技術の日立

HITACHI

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

WINTER 1981
VOL.24 NO.3/4

目　次

報　文

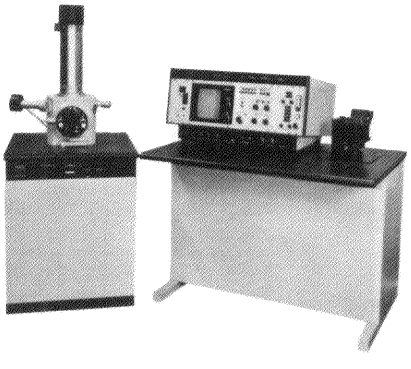
U.D.C. [548.74:537.533.71].087.5:620.186.84

エレクトロン・チャンネリング・パターン(Electron Channeling Pattern, ECP)による結晶方位解析と金属の粒界研究への応用

渡辺　忠雄*

1. 緒　言

単結晶の諸性質が結晶構造と同時に結晶方位に依存することから，結晶方位を制御することによって，単結晶の諸性質を制御しうることが考えられる。最近，実用材料開発の方面において結晶方位制御による材料開発が注目されており，集合組織をもつ多結晶体の諸性質の異方性を利用して新しい材料が開発されてきている。磁性材料としての珪素鋼板はその代表的なものであり，今後，機能材料開発の要求が益々高まると予想されるが，材料の諸性質をさらに向上させ，信頼度の高い材料を得ようとすれば，結晶方位制御がこれまで以上に要求されてくるものと思われる。したがって，結晶方位解析が基礎研究の分野だけでなく材料開発の応用分野においても，今や重要な実験手法の一つとなってきている。



S-450形　日立走査電子顕微鏡

結晶方位解析法としては，これまでX線回折による方法，透過電顕回折パターン法などが用いられているが，これらには一長一短がある。X線法では試料の前処理が比較的簡単な反面，精度よく（少なくとも1°以下），微小領域（100μ以下）の方位解析ができず，また時間がかかるという点からも，多くの試料の方位解析には適していない。一方，透過電顕回折パターン法は微小領域の方位解析を精度よく(0.1°)行なえるが，薄膜試料の作製という点で手軽な方法とはいえない。これら従来の方法の問題点を解決した方法として，ごく最近，エレクトロン・チャンネリング・パターン（ECP）法が注目されてきている。ECP法は後で詳しくのべるように，結晶方位解析法としては非常に優れた方法であるが，その歴史が浅いために（1967年にECPが初めて報告された）一般的な方法として未だ用いられるに至っていない。しかし今後，種々の分野においてSEMによる結晶性材料の表面観察に際し不可欠な結晶方位解析法として用いられることが予想される。

* 東北大学 工学部 金属材料工学科，助手，工博

2. ECP撮影に関する基礎知識

ECPの原理およびその応用に関しては，既にいくつかの優れた解説[1)~4)]があり，それらを参考にして戴くことにして，ここでは，ECPを用いる場合の実験手法に関する基礎知識についてのべる。

(a) 装　　置

著者が用いているECP装置は日立S-450型走査電子顕微鏡用に最近開発されたもので，その詳細はHitachi Technical Data(SEM No. 24)に示されている。標準仕様としては，加速電圧30kV，作動距離(W.D.) 5 mmのもとでロッキング径10μmϕで±15°のロッキング角を得ることができることになっている。実際には，さらに広い角度範囲でのロッキングができる。図1にはCu-50%Zn合金(bcc)焼鈍試料から得られた，ほぼ(001)を表面とする結晶粒からのECP写真を示している。この写真から視野内で少なくとも±16°のビーム・ロッキングがなされており(W.D.)10mm，三次，四次の高次のECPラインペアまでが得られていることがわかる。ECPは二次電子，反射電子いずれをつかっても観察しうるが，エネルギーの高い反射電子を用いた方が，より鮮明なECPが得られる。

