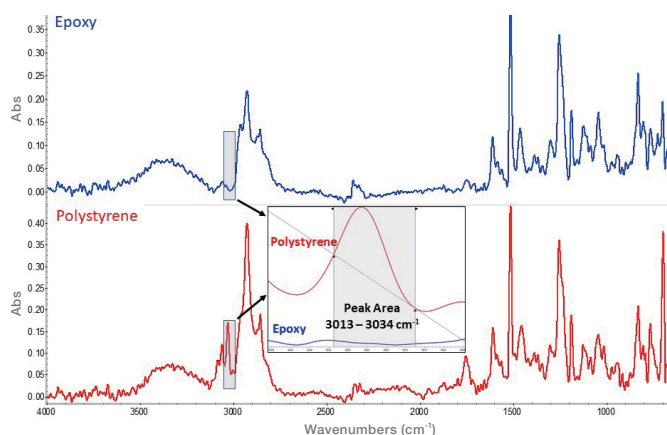


図4. サンプルのポリスチレン（赤）およびエポキシ（青）部分からの代表的な赤外スペクトル。図3の赤外イメージ画像に使用されるピーク面積（3,013 cm^{-1} ~ 3,034 cm^{-1} ）を示す。

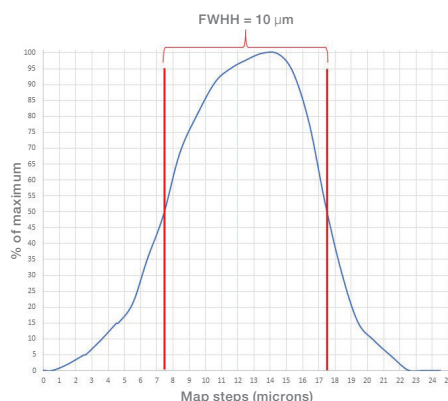


図5. ポリスチレン球の断面を二等分する線に沿ったマップステップに対する最大値のパーセントとして表されるピーク面積のプロットです。赤線は半値を示す。FWHM = 10 μm 。

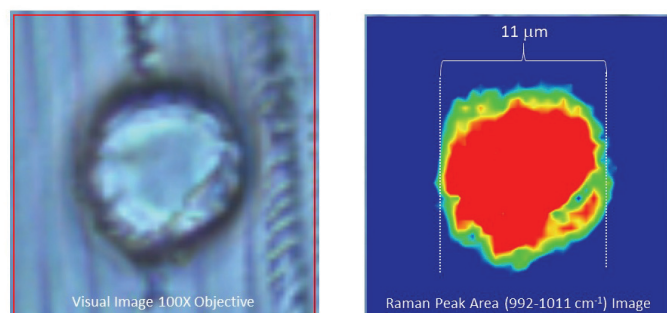


図6. エポキシに埋め込まれたポリスチレン球の断面を100倍対物レンズ、532 nmレーザー、レーザー強度10 mW、画像ピクセルサイズ 0.5 μm 、25 μm ピンホールを使用して取得した可視画像とラマンイメージング画像（ポリスチレンの992~1,011 cm^{-1} ピーク）。

赤外顕微鏡のより一般的なアプリケーションの1つとして、多層のポリマー複合材料の分析が挙げられます。一部の層が非常に薄い可能性があるため、空間分解能を考慮した測定が求められます。今回はそれを説明するために、比較的薄いナイロン層とポリエチレン層の間のポリウレタン層（約6 μm ）を分析しました。図7は、この層状ポリマー複合材料の断面の可視画像と、ポリウレタン層および2つの隣接する層の赤外スペクトルのピーク面積イメージ像を示しています。また、図8に、ポリウレタン赤外イメージを生成するために使用したピーク面積（1,302～

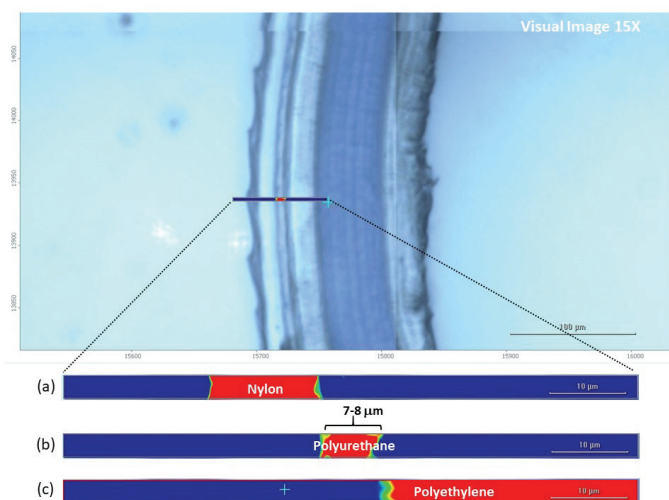


図7. 多層ポリマー複合材料の断面の測定例。5 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ アパーチャーを使用し、1 μm ステップで分析した。a, b, cはポリウレタン層 (b) と2つの隣接する層 (a) ナイロン、ポリエチレン (c) の位置を示す。

