

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SPRING 1979
VOL.22 NO.1

U.D.C. 57.088.1:543.423.8:621.385.833.2

目次

報 文

- X線微小分析のための生物試料—
—基礎的諸問題— ……………
……………石川春律 山田英智
米原勝久 鶴田忠正 岡村定彦… 1

- 高速液体クロマトグラフィによる
有機溶剤の尿中代謝産物の定量
……………緒方正名 杉原黎子… 5

解 説

- 最近のエネルギー分散形X線分析
装置……………原 行一 篠原 実…11

- “In Beam” CIマスマスプロメト
リ……………菱田真三郎…16

- メタスティブルイオンについて…
……………中島康雄…19

トピックス

- S-405形 日立走査電子顕微鏡 ……24

- 320形 日立自記分光光度計 ……25

- 650-40形 日立高感度分光けい光
光度計……………25

- 726形 日立自動分析装置……………26

- 712形 日立自動分析装置……………26

報 文

X線微小分析のための生物試料—基礎的諸問題—

石川 春律* 山田 英智* 米原 勝久** 鶴田 忠正** 岡村 定彦**

1. はじめに

走査電子像観察装置を組込んだ透過形電子顕微鏡 (STEM) とエネルギー分散形X線検出器 (EDX) とを組合せることにより、微小部位の元素分析が可能となった。加えて、検出効率が改善され、元素分別の正確さが確立されるにつれ、広く医学・生物学の領域に応用の道が開けてきた。

当然のことながら、分析対象の生物試料は自然の状態における元素の組成や分布が保たれるように作成されなければならない。理想的には試料作成中にいかなる物質も移動・流失したり、外から加えられることがあってはならない。また、同時に微細構造が明らかで、分析部位が同定できるような試料であることを要する。樹脂包埋の切片試料では、組織や細胞が化学固定、脱水、包埋のような処理を受けるので、拡散性や可溶性の物質が移動したり、流出したりするばかりでなく、新たに不自然な物質が導入される。

このような試料作成上の問題を最小にするため、多くの研究者によっていろいろな方法や装置が工夫されている。要は、目的とする構造や元素に適した試料作成法を選べばよいわけであるが、同時に、用いられた方法ないし試料が適当であるかどうかの吟味をする必要がある。場合によっては、通常の化学固定や樹脂包埋が許されることもある。最近、改善された凍結置換法による樹脂包埋切片で拡散性物質の保存がよいという結果が報告されている^{2),3)}。しかし、現在のところ、無固定新鮮材料の凍結超薄切片がX線微小分析 (X-ray microanalysis, 以下「XMA」という) に最も理想的な試料といえる^{4),5)}。それは、試料作成の全過程においていかなる液体にも触れない試料であるからである。

ここでは、われわれの経験をもとに、XMAのための生物試料作成上の問題点と分析方法について基礎的観点から検討してみたい。

2. 分析装置と試料

分析装置として、H-500H形 日立透過形電子顕微鏡に走査電子像観察装置 (H-

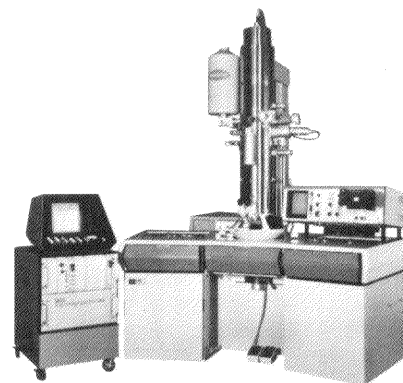


図1 分析に使用した日立トータルシステム H-500H 日立透過形電子顕微鏡に走査電子像観察装置 (H-5010) と KeveX 5100 エネルギー分散形X線スペクトロメータとを組合せた装置。

* 東京大学 医学部 解剖学教室、医博

** 日立製作所 那珂工場 応用技術センタ

5010)とKevex 5100形エネルギー分散形スペクトロメータとを組み込んで使用した(図1, 2)。試料は、まず、通常の透過電子像として観察し、次いで走査形透過電子像として観察して分析部位を決定し、主として静止スポット(点)分析を行った。

試料として、各種組織・細胞の通常包埋切片の他、凍結切片を作成し、また、遊離細胞や分離色素顆粒の全載試料を用いた。凍結切片は基本的にはChristensenの凍結超薄切片作成法に従って作成した。細切された組織片を銅製試料ホルダに載せ、液体窒素温度に急速凍結を施した。Sorvall MT-2形ミクロトーム用クライオキット(FTC/LTC-2)により得られた凍結超薄切片はコロジオン・炭素支持膜を張ったグリッドに乾式に圧着させ、温風乾燥または真空凍結乾燥を施した^{7),8)}

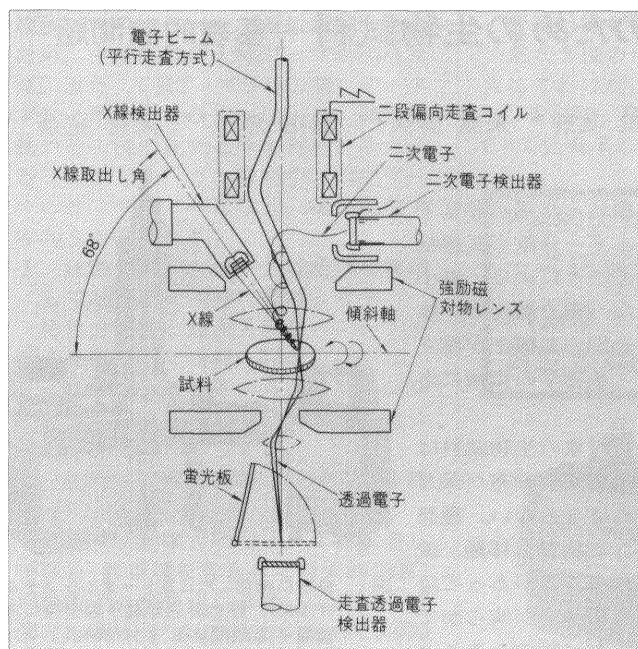


図2 トータルシステム解説図

3. 分析条件の選択

得られるX線スペクトルは分析の条件により様相を異にする。組織や細胞は、ほとんどが水素(H)、炭素(C)、窒素(N)、酸素(O)、ナトリウム(Na)、リン(P)、イオウ(S)、塩素(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)のような軽元素から構成されており、元素の密度も小さい。

現在の装置では、上記のうち酸素以下の超軽元素の検出はできない。

したがって、この場合、検出効率が問題になる。装置面からの改良もなされ、検出効率が上昇しているが、分析条件も効率をよくするよう選ばなければならない。加速電圧、試料電流値、スポットサイズ、分析時間などの分析条件の選択は検出効率ばかりでなく、バックグラウンドノイズにも大に関係する⁹⁾⁻¹²⁾。分析条件は対象とする試料や元素の種類も考慮して選ばれるし、また、分析結果を比較するときは同一の条件が用いられなければならない。

試料が加速された電子線で照射されると、X線が発生する(図3)。このX線には2種類あり、一般にバックグラウ

ンドノイズとなる連続X線と、それぞれの原子(元素)に特有な波長、つまりエネルギーを有する特性X線とがある。当然、元素分析においてはバックグラウンドノイズ(B)に対していかに高率の特性X線(ピーク:P)を得るかということが重要である。以下、それぞれの分析条件について考察する。

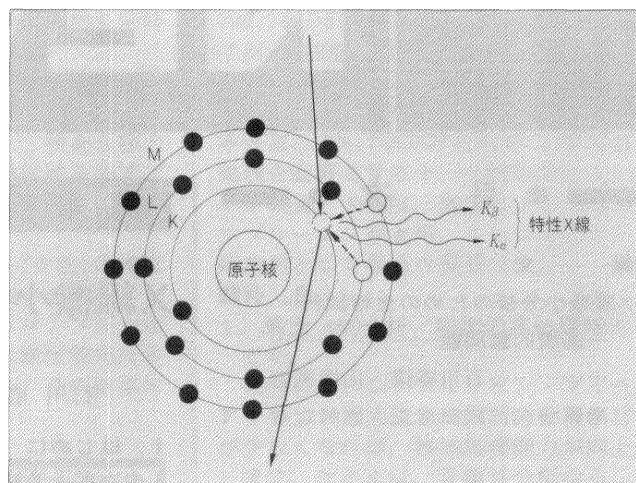


図3 特性X線の発生

3.1 加速電圧

高率の特性X線、したがって高いP-B比を得るためには、加速電圧が問題となる。各元素には原子殻の系列(K, L, Mなど)に応じて特有の励起電圧があるが、高いP-B比を得るためにはそれぞれの元素の励起電圧の3~4倍の加速電圧を用いるのが最適とされている。元素の励起電圧はK系列で、Na 1.1, P 2.1, Ca 4.0, Fe 7.1, Zn 9.7(kV)であり、複数の元素組成から成る生物試料では選ばれた加速電圧がどの元素にも最適というわけではない。生物試料では一般に加速電圧10~40kVがよいことになるが、実用的には、試料の厚さを考えて幾分加速電圧を高くする必要があり、我々は通常50~75kVを用いている。

3.2 試料電流

試料から発生するX線の強度は照射する電流値に比例する。試料電流値は正しくはファラデー・ゲージでスポット(プローブ)電流を測定することにより得られるが、通常は試料吸収電流値として測定される。この値は便宜的に試料が載っていない銅製グリッド上にスポットを当てて測定する。電流値は、試料の電子線損傷、P-B比、分析時間などを考慮して決定され、通常 $2 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-10}$ A(分析時間30~100秒)が使用されるが、我々は比較的高い加速電圧(75kV)、大きい電流値(1×10^{-9} A)で短時間分析(30秒)を常用している。

3.3 分析時間

目的とする特性X線のピークは時間とともに上昇する。この上昇速度は元素の濃度(密度)や試料電流によって異なる。試料電流値を増して分析時間を短縮するか、またはその逆にするかが考えられるが、電子線照射による試料の損傷やコンタミネーションを考えると、適切な条件を選ぶ必要がある。特に長時間照射によりバックグラウンドノイズが増大し、特性X線のピークが不明瞭になるので注意を要

する。したがって、30～100秒が適当である。

3.4 スポットサイズ

分析対象のディメンションを考慮して決定する。スポットサイズは分析部位の観察のためのSTEM像の像質をも決定する。通常直径50～100nmのスポットが用いられる。

4. 分析方法の問題点

4.1 コンタミネーションと電子線損傷

分析中、時間の経過に伴って、特性X線の単位時間当りのカウント数が減少してくるが、この理由として、コンタミネーションと電子線損傷とが考えられる。しかし、そのいずれによるか決定できないことが多い。コンタミネーションの場合、試料表面に主として炭化水素の吸着が生じ、特性X線の発生を減じ、また吸収し、検出効率を低下させ、同時にバックグラウンドノイズを増大させる。電子線損傷の場合、試料内の物質が昇華したり、極端な場合には孔があくことになる。そのため、コンタミネーションを最小限に抑えるよう、装置の保守、真空度、発生源などについて十分留意しなければならない。実際には、高真空を得るための排気系の改善がなされており、さらに液体窒素を用いた冷却によりコンタミネーションを減少させることができる。また、しばしばケイ素(Si)が検出されることがある。この場合、冷却処置により減少するときはコンタミネーションによるといえるが、Siは自然の分布のこともあるので、区別が困難なことが多い。試料作成時、特に支持膜の炭素蒸着補強時にSiのコンタミネーションが起こらないように注意しなければならない。

4.2 グリッドの影響

試料を載せるグリッドも分析スペクトルに影響を及ぼす。銅(Cu)やニッケル(Ni)製のグリッドを用いると、それらの金属元素のピーク群が加わる。それらの強いピークに分析対象元素のピークが重なることがあるので、解釈上注意を要する。さらに、バックグラウンドノイズを増大させ、他の少量の元素のピークを不明瞭にすることもある。すなわちP-B比が低下する。したがって、検出されない炭素(C)やベリリウム(Be)製グリッドが有利である(図7)。いずれにしても、グリッドは網目の粗なものがよく、分析も網目の中心部で行うようにする。ガーボングリッドは自作によるが、水平の方法⁸⁾により作るとよい。

問題となるのは銅やニッケル製のグリッドを用いた場合、直接電子線スポットが当たっていないにもかかわらず、これら金属のピークが顕著に出ることである。このピークはスポットをグリッドの網の縁に近づけるほど大きい。また試料に当たるときと支持膜だけに当たった場合とで金属ピークに大きな差があり、バックグラウンドノイズにも差がある。ベリリウムグリッドを用いても、網目の中央部と縁近くではスペクトルに差がある。これは散乱電子が電子線スポット以外の部位に当たるためである。試料相互間でも近接しているときは、スペクトルに影響を及ぼし合う可能性がある。

4.3 検出装置

試料から発生したX線を効率よく検出するためには検知部をできるだけ試料に近づけ、さらに取出し角を大きくとる必要がある(図4)。また、検知部の面積(図のA)もでき

るだけ大きくする。我々が使用している装置では試料面を傾斜する必要はなく(通常電子線は試料に垂直入射)、その取出し角度は68°となるように設計されている。また、良質なX線とするためにはコリメータを用い、必要な特性X線を有効に取り入れている。さらに、前述の散乱電子によるX線発生を最小限に抑えるよう装置面でも工夫されている。

5. 試料作成法の検討

分析結果(X線スペクトル)は試料の作成法により大いに異なる。筋細胞の凍結超薄切片で対比してみても、通常のアルデヒド固定を施したものと、新鮮無固定のものとの間ではスペクトルの差は顕著である⁵⁾(図5, 6, 7)。中でも細胞内のカリウム(K)はその好例である。Kは無固定試料で著明なピークをなすのに対し、固定試料ではKのピークは消失している。細胞内にKのピークが認められない分析例では、Kばかりでなく、他の拡散性物質(特に電解質)の移動・喪失が起こっていると判断してよいくらいである。化学固定に緩衝液を用いると、その組成元素がスペクトルに加わる。例えば、リン酸緩衝液ではナトリウム(Na)とリン(P)が、s-コリジン緩衝液では著明な塩素(Cl)のピークが出る。これらのピークは、固定後蒸留水で洗ったり、エタノールで脱水した試料では認められない。四酸化オスミウム(OsO₄)の後固定によりオスミウム(Os)が不可逆的に付加される。さらに樹脂包埋を行うと、その成分中の元素(例えば、Cl)が顕著なピークをなす。切片に電子染色を施すと、染色用金属が検出されることはいうまでもない。

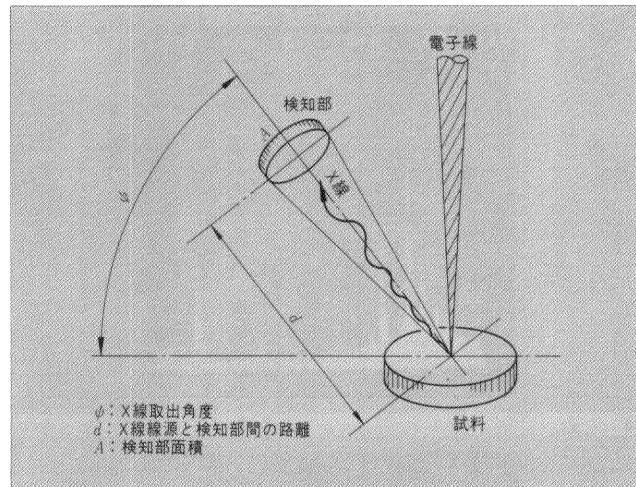


図4 試料と検知部の関係

固定の効果はマウス赤血球の全載標本の分析で容易に示される⁵⁾(図6)。新鮮な無処理赤血球では、Na, P, S(イオウ), Cl, K及びFe(鉄)のピークが得られる(図6(a))。これらは新鮮血の無固定凍結超薄切片における赤血球分析と同じスペクトルである。赤血球を生理的食塩水(0.9% NaCl)で洗うと、上記スペクトルに加えて、NaとClのピークが増強される。これは乾燥の際の赤血球表面に析出したNaClを反映している。しかし、生理的食塩水で洗っても、細胞内の電解質はよく保持されていることがわかる。次に、赤血球を3%グルタルアルデヒド水溶液で固定すると、Kのピークは消失し、PやClのピークもかなり減少する。緩衝アルデヒド液で固定すると、これに緩衝液の元素

のピークが加わる(図6(b))。このように、Na、Cl、P、Kのような拡散性物質は化学固定により流出することが明らかである。他方、これらの処理後も比較的よく保存される元素(S、Fe)もある。それらは構造と強く結合している元素であろう。しかし、よく保存されると考えられる元素でも、X線スペクトルで対比してみると幾分差が認められることから、処理中に一部移動したり、流出したりする可能性は否定できない。

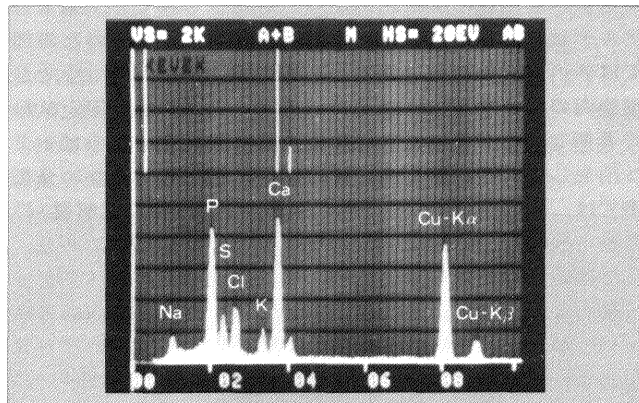


図5 エネルギー分散形X線スペクトルの一例
マウス心筋の無固定凍結超薄切片に見られたミトコンドリア内顆粒のスポット分析。Na、P、S、Cl、K、Caのピークが顕著である。右側の2つのピークは使用したグリッドの銅(Cu)の K_{α} と K_{β} を示す。白線棒はCaの K_{α} と K_{β} を指す。
(分析条件：75kV, 2×10^{-9} A, $\phi 90$ nm, 30s)

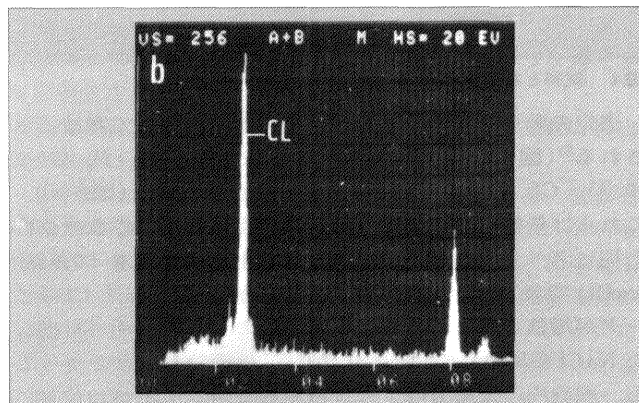
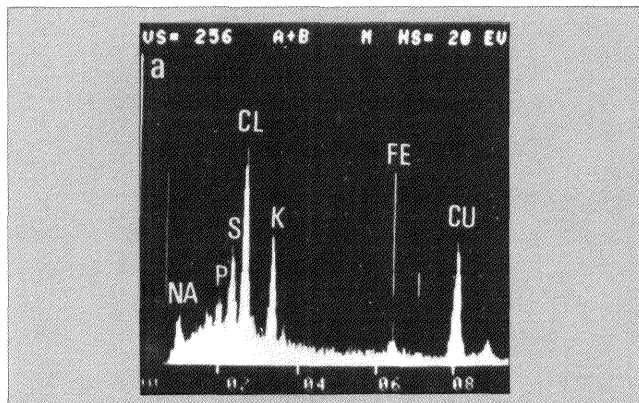


図6 異なる前処理の赤血球全載標本のX線スペクトル
(a)無処理新鮮赤血球
(b)s-コリジン緩衝の3%グルタルアルデヒドにて固定した赤血球
(分析条件：25kV, 1.2×10^{-11} A, $\phi 50$ nm, 200s)

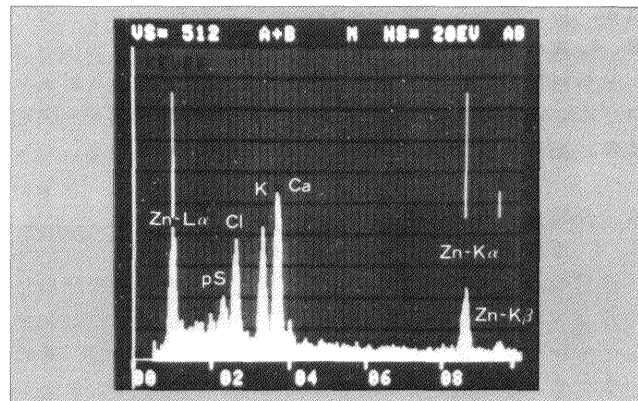


図7 ベリリウムグリッドに載せたカエル網膜の無固定凍結超薄切片(色素顆粒)の分析例
グリッドからのピークはない。銅などの金属メッシュからのピークと重なる物質の検出に必要である。
(分析条件：75kV, 2×10^{-9} A, $\phi 90$ nm, 30s)