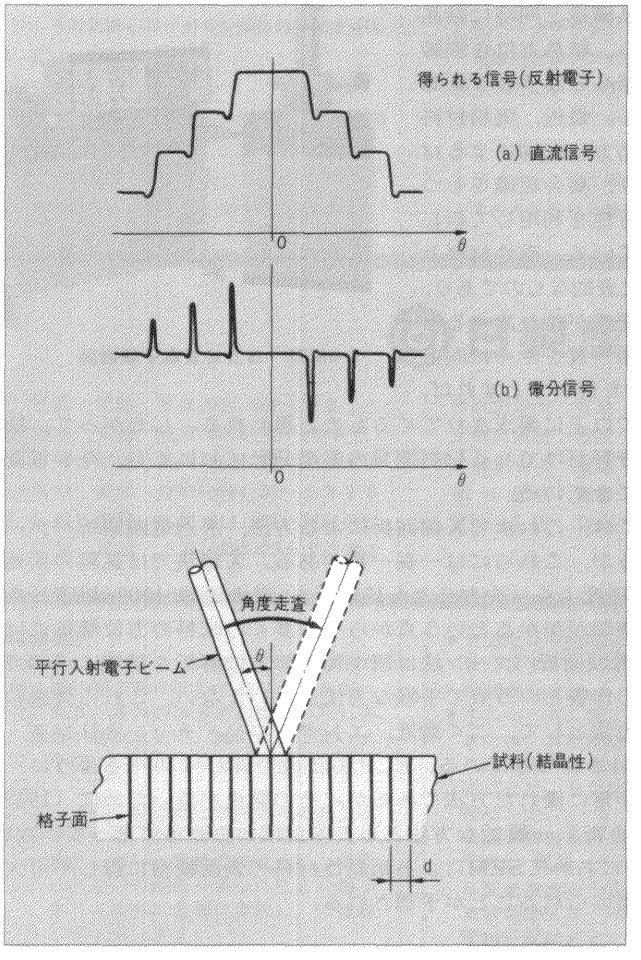
(b) 試料の表面状態

ECP法による結晶方位解析に供する試料の表面状態は，できるだけ平滑であることが望ましく，電解研摩などにより鏡面状態にあればより鮮明なECPが得られる。表面に深い溝や逆に表面に突き出たものがあると，ビーム・ロッキングによる結像がなされず，ECPはえにくい。また表面層に歪が残っていたり，表面に酸化膜が存在するとECPはぼけてくる。しかし，アルミニウム試料で電解研摩後デシケーターに入れておけば1年以上経過しても，図2に示すような鮮明なECPがえられるので，かなり厚い酸化膜でなければ比較的高い加速電圧(30kV，40kV)を用いることによってECP撮影は可能である。また，図3に示すように，エッチングによって表面に凹凸が生じている組織でもECP撮影時の焦点を適当に調整することによって図3(b)に見られるような，かなり鮮明なECPがえられる。しかし，一般には研摩直後が良質のECPがえやすい。

(c) 試料の種類

通常の金属材料では，単相で焼鈍状態のものはほとんど問題なくECPが観察される。強磁性材料でも，たとえば図3に示したFe-Co合金の例にみられるように，かなり鮮明

エレクトロン・チャンネリング・パターン法について



図A　エレクトロン・チャンネリング効果

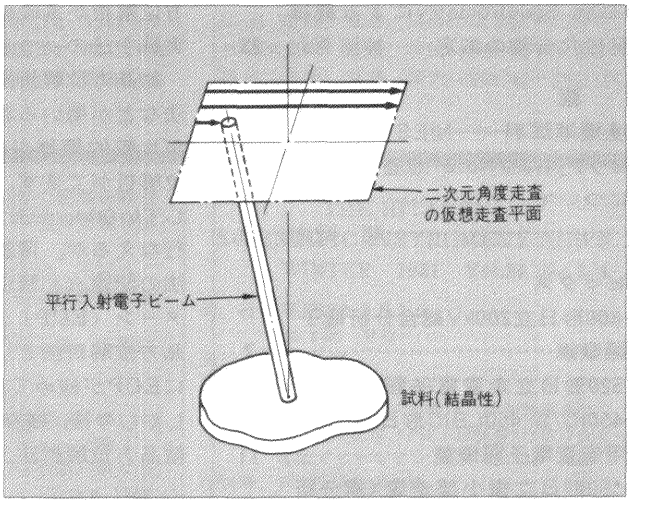
エレクトロン・チャンネリング・パターン法とは，面間隔 d の結晶に，入射角 θ で，波長 λ の平行電子ビームを照射すると，ブラッグの条件

$$n\lambda = 2d\ \sin\theta_b$$

を満たす入射角 θ_b の所で後方散乱電子(または試料吸収電子)の量に急激な変化が生じる(図A)。これをエレクトロン・チャンネリング効果といい，この情報を利用して結晶の性質を研究する。

電子ビームの試料照射点を固定したまま，電子ビームの入射角を変化させる方式をロッキング方式といい，多結晶性試料中のそれぞれの微結晶の性質(面方位，歪など)を研究できる。

エレクトロン・チャンネリング効果による情報を，陰極線管に二次元的に表示したものをエレクトロン・チャンネリング・パターンといい，これは陰極線管の偏向走査と同期して試料照射電子ビームの入射角度走査を行なわせることにより得られる(図B)。