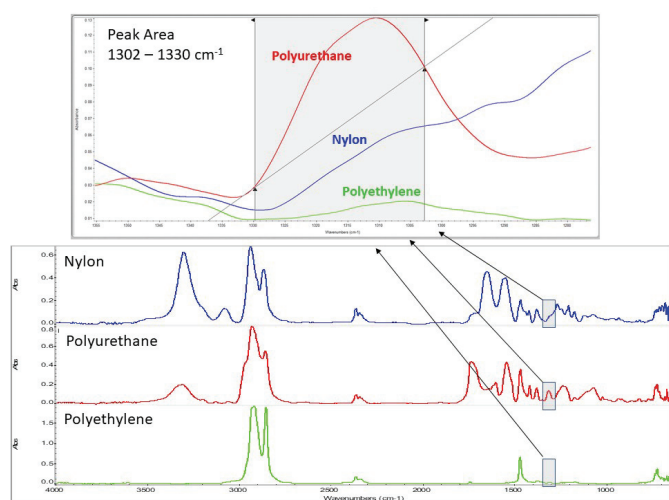


図8. 3層（赤-ポリウレタン、緑-ポリエチレン、青-ナイロン）からの代表的な赤外スペクトル。挿入図は、図7に示すポリウレタンピークのイメージング作成に利用したピーク面積を示す。

1,330 cm^{-1}) を示します。およその厚さは赤外イメージからも直接計測できますが、別のアプローチとして、ポリマー層の配向に垂直な線をマップ位置として横軸にとった際のピーク面積値（最大値のパーセントとして表される）のプロットを使用する方法があります（図9）。FWHHの計測値は、ポリウレタンピークの幅を示します（8 μm ）。ラマンイメージング画像から得られた6 μm の値からそれほど離れていないことがわかります（図10）。

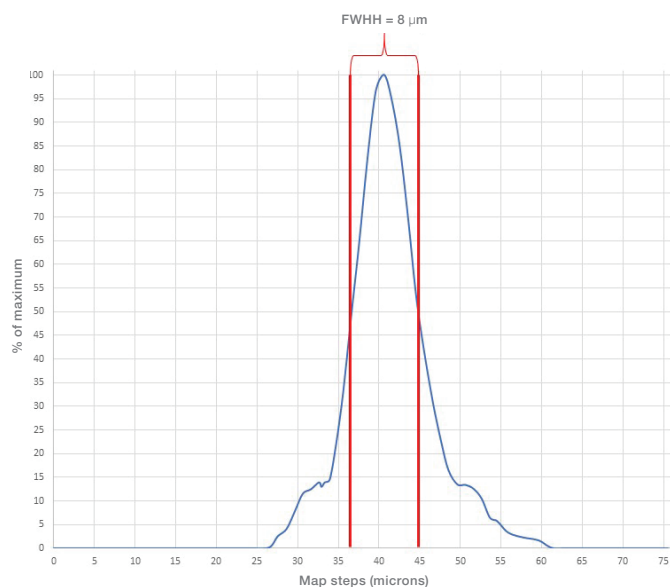


図9. ポリマー層の配向に垂直な線をマップ位置として横軸にとった際のピーク面積値（最大値のパーセントとして表される）のプロット。赤線は半値を示す。FWHH=8 μm 。

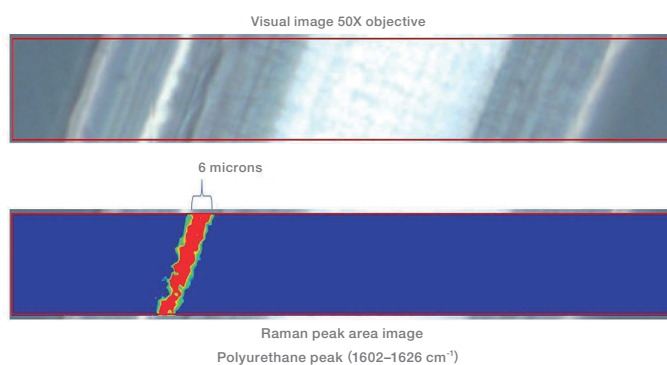


図10. 多層ポリマー複合材料の断面です。50倍対物レンズ、532 nmレーザー、レーザー強度10 mW、ピクセルサイズ1 μm 、25 μm ピンホールを使用して取得した可視画像とラマンイメージング画像（ポリスチレンの1,602～1,626 cm^{-1} ピーク）。

結論

空間分解能は、赤外顕微鏡のアプリケーションを検討する際に考慮すべき要素の1つです。空間分解能はさまざまな方法で定義され、特定のアプリケーションを成功させるための重要性が異なる可能性があるため、空間分解能の基本を理解することは重要です。一部の空間分解能テストにはメリットがありますが、実際のサンプルを表すことはめったにないため、より代表的なサンプルとともに検討する必要があります。多くの場合、FT-IRの測定は、結果の最適化に向けて、いかに全ての要素をバランスよく設定できるかにかかっています。特に赤外イメージングにおいては、空間分解能よりも、意味のあるイメージを作成する方が重要で、実際の空間分解能よりもスペクトルデータの品質の方がより重要な場合があります。

ここに示す結果は、Nicolet RaptIR 赤外顕微鏡が、非常に小さい対象物を空間的に区別でき、空間分解能とスペクトル品質のバランスが取れていることを示しています。つまり赤外顕微鏡を活用したさまざまなアプリケーションに対応できる優れた選択肢になるでしょう。



Nicolet RaptIR FT-IR 赤外顕微鏡

お申し込みはこちら thermofisher.com/raptir

研究用에만使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2022 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 **FTIR161-A22080B**

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

thermo scientific