6. むすび

以上、XMAの装置、分析方法及び試料について、それぞれの問題点を検討した。生物試料に含まれる元素のほとんどは軽元素であり、試料に由来する特殊性、問題点がある。現在の分析装置ではすべての元素が分析できるわけではなく、微量元素の検出限界や定量性など装置上の問題もある。加えて、分析方法も確立したものはまだなく、基礎実験や応用を通して改良して行かなければならない。分析対象(試料や元素)により、分析方法を変え、試料作成法を選ぶ必要がある。

参考文献

- 1) Russ, J. C. : In Thin-section Microanalysis (ed. by J. C. Russ & B. J. Panessa), P. 7, EDAX Lab., Raleigh, N. C., 1972
- 2) Harvey, D. M. R., Hall, J. L. & Flowers, T. J. : J. Microsc., 107, 189 (1976)
- 3) Mizuhira, V. : J. Electr. Micr., 27, (1978)
- 4) Appleton, T. C. : J. Microsc., 100, 49 (1974)
- 5) Yamada, E. & Ishikawa, H. : Acta Histochem. Cytochem., 10, 268 (1977)
- 6) Christensen, A. K. : J. Cell Biol., 51, 772 (1971)
- 7) Yonehara, K., Ishikawa, H., Yamada, E. & Asai, T. : J. Electr. Micr., 24, 217 (1975)
- 8) Yonehara, K., Ishikawa, H., Yamada, E. & Asai, T. : J. Electr. Micr., 25, 179 (1976)
- 9) Panessa, B. J. & Russ, J. C. : In Scanning Electron Microscopy (ed. by O. Johari), P. 251, IIT Res. Inst., Chicago, 1975
- 10) Marshall, A. T. : In Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy (ed. by M. A. Hayat), Vol. 4, P. 103, Van Nostrand Reinhold, New York-Cincinnati-Toronto-London-Melbourne, 1975
- 11) Mizuhira, V. : Acta Histochem. Cytochem., 9, 69 (1976)
- 12) 水平敏知：電子顕微鏡, 12, 107 (1977)

高速液体クロマトグラフィによる有機溶剤の尿中代謝産物の定量

緒方 正名* 杉原 黎子**

1. 緒 言

有機溶剤の取扱作業において、作業者の有機溶剤暴露量は、作業環境における気中濃度の時間的・場所的変動が強いため、気中濃度を用いて暴露量を推定することは困難であるので、最近では、作業者各個人について、個人サンブラを付けて暴露量を測定する方法が考案されている¹⁾。また、実際には有機溶剤取扱作業者は、防毒マスクを着用している場合が多いため、防毒マスクの効率やその使用方法などの因子によって吸入量に変化するので、暴露量から作業者の真の吸入量を推定することは困難である。

有機溶剤の中には、その大部分が尿中に代謝産物として排泄されるものがある(例えば、tolueneは吸入量の約68%、*m*-xyleneは約72%が尿中に代謝排泄される²⁾)。したがって、有機溶剤の人体に対する影響を考慮していくうに最も関係が深いと考えられる吸入量は、これらの有機溶剤に関しては尿中の代謝産物の量から推定することが可能である²⁾。

toluene, xylene 及び styrene の生体内代謝経路は図1に示すとおりであり^{3),4)}したがって toluene 作業現場ではその尿中代謝産物である hippuric acid (HA) を、また、*m*-及び *p*-xylene 作業現場では *m*-及び *p*-methylhippuric acid (*m*-MHA, *p*-MHA) を定量すれば、それぞれの吸入量が推定できる。一方、styrene 作業現場では mandelic acid (MA), phenylglyoxylic acid (PhGA) 及び HA が暴露量の指標となり得る。

尿中代謝産物の定量には、一般に、比色法、ガスクロマトグラフ法(gas chromatography)、高速液体クロマトグラフ法(high performance liquid chromatography,以下「HPLC」という)などがある。このうち、HPLCは、特異性に優れ、かつ操作が簡便であるという特長をもっている。そこで、このほど、HPLCによって、toluene, xylene, styrene の尿中代謝産物の分離定量を検討したので報告する^{5),6),7)}。なお、*o*-xylene の代謝産物の定量については検討中であるが、現在、*o*-toluic acid glucuronide の分離・同定に成功している⁸⁾。

2. 実験材料及び実験方法

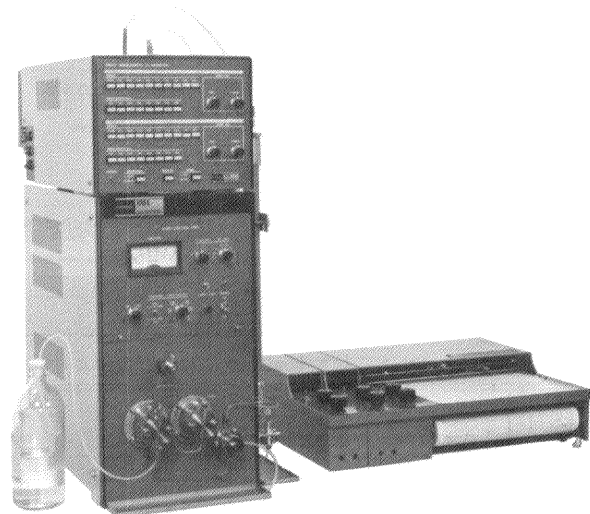
2.1 <実験I> hippuric acid と *m*-(*p*-)methylhippuric acid の定量

被験尿：健康人の尿(正常尿と称する)と、toluene 67 ppm 及び *m*-xylene 83 ppm の混合気体に3時間暴露後、2.5時間後に採取した尿(toluenes・*m*-xylene 暴露尿)を用いた。

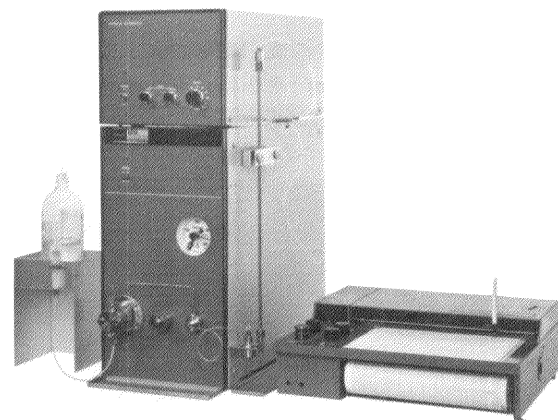
被験尿の処理：

<A法> 尿を1500rpmで5分間遠心分離し、上澄液をそのままHPLCに注入した。

<B法> 尿1.0mlに対し、内部標準物質として *o*-methylhippuric acid (*o*-MHA) の水溶液(10mg/ml)を0.1ml



635形 日立高速液体クロマトグラフ



633形 日立高速液体クロマトグラフ

に加え、濃塩酸1～2滴を加えて酸性(pH 2)としたのち、食塩約0.3gを添加し、10% methanol 含有 ethyl ether 2 ml で2分間振とうする方法で2回抽出を行った。抽出液(ether層)1.0mlを別の試験管にとり、送風下で抽出溶媒を除去し、再びmethanol 0.5mlに溶かしてHPLCの試料とした。

定 量：表1に示す条件によって行った。

2.2 <実験II> *m*-methylhippuric acid と *p*-methylhippuric acid の定量

被験尿：wistar系ラット(♀)に *m*-xylene, *p*-xylene を表2に示す割合で腹腔内投与後、24時間に採取した尿(xylene 投与尿)を用いた。

被験尿の処理：尿1.0mlに対して、内部標準物質としてMAの水溶液(10mg/ml)を0.1ml 加え、濃塩酸1～2滴を加えて酸性(pH 2)としたのち、methyl ethyl ketone (MEK) 2 ml で2分間抽出を行った。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水したのち、その中から1.4mlを採取し、これ

* 岡山大学医学部 公衆衛生学教室 教授、医博

** 岡山大学教育学部 家政科教室

表1 液体クロマトグラフィの条件

	実験 I (A法, B法)	実験 II	実験 III	
			A 法	B 法
使用機器	633形 日立液体クロマトグラフ	633形 日立液体クロマトグラフ	635形 日立液体クロマトグラフ	633形 日立液体クロマトグラフ
充填剤	LiChrosorb RP 18, 10 μ m (Merck)	LiChrosorb SI 100, 5 μ m (Merck)	Nucleosil 5C18, 5 μ m (Nagel) または LiChrosorb RP 18, 5 μ m (Merck)	LiChrosorb SI 100, 5 μ m (Merck)
カラム	ステンレスカラム $\phi 4.0 \times 150$ mm	ステンレスカラム $\phi 8.0 \times 250$ mm	ステンレスカラム $\phi 4.0 \times 150$ mm	ステンレスカラム $\phi 8.0 \times 250$ mm
測定波長	UV 254nm	UV 254nm	UV 225nm, 254nm	UV 254nm
移動相	水/methanol/酢酸 (80/20/0.2)	n-hexane/chloroform (25/75)	水/acetonitrile/酢酸 (95/5/0.02-225nmで測定するとき) (95/5/0.25-254nmで測定するとき)	n-hexane/chloroform (25/75)
流量	1.2ml/min	2.0ml/min	1.2ml/min	2.0ml/min
圧力	50kg/cm ²	40kg/cm ²	140kg/cm ²	40kg/cm ²

表2 ラットに対する *m*-, *p*-xylene 投与量と、投与後24時間内に尿中に代謝・排泄された *m*-, *p*-MHAの量との関係

	投与量 (mmole/kg)			排泄量 (mmole/kg)			排泄比 (%)		
	<i>m</i> -xylene	<i>p</i> -xylene	total	<i>m</i> -MHA	<i>p</i> -MHA	total	<i>m</i> -MHA	<i>p</i> -MHA	total
A	0.81	0.81	1.62	0.45 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.06	55.6 $\pm$ 3.0	69.1 $\pm$ 4.5	62.3 $\pm$ 3.7
B	0.41	0.41	0.82	0.24 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.02	57.7 $\pm$ 2.4	67.5 $\pm$ 2.4	63.4 $\pm$ 2.4
C	0.81	0.41	1.22	0.40 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.08	49.0 $\pm$ 5.7	64.2 $\pm$ 8.2	54.1 $\pm$ 6.4
D	0.41	0.20	0.61	0.26 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.04	62.6 $\pm$ 6.3	75.0 $\pm$ 8.5	66.7 $\pm$ 6.9

(Mean $\pm$ SEM)

に phenacyl bromide の MEK 溶液 (100mg/ml) と triethylamine の MEK 混液 (100mg/ml) を 0.3ml ずつ加え、50℃で2時間加熱処理して HPLC の試料とした。

定量：表1に示す条件で行った。

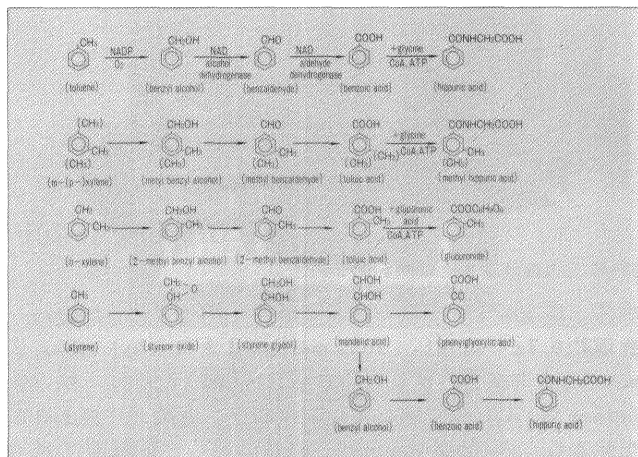


図1 toluene, xylene³⁾及びstyrene⁴⁾の代謝経路

2.3 <実験III> phenylglyoxylic acid, mandelic acid及びhippuric acidの定量

被験尿：styrene 取扱作業後のヒトの尿（気中 styrene 濃度1~90ppm, styrene 暴露尿）、及び styrene を腹腔内投与(900mg/kg)後のラットの尿(styrene 投与尿)を用いた。

被験尿の処理：尿1.0ml に対して、内部標準物質として *o*-MHA (10mg/ml) を 0.1ml 加えたのち、10% methanol 含有 ethyl ether 4ml で2分間抽出を行った。抽出液は、無水硫酸ナトリウムで脱水後、別の試験管に1.0ml 採取し、送風下で抽出溶媒を除去した。

<A法> これに methanol 0.25ml を加え、HPLC の試料と

した。

<B法> 一方、抽出液1.0ml を試験管に採取し、抽出溶媒を除去したのち、phenacyl bromide の MEK 溶液 (7 mg/ml) 及び triethylamine の MEK 混液 (7 mg/ml) を 1.0ml ずつ加え、50℃で2時間加熱して HPLC の試料とした。

定量：分析条件は表1のとおりである。

なお、<A法>では PhGA を 254nm で、MA, HA, *o*-MHA は 225nm で定量した。また、<B法>では、MA, HA, *o*-MHA をフェナシルエステル化後、いずれも 254nm で定量し、PhGA は別に <A法>と同じ条件で測定した。

3. 結果と考察

3.1 hippuric acid, *m*-(*p*-)methylhippuric acid の定量

3.1.1 尿中HA, MHAの液体クロマトグラム

HA, *m*-MHA, *p*-MHA, *o*-MHA の既知物質及び尿中に存在すると考えられる種々の glycine 抱合物、すなわち、isonicotinuric acid (INA), nicotinuric acid (NA), salicyluric acid (SA) 及び phenylacetyl glycine (PAG) (いずれも市販品または日本感光色素研究所で合成されたもの) の水溶液について、<A法>によるクロマトグラムを図2に示す。

また、正常尿及び toluene・*m*-xylene 暴露者の尿を <A法>、<B法>によって定量した際のクロマトグラムは図3のようになり、尿中 HA, *m*-MHA は他の物質と分離することができた。

3.1.2 正常尿中のHA量

正常尿中の HA 量を、この<A法>・<B法>により測定し、直接比色定量法(重層法)⁹⁾による定量値と比較した結果、直接比色定量法と<A法>との間には $y_1 = 1.37x + 0.21$ (ただし、 x : <A法>による測定値、 y_1 : 直接比色定量法によ

る測定値), $r=0.98$ ($n=21$), <A法>と<B法>との間には, $y_2=1.16x-0.09$ (y_2 : <B法>による測定値), $r=0.98$ ($n=21$) の関係が成立し, ともに高い相関が認められた。

尿中 HA の定量法のうち, 筆者らによって考案された直接比色定量法^{9),10)}は, 極めて簡便で, 多量の検体を処理する健康診断用には適しているが, 発色試薬に対して HA と同様な反応を呈する尿中物質の影響を考慮する必要がある。特に, HA と MHA の混在する尿では, これを分離定量するために, 薄層クロマトグラフィ¹¹⁾ paper chromatography, ¹¹⁾ gas chromatography¹²⁾ などが用いられているが, 定量精度や試料の前処理の複雑さなどの点で問題があった。これに対して, HPLC では, 比較的簡単に尿中 HA, MHA の分離定量ができた。尿を遠心分離後, 直接分離定量できるが, 注入量による測定誤差を小さくする意味からは, 内部標準物質を添加した抽出法の方が望ましいと考えられる。

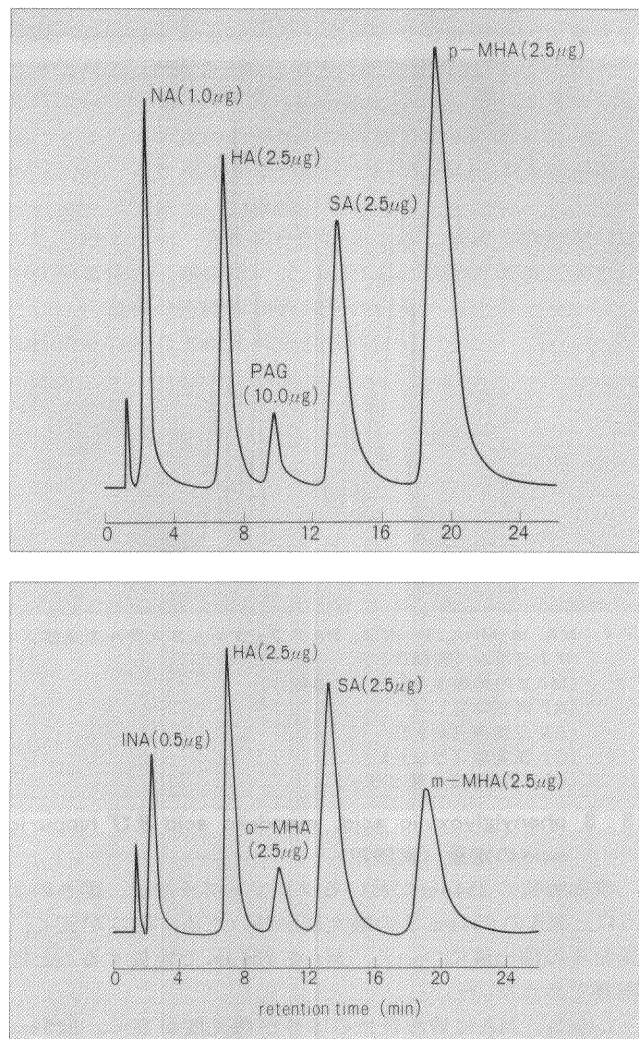


図2 種々の glycine 抱合物の液体クロマトグラム

NA : nicotinic acid
INA : isonicotinic acid
SA : salicylic acid
PAG : phenylacetyl glycine
HA : hippuric acid
o-MHA : o-methylhippuric acid
m-MHA : m-methylhippuric acid
p-MHA : p-methylhippuric acid

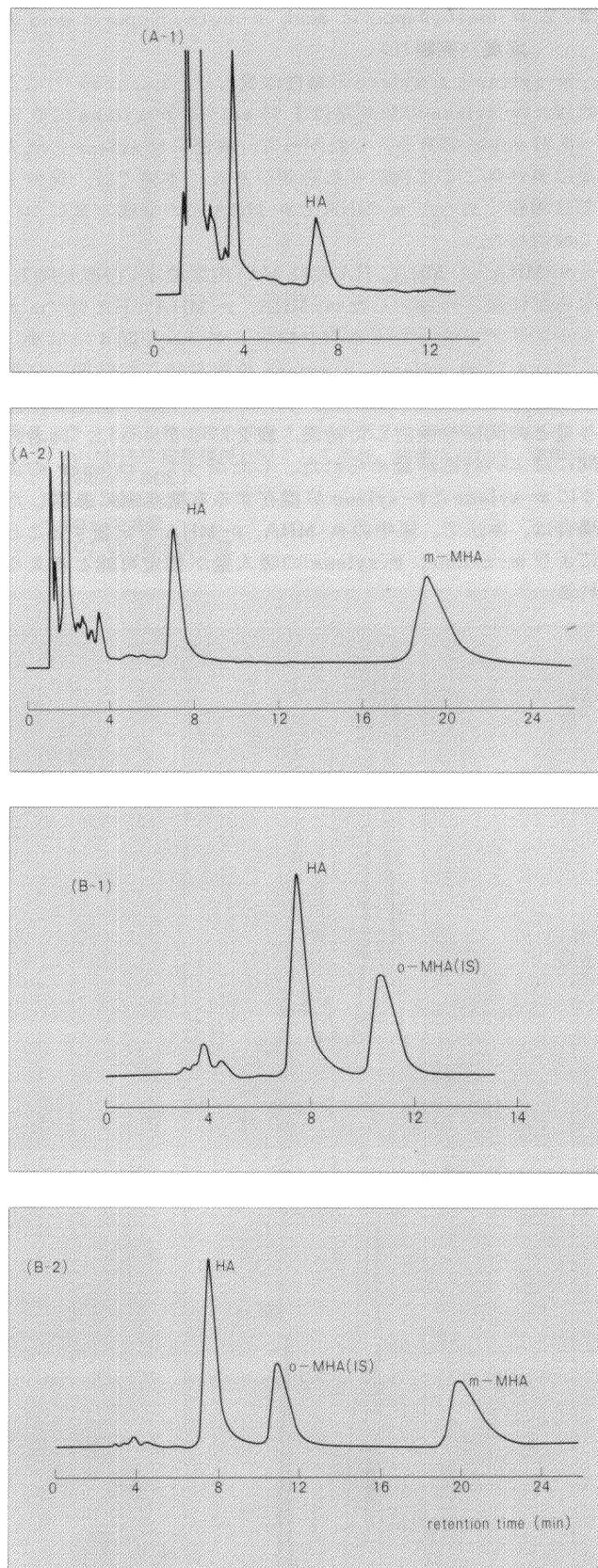


図3 toluene・m-xylene 暴露者の尿の液体クロマトグラム (実験 I)
(A-1) A法による正常尿
(A-2) A法による toluene・m-xylene 暴露尿
(B-1) B法による正常尿 (o-MHA は内部標準 (IS) として添加)
(B-2) B法による toluene・m-xylene 暴露尿