図B　エレクトロン・チャンネリング・パターン

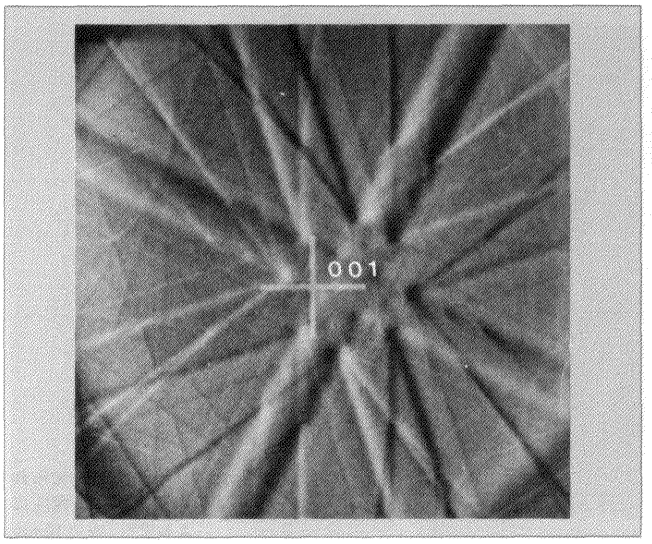


図1　Cu-50%Zn合金再結晶試料からのECP 加速電圧40kV, W.D.10mm, 反射電子

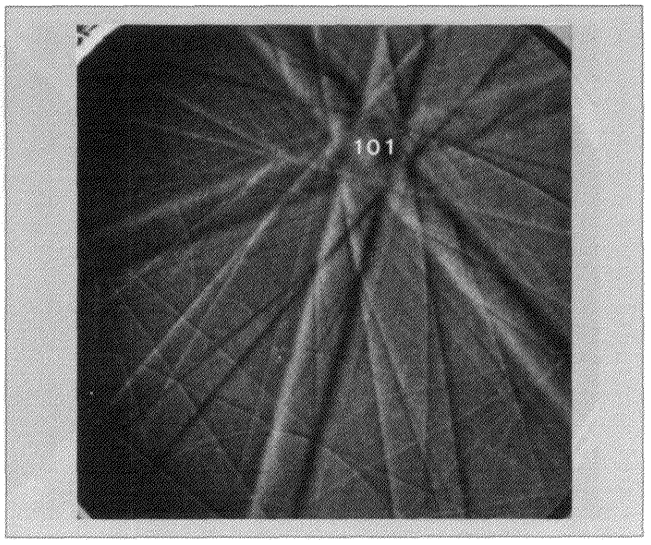


図2　加工したアルミニウム単結晶の再結晶粒からえられたECP. 加速電圧, 40kV, W.D.10mm, 反射電子

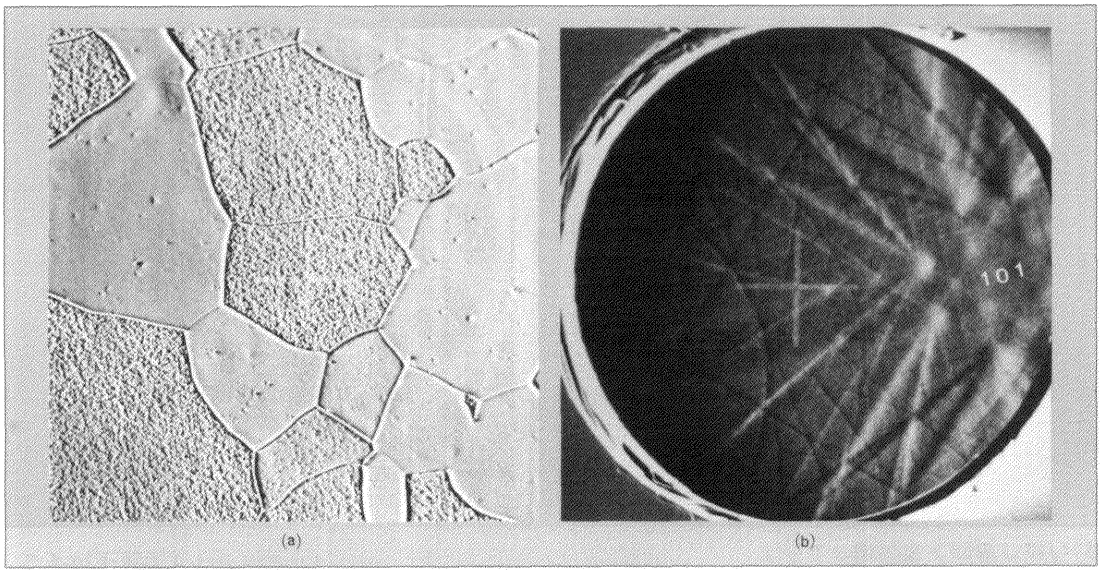


図3　エッチングによる表面の凹凸をもつ試料からのECP(Fe-20%Co合金, 加速電圧40kV, W.D.10mm, 反射電子)

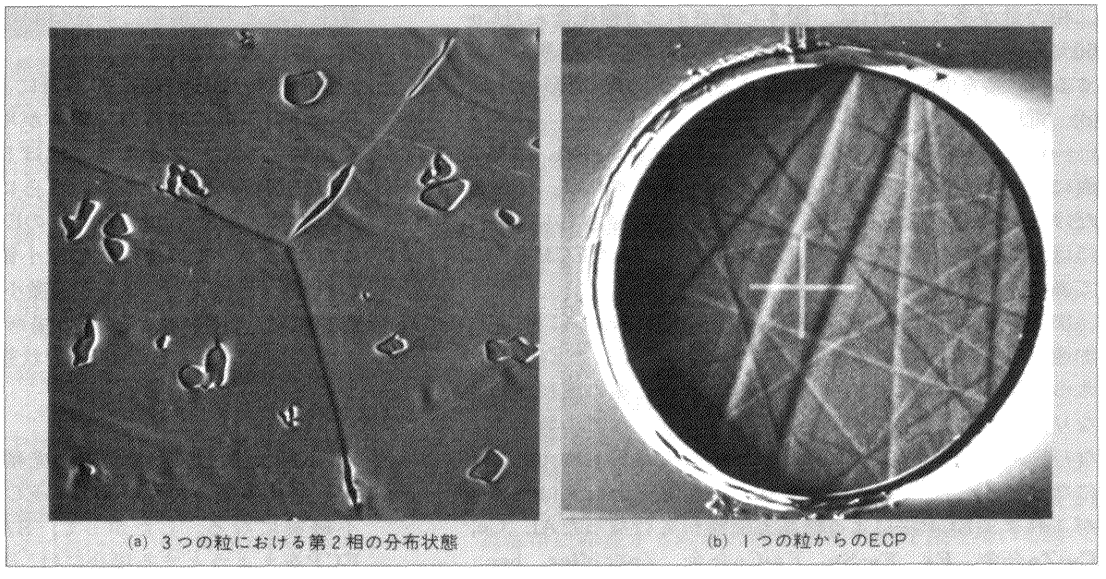


図4　第2相を含むCu-50%Zn合金からのECP

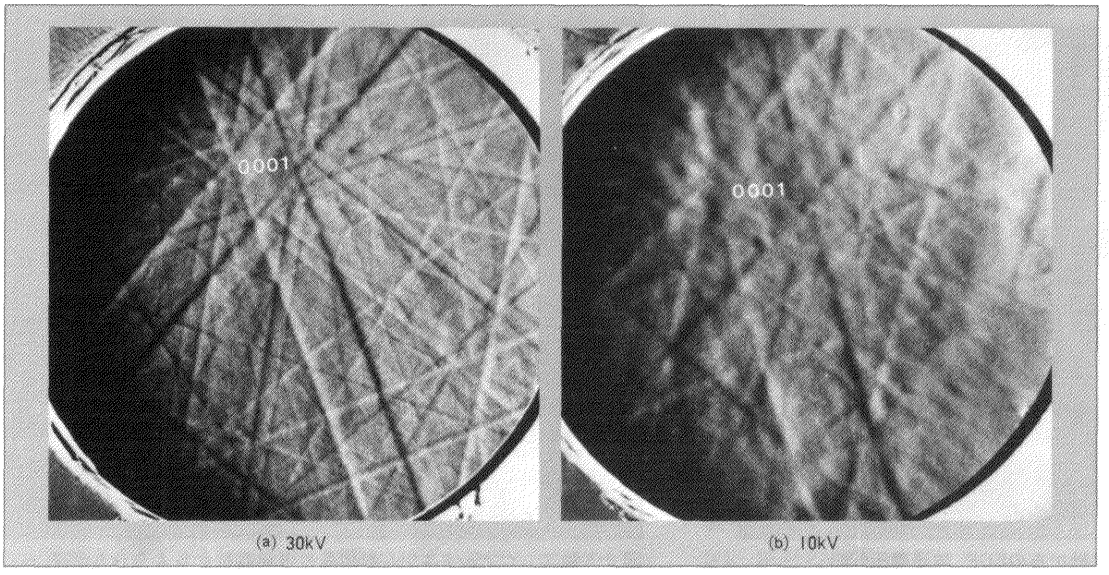


図5 Zn単結晶からえられるECPの加速電圧による変化(W.D.10mm, 反射電子)