3.2 *m*-methylhippuric acid, *p*-methylhippuric acid の定量〈実験Ⅱ〉

m-xylene と *p*-xylene の毒性は異なり、Lazarew¹³⁾ によれば、*m*-xylene の致死量は 1.15 vol%，*p*-xylene は 0.35～0.81 vol% である。したがって、厳密には xylene の吸入量は異性体ごとに検討する必要がある。本稿では、実験Ⅰでは困難であった *m*-MHA と *p*-MHA との分離定量について検討した。

m-MHA、*p*-MHA、HA 及び MA (内部標準) の既知物質、ならびに尿から抽出した *m*-MHA、*p*-MHA、HA をフェナシルエステル化したときのクロマトグラムを図 4 に示す。

ラットに *m*-xylene、*p*-xylene を投与後、24 時間内に尿中に排泄された *m*-MHA、*p*-MHA 量を本法で測定し、投与量との関係を検討した結果、表 2 に示すように、両者の間にはよい対応が認められた。したがって、thinner のように *m*-xylene と *p*-xylene が混在する有機溶剤に暴露した場合は、本法で、尿中の *m*-MHA、*p*-MHA を定量することにより *m*-xylene、*p*-xylene の吸入量が推定可能と考えられる。

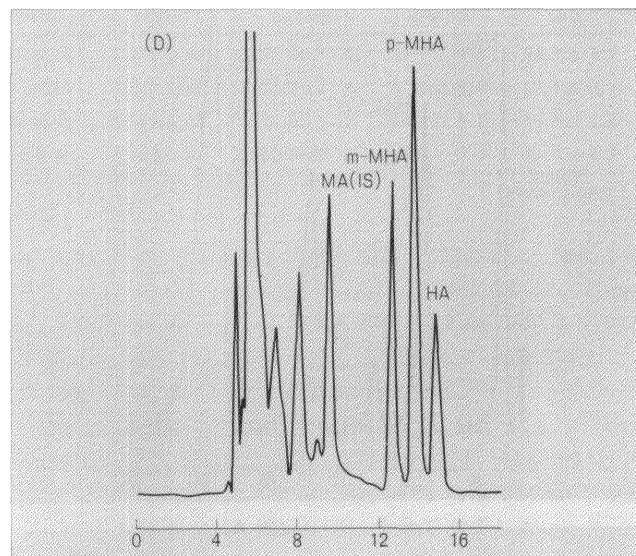
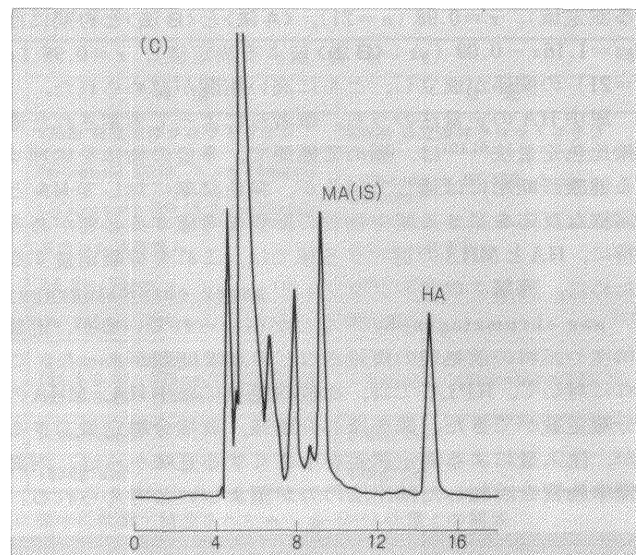
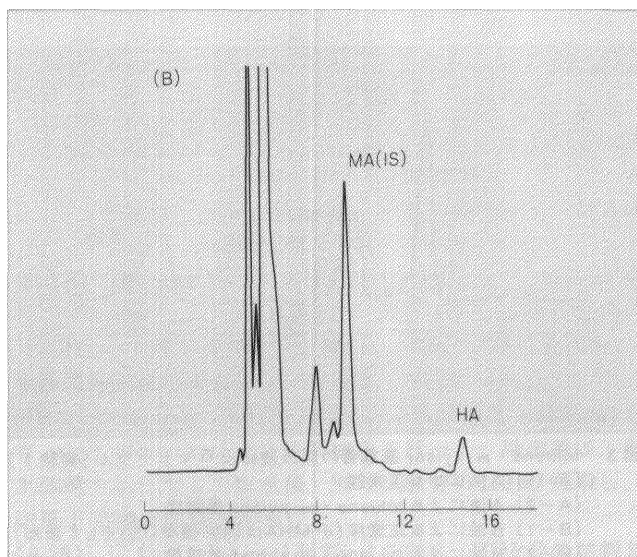
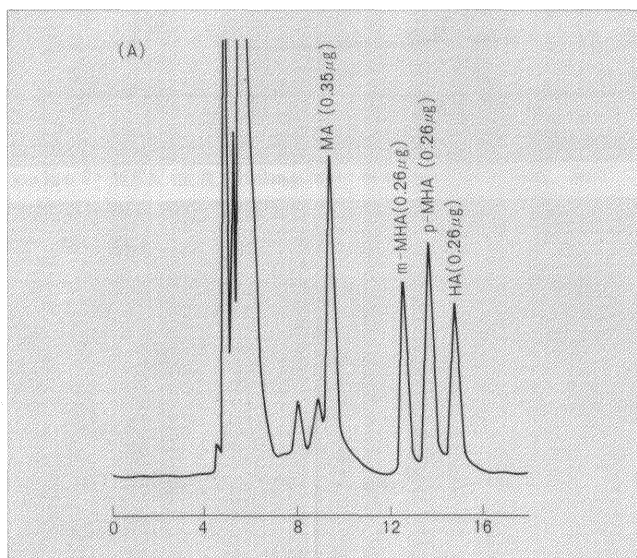


図 4 MA, *m*-MHA, *p*-MHA, HA のフェナシルエステルの液体クロマトグラム〔実験Ⅱ〕
(MA は内部標準 (IS) として添加)
(A) 既知物質
(B) 正常尿 (ヒト)
(C) 正常尿 (ラット)
(D) xylene 投与尿 (ラット)

3.3 phenylglyoxylic acid, mandelic acid 及び hippuric acid の定量〈実験Ⅲ〉

既知物質の 254nm におけるクロマトグラムは、図 5 のように、MA の 254nm での吸光度が低いため、感度が悪く、尿からの抽出液について、MA を 254nm で定量することは困難であった。

しかし、MA は短波長域のほうが吸光度が高く、225nm における吸光度は 254nm の約 14.7 倍であり、HA も 254nm より 225nm のほうが吸光度が高いため、図 5 に示すように、225nm において MA、HA を同時に定量することができた。一方、PhGA の感度は、225nm に比べて 254nm におけるほうが高いため、尿中の PhGA、MA、HA、*o*-MHA (内部標準) を one way で測定するときは、先ず、最初に溶出する PhGA のピークを 254nm で求め、分光光度計の測定波長を

225nmに切換えてMA, HA, *o*-MHAを測定すればよいことが示唆された。

また、MAは、フェナシルエステル化することにより、254nmにおける吸光度は、フェナシルエステル化前の約53倍(等モルでの比較)となり、図6のように、尿中のMA, HA, *o*-MHA(内部標準)は、抽出後、フェナシルエステル化することによっても定量が可能となった。なお、PhGAはフェナシルエステル化処理の際、分解したものと思われる、そのピークは認められなかった。〈B法〉は、〈A法〉に比べ定量感度が高く、測定値の安定性もよい〔同一試料を5回測定したときの変異係数(S.D./mean)は、例えばMAの定量において〈A法〉では0.05、〈B法〉では0.03であった〕が、PhGAだけ別に〈A法〉で測定しなければならない。

これまで、尿中のPhGA, MA, HAの定量法に関しては、比色法¹⁴⁾ polarography¹⁵⁾ isotachopheretic analysis¹⁶⁾ gas chromatography¹⁷⁾などが報告されている。比色定量法は、styrene非暴露者の尿においても非特異的な発色を呈するため、PhGA, MA, HAの定量値はHPLCに比べてかなり高い¹⁸⁾。また、gas chromatographyは、低沸点化合物にするための試料の前処理が複雑である。これに対して、HPLCは、尿を抽出するだけでPhGA, MA, HAの定量がone wayでできるという特長をもっている。

以上のように、芳香族化合物を中心とする有機溶剤の尿中代謝産物の分離定量には、HPLCが極めて簡便であり、今後、作業者の有機溶剤吸入量の定量に有効な方法として活用されることが考えられる。

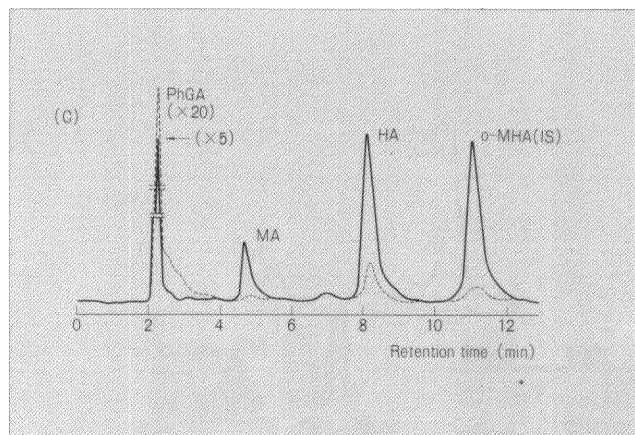
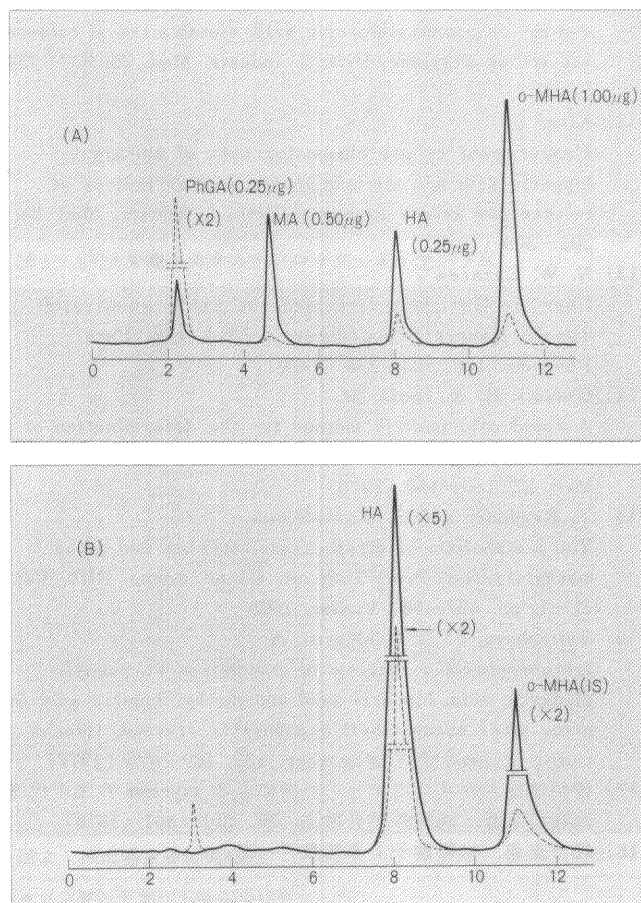
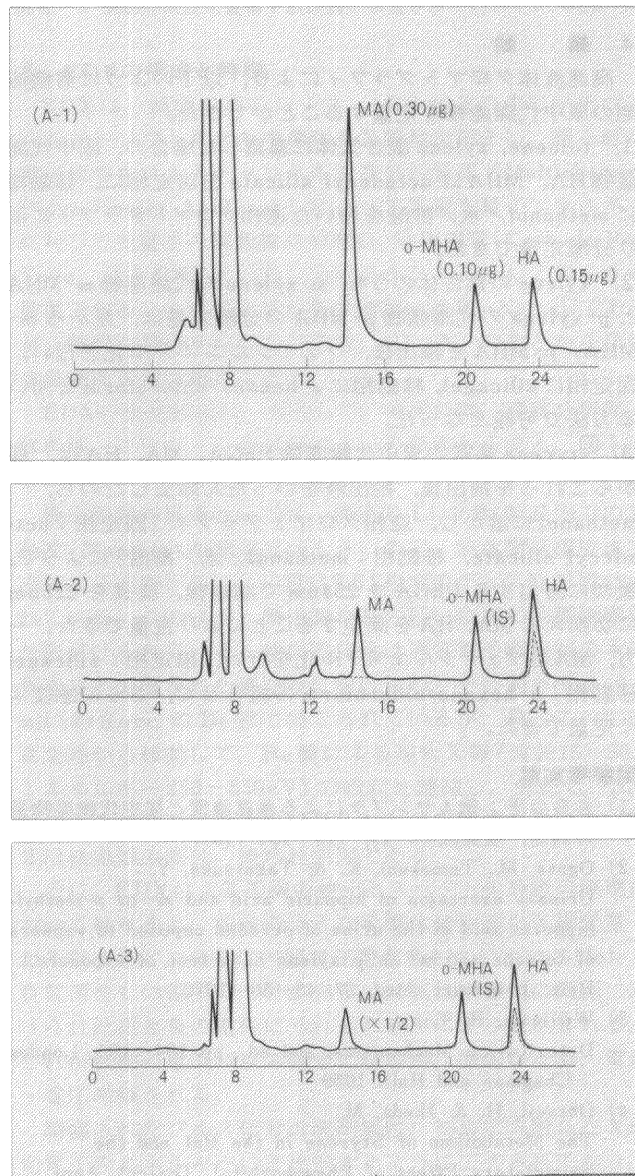


図5 ラット尿の抽出物の液体クロマトグラム〔実験Ⅲ・A法〕
(*o*-MHAは内部標準(IS)として添加。実線は225nm、破線は254nmで測定)
(A) 既知物質
(B) 正常尿
(C) styrene投与尿



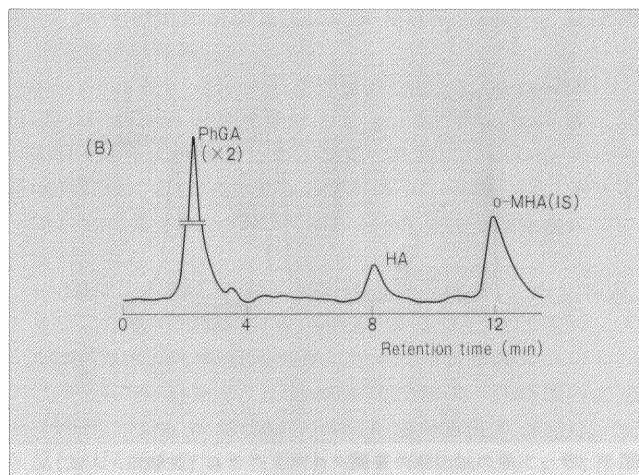


図6 尿抽出物のフェナシルエステルの液体クロマトグラム(実験Ⅲ)
(o-MHAは内部標準(1S)として添加)
(A-1) 既知物質 (B法)
(A-2) ラット尿 (B法 実線: styrene投与尿, 破線: 正常尿)
(A-3) ヒトの尿 (B法 実線: styrene暴露尿, 破線: 正常尿)
(B) ヒトの尿 (A法 実線: styrene暴露尿, 破線: 正常尿)

4. 結 論

高速液体クロマトグラフィにより、以下のように有機溶剤の尿中代謝産物を定量することができた。

- (1) toluene, xylene 混合気体に暴露した場合の、尿中代謝産物 HA, MHA は octadecyl silicate を固定相に、移動相に methanol/水/酢酸を用いた逆相クロマトグラフィにより分離定量できた。
- (2) xylene の異性体のうち、*m*-xylene の代謝産物 *m*-MHA と *p*-xylene の代謝産物 *p*-MHA の分離定量は、尿から *m*-MHA, *p*-MHA を抽出後、フェナシルエステル化を行い、固定相に silicagel, 移動相に *n*-hexane/chloroform を用いる方法で可能となった。
- (3) styrene 暴露の尿中代謝産物 PhGA, MA, HA は、尿からこれらを抽出後、抽出液をいったん除去したのち、methanol に溶かし、逆相クロマトグラフィ (固定相: octadecyl silicate, 移動相: methanol/水/酢酸) によって、最初に溶出する PhGA を 254nm で測定後、波長を 225nm に切換えて MA, HA を測定することにより定量できた。一方、MA はフェナシルエステル化を行い、固定相: silicagel, 移動相: *n*-hexane/chloroform の組合せで、さらに感度よく定量できた。

■参考文献

- 1) 吉良尚平: 個人サンブラによる暴露濃度と尿中代謝産物量の測定, 産業医学, 19, 119-131 (1977)
- 2) Ogata, M., Tomokuni, K. & Takatsuka, Y.: Urinary excretion of hippuric acid and *m*- or *p*-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and *m*- or *p*-xylene as a test of exposure, Brit. J. industr. Med. 27, 43-50 (1970)
- 3) Williams, R. T.: Detoxication Mechanisms, 2nd ed., pp. 194-196, London: Chapman and Hall, 1959
- 4) Ohtsuji, H. & Ikeda, M.: The Metabolism of Styrene in the Rat and the Stimulatory Effect of Phenobarbital, Toxicol. Appl.

Pharmacol. 18, 321-328 (1971)

- 5) Ogata, M., Sugihara, R. & Kira, S.: Quantitative Determination of Urinary Hippuric Acid and *m*- or *p*-Methylhippuric Acid as Indices of Toluene and *m*- or *p*-Xylene Exposure by High Performance Liquid Chromatography, Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. 39, 199-206 (1977)
- 6) Sugihara, R. & Ogata, M.: Quantitation of Urinary *m*- and *p*-Methylhippuric Acids as Indices of *m*- and *p*-Xylene Exposure, Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. 41, 281-286 (1978)
- 7) Ogata, M. & Sugihara, R.: High Performance Liquid Chromatographic Procedure for Quantitative Determination of Urinary Phenylglyoxylic, Mandelic and Hippuric Acids as Indices of Styrene Exposure, Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. 42, 11-19 (1978)
- 8) 山崎吉郎, 緒方正名: phenol 及び *o*-xylene の尿中代謝産物の高速液体クロマトグラム, 第51回日本産業衛生学会講演集, P. 414, 1978
- 9) Ogata, M. & Sugihara, R.: An improved direct colorimetric method for the quantitative analysis of urinary hippuric acid as an index of toluene exposure, Acta Med. Okayama. 31, 235-242 (1977)
- 10) Tomokuni, K. & Ogata, M.: Direct Colorimetric Determination of Hippuric Acid in Urine, Clin. Chem. 18, 349-351 (1972)
- 11) Ogata, M., Tomokuni, K. & Takatsuka, Y.: Quantitative determination in urine of hippuric acid and *m*- or *p*-methylhippuric acid, metabolites of toluene and *m*- or *p*-xylene, Brit. J. industr. Med. 26, 330-334 (1969)
- 12) Kira, S.: Measurement by gas chromatography of urinary hippuric acid and methylhippuric acid as indices of toluene and xylene exposure, Brit. J. industr. Med. 34, 305-309 (1977)
- 13) N. W. Lazarew: Über die Giftigkeit verschiedener Kohlenwasserstoffdämpfe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 143, 223-233 (1929)
- 14) Ohtsuji, H. & Ikeda, M.: A rapid colorimetric method for the determination of phenylglyoxylic and mandelic acids, Brit. J. industr. Med. 27, 150-154 (1970)
- 15) Z. Bardoděj and E. Bardodějová: The metabolism of ethylbenzene, styrene and alpha-methylstyrene. Proc. 15th int. Congr. occup. Hlth, Vol. II-1. pp. 457-460 Vienna, 1966
- 16) Sollenberg, J. & Baldesten, A.: Isotachophoretic analysis of mandelic acid, phenylglyoxylic acid, hippuric acid and methylhippuric acid in urine after occupational exposure to styrene, toluene and/or xylene, J. Chromatogr. 132, 469-476 (1977)
- 17) 佐伯孝雄: ガスクロマトグラフによる styrene の尿中代謝産物の定量, 岡山医学会雑誌, 88, 397-401 (1976)
- 18) 緒方正名, 杉原黎子: 未発表データ

解 説

最近のエネルギー分散形X線分析装置

原 行一* 篠原 実*

1. はじめに

エネルギー分散形X線分析装置は、電子顕微鏡の普及に伴い、最近、形態観察ばかりでなく、元素分析も併用される機会も増し、研究面・実用面の広い分野で利用されるようになった。すでにアメリカでは波長分散X線分光法を用いた分析手法に代わる勢いであり、日本でもX線用EDX(後出)では150台程度が使用されているものと思われる。本稿では、エネルギー分散形X線分析装置(Energy Dispersive type X-Ray Analyzer, 以下EDXという)の原理、特徴、使用上の留意点及び応用例などについて述べ、特に定量分析について、最近の測定例をご紹介します。