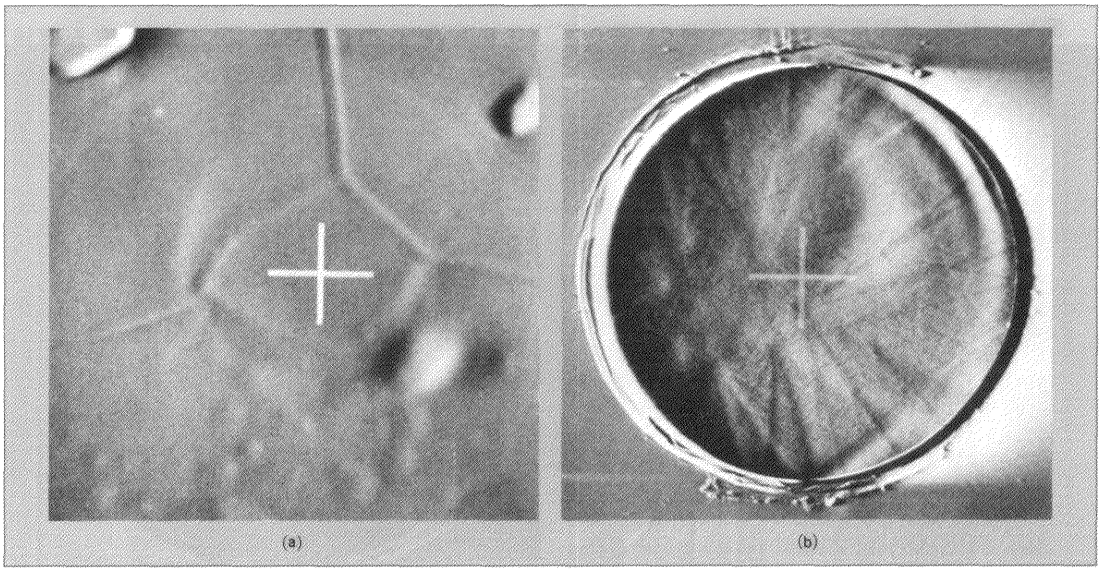


図6 鉄粉焼結体の微細粒(約5μm)でのECP観察(W.D.10mm, 加速電圧40kV, 反射電子によるECP)

な良質のECPがえられている。第二相を含む材料では，第二相の量が多くなければ，**図4**に示されるβ相を含んだCu-50%Zn合金の例にみられるように，コントラストは多少低下するが結晶方位解析に十分に供しうるECP写真が撮影される。

(d) 電圧効果

一般に加速電圧が高いほど鮮明なECPがえられ，試料表面に多少とも酸化膜が存在することを考慮すれば，できるだけ高い加速電圧でECPを観察することが望ましい。**図5**には，異なる加速電圧の下でZn単結晶からえたECPを示してある。

加速電圧30kVで鮮明なECPがえられているのに対して，加速電圧が10kVになるとかなり鮮明度の低下したECPしかえられない。また，加速電圧が高いと電子線の波長が短くなり，同一視野内に観察されるECPラインペアの数も多くなり，それだけ結晶方位解析のための情報量が増えることになり解析に際して有利である。加速電圧としては，著者がこれまでECP法による結晶方位解析を行なったAl，Cu，Cu-Zn合金，Fe，Fe-Sn，Fe-Co合金，Znなどfcc，bcc，hcpいずれの構造をとる試料に対しても，30kV以上の加速電圧で結晶方位解析に十分な鮮明度のECPがえられている。

(e) 解析領域の大きさ

制限視野ECP(SACP)解析により，標準仕様の装置では10μmφの領域の結晶方位解析が可能とされているが，**図6**に示すように，実際には，ほぼ5μmφの微小領域までの結晶方位解析が可能である。さらにまた，2つあるいは3つの異なる方位をもつ領域からのECPでも解析が可能であり，したがって，2μmφ程度の微小領域の方位解析も可能と思われる。ただし，このような微小領域のECP解析を行なうためには，SEM像とECPの場所的対応を確認しておくことが必要であり，SEM/ECP状態の光軸合せを厳密に行なうことが不可欠である。

(f) 軸合せ

SEM状態とECP状態での光軸が合っていないと，SEMで観察する望みの微小領域のECPがえられているかどうか不確実になる。したがって，SACPによって微小領域のECPをえようとする場合には，予め軸合せを十分に行なう

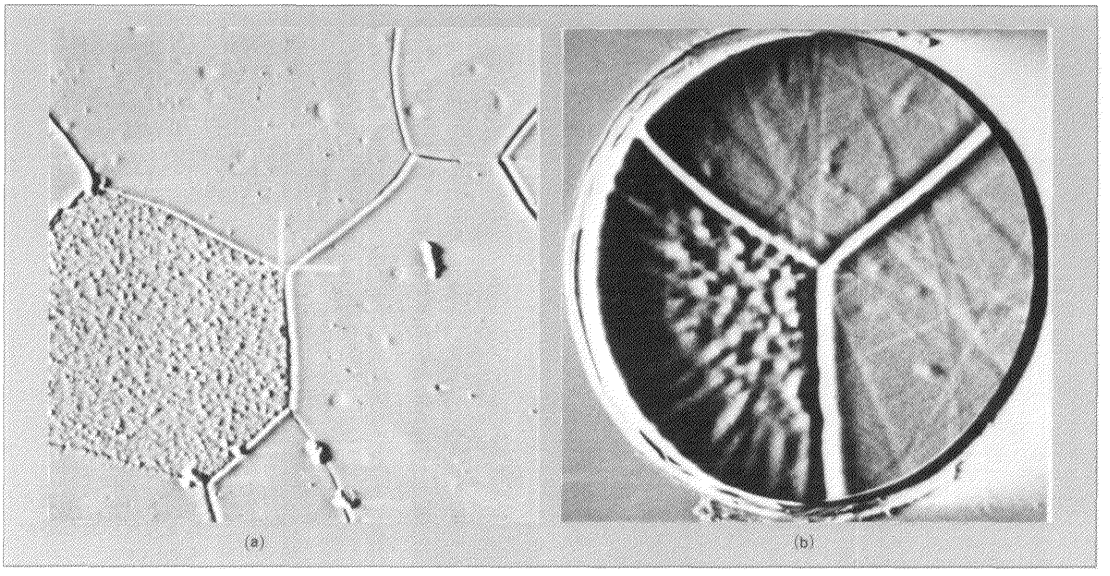


図7　粒界三重点を用いての軸合せ，およびSEM/ECPの場所的対応の確認

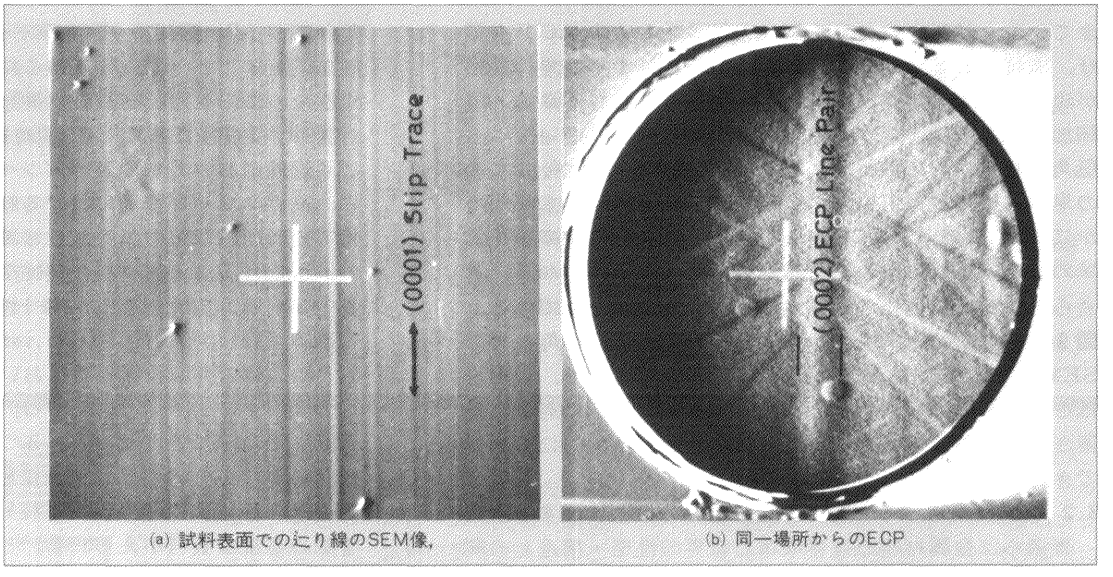


図8　(1010)表面をもつZn単結晶での辷り線およびECP観察

ことが不可欠である。軸合せには，図7に示すような多結晶試料の粒界三重点を用いると，SEM状態からECP状態へ観察を切替えた時の光軸のズレが3つの粒のECPそれぞれのズレから一目瞭然であり軸調整が容易である。ECP状態で焦点を調整してビーム・ロッキング位置を試料表面のわずか上方にもってくると，SEM像とECPとが同時に観察され軸合せが一層容易になる。また，粒界三重点を用いると，3つの粒界の向きがSEM/ECP切替えによって，像がどれだけ回転するかも調べやすく，次にのべる像の回転の補正もしやすい。

(g)　SEM/ECPでの像の相対的回転とその補正

SEM/ECP切替えによって，一般に像は相対的に回転し，SEMで観察された組織の特定の方向の結晶学的方位を決定しようとする場合には，この回転を補正しなければならない。ところで，SEM/ECP切替えに伴う像の回転角はECP状態での焦点位置に依存する。像の回転角と焦点調整ツマミの回転角との間には直線関係があるので，両者の関係を予め調べて補正カーブをえておけば，SEM/ECP切替えによっても像が全く回転しない(相対的に)条件がみつけられる。図8はこのような確認実験としてZn単結晶の辷り面((0001)面)トレース方向と(0002)ECPラインペアの方向との対応を調べて，像の相対的回転を確認した例を示してある。用いたZn単結晶は高温(350°C)で変形させたために，辷り線近傍でもほとんど歪がのこっておらず，変形した試料でもECPが観察される。ビーム・ロッキング位置を試料表面に対して上方，または下方に移動させることによってECP像は180°回転するので，SEM像との対応をつけるためには常にロッキング位置が試料表面のわずか上方にくるようにした方が，SEM像における特定の方向とECPからえられる結晶学的方位を直接対応させることが出来，後の解析が極めて容易になる。