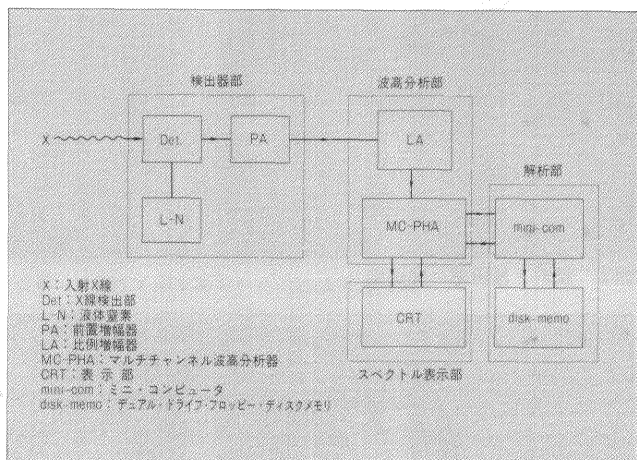


図1 EDX定量システム・ブロック・ダイアグラム

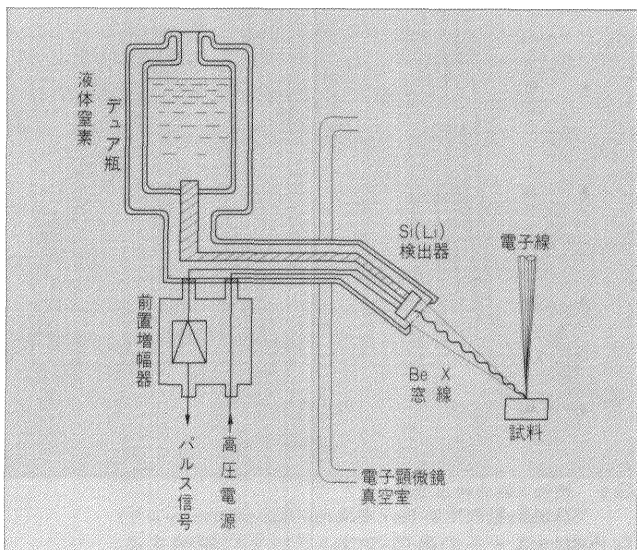


図2 検出器主要部概略図

* 日立製作所 那珂工場 応用技術センタ

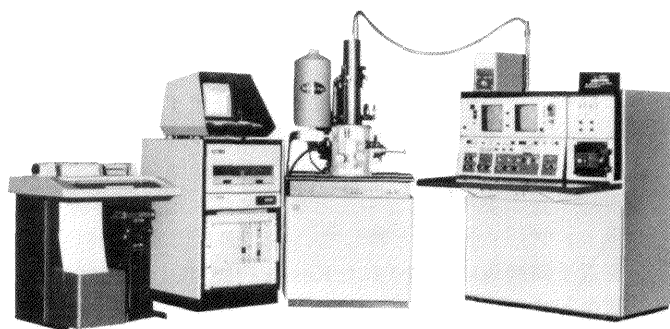


図3 S-550形日立走査電子顕微鏡に装着されたkeveX MODEL 70000

2. EDXの構成と特徴

EDXは、純度の高いシリコン(Si)結晶の中にリチウム(Li)をドリフトさせた半導体をX線検出部とし、得られた電気信号をマルチチャンネル波高分析装置(Multichannel Pulse Height Analyzer)によってX線光子エネルギーに対して光子数の個数毎に分離し、陰極線管(Cathode Ray Tube, 以下CRTという)上にスペクトルとして表示する装置である。分析可能な元素の種類は通常 ^{11}Na ~ ^{92}U であるが、特殊な構造をもつものでは、 ^6C , ^7N , ^8O などから発生する超軟X線も検出できる。

EDXの全体構成は、大別して、検出器部、波高分析部、解析部、スペクトル表示部の4つの要素から成る。図1にそのブロックダイアグラムを示す。

検出器部の構成としては、前述のLiのSi結晶内での易動度(Mobility)が室温では大きいので、液体窒素温度まで冷却する必要がある。一般に7.5l程度のデュア瓶が設けられている。このほか、検出器自身の近い位置に前置増幅器が取り付けられている。検出器自体は通常電子顕微鏡の本体真空室と分離された真空室に設けられ、その間を厚さ0.3mil(約 $8\mu\text{m}$)のBe窓で隔てられているが、最近この窓を真空外から移動して、Be膜による超軟X線(波長 $15\sim 50\text{\AA}$:エネルギー $250\sim 850\text{eV}$)の吸収を軽減し、前記C, N, Oなどの特性X線も検出できるものが市販されている。図2は検出器主要部の概略説明図である。

次に、EDXによるX線の検出とスペクトル分離の原理について触れると、前述のような半導体検出器にX線光子が入射すると、半導体内部で正電荷をもついわゆるHoleと負電荷をもつ電子のペアが発生し、板状半導体の両面に設けられた正と負の電極にそれぞれ電界により引込まれる。これが最初の電気パルス信号となるが、微弱なため、電流-電圧増幅される。

増幅されたパルス信号の波高値は、初めに入射したX線光子のエネルギーに正比例するように工夫されており、

波高分析器に入るパルス信号の高さは、光量子エネルギー ϵ が 2keV と 6keV では 3 倍になる。光量子の波長 λ でいえば実用的には $\lambda(\text{\AA}) = 12.4/\epsilon(\text{keV})$ からわかるように光量子エネルギー ϵ に逆比例するが、波長 λ が長くなるほどパルス波高値は低くなる。一般に、分析の場合は、多元素から構成された試料から、いろいろなエネルギーをもった多数の光量子が発生する。したがって、次から次へと検出器に飛び込んできた光量子は、そのエネルギーに対応した波高値のパルス信号となって検出される。このようなパルス信号はそれぞれの波高値とパルスの数毎に電気的に分類することによって、スペクトルとして表示することができるようになる。この短時間内に「電気的に分類する」装置のことをマルチ・チャンネル波高分析器と称し、「パルス信号の波高値を横軸に、パルス信号の数ある時間積分して数えて縦軸に表示する」装置のことをスペクトル表示装置（通称ディスプレイ装置）と称している。図 3 に S-550 形日立走査電子顕微鏡に装着された Kevex 社製 MODEL 7000Q の外観を示す。

EDX の特徴は、通常波長分散形 X 線分析装置（Wavelength Dispersive type X-Ray Analyzer, 以下 WDX という）と対比される。使用上から、(a) 可能な元素分析範囲、(b) スペクトル分解能、(c) X 線を発生させる場合に試料に照射する電子流量に基づく試料の損傷やコンタミネーション、(d) 最大分析面積、(e) 元素の検出限界、(f) データの取込みや処理の所要時間、(g) 試料の設定誤差、(h) 操作性や保守性、などである。これらの諸項目の一覧表を表 1 に示す。この表からわかるように、両者間には一長一短があるが、全体としてはここ数年の間にアメリカでは EDX が主流を占める状況であり、今後ますますこの傾向が広がることは間違いない。日本では、現在、EDX と WDX のコンビネーションで使用される場合もある。すなわち、実用上 EDX が 1 台と超軟 X 線検出用 WDX が 1 台との組合せである。しかし、いずれにしても、EDX が主流となりつつあるのは、表 1 の長所の中でも、定量分析を含めた測定効率が WDX に比べて圧倒的にスピード豊かである点にあり、測定結果のフィードバックが桁違いであることに由来しているといっても過言でない。しかし、ここで注意しなければならないことは、EDX の粒子線検出に対して立体角が広いこと、試料面から後方散乱する電子に対しても十分考慮された電子顕微鏡でなければ、EDX の真の測定効果をあげることができないことである。換言すれば、EDX は「ちょっと取付けばよい」というものではない。不要なバックグラウンドとなる諸因子を最少にした電子顕微鏡でなければ EDX を使いこなすことができないことは自明の理である。

なお、EDX に対して二・三の事項に触れておくと、一つは X 線発生源が検出器に対する立体角であり、二つには検出器の検出効率である。図 4 に立体角を求める関係図を示し、図 5 に検出器の光量子エネルギーに対する効率を示す（Kevex 社刊：“X-Ray Energy Spectrometry”より抜す）。図 5 で、一般に Be 窓の厚みは 0.3mil 、検出器自身の厚みは 3mm が多く使用されている。

3. 使用上の注意すべき事項

電子顕微鏡による分析で、基本的を知っておかなければ

表 1 EDX と WDX の一般的比較

項 目	EDX	WDX	備 考
a 元素分析範囲	$11\text{Na} \sim 92\text{U}$ ($\text{eC} \sim \text{eF}$)	$5\text{B} \sim 92\text{U}$ (LiBe)	() 内は option で可能
b スペクトル分解能	$146\text{eV}(10\text{mm}^2)$ $148\text{eV}(30\text{mm}^2)$	$\sim 13\text{eV}$	Mn-K α 線の FWHM のエネルギー幅
c プローブ電流	$10^{-11} \sim 10^{-9}\text{A}$	$10^{-9} \sim 10^{-6}\text{A}$	EDX は試料ダメージやコンタミネーションが少ない。
d 最大分析面積	$\sim 5\text{mm}$ 四角	$\sim 0.4\text{mm}$ 四角	一般的な値を示す。
e 元素の検出限界	数 $1,000\text{ppm}$	数 100ppm	均質分布の場合。元素の種類と分布により異なる。
f 測定時間	数 $10 \sim$ 数 100 秒	20 分 $\sim$ 1.5 時間	
g 試料設定の許容量	数 mm 以内	数 μm 以内	
h 操作性	タイプライターと同等	タイプライターより複雑	
保守性	液体窒素要	液体窒素不要	1 l/day 程度

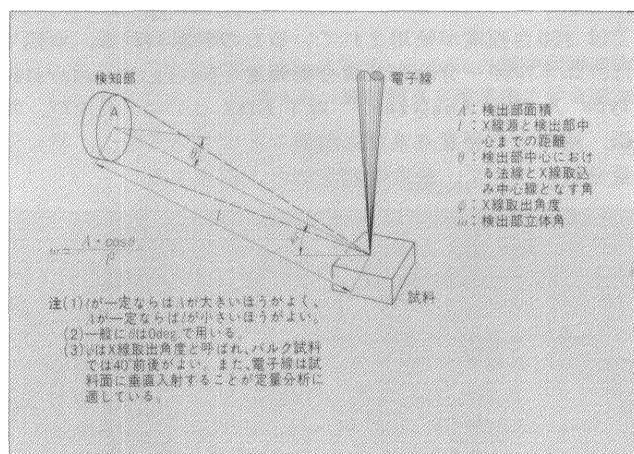


図 4 試料と検出部の関係図

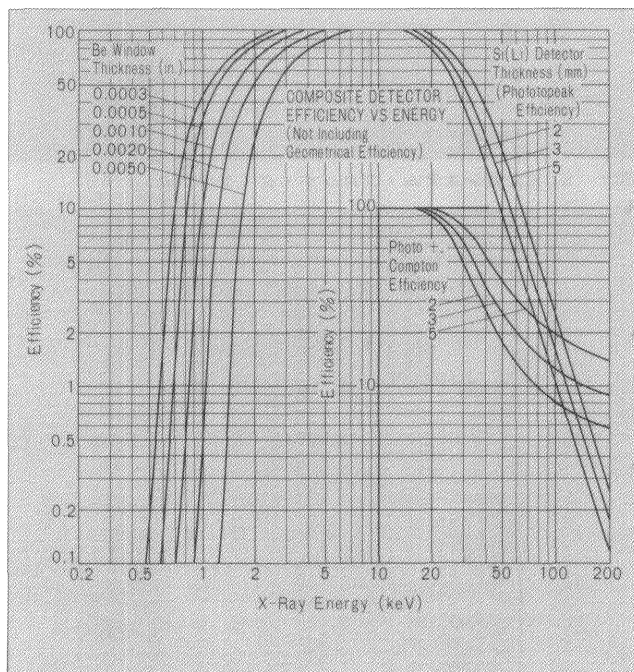


図 5 特性 X 線の検出効率

(kevex 社刊：X-Ray Energy Spectrometry より)

ならない二・三の事項について以下に説明する。

3.1 分析に使用する電子の加速電圧

試料を構成する元素は、混合物であれ化合物であれ、特

性X線を発生させるのに必要な最低のエネルギーがある。一方、特性X線と連続X線に対する実験式から、X線的なS-N比、すなわちP-B比（P：Peak, B：Background）は二者のX線強度の比で示され、この値Qの大きいほうがきれいなX線といえる。図6は、横軸に前記最低必要限のエネルギー、すなわち励起電位 E_K を単位とし、そのエネルギーの倍数で加速電圧 E_0 との比を示している。つまり E_K に対し何倍の E_0 で照射電子にエネルギーを与えるかを示している。また、縦軸はX線の質を表わす指標で、前記のように大きいほうがよい。パラメータを二・三の元素にとってあるが、中位の原子番号の元素では、 E_K に対し3ないし5倍の E_0 をとるのが一般的であるが、軽元素では10倍程度とすることが多い。最近では、後述の特性X線の発生源をできるだけ小さくする意味で、低い E_0 で使用する傾向がある。

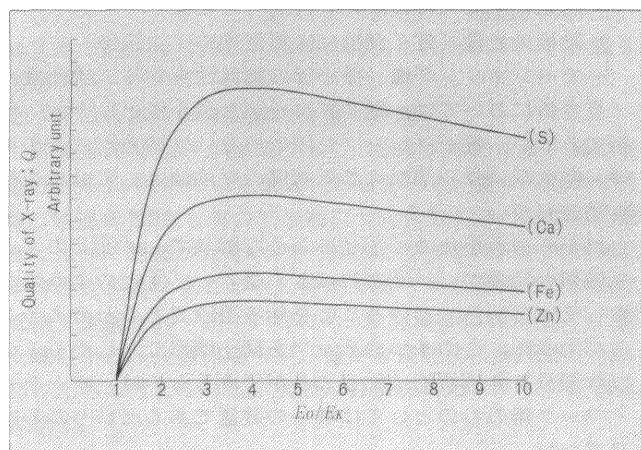


図6 良質なX線を得るための加速電圧指標

3.2 特性X線の発生領域

試料にあるエネルギーをもった電子が入射すると、試料を構成する原子との相互作用で散乱が生じ、特性X線が発生するが、散乱域すなわち特性X線の発生域、特に発生の最大深さを知っておくことは分析上極めて重要である。1963年ZieboldやOgilvieらによって重元素に対してはHemispherical（半球状）から、軽元素に対してはTear Drop（涙滴状）からとされていたが、最近ではすべてTear Dropとされている。特性X線の発生の飛程はCritical Range（臨界飛程）とか、Effective Range（有効飛程）—Birksによる—と呼ばれているが、Birksはグラフで、また、Thomson—Whindington及びCastaingは計算式で飛程の大きさを示している。図7にBirksの有効飛程のグラフを示す。また、式(1)にThomson—Whindingtonの関係式を、式(2)にCastaingの式を示す。

Thomson—Whindingtonの式

$$t = \frac{E_0^2 - E_K^2}{\beta \cdot \rho} \quad (1)$$

ここに E_0 ：加速電圧

E_K ：励起電位

β ： $E_0 = 10\text{kV}$ のとき 2.3×10^5

15kV " 2.6×10^5

20kV " 2.9×10^5

ρ ：密度（ g/cm^3 ）

Castaingの式

$$t = 0.033 (E_0^7 - E_K^7) \cdot \frac{\bar{A}}{\rho \bar{Z}} \quad (2)$$

ここに $\bar{A}$ ：平均原子量

$\bar{Z}$ ：平均密度

いずれにしても、図8に示すような試料において分析する場合には、(a)では見掛けよりも得られるX線強度は低く、(b)では逆に高く得られる。また、(c)のような場合には分析がむずかしくなるが、試料の分析位置を多数点にわたり測定すると、試料調整を再検討することなどが必要となる。

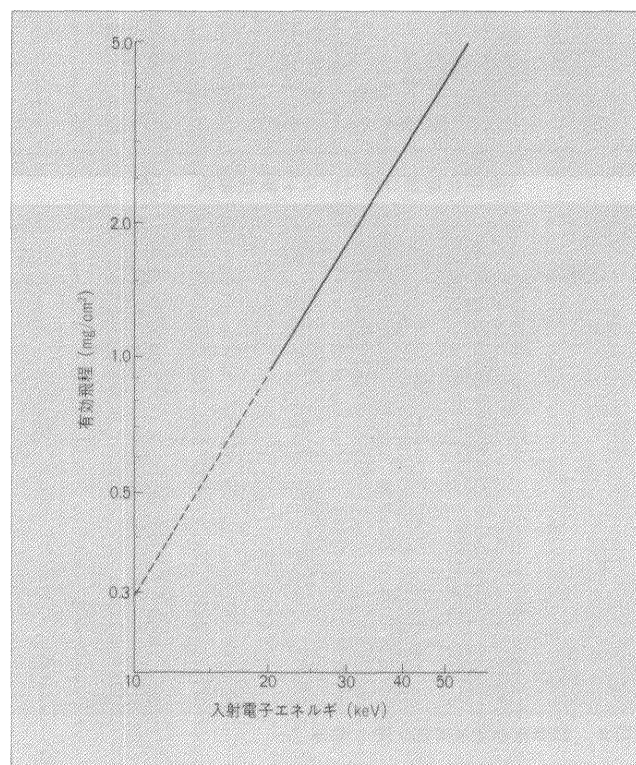
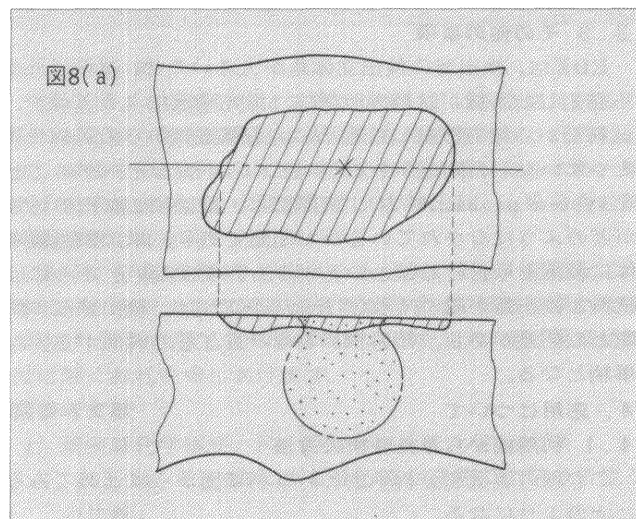


図7 Birksによる有効飛程のグラフ

文献：Electron Probe Intensity Calculations for 20—50kV Electrons. J. A. P., 33, 233 (1962)



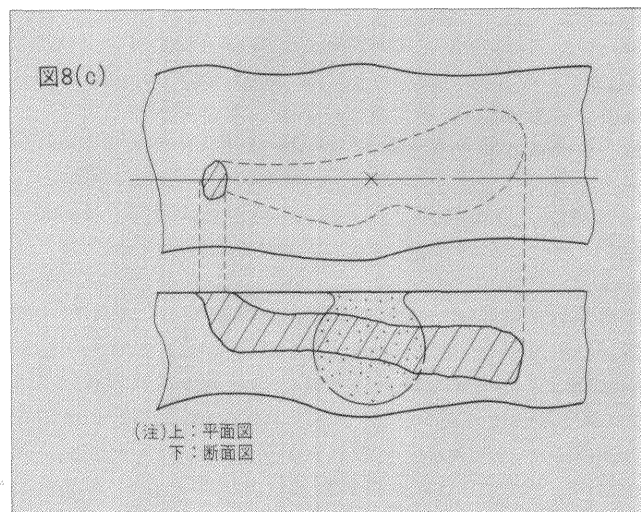
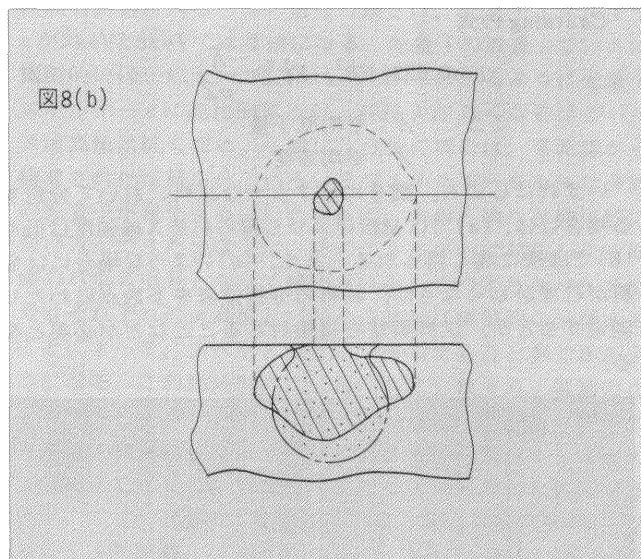


図8 観察形状とX線発生源の関係

3.3 その他の事項

EDXは、検出器の検出立体角が大きいため、試料以外から発生したX線が試料を照射し、蛍光励起によるX線や、試料面から後方散乱した電子による構造物からのX線を捕えやすいなどの問題があるが（これら不要なピークのことをsystem peaksと呼ぶ）、実際には、装置にこれらの対策がどのようになされているかが問題であり、単に顕微鏡本体に装置を取付けばよいというものではない。さらには、試料と検出器が離れて取付けられることは、検出感度の問題とも関連があり、結局検出X線の質と量の両面が重要な事柄となる。