3.　ECP法の結晶粒界研究への応用例

3.1　多結晶体における粒界性格分布の決定

SEM/ECP装置を用いると，微小領域のECPを短時間で撮影できることから，著者らは異なる履歴をもつ金属多結晶体中に存在する粒界の性格分布をECP法を用いて調べて

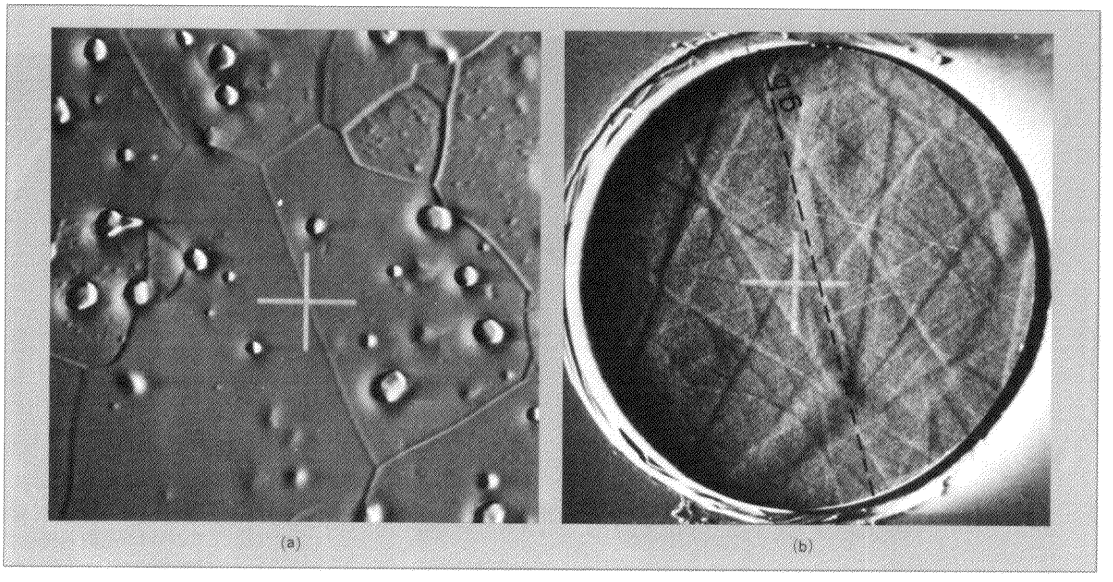


図9 鉄粉焼結体で観察される対称傾角粒界からのECP

きている。試料に含まれる個々の結晶粒からのＥＣＰを撮り，隣接する２つの結晶粒の相対方位関係から粒界の性格が決定され[5]，粒界の性格分布を調べることができる。圧縮加工したアルミニウム単結晶の再結晶組織においては，低角度粒界，対応粒界，ランダム粒界の存在比率が，はじめの単結晶板の表面方位および加工度に依存することが明らかにされている[6]。ECP法を用いると10μmϕ程度の微小領域の結晶方位解析を0.1°の精度で解析できることから，著者らは鉄粉焼結体での粒界性格分布をも調べてきている。図９は鉄粉焼結体で観察された，ほぼ対称な傾角粒界のSEMおよびECP写真である。ECP写真において，粒界をはさんで２つの粒の特定のECPラインペアがほぼ対称に配置されていることが知られ，粒界の性格が直感的にも判断できる。

3.2 塑性変形および破壊における粒界の役割に関する研究

著者らは金属材料の粒界破壊と粒界の性格・構造との関連に注目して，双結晶試料を用い，予め性格の決定された粒界の種々の性質（粒界辷り，粒界偏析，粒界破壊）を調べてきている[7]。図10は金属材料の高温粒界破壊に重要な役割を果たすことが知られている粒界辷りの機構を明らかにするために，亜鉛双結晶の粒界辷りをおこさせた〈1010〉対称傾角粒界のSEM/ECP同時撮影写真である[8]。粒界のごく近傍においてもECPラインペアがぼけていないことから，高温クリープ変形における粒界辷りに際して，粒界近傍での局所的な応力集中が生じていないことがわかる。このようにECPは金属材料の塑性変形に際しての局所的応力集中の有無，塑性変形の不均一性の調査にも用いることができる。