4. 応用について

4.1 利用面からみた分析の方法

この種の装置を分析手法という利用面からまとめてみると次のようになる。

A. 点分析 [Point Analysis]

- 定性分析 — 波長分散分光 (WDX法)
- エネルギー分散分光 (EDX法)
- 定量分析 — 検量線法
- ZAF法 (主に金属間化合物を対象)
- Bence-Albee法 (酸素との化合物を対象)

B. 線分析 [Line Analysis]

- 電氣的 (静止試料上を電子プローブが一次元走査)
- 機械的 (静止電子プローブに対し試料が一次元走査)

C. 面分析 [Surface Analysis & Observation]

- 特性X線像 (元素分布像) (特定元素の二次元分布像)
- 二次電子像 (焦点深度の深い二次元像)
- 吸収電子像 (組成的二次元像)
- 反射電子像 (後方散乱電子像) (凹凸表示二次元像)
- 透過電子像 (薄膜試料の透過二次元像)
- 陰極冷光像 (電子刺激による蛍光の二次元像)
- チャンネリング像 (微小部の結晶性を知る二次元像)

点分析においては、電子プローブを最小径として「点」分析するほか、電子プローブを円形あるいは四角形に若干広げ、完全な「点」でなくある範囲の平均値として分析を行う場合も多い。

以上の分析手法は「①どのような形状で」、「②どのような種類の元素が」、「③どれほどの量で」、「④どのように分布しているか?」ということを知る手段であると考えることができる。この4つのテーマを同一機器で、しかもミクロな部分を非破壊的に知ることができるものは、ルーチン・ワーク用のものとしては唯一の装置であるといっても過言でない。

4.2 EDXを用いた定量分析例

(1) 鉱物の定量分析例

鉱物は各種の酸化物、ケイ酸塩などが含まれており、ここではKaersutite(天然物)¹⁾の分析例を示す。表2に化学

表2 ケルースタイトの分析結果比較(%)

分析対象 化合物	化学分析	WDX	EDX	化学分析と EDX分析の差
Na ₂ O	2.80	2.93	2.62	-0.18
MgO	11.36	11.7	11.65	+0.29
Al ₂ O ₃	14.26	14.4	14.42	+0.16
SiO ₂	39.51	39.9	39.52	+0.01
K ₂ O	1.59	1.67	1.69	+0.1
CaO	10.12	9.89	9.53	-0.59
TiO ₂	5.64	5.74	5.78	+0.14
FeO Fe ₂ O ₃	12.49	12.0	12.75	+0.25
MnO	0.09	0.11	(0.09)	(0)
H ₂ O ⁺	1.34	(1.34)	(1.34)	(0)
その他	0.45	(0.45)	(0.45)	(0)
合 計	99.65	100.11	99.85	+0.2

(注) 1) ()内の値は参考文献にならった。



分析及びWDX付XMAで分析した結果とEDXによる分析結果との比較を示す。EDX分析では電子の加速電圧15kV、電子プローブの試料に対する入射角90°(deg)、X線取出角度38°(deg)、プローブ電流100pA、定プローブ電流法で測定した。使用した装置はS-550形日立走査電子顕微鏡とKevex社製7000Q・エネルギー分散形X線分析装置である。その結果、EDXによる定量分析は困難であるとの常識は破られ、表からわかるように化学分析値に対して2桁の含有率の場合では±0.3%以内に、また1桁の場合では±0.2%以内の値が得られている。他の測定点に対しても前者では±0.5%以内に、後者では±0.2%以内に入る。表2では合計値が97.97%となっているが、MnO、H₂O⁺、その他などを化学分析値と同等値(1.88%)¹⁾とすれば総計99.85%となり実用上は問題ないと考えられる。

この程度の試料ならば、1回の測定が、開始から打出し終了まで約15分である。実際に打出されたチャートを表3に示す。

(2) 非磁性高マンガン鋼の定量分析例

金属間化合物の分析例として、非磁性高マンガン鋼の定量分析をEDXを用いて測定した例を示す。表4に化学分析値と前述のEDXを用いて分析した比較を示す。全般的に鉱物に比べて誤差が大きいが、これはそれぞれの分析部位の平均密度が異なることや、特性X線の発生領域が近似的に鉱物：金属≒20～30：1のため(発生域を球状と仮定)、発生域の小さい金属のほうが、僅かな偏析による誤差が生じ易いためと考えられる。実際に打出されたチャートを表5に示す。

表3 鉱物の定量分析例

SPECTRUM - UNKNOWN									
10 EV/CH									
200. SEC. 0.00. TIME									
UNKNOWN ANALYSIS RESULTS									
	CALIB.	PEAK							
	ENERGY	ENERGY	CTS/SEC	PERCENT					
				ERROR					
1 Si (2x14) K-ALPHA 1	1.740	1.740	21.020	21.2					
2 Si (2x14) K-ALPHA 2	1.740	1.740	11.020	11.1					
3 Si (2x14) K-ALPHA 3	1.740	1.740	11.020	11.1					
4 Mn (2x25) K-ALPHA 1	1.720	1.720	11.020	11.1					
5 Mn (2x25) K-ALPHA 2	1.720	1.720	11.020	11.1					
6 Fe (2x26) K-ALPHA 1	1.740	1.740	11.020	11.1					
7 Fe (2x26) K-ALPHA 2	1.740	1.740	11.020	11.1					
8 Fe (2x26) K-ALPHA 3	1.740	1.740	11.020	11.1					
9 Ni (2x28) K-ALPHA 1	1.740	1.740	11.020	11.1					
10 Ni (2x28) K-ALPHA 2	1.740	1.740	11.020	11.1					
11 Ni (2x28) K-ALPHA 3	1.740	1.740	11.020	11.1					
12 Cr (2x24) K-ALPHA 1	1.740	1.740	11.020	11.1					
13 Cr (2x24) K-ALPHA 2	1.740	1.740	11.020	11.1					
14 Cr (2x24) K-ALPHA 3	1.740	1.740	11.020	11.1					
15 Cr (2x24) K-ALPHA 4	1.740	1.740	11.020	11.1					
16 Cr (2x24) K-ALPHA 5	1.740	1.740	11.020	11.1					
17 Cr (2x24) K-ALPHA 6	1.740	1.740	11.020	11.1					
18 Cr (2x24) K-ALPHA 7	1.740	1.740	11.020	11.1					
19 Cr (2x24) K-ALPHA 8	1.740	1.740	11.020	11.1					
20 Cr (2x24) K-ALPHA 9	1.740	1.740	11.020	11.1					
21 Cr (2x24) K-ALPHA 10	1.740	1.740	11.020	11.1					
22 Cr (2x24) K-ALPHA 11	1.740	1.740	11.020	11.1					
23 Cr (2x24) K-ALPHA 12	1.740	1.740	11.020	11.1					
24 Cr (2x24) K-ALPHA 13	1.740	1.740	11.020	11.1					
25 Cr (2x24) K-ALPHA 14	1.740	1.740	11.020	11.1					
26 Cr (2x24) K-ALPHA 15	1.740	1.740	11.020	11.1					
27 Cr (2x24) K-ALPHA 16	1.740	1.740	11.020	11.1					
28 Cr (2x24) K-ALPHA 17	1.740	1.740	11.020	11.1					
29 Cr (2x24) K-ALPHA 18	1.740	1.740	11.020	11.1					
30 Cr (2x24) K-ALPHA 19	1.740	1.740	11.020	11.1					
31 Cr (2x24) K-ALPHA 20	1.740	1.740	11.020	11.1					
32 Cr (2x24) K-ALPHA 21	1.740	1.740	11.020	11.1					
33 Cr (2x24) K-ALPHA 22	1.740	1.740	11.020	11.1					
34 Cr (2x24) K-ALPHA 23	1.740	1.740	11.020	11.1					
35 Cr (2x24) K-ALPHA 24	1.740	1.740	11.020	11.1					
36 Cr (2x24) K-ALPHA 25	1.740	1.740	11.020	11.1					
37 Cr (2x24) K-ALPHA 26	1.740	1.740	11.020	11.1					
38 Cr (2x24) K-ALPHA 27	1.740	1.740	11.020	11.1					
39 Cr (2x24) K-ALPHA 28	1.740	1.740	11.020	11.1					
40 Cr (2x24) K-ALPHA 29	1.740	1.740	11.020	11.1					
41 Cr (2x24) K-ALPHA 30	1.740	1.740	11.020	11.1					
42 Cr (2x24) K-ALPHA 31	1.740	1.740	11.020	11.1					
43 Cr (2x24) K-ALPHA 32	1.740	1.740	11.020	11.1					
44 Cr (2x24) K-ALPHA 33	1.740	1.740	11.020	11.1					
45 Cr (2x24) K-ALPHA 34	1.740	1.740	11.020	11.1					
46 Cr (2x24) K-ALPHA 35	1.740	1.740	11.020	11.1					
47 Cr (2x24) K-ALPHA 36	1.740	1.740	11.020	11.1					
48 Cr (2x24) K-ALPHA 37	1.740	1.740	11.020	11.1					
49 Cr (2x24) K-ALPHA 38	1.740	1.740	11.020	11.1					
50 Cr (2x24) K-ALPHA 39	1.740	1.740	11.020	11.1					
51 Cr (2x24) K-ALPHA 40	1.740	1.740	11.020	11.1					
52 Cr (2x24) K-ALPHA 41	1.740	1.740	11.020	11.1					
53 Cr (2x24) K-ALPHA 42	1.740	1.740	11.020	11.1					
54 Cr (2x24) K-ALPHA 43	1.740	1.740	11.020	11.1					
55 Cr (2x24) K-ALPHA 44	1.740	1.740	11.020	11.1					
56 Cr (2x24) K-ALPHA 45	1.740	1.740	11.020	11.1					
57 Cr (2x24) K-ALPHA 46	1.740	1.740	11.020	11.1					
58 Cr (2x24) K-ALPHA 47	1.740	1.740	11.020	11.1					
59 Cr (2x24) K-ALPHA 48	1.740	1.740	11.020	11.1					
60 Cr (2x24) K-ALPHA 49	1.740	1.740	11.020	11.1					
61 Cr (2x24) K-ALPHA 50	1.740	1.740	11.020	11.1					
62 Cr (2x24) K-ALPHA 51	1.740	1.740	11.020	11.1					
63 Cr (2x24) K-ALPHA 52	1.740	1.740	11.020	11.1					
64 Cr (2x24) K-ALPHA 53	1.740	1.740	11.020	11.1					
65 Cr (2x24) K-ALPHA 54	1.740	1.740	11.020	11.1					
66 Cr (2x24) K-ALPHA 55	1.740	1.740	11.020	11.1					
67 Cr (2x24) K-ALPHA 56	1.740	1.740	11.020	11.1					
68 Cr (2x24) K-ALPHA 57	1.740	1.740	11.020	11.1					
69 Cr (2x24) K-ALPHA 58	1.740	1.740	11.020	11.1					
70 Cr (2x24) K-ALPHA 59	1.740	1.740	11.020	11.1					
71 Cr (2x24) K-ALPHA 60	1.740	1.740	11.020	11.1					
72 Cr (2x24) K-ALPHA 61	1.740	1.740	11.020	11.1					
73 Cr (2x24) K-ALPHA 62	1.740	1.740	11.020	11.1					
74 Cr (2x24) K-ALPHA 63	1.740	1.740	11.020	11.1					
75 Cr (2x24) K-ALPHA 64	1.740	1.740	11.020	11.1					
76 Cr (2x24) K-ALPHA 65	1.740	1.740	11.020	11.1					
77 Cr (2x24) K-ALPHA 66	1.740	1.740	11.020	11.1					
78 Cr (2x24) K-ALPHA 67	1.740	1.740	11.020	11.1					
79 Cr (2x24) K-ALPHA 68	1.740	1.740	11.020	11.1					
80 Cr (2x24) K-ALPHA 69	1.740	1.740	11.020	11.1					
81 Cr (2x24) K-ALPHA 70	1.740	1.740	11.020	11.1					
82 Cr (2x24) K-ALPHA 71	1.740	1.740	11.020	11.1					
83 Cr (2x24) K-ALPHA 72	1.740	1.740	11.020	11.1					
84 Cr (2x24) K-ALPHA 73	1.740	1.740	11.020	11.1					
85 Cr (2x24) K-ALPHA 74	1.740	1.740	11.020	11.1					
86 Cr (2x24) K-ALPHA 75	1.740	1.740	11.020	11.1					
87 Cr (2x24) K-ALPHA 76	1.740	1.740	11.020	11.1					
88 Cr (2x24) K-ALPHA 77	1.740	1.740	11.020	11.1					
89 Cr (2x24) K-ALPHA 78	1.740	1.740	11.020	11.1					
90 Cr (2x24) K-ALPHA 79	1.740	1.740	11.020	11.1					
91 Cr (2x24) K-ALPHA 80	1.740	1.740	11.020	11.1					
92 Cr (2x24) K-ALPHA 81	1.740	1.740	11.020	11.1					
93 Cr (2x24) K-ALPHA 82	1.740	1.740	11.020	11.1					
94 Cr (2x24) K-ALPHA 83	1.740	1.740	11.020	11.1					
95 Cr (2x24) K-ALPHA 84	1.740	1.740	11.020	11.1					
96 Cr (2x24) K-ALPHA 85	1.740	1.740	11.020	11.1					
97 Cr (2x24) K-ALPHA 86	1.740	1.740	11.020	11.1					
98 Cr (2x24) K-ALPHA 87	1.740	1.740	11.020	11.1					
99 Cr (2x24) K-ALPHA 88	1.740	1.740	11.020	11.1					
100 Cr (2x24) K-ALPHA 89	1.740	1.740	11.020	11.1					
101 Cr (2x24) K-ALPHA 90	1.740	1.740	11.020	11.1					
102 Cr (2x24) K-ALPHA 91	1.740	1.740	11.020	11.1					
103 Cr (2x24) K-ALPHA 92	1.740	1.740	11.020	11.1					
104 Cr (2x24) K-ALPHA 93	1.740	1.740	11.020	11.1					
105 Cr (2x24) K-ALPHA 94	1.740	1.740	11.020	11.1					
106 Cr (2x24) K-ALPHA 95	1.740	1.740	11.020	11.1					
107 Cr (2x24) K-ALPHA 96	1.740	1.740	11.020	11.1					
108 Cr (2x24) K-ALPHA 97	1.740	1.740	11.020	11.1					
109 Cr (2x24) K-ALPHA 98	1.740	1.740	11.020	11.1					
110 Cr (2x24) K-ALPHA 99	1.740	1.740	11.020	11.1					
111 Cr (2x24) K-ALPHA 100	1.740	1.740	11.020	11.1					
112 Cr (2x24) K-ALPHA 101	1.740	1.740	11.020	11.1					
113 Cr (2x24) K-ALPHA 102	1.740	1.740	11.020	11.1					
114 Cr (2x24) K-ALPHA 103	1.740	1.740	11.020	11.1					
115 Cr (2x24) K-ALPHA 104	1.740	1.740	11.020	11.1					
116 Cr (2x24) K-ALPHA 105	1.740	1.740	11.020	11.1					
117 Cr (2x24) K-ALPHA 106	1.740	1.740	11.020	11.1					
118 Cr (2x24) K-ALPHA 107	1.740	1.740	11.020	11.1					
119 Cr (2x24) K-ALPHA 108	1.740	1.740	11.020	11.1					
120 Cr (2x24) K-ALPHA 109	1.740	1.740	11.020	11.1					
121 Cr (2x24) K-ALPHA 110	1.740	1.740	11.020	11.1					
122 Cr (2x24) K-ALPHA 111	1.740	1.740	11.020	11.1					
123 Cr (2x24) K-ALPHA 112	1.740	1.740	11.020	11.1					
124 Cr (2x24) K-ALPHA 113	1.740	1.740	11.020	11.1					
125 Cr (2x24) K-ALPHA 114	1.740	1.740	11.020	11.1					
126 Cr (2x24) K-ALPHA 115	1.740	1.740	11.020	11.1					
127 Cr (2x24) K-ALPHA 116	1.740	1.740	11.020	11.1					
128 Cr (2x24) K-ALPHA 117	1.740	1.740	11.020	11.1					
129 Cr (2x24) K-ALPHA 118	1.740	1.740	11.020	11.1					
130 Cr (2x24) K-ALPHA 119	1.740	1.740	11.020	11.1					
131 Cr (2x24) K-ALPHA 120	1.740	1.740	11.020	11.1					
132 Cr (2x24) K-ALPHA 121	1.740	1.740	11.020	11.1					
133 Cr (2x24) K-ALPHA 122	1.740	1.740	11.020	11.1					
134 Cr (2x24) K-ALPHA 123	1.740	1.740	11.020	11.1					
135 Cr (2x24) K-ALPHA 124	1.740	1.740	11.020	11.1					
136 Cr (2x24) K-ALPHA 125	1.740	1.740	11.020	11.1					
137 Cr (2x24) K-ALPHA 126	1.740	1.740	11.020	11.1					
138 Cr (2x24) K-ALPHA 127	1.740	1.740	11.020	11.1					
139 Cr (2x24) K-ALPHA 128	1.740	1.740	11.020	11.1					
140 Cr (2x24) K-ALPHA 129	1.740	1.740	11.020	11.1					
141 Cr (2x24) K-ALPHA 130	1.740	1.740	11.020	11.1					
142 Cr (2x24) K-ALPHA 131	1.740	1.740	11.020	11.1					
143 Cr (2x24) K-ALPHA 132	1.740</								

“In Beam” CI マススペクトロメトリー

菱田 真三郎*

1. はじめに

マススペクトロメトリーは極微量の試料で価値の高いスペクトル情報を与えることから、GC/MSをはじめ、定性あるいは定量分析の有力な手法として広く利用されてきた。しかし、通常用いられている Electron Impact (EI) や Chemical Ionization (CI) によるイオン化法は試料の安定な気化を第一の条件としている。つまり、安定な気化ができるか否かがマススペクトロメトリーの可否を決める本質的制約となっている。マススペクトロメトリーの利用が生体由来の試料に拡大されるとともに、熱に不安定で、安定な気化がむづかしい化合物の測定に対する要求がますます強まっている。しかし、生理活性に興味をもたれる化合物には、高い極性あるいは大きい分子量などのため、従来マススペクトロメトリーの範囲外とされていたものが多い。気化を容易にするための誘導体の研究も大きな成果を得ているが、試料そのままからの情報を得ることが生体試料の場合には特に重要視される。

熱に不安定な固態試料のマススペクトル測定は、分子内結合の開裂（熱分解）と分子間結合の開裂（気化）の競合という点から見る事ができる。

Field Desorption (FD)¹⁾はマイクロニードル上に塗布された試料が加熱により分子間結合が弱められ、加えられた電界によりイオンとして脱離する方法である。この方法は、気化を伴わないイオン化法として熱に不安定な化合物への適用が注目され、応用範囲が急速に拡がりつつある。エミッタ（マイクロニードル）の作成、試料の塗布など測定上のむずかしさなどの問題も残されているが、EIやCIの障害を超えるものとして高く評価されている。

MummaとVastola²⁾は気化を熱分解に優先させるために超高速加熱を兼ねて、レーザーによるイオン化を行い、スルホン酸のナトリウム塩のマススペクトルを測定している。

Meuzelaar³⁾らはステンレス鋼製の試料台に薄く塗布された試料表面にレーザー光線を照射し、多糖類、配糖体、アミノ酸、オリゴペプチドなどの測定に成功している。アルカリ金属イオンの生成が有機物のイオン化を促進するらしい。

MacFarlaneとTorgerson⁴⁾は²⁵²Cfの自発核分裂による核分裂片（主な分裂片は¹⁴²Ba⁺¹⁸: 79MeVと¹⁰⁶Tc⁺²²: 104MeV）を用い、熱に不安定な生体分子、例えば、Tetrodoxine, Vitamin B₁₂などのマススペクトル測定に成功している。試料は溶液にし、厚さ 1×10^{-3} mmのNi膜に薄く塗布し、核分裂片を照射する。分子は2量体として脱離後(M+1)⁺と(M-1)⁻のイオンに開裂する。これは、²⁵²Cf-Plasma Desorption (PD) と名付けられている。

BenninghovenとSichtermann⁵⁾はMeV級のイオンの代りに、2.25kVのAr⁺を試料に照射する方法でアミノ酸、ペ

プチド、スルホン酸アミドなどのマススペクトル測定を報告している。

FD, PD, あるいはレーザー光線による方法は特殊な付属品を必要とし、測定の煩雑さを考え合えると、ルーチン分析に適しているとはいえない。EIやCIに用いられる通常のマススペクトロメータのまま、もしくは簡単な改造で、熱に不安定な化合物のマススペクトル測定を可能にする方法も報告され、注目されつつあるが、現在までの所、FDに比べて、試料の適用範囲は狭いようであり、FD(あるいはPD)に勝るとはいいにくい。しかし、この方法は操作の簡便さなどを考えれば、今後の発展は注目してよいであろう。

BaldwinとMcLafferty⁶⁾は石英製試料用細棒の表面に試料を塗布あるいは付着させイオン化室内に挿入し、CIを行うDirect Chemical Ionizationを報告した。この方法によると、通常試料直接導入法によるEIまたはCIでは検出できなかったOligopeptide (Leu-Leu-Val-Tyr など) の(M+H)⁺が容易に検出された。

Dellら⁷⁾とOhashiら^{8),9)}はBaldwinと全く同じ試料導入法をEIに利用し、通常の方法では認められないM⁺または(M+H)⁺を検出できることを報告した。この方法を、Dellは抗生物質Echinomycinに、Ohashiは炭水化物、アミノ酸に応用している。彼らはこの方法を“In Beam”法と名付けている。Baldwinらの方法も、CI, EIの相違はあるが、試料の導入法は同一と考えられるから、我々はこの方法を“In Beam”EI, “In Beam”CIと呼ぶこととする。

HansenとMunson¹⁰⁾は試料をテフロン細管表面につけてイオン化室内に挿入し、isopentaneによるCIを行っている。彼らは、電子線に対する試料位置、イオン化室温度(反応ガス温度)、測定のタイミングがスペクトル特に相対強度に大きく影響する事実を報告している。彼らは、固体試料の表面でCIが起こると説明し、Surface Chemical Ionizationという言葉を用いている。テフロンを試料保持に用いる方法はFriedmanら¹¹⁾により採用されたもので、熱分解しやすい化合物の急速気化を行う場合、試料と試料保持材との間の結合力を小さくするのにテフロンが優れているといわれている。

Soltmannら¹²⁾はFD法における高電界の使用を除いてはFDと全く同一の方法、すなわち、FDエミッタに試料を塗布し、電流を流して加熱し、気化と同時にElectron Impactを用いるイオン化を行った。この方法に彼らはEI/Dの略称を用い、CIを行う場合をCI/Dとしている。

Huntら¹³⁾は時を同じくして、FDエミッタを試料導入に用いるCI法を報告した。彼らは、Nucleoside, アミノ酸、オリゴペプチド、四級塩基、カルボン酸塩のマススペクトル測定に成功している。

マススペクトル測定の成否の一つの基準に分子イオン(M⁺)または擬分子イオン(QM⁺)の確認、すなわち、分子量が判明するか否かがある。分子イオンが過剰の内部エネルギー

* 日立製作所 那珂工場 応用技術センタ、副技師長、理博

ーでフラグメンテーションし易く、分子イオンの確認の困難な場合には、CI など温和なイオン化が用いられ、分子イオンの開裂を防ぐことができる。しかし、加熱により試料が熱分解を受ければ、熱分解生成物のマススペクトルが得られ、試料の真のマススペクトルは得られない。一般にマススペクトルはフラグメンテーションと熱分解の両者が混在していることが多い。特に熱に不安定な化合物においては、熱分解の要素が大きく、前述のようにマススペクトルの測定に種々の工夫がなされてきた。しかし、イオン化に先立つ気化の必要の有無に関係なく、いずれの方法も試料の加熱が必要である。熱分解を抑えてマススペクトルを測定する工夫の報告とともに、積極的に熱分解を行い、熱分解生成物のマススペクトルから同定を行う方法 (Pyrolysis Mass Spectrometry: Py/MS) が生物体のような高分子化合物に応用されている¹⁴⁾が、Py/MS は本稿では触れないこととする。

"In Beam" CI の有用性は既に "In Beam" EI の段階で予想されたところであるが⁹⁾今回、CI/EI の高速切換も確立されたので、この技術も取入れ、以下に "In Beam" CI の二、三の測定例を紹介する¹⁵⁾

2. 測定法^{8),9)}

M-60 及び M-70 形 日立質量分析計を用い、"In Beam" 試料導入機構で測定した。試料は "In Beam" 用石英試料細棒の先端表面に塗布し、イソブタンを反応ガスとした。

CI/EI の切換は¹⁵⁾反応ガスの導入あるいは排気と同時にイオン化電圧、リペラ電圧などイオン化条件を CI, EI の最適条件に切換える改良形高速切換機構を採用した。この高速切換により、CI/EI の交互切換によるマスプロトグラフも可能となった。ただし、GC/MS における交互切換の有用性の紹介は別の機会に譲ることにする。

"In Beam" 測定におけるマススペクトルの時々刻々の変化は、002B 形データ処理装置 (Hitac 10II/A 8kW、ディスクメモリ 4.8MW、CRT、ハードコピー) を用い、CI/EI の高速切換を含めた繰返しスキャンによって追跡した。

3. 測定例

3.1 グルコサミン塩酸塩

図 1 は直接導入 (DI) EI 及び CI, "In Beam" (IB), EI, CI のマススペクトルを比較したものである。それぞれの方法で多数回測定したスペクトル中、標準的スペクトルを示す。DI/EI 及び IB/EI では分子イオン領域 (グルコサミン MW179) に明りょうなピークは出現しない。DI/CI では QM^+ : M/e180, $M+H-H_2O$ M/e162 が出現し、CI の効果が見られる。IB/CI においては M/e180, M/e162 の強度はさらに高くなる。DI, IB の差より EI, CI の差が出ている。

図 2 は 2.2 秒サイクルの繰返しスキャンを行いつつ、EI

CI → EI の切換を行い、IB スペクトルの変化を見たものである。CI → EI 切換時、反応ガスの排気が不完全な 1 回目は CI と EI の混合スペクトルとなっている。

3.2 グルタミン酸

図 3 にグルタミン酸に対する各測定法の比較を示す。

DI/EI では分子イオン M/e147 は全く出現しないが、DI/CI で僅かに QM^+ M/e148 が認められる。CI の場合、 QM^+

-H₂O M/e130 が特長的となる。IB/EI では QM^+ の形で M/e148 が僅かに認められるにすぎないが、IB/CI では、 QM^+ M/e148 が明らかに認められる。DI/CI, IB/CI を比較し、IB 法の効果が明らかである。

図 4 は 2 秒サイクルの繰返しスキャンを行いつつ、CI → EI の切換を行い、連続的に IB スペクトルを測定した結果の一部を示す。CI 時 QM^+ M/e148 がベースピークとなる。

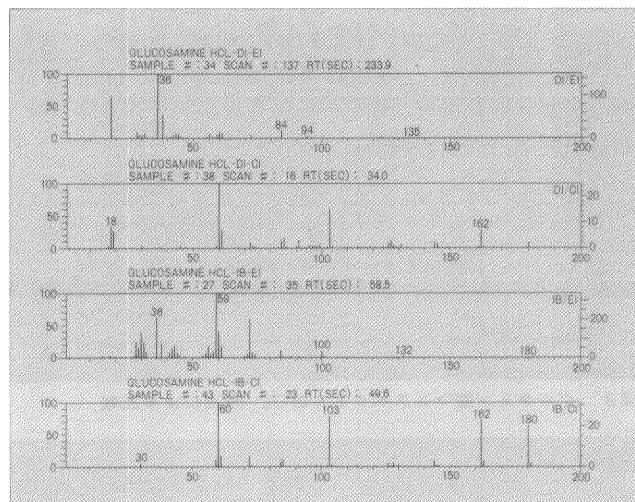


図 1 グルコサミン塩酸塩マススペクトルの DI, IB 法による比較

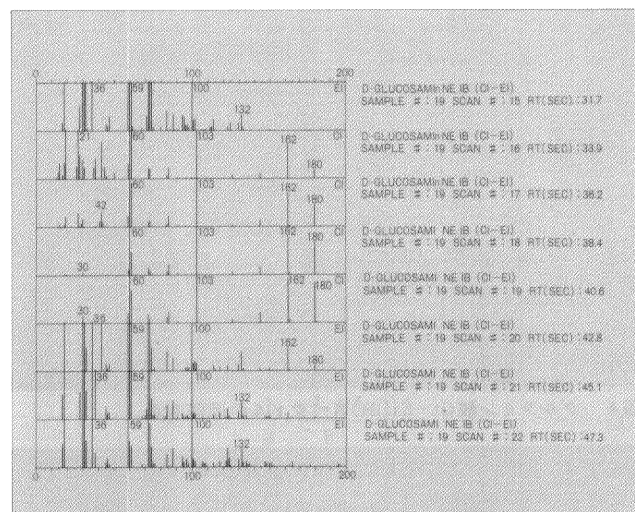


図 2 グルコサミン塩酸塩 EI-CI (IB) スペクトルの連続測定

3.3 アルギニン塩酸塩, シスチン, グルタミン酸モノナトリウム塩

図 5 にアルギニン塩酸塩の IB/CI マススペクトルを示す。アルギニン (遊離酸: MW174) の QM^+ M/e175 が僅かな強度であるが認められる。Hunt¹³⁾が FD エミッターを用いた CI スペクトルと相対強度に異なる点もあるが、これは測定条件の差によるものであろう。

図 6 はシスチンの IB/EI と IB/CI のマススペクトルを示す。IB/EI では M/e100 以上にピークは認められないが、IB/CI によれば QM^+ M/e241 が僅かな強度で確認できる。

図 7 はグルタミン酸モノナトリウム塩の IB/EI, IB/CI スペクトルを示す。IB/EI では高質量域に ($M-NaOH$)⁺

M/e 130 が僅かに確認されるだけであるが、IB/CI によれば M/e 130 がベースピークとなり、さらに高質量域に (M-Na+H₂)⁺ M/e 148, M⁺ M/e 170 が確認される。

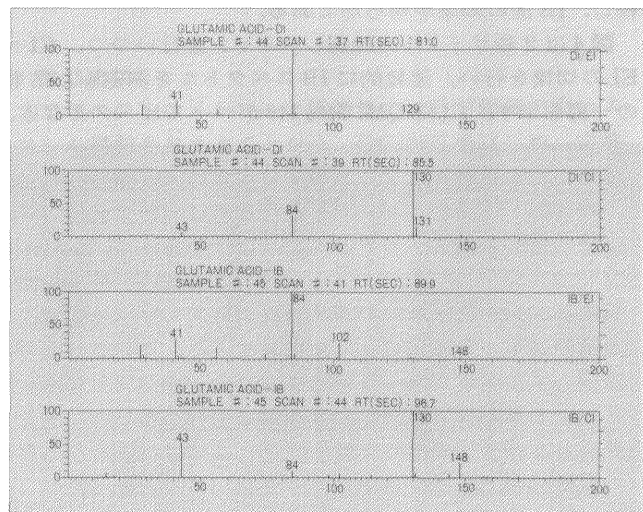


図3 グルタミン酸マススペクトルのDI, IB法による比較

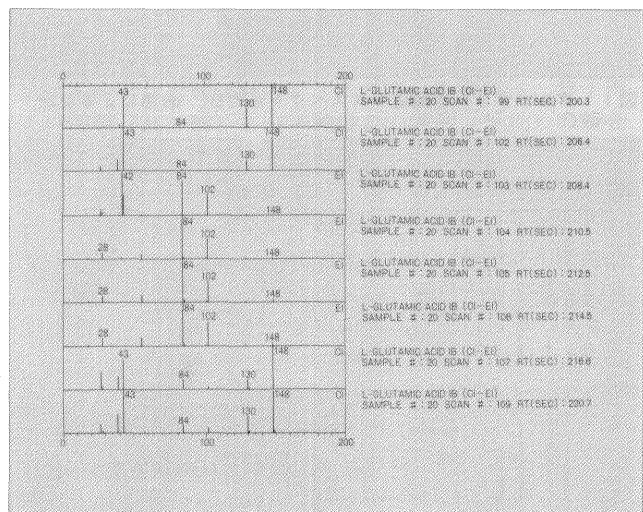


図4 グルタミン酸CI-EI(EB)スペクトルの連続測定

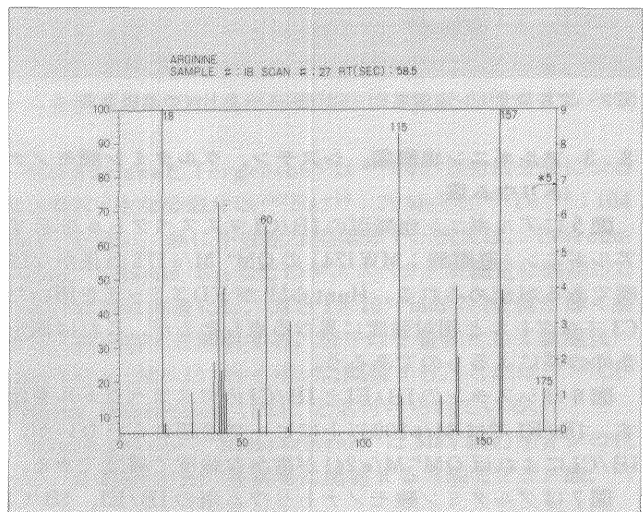


図5 アルギニン塩酸塩のIB/CIスペクトル

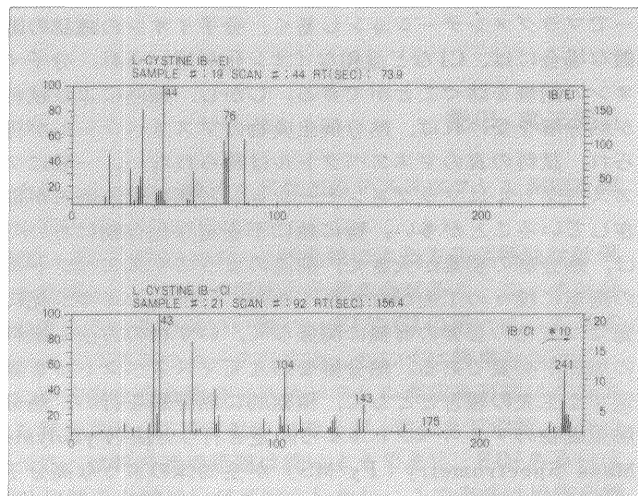


図6 シスチンのIB/EI, IB/CIスペクトル

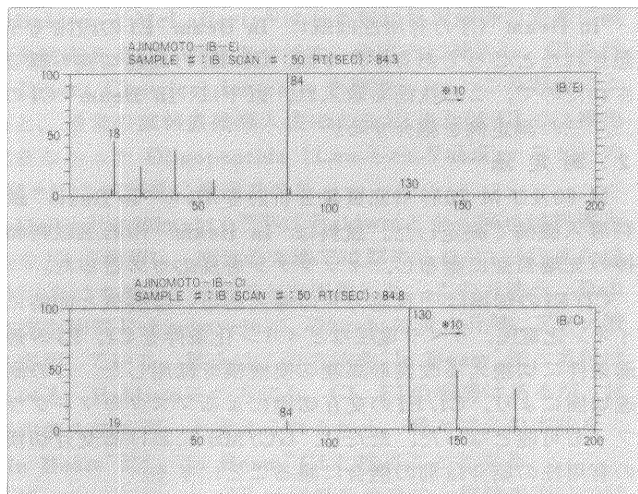


図7 グルタミン酸(モノナトリウム塩)のIB/EI, IB/CIスペクトル

4. まとめ

研究分野が拡大するとともに、熱に不安定で、通常のEIあるいはCIマススペクトル測定が不可能な化合物も測定する必要が多くなった。そうした要求をみたすため、FDをはじめ各種の方法が提唱されている。適用範囲の広さから、FDが最も優れた方法と思われるが、ここに紹介した“*In Beam*”法は簡便な方法として魅力をもっている。“*In Beam*”EIあるいはCIは、現在まだ測定例も少なく、その限界も不明であるが、マススペクトルの応用拡大に大きく貢献するものと期待している。

参考文献

- 1) Schulten, H. R. and Beckey, H. D.
Advan. Mass Spectrom., **6**, 499 (1973)
Beckey, H. D.,
Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., **2**, 500 (1969)
- 2) Mumma, R. O. and Vastola, F. J.,
Org. Mass Spectrom., **6**, 1373 (1972)
- 3) Posthumus, M. A., Kistemaker, P. G., Meuzelaar, H. L. C. and Ten Noever de Brauw, M. C.,
Anal. Chem., **50**, 985 (1978)
- 4) MacFarlane, R. D. and Torgerson, D. F.,



- Science, 191, 920 (1976)
- 5) Benninghoven, A. and Sichtermann, W. K.,
Anal. Chem., 50, 1180 (1978)
- 6) Baldwin, M. A. and McLafferty, F. W.,
Org. Mass Spectrom., 7, 1353 (1973)
- 7) Dell, A., Williams, D. H., Morris, H. R., Smith,
G. A., Feeney, J. and Roberts, G. C. K.,
J. Am. Chem. Soc., 97, 2497 (1975)
- 8) Ohashi, M., Tsujimoto, K. and Yasuda, A.,
Chemistry Letters, (1976) 439
- 9) 菱田真三郎, 佐藤弘:
Hitachi Scientific Instrument News, 20, 12 (1977)
- 10) Hansen, G. and Munson, B.,
Anal. Chem., 50, 1130 (1978)
- 11) Beuhler, R. J., Flanigan, E., Greene, L. J. and
Friedman, L.,
J. Am. Chem. Soc., 96, 3990 (1974)
- 12) Soltman, B., Sweely, C. C. and Holland, J. F.,
Anal. Chem., 49, 1164 (1977)
- 13) Hunt, D. F., Shabanowitz, J., Botz, F. K. and
Brent, D. A.,
Anal. Chem., 49, 1160 (1977)
- 14) Schulten, H. R. and Görtz, W.,
Anal. Chem., 50, 428 (1978)
- 15) 零石賢一, 高橋貞夫, 中島康雄: 第13回有機化合物の
マススペクトロメトリー討論会(広島), 1978年11月,
講演要旨集, 37頁

U.D.C. 543.51:539.196.6

メタステイブルイオンについて

1. はじめに

質量スペクトルに現われる特異なブロードピークは、メタステイブルイオン(Metastable ion, 以下「M-I」という)であり、Hipple¹⁾等によってその生成機構が明らかにされて30余年が経過している。

この間、質量分析計が炭化水素などの定量分析に使用されていた時代には、分析精度を損ねるものとして邪魔物扱いを受けた時期もあったが、有機化合物の構造解析に質量分析計が広く使用されるようになった近年では、fragmentation pathを裏付けるものとして、その存在が歓迎されるようになった。

さらに、Beynon^{2),3)} McLafferty⁴⁾等によって Defocus 法が提唱され、多くの研究者によってこの分析法が発展されるに及んで、M-Iは単に fragmentation pathの裏付けばかりでなく、イオンそのものの構造を明らかにするものとして広く研究されるようになってきている。また、最近では混合物の定性・定量分析にも適しているとして注目されている。この分析法の特長は、試料の前処理を必要とせず、また感度が極めて高いという点にある。

装置の面でも、一般に二重収束質量分析計が使用されているが、正配置、逆配置、また電場、磁場のリンクスキャンなど、種々の方法が試みられている。このようにM-Iによる分析は新しい質量分析法として定着化しつつあるように思われるので、ここに最近の研究の動向をご紹介します。

2. M-Iの生成

質量分析計のイオン化室で生成した質量 m_1 のイオンが、加速電圧 V でイオン源から加速出射されると、このイオンの速度 v_1 は

$$\frac{1}{2} m_1 v_1^2 = eV \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここで e : イオンの電荷

このイオンが、イオン源と磁場の中間の field free region において $m_1^+ \rightarrow m_2^+ + m_3$ なる開裂を生じ、しかもこの開裂によってイオンの速度は変化しないものとすれば、このイオンは質量 m_2 で速度が v_1 であるから、磁場による質量分散は

$$\frac{m_2 \cdot v_1}{r} = eH \quad \dots\dots\dots (2)$$

(1), (2)により

$$\left(\frac{m_2}{m_1} \right) / e = \frac{1}{2} \cdot \frac{r^2 \cdot H^2}{V}$$

ここで r : イオンの軌道半径 H : 磁束密度

$$m^* = \frac{(m_2)^2}{m_1}$$

とおけば

$$m^* / e = \frac{1}{2} \cdot \frac{r^2 \cdot H^2}{V} \quad \dots\dots\dots (3)$$

(3)式は、いわゆる質量分析の原理式であって、上述のような開裂が生じた場合には、 m_2^+ のイオンは質量スペクトルの上では、見掛け上 m^* なる質量の位置に検出されることになる。これがM-Iである。

3. 二重収束質量分析計のM-I

二重収束質量分析計は一般に Energy Selector である電場部をもっているため、正常なエネルギーをもたないM-Iは原理的にこの電場部を通過することができない、二重収束質量分析計で測定されるM-Iは、電場を通過したあとで、電場と磁場の中間の field free region で開裂を起こしたイオンがM-Iとして測定されるものである。

また、磁場先行の二重収束質量分析計の場合には、原理的に全く測定されないことになる。

正常のエネルギーをもたないM-Iを電場を通過させるには

$$\frac{m_1 \cdot v_1^2}{r e} = e \cdot E_1 \quad \dots\dots\dots (4)$$

$$\frac{m_2 \cdot v_1^2}{r_e} = e \cdot E_2 \quad \dots\dots\dots (4)$$

ここで r_e : 電場の軌道半径 E_1, E_2 : 電場電圧

正常のイオンが通過できる電場電圧 E_1 から E_2 まで電場電圧を下げることで、速度 v_1 のイオン m_2^+ を通過させることができる。($m_1/m_2=R$ とする)

電場電圧 E_1 はそのまま、イオン加速電圧 V を $V \cdot R$ まで上げることで、このイオンを通過させることも可能であるが、イオン加速電圧を変化させることは、イオンの速度が変わり、field free region に滞留する時間が変化することになるので、条件が一定に保たれない欠点がある。また、イオン加速電圧は数 kV であり、この電圧をさらに 2 倍、3 倍と高くすることは、イオン源の絶縁などの面でむずかしい点もあり、一般には電場電圧を変化させる方法が広く用いられている。

二重収束質量分析計の電場電圧を走引して M-I を測定する方法を一般に Metastable ion defocus 法と呼んでいるが、この defocus 法でも、使用される二重収束質量分析計の種類によって、その測定法も、また得られる結果も異なったものとなる。すなわち、イオン源を出射されたイオンが、まず電場でエネルギー分散を受けた後で磁場によって質量分散を受けるいわゆる正配置のものと、この電場と磁場の順が逆になった逆配置のもの、及び電場電圧と励磁電流をリンクさせて走引させるものの 3 つに大別される。

3.1 正配置の場合

イオン源から電場までの間で開裂して生じた M-I を電場電圧を走引して測定するもので、検出器は電場の後でエネルギー収束点におかれる。この検出器はイオンを磁場に入射させるために可動式になっている。

測定は 1 荷イオンに対しては、電場電圧は正常値から零まで走引して、イオン源から出射されたすべてのイオンのエネルギースペクトルを求めるもので、このスペクトルを一般に IKES (Ion Keinetic Energy Spectrum) と呼んでいる。

この IKES のピークはすべて M-I によるものであり、そのイオンのもつエネルギーすなわち、前述の E, R の値を求めることができる。実際の測定法としては、IKES より M-I のある電場電圧 E_n を求め、この値に電場電圧を設定して、そのエネルギーをもつ M-I を磁場に投射して、質量スペクトルから m^* 値を求める。

$$m^* \cdot R = m_2 \quad \dots\dots\dots (5)$$

$$m_2 \cdot R = m_1 \quad \dots\dots\dots (5)'$$

このようにして、すべての IKES のピークについての質量スペクトルから、その試料から生ずるすべての M-I を求めるのである。

この方法の特長は、最初に IKES を求めるので、その試料の M-I の全容をつかむことのできる点である。また、難点としては、 m_1 を直接求めることができないことで、これは逆配置法とちょうど反対の関係にあるものである。

M-I の存在から fragmentation path の裏付けを行う研究にはこの方法が用いられている。

3.2 逆配置の場合

この方法では、イオン源から出射されたイオンは、まず

磁場によって質量分散を受けるので、特定質量のイオンのみが電場に導入され、電場電圧を走引することで、このイオンのエネルギースペクトルを求めるものである。すなわち、最初に m_1 を決め、その後で電場電圧から m_2/m_1 を求めるものである。

この方法は親イオン (分子イオンの意味ではなく、特定質量のイオン・プレカーサ・イオンの意味) がわかっていて、そのイオンから生ずる M-I を求める点では直接的であるといえる。

また、この方法では、磁場と電場の中間に反応室を設けて、ヘリウムガスなどを導入して、この中性分子と特定イオンとの非弾性衝突によって、運動エネルギーの一部を内部エネルギーに変え、活性化して開裂を起こさせるいわゆる衝突活性化 (Collision Activation) スペクトルの測定ができることが特長である。

この方法を用いて、イオンの構造に関する研究が行われているが、最近では混合物の分析にも広く用いられている。

3.3 リンクスキャン

最近、前述の逆配置法に代るものとして、正配置の装置での電場・磁場の Linked Scan が開発された⁵⁾ 前述の逆配置法では、装置は磁場先行の二重収束質量分析計が必要であるが、一般の装置がすべて磁場先行であることは望めない。

このリンクスキャンは電場先行の装置で、電場電圧と磁場強度を $E/B = \text{Constant}$ の関係を保って走引して、磁場先行の場合と同じ結果を得るものである。

その原理は、質量 m_1 のイオンが加速電圧 V で加速されてイオン源から出射され、半径 r_e の電場を速度 v_1 で通過したとすると、電場の強度 E_1 は

$$\left. \begin{aligned} \frac{m_1 \cdot v_1^2}{r_e} &= e \cdot E_1 \\ \frac{1}{2} m_1 \cdot v_1^2 &= eV \\ 2V &= r_e \cdot E_1 \end{aligned} \right\} \quad \dots\dots\dots (6)$$

また、 m_1^+ のイオンが、磁場強度 B_1 の磁場を半径 r_m で通過するには

$$\left. \begin{aligned} \frac{m_1 \cdot v_1^2}{r_m} &= B_1 \cdot e v_1 \\ \frac{m_1}{e} &= \frac{r_m^2 \cdot B_1^2}{2V} = \frac{r_m^2 \cdot B_1^2}{RE} \end{aligned} \right\} \quad \dots\dots\dots (7)$$

いま、 m_1^+ イオンが、イオン源と電場の中間の field free region で $m_1^+ \rightarrow m_2^+ + m_3$ に開裂したとすると、この m_2^+ イオンが電場を通過できる電場強度 E_2 は

$$E_2 = \left(\frac{m_2}{m_1} \right) \cdot E_1 \quad \dots\dots\dots (8)$$

であり、同様に磁場を通過するには、磁場強度 B_2 は

$$B_2 = \left(\frac{m_2}{m_1} \right) \cdot B_1 \quad \dots\dots\dots (8)'$$

m_2^+ が電場・磁場を通過するには、 m_1^+ が通過した時の電場・磁場の値の (m_2/m_1) にすればよいことになる。

すなわち、 $E/B = \text{Constant}$ の形で、電場と磁場を同時に走引すれば、 m_1^+ から生ずるすべての M-I のスペクトルが得られることになる。これは逆配置法で m_1^+ を磁場で選んで、このイオンのエネルギースペクトルを電場走引で求めるのと全く同じ結果が、正配置のリンクスキャンで得ら

れることを意味している。

この方法と逆配置法の差は、逆配置の場合には磁場を通過した後で開裂を生じたイオンのエネルギースペクトルを求めているために、この開裂によって得られた運動エネルギーに対しては、二重収束が成立しないために、この方法で得られたスペクトルのピークは、かなりブロードなものになる傾向がある。

これに反して、このリンクスキャンの場合には、電場に入る前に開裂を起こしたイオンを測定するもので、原理的に二重収束条件が成立した形で測定されるために、得られるスペクトルは逆配置法の場合に比較して、はるかにシャープなものである。

このリンクスキャン法においても、前述の逆配置法と同様に、反応室を設けて CA スペクトルを求めることができる。ただし、この場合反応室はイオン源と電場部の中間に置かれることになる。この方法の応用面は当然前述の逆配置の場合と同じである。

4. 応用例

以上 M-I の原理及び装置について述べたが、この defocus 法で実際にどのような研究が行われているか、正配置・逆配置 各々についてご紹介する。

4.1 正配置法

イオンの構造に関する研究の一例として、Beynon³⁾等はベンゼンの 2 荷イオンについて



の開裂に伴って放出されるエネルギー T を、IKES の C_5H_5^+ のピーク幅から求めた。

この IKES のピーク幅から T を求める方法⁶⁾については、紙面の都合から文献を紹介するに止める。

この放出エネルギー T は、少なくともベンゼンの 2 荷イオンが、2 個の電荷をもつためのエネルギーに相当するものであり、それはまた 2 個の電荷によって生ずるクーロンの力に釣合うはずである。これから 2 つの電荷の距離を求め、5.2~5.8 Å の結果を得た。この値は 6 員環のベンゼン分子の大きさをはるかに超えるものであり、ベンゼンの 2 荷イオンが“linear structure”をもっていることを示しているとしている。

同様な研究が pyrazine, pyrimidin, pyridazone についても報告されている⁷⁾

fragmentation path の裏付けとしては複雑な有機化合物の開裂機構を解析する際に、M-I の存在はその開裂機構の存在を裏付けるものとして重要視されてきた。

しかし、質量スペクトルに現われる M-I から、すべての開裂に対応する M-I を求めることは困難であるが、Defocus 法によれば、容易にすべての M-I を測定することができる。

高橋等⁸⁾は、この開裂機構の解析への応用として、いくつかの化合物についての測定例を報告している。

4-hydroxypyridine の図 1 に示した 3 つの誘導体の質量スペクトル、高分解能質量分析計による各イオンの精密質量及び IKES による M-I を求めた。

図 1 はこれら 3 つの化合物の質量スペクトルである。

図 1 から明らかなように、化合物 I, II は極めて類似

した fragmentation path をもつことがわかる。精密質量測定から、化合物 I, II からの methyl radical の脱離は methoxy group からのものであり、すべての fragmentation path はこの methyl radical の脱離したイオンから生じている。これらのすべての開裂は M-I の存在によって裏付けられている。図 2 は、化合物 I の fragmentation pattern を示すものである。

化合物 III については、開裂のどの段階でも methoxy group から methyl radical の脱離は認められず、methoxy group の methyl は formyl radical か formaldehyde として初期の段階で脱離していることがわかる。図 3 は化合物 III の fragmentation pattern を示すもので、すべての開裂は M-I の存在によって裏付けられている。

さらに分子量の大きな化合物として Coumarin の誘導体、Gibberellin の誘導体及び β -Sitosterol についても同様な測定を行い、この defocus 法が fragmentation path の解析

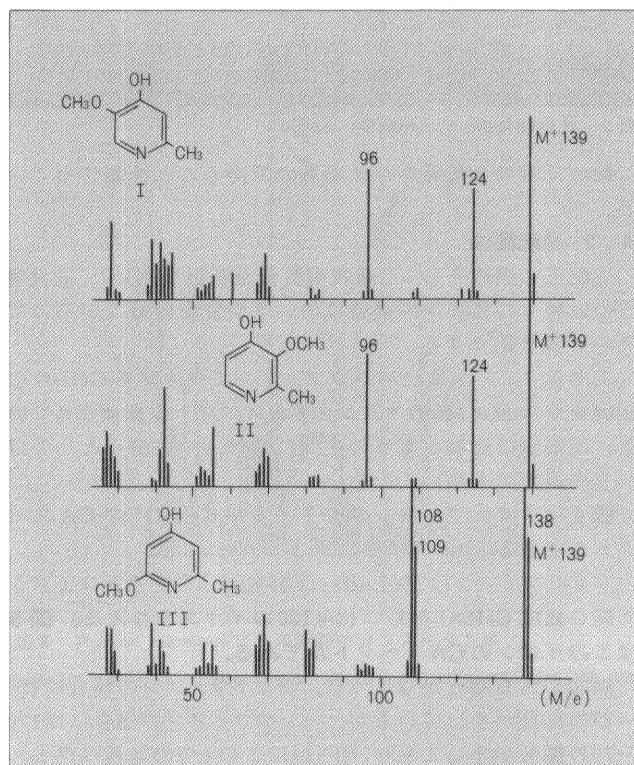


図 1 4-hydroxypyridine 誘導体のマススペクトル

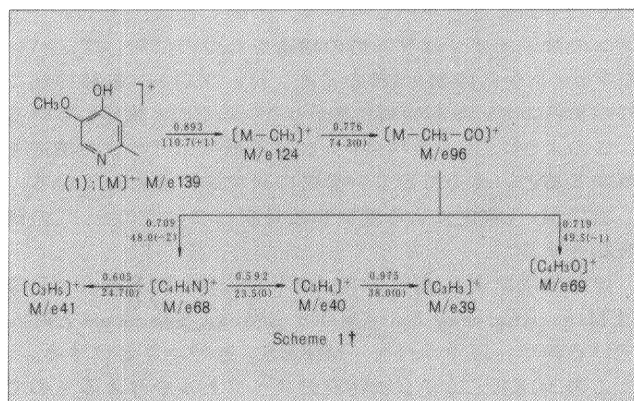


図 2 化合物 I の fragmentation pattern

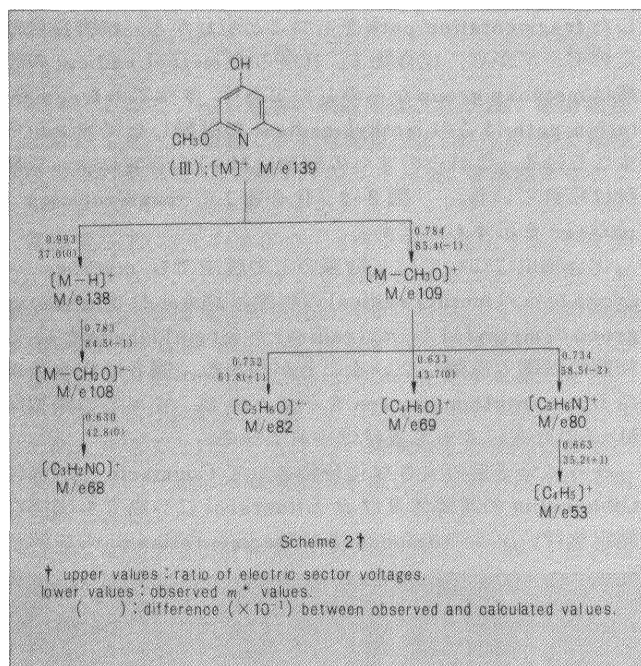


図3 化合物IIIの fragmentation pattern

に極めて有効な情報を与えるものであることを報告している。

4.2 逆配置法

逆配置の構成をもつ二重収束質量分析計を用いて、酒井等^{9),10)}は種々のイオンの構造について研究を行っているの、その一部を紹介する。

アセトフェノン及びバレロフェノンより生ずる C_8H_8O の組成をもつ $M/e 120$ のイオンの CA スペクトルを測定している。反応室は磁場と電場の中間に設け、中性分子としてはヘリウムガスを用いている。

図4はアセトフェノンの分子イオン $C_8H_8O^+$ の CA スペクトルである。

バレロフェノンは McLafferty 移転によりアセトフェノンと同じ組成 C_8H_8O をもつ $M/e 120$ のイオンを与える。図5はこのイオンの CA スペクトルである。

両図からも明らかのように、アセトフェノンの場合は $120 \rightarrow 77$ の開裂が生じているが、バレロフェノンの場合には $120 \rightarrow 78$ の開裂が生じており、明らかにこの2つのスラベクトルは異なるものであり、この2つのイオンは異なる構造をもつものであることを示している。このことは、アセトフェノンの分子イオンはケトン形の構造をもつものに対して、バレロフェノンからの $M/e 120$ のイオンは、プロトン転移の起こりやすいエノール形の構造をもっているものと推定している。

このように、CA スペクトルによる研究はイオンの構造を解明するという全く新しい分野の研究を可能としている。

次に M-I 測定による混合物の分析についての一、二の例を紹介する。

逆配置法による M-I のスペクトルに対して Beynon¹¹⁾等は Mass Analyzed Ion Kinetic Energy Spectrum と呼んでいるので、以下これを「MIKES」と呼ぶことにする。

この MIKES は化合物特有のスペクトルを与えるものであるが、このことは前述の fragmentation path の裏付けの

ちょうど逆の立場にあるもので、当然のことと思われる。

図6は coniine¹²⁾ のプロトン付加イオンの MIKES であり図7はその fragmentation pattern である。

この分析法の特長は試料の前処理を必要としない点である。

図8は poison hemlock¹²⁾ から得た液体試料を、そのまま直接導入で測定した質量スペクトルの一部である。上図は試料導入前、下図は試料導入後のスペクトルを示すもので、試料導入によって $M/e 126$, 144 は明らかに増大している。これはこの植物の主成分である γ -conicein ($C_8H_{15}N$ mw 125) 及び conhydrine ($C_8H_{17}NO$, mw 143) のプロトン付加イオンによるものである。

しかし、 $M/e 128$ は試料導入によってもほとんど変化していないが、 $M/e 128$ の MIKES は図9に示すように、試料導入前のバックグラウンドの MIKES (上段) と異なり、導入後の MIKES (下段) は前述の coniine の MIKES と一致したものであり、その存在を示している。

同様な結果が、製剤中の phenobarbital¹³⁾ の分析、raw opium¹³⁾ 中の papaverin の測定など多くの報告がある。

次にこの分析法の感度であるが、図10は p-nitrophenole のプロトン付加イオンについての分析例であり、70pg の検出が可能である¹⁴⁾ としている。また、Cooks 等も¹³⁾ GC/MS と比較して、マスフラグメントグラフィの約 1/10 であると報告しており、前処理を必要としない点を加味して考えるならば、本分析法は GC/MS と同等の感度をもつものとも考えられる。

リンクスキャンについての分析例については、原理的に逆配置法と全く同じ結果が得られることから、特に触れなかったが、最後にリンクスキャンで測定した n-decane⁵⁾ の $M/e 143$ の MIKES だけを図11に示した。このスペクトルと前掲の逆配置の MIKES と比較されれば、その分解能のよさがご理解いただけたと思う。

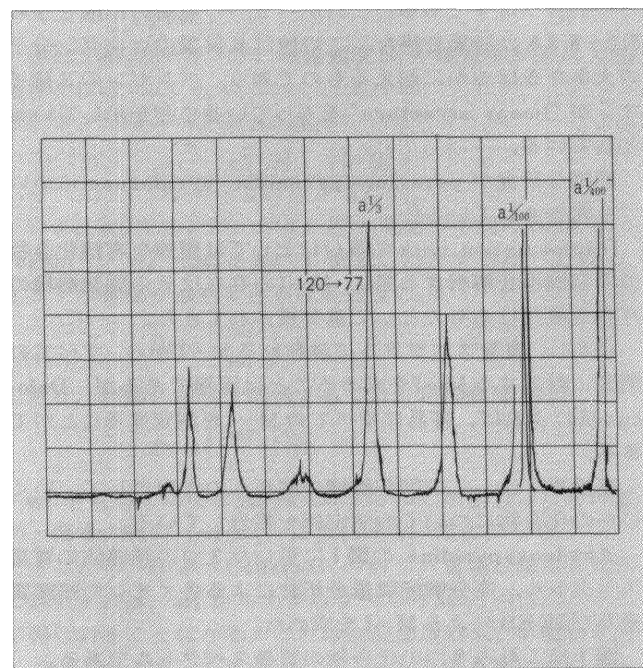


図4 アセトフェノンの CA スペクトル

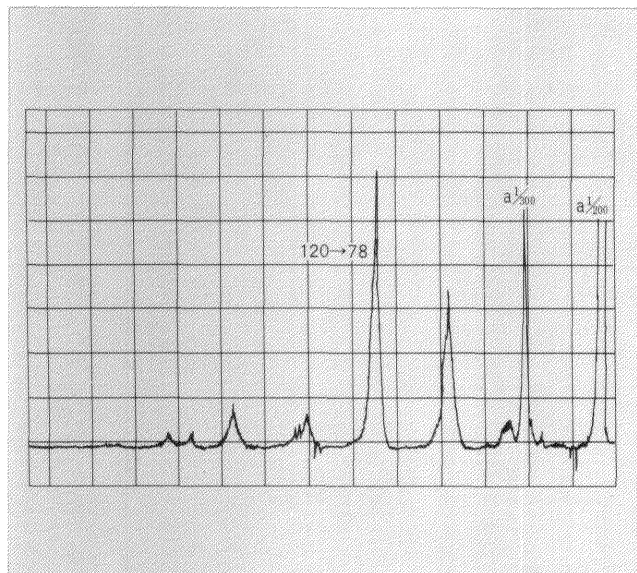


図5 パレロフェノンのCAスペクトル

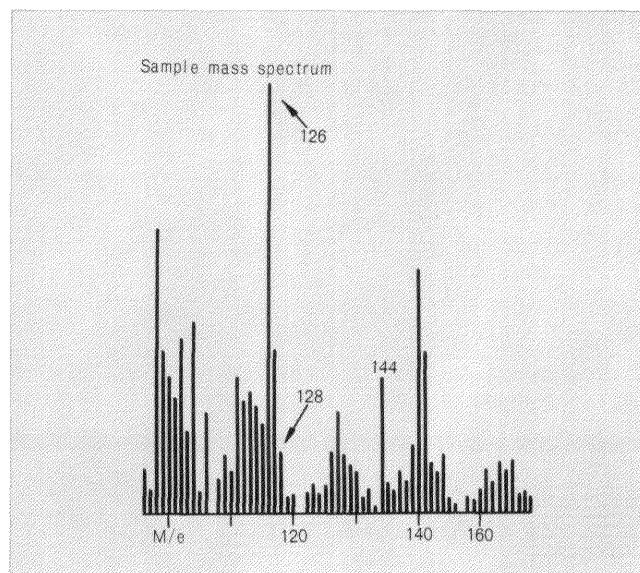
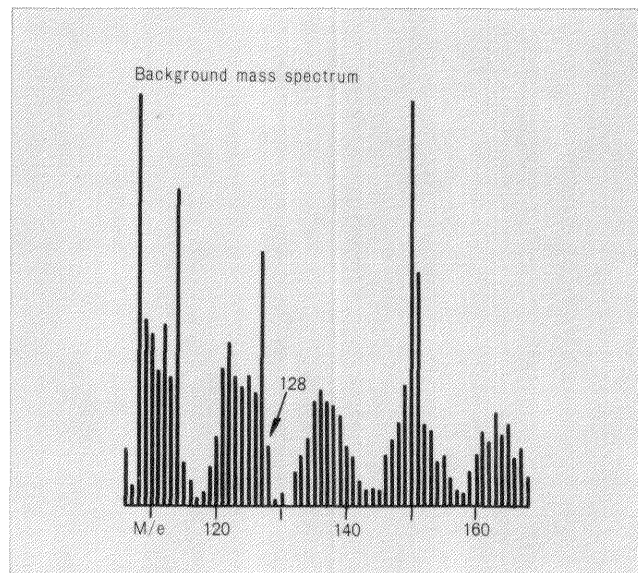


図8 Poison Hemlockよりの試料のマススペクトル

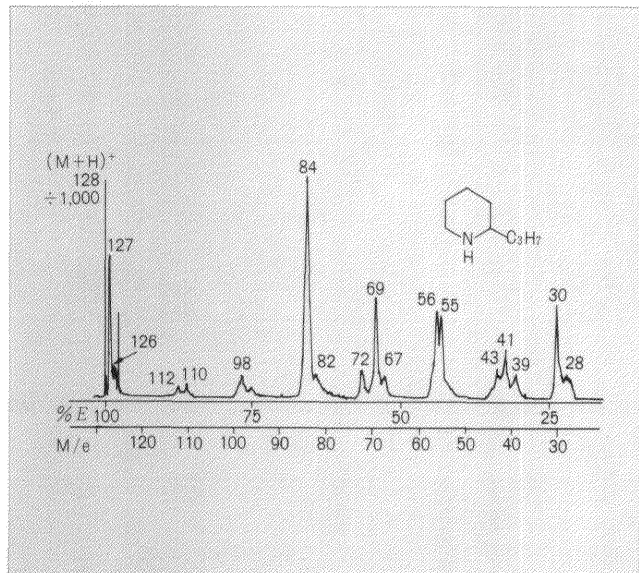


図6 Coniineのプロトン付加イオンのMIKE S

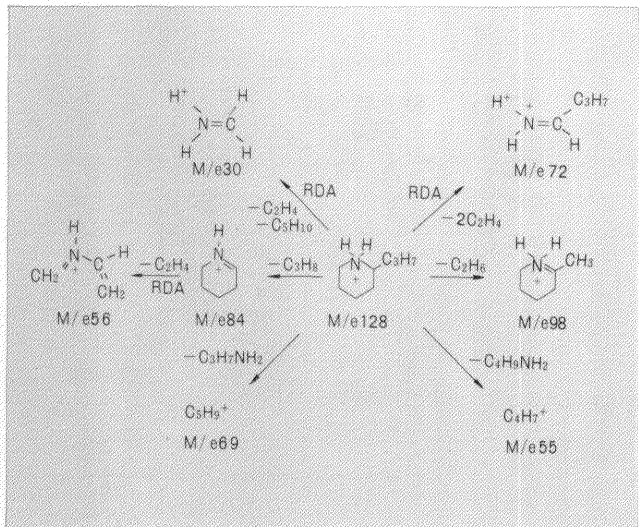


図7 Coniineのfragmentation pattern

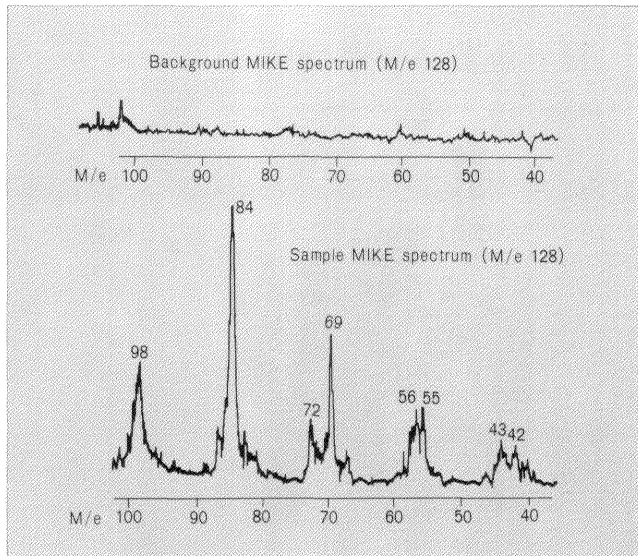


図9 Poison Hemlockよりの試料のMIKE S

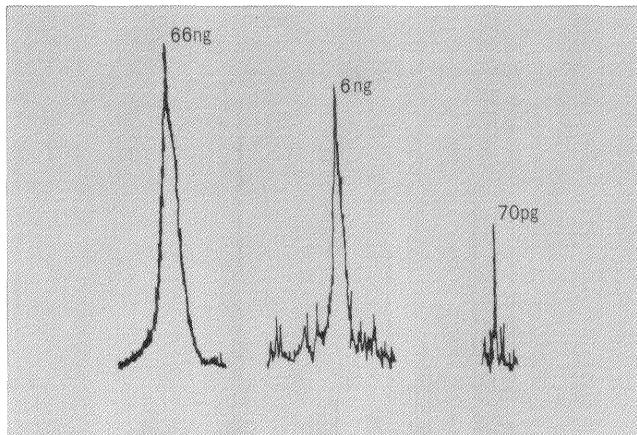


図10 Defocus法の感度

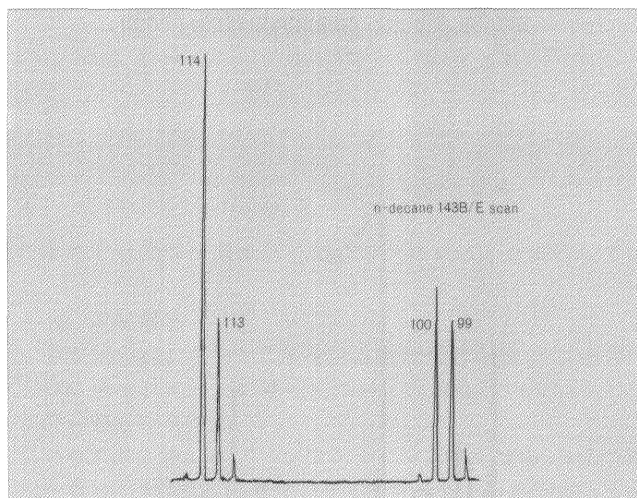


図11 n-decaneのMIKES (リンクスキャンによる)

5. おわりに

M-Iの原理、応用などについての最近の研究の動向について述べたが、この分野の研究が、イオンの構造、fragmentation pathの解明、定性、定量分析など多岐の分野にわたって活発に行われており、質量分析法の一つの新しい分野となりつつあるように思われる。

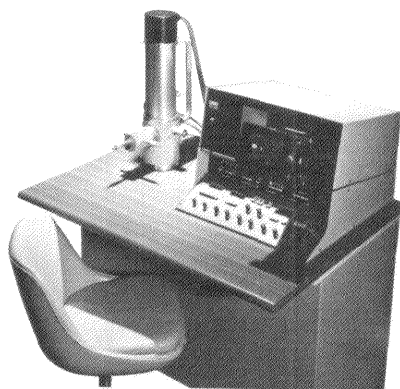
最後に混合物分析について種々ご指導いただいた京都大学農学部 上野民夫先生に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Hipple et al., : Phys. Rev., **69**, 347 (1946)
- 2) Beynon et al., : Research/Development Nov., 26 (1971)
- 3) Beynon : Anal. Chem., **42**, 97A (1970)
- 4) McLafferty et al., : Anal. Chem., **39**, 1748 (1967)
- 5) Bruins et al., : Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., **26**, 395 (1978)
- 6) Beynon et al., : Org. Mass Spectrom., **3**, 661 (1970)
- 7) Beynon et al., : Org. Mass Spectrom., **16**, 273 (1972)
- 8) Takahashi et al., : Org. Mass Spectrom., **9**, 470 (1974)
- 9) 酒井他 : 質量分析, **26**, No. 2, 187 (1978)
- 10) 酒井他 : 質量分析, **26**, No. 3, 223 (1978)
- 11) Beynon et al., : Anal. Chem., **45**, 1023A (1973)
- 12) Kondrat et al., : Science, **199**, 978 (1978)
- 13) Kondrat et al., : Anal. Chem., **50**, 81A (1978)
- 14) Kruger et al., : Anal. Chem., **48**, 2113 (1976)

Topics

S-405形 日立走査電子顕微鏡



S-405形 日立走査電子顕微鏡

S-405形日立走査電子顕微鏡は、すでに発売以来好評をいただいています。S-400シリーズ(S-450/S-430/S-410)の実績をもとに、新たに開発した装置です。特に簡易操作、高信頼性、および容易なメンテナンスに重点をおいて設計され、小形機ながら大形機並の機能を持ち、研究部門から生産部門の品質管理まで幅広く御利用いただけます。

特長

1. 倍率切換えは、ツインキー (up-downの2個の押ボタン) 操作で簡単に行なえます。さらに高倍率像観察から視野選択に便利な低倍率像への切換えは、PRESETスイッチで瞬時に行なえます。
2. 倍率はデジタル表示され、コントラスト、ブライツネスおよびエミッション電流は暗室でも一目でわかるカラーバー表示方式です。
3. 大形の3インチ油拡散ポンプ (排気速度400ℓ/s)を搭載し、高速・高

真空排気を可能にしています。

4. 収束レンズの固定絞りは、安価で、使いすて方式ですので、煩雑なクリーニング操作は不要です。
5. 焦点合せに便利なフォーカスマニター、スティグマモニター、およびダイナミックフォーカスが標準装備されています。

主な仕様

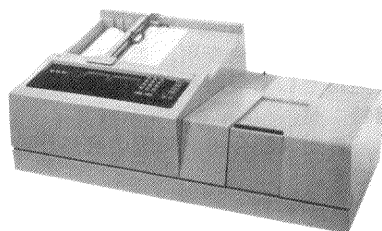
分解能	;	90Å保証
加速電圧	;	5, 15, 25kV
倍率	;	30倍～150,000倍
試料微動	;	X: 20mm Y: 10mm Z: 5mm, 15mm
		回転: 360°エンドレス 傾斜: -20°～70°
		試料サイズ: 60mm径 (最大)
電氣的視野移動	;	X: ±25μm Y: ±25μm

分光器の日立…

その全ての技術を結集して
今ここに、自記分光光度計
の決定版誕生

320形

日立自記分光光度計



320形 日立自記分光光度計

101形、124形、EPS形、100シリーズ、200シリーズ、340形と、次々に時代を代表するヒット製品を生み出してきた「分光器の日立」が、その技術の全てを結集し、自信を持って世に送り出したのが、320形 日立自記分光光度計です。

ダブルモノクロメータの採用、マイクロコンピュータ制御、記録計の内蔵など、盛沢山の特長を持つ 320形ですが、その設計思想はすべて、使い易く、いつも高い精度を保ち、故障の少ない装置の三つのポイントにもとづいています。

■特 長

1. 迷光は 0.0001%以下 (世界最高)

日立が世界に誇る高性能回折格子を2個使用するダブルモノクロメータを採用。もう、迷光による検量線の曲りはまったく考えなくても良くなりました。

2. 分解は 0.07nm (全域)

反転ダブルリトロ形ダブルモノクロメータと、通電の度毎のマイクロコンピュータによる分解能自動校正で、常に高い精度に保たれます。

3. 大型試料室の採用

ビーム間隔100mm、試料室の大きさは幅120mm、奥行300mm、深さ140mmで、カバーは使い易さを考え、スライド方式を採用しました。

4. ABS-3~4が直接記録できます。

日立独自のディファレンシャル・ダ

イノードフィードバック方式の採用により、ABS-3~4 (ダイナミックレンジはABS-7相当)をいっしょに記録できます。

5. マイクロコンピュータによる完全演算方式

単なる装置内部の機構系コントロールやベースライン補正用ではなく、マイクロコンピュータにより、全ての演算を処理しています。 %T, ABS, シングルビーム、濃度直読、 $\times k$ 、微分、オートゼロ、波長域大、測光値拡大、レスポンス、スリットサーボ、などなど、全てコンピュータ処理ですから、従来のアナログ回路のような調整や誤差は一切ありません。常に安心して測定することができます。

6. 圧倒的な自由度の広さを誇ります。

スキャンスピード1003段、スリット幅 600段、波長拡大2000段、タイムドライブ 600段など、今までの切替段数 (せいぜい10段)から考えれば、比較にならぬほど自由度が増えました。

7. 抜群の機動力を発揮します。

リピートスキャン、波長プログラム、バックグラウンド消去、オートベースライン校正、オートゼロ、微分スペクトル、光源自動切替、オートペンポジション……すべて内蔵……完璧な自記分光光度計になりました。

8. 自動校正機能を内蔵

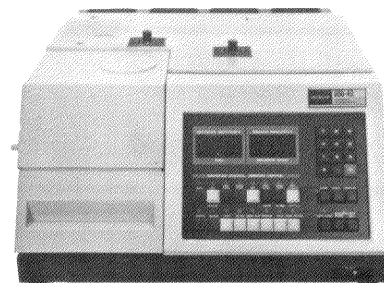
POWERスイッチを投入後、3分以内に自動的に校正、診断を行います。常に安定な状態で測定できるようになりました。

9. 据付は電源コード一本接続するだけ。

電源、記録計、マイクロコンピュータはすべて本体内部に内蔵しています。据付はコード一本継ぐだけ。本体のデザインは従来の板物設計を一掃、優雅な設計になりました。

高感度測定を可能にする
光学系にマイクロコンピ
ューターがプラス

650-40形

日立高感度分光けい光
光度計

650-40形 日立高感度分光けい光光度計

すでに1年前より市場で好評を得ている650-10形日立高感度分光けい光光度計の特長に加えて、マイクロコンピュータ内蔵による種々の特長があります。

■基本的な特長

(1)高感度

メカニカルルーリング大口徑凹面回折格子と、水平形試料室光束の採用により高感度測定が可能です。

(2)少試料量

通常の10mmセルを用いた場合でも、試料量は0.5mlですみます。

(3)広波長領域

石英バルブのXeランプ—300nm以下でもエネルギーロスがありません。

フォトマル R928F—850nmまですぐれた感度を示します。

(4)オゾン自己解消

有害オゾンを室内に出しません。

(5)高安定性

単色光モニターによる比測光方式です。

(6)試料室の広さと融通性

180mm×190mm。拡張可能です。

(7)バンドパス任意選択

1.5~20nm連続可変です。

■コンピューター内蔵による特長

(1)単純明解な操作方式

(2)ピーク波長自動検知・レコーダスケール自動調整

高速度のプリスキャンにより、最大ピーク波長を見つけます。また最大ピークがレコーダー上で約70%になるようレコーダー出力に対して自動利得調整することもできます。

(3)波長走査速度任意選択

1~480nm/min。480通り。

(4)オートゼロ、ゼロサプレッション

ワンタッチでゼロ点調整完了。溶媒けい光による浮上り補正も可能です。

(5)自動濃度換算表示

4秒間で濃度表示準備OKです。

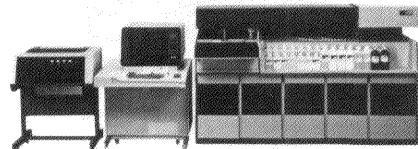
(6)時間積分

1~100秒間の積分値表示可能です。

(7)ダイナミックレンジの広い測光値表示

0.001より2000以上まで表示可能です。

1時間に150検体の高速 処理ができる 726形日立自動分析装置



726形 日立自動分析装置

本装置は、臨床検査用及び毒性試験用として、血清中のコレステロールや各種酵素などを比色分析法とレート分析法を組み合わせ16項目を同時に150検体/時のスピードで検体処理を行うため、分析件数の大幅アップが図れます。また、CRT(ブラウン管)ディスプレイを採用することにより、測定波長やその他の測定条件を容易に設定することができ、また分析中は測定データのモニターができるなど、操作性の大幅向上が図れます。

1. 比色分析法とレート分析法を併用して16項目を同時に分析します。

比色分析法と最大8項目のレート分析法を併用して同時に16項目分析し、さらにA/G比計算等の各項目間の計算によって求められる項目も最大4項目同時に計算し出力します。

2. 毎時150検体の高い処理能力を持っています。

毎時150検体を処理し、1検体当たり16項目(計算項目を含めて最大20項目)の分析データを出します。これは1時間に2,400分析(計算項目を含めて3,000分析)に相当し、従来の分析計に比べて処理能力が大幅にアップしています。

3. 16項目の分析と同時に、血清の乳ビ、溶血、黄色の度合いを測定します。

分析項目中にGOTまたはGPT(UV法、レート法)がある場合にはGOT(GPT)の反応液の可視域6波長の吸光度を同時に測定し、血清の乳ビ、溶血、黄色の度合を測定して分析データとともに出力します。

4. CRT(ブラウン管)ディスプレイを標準装備、測定条件を任意に設定でき、また測定モニターができます。

各種測定条件がキーボードよりCRTで確認しながら容易に設定することができます。また、キーボードからの指示により、分析中は測定データのモニターができ、さらに装置の状態も同時に表示します。

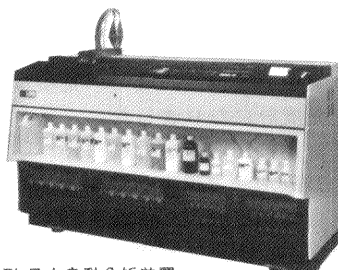
5. 高速プリンタにより、検査台帳のほか報告書の印字も可能です。

CRTからの指示により、検査台帳のほか、印刷された報告書用紙を高速プリンタにセットすることによって報告書の作成もできます。

6. パイロットサンプル(3種)の精度管理計算を自動的に行います。

最大3種のパイロットサンプルを挿入しておけば、自動的に精度管理計算(n , $\bar{x}$, SD , CV)を行い、その結果をCRTに表示します。

706形の自動分析装置シリーズ新鋭機、毎時480分析 712形 日立自動分析装置



712形 日立自動分析装置

さきに、臨床検査室の御要望に応え、400形、500形、716形、および706/706D形日立自動分析装置を発売し、ユーザの方々より格別な御愛顧をいただいております。このたび、自動分析装置のベストセラーとして高い評価を頂いています706/706D形をさらに性能アップさせた712形日立自動分析装置を発売しました。

712形は同時分析項目が1~12項目であり、処理能力は最大480分析です。従って、処理検体数が200検体/日以下の検査室は本機1台で12分析項目が自動化できます。分析法の設定・変更が容易であることとか、分析項目の切替が全自動であること等、706/706D形の特長は全て引継いでいますが、712形では内蔵のマイクロコンピュータの機能を最大限に活用し、さらにきめ細かい処理を行なっています。本装置は706/706D形と同様に、多項目処理を必要とする中、小病院でのルーチン検査、大病院、検査センターでのサブルーチン検査用、または生化学の研究用として最適な装置です。

■特長

1. 最大480分析/時間の高処理能力です。

効率のよいシングルライン・マルチアナリシス方式により、同時分析項目が少なくなれば、検体処理能力が向上します。たとえば、2項目分析なら、毎時240検体の高い検体処理能力を発揮します。

2. 分析項目の切換えはワンタッチです。

毎日のルーチン分析はOPERATIONボタンを押すだけ。検体のグループが変わるごとに、分析項目が自動的に切替わります。

3. 分析法ソフトの設定・変更が容易です。

比色分析とレート分析の選択、測定波長、血清や試薬量、モニタリング条件などの設定・変更が容易に行なえます。

4. レート分析法のデータ処理、モニタは強力です。

測光データをきめ細かに統計処理することにより分析結果の信頼性を向上させました。また、反応過程のモニタは、ノイズ、直線性、吸光度リミットなどをチェックしています。

5. マイクロコンピュータの内蔵により測定がすべて自動化されています。

<編集後記>

■「X線微小分析のための生物試料—基礎的諸問題—」の報文では、最近主流となりつつあるEDXを用いた、X線微小分析に理想的な試料である、無固定新鮮材料の凍結超薄切片についての分析における装置、分析方法、試料についての諸問題を詳細に報告して頂きました。

■本号の報文では、岡山大学の緒方先生に、高速液体クロマトグラフによる有機溶剤の

尿中代謝産物の定量について報告して頂きました。各種の代謝産物を、簡単な前処理で感度よく分別定量された実例と考えます。

本NEWSに関するお問合せは、下記へご連絡ください。

日立産業株式会社 精機部
東京都港区虎ノ門1丁目26番5号 第17森ビル
〒150 電話 ダイヤルイン 東京(03)504-7211

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
SPRING 1979 Vol.22 No.1

発行 昭和54年4月1日
(年4回 発行)

発行人 湯川 清
編集人 菱田真三郎 岩井孝之
発行者 株式会社 日立製作所 計測器事業部
〒105 東京都港区虎ノ門1丁目26番5号第17森ビル
電話 ダイヤルイン 東京(03)504-7866
印刷所 日立印刷株式会社