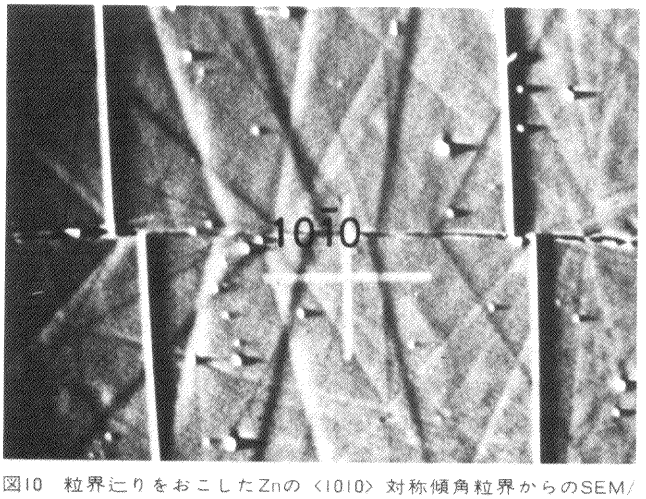


図10 粒界辷りをおこしたZnの〈1010〉対称傾角粒界からのSEM/ECP[8]（加速電圧40kV，W.D. 10mm）

多結晶体の高温粒界破壊において粒界三重点が重要な役割を果たすことが知られている。図11に示すように，粒界三重点でのECPを予めとり，３つの結晶粒の結晶学的配置を明らかにしておくと，塑性変形に際しての粒界近傍での歪の適合性および粒界破壊と粒界の性格との関連を検討する際の有益な資料がえられる。

4. ECPの応用における今後の課題

ECP法を用いると，X線法にくらべて写真撮影に要する時間が約２桁近くも短縮され，現在では写真撮影後の解析に要する時間が結晶方位解析の時間を決定するようになってきた。

そこで電算機グラフィックディスプレイで予め作製しておいたECPに，撮影したECPフィルムを重ね合せて直ちに結晶方位を読みとることによって，解析時間を数分に縮めることがなされている[9]。しかし今後は，ECPを観察したその場で直ちに結晶方位を解析してしまうソフトウェアの開発が必要とされる。結晶方位解析が，決しておっくうなものでなく，ほぼ半自動的に行なわれ，ECP法が他の方法の追随を許さないほどに優れた結晶方位解析法として広く一般に普及するためにも，このようなソフトウェアの開発が早急に望まれる。

5. おわりに

最後に，著者らのECPを用いた金属材料の粒界研究を可能とした三菱財団の研究助成に対し，また著者らの要望に応えて十分に満足すべき性能をもったECP装置の開発に努

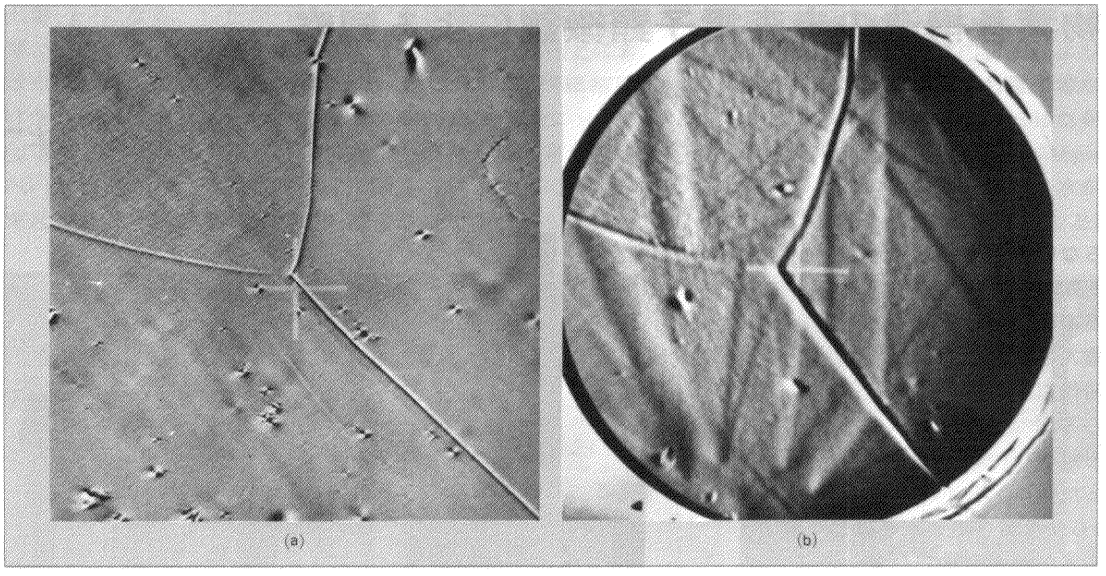


図11 Cu-50%Zn合金再結晶試料の粒界三重点からのECP

力して下さった日立製作所那珂工場の神田公生氏，斉藤 稔氏に感謝の意を表わすとともに，著者が日頃，有益なご助言とご討論を戴いている東北大学工学部，辛島誠一教授，東京大学生産技術研究所，石田洋一教授に感謝申し上げる次第である。

参考文献

1) 山本，高嶋：日本金属学会々報，13(1973)，177.
2) D.E.Newbury and H.Yakovitz：Practical Scanning Electron Microscopy. Plenum Press(1975)，149.
3) E.M.Schulson：J.Mater. Sci., 12(1977)，1071.
4) 山本・石田：材料科学，15(1978)，44.
5) 渡辺：日本金属学会々報，19(1980)，253.
6) T.Watanabe, N.Yoshikawa and S.Karashima：The 6th Intern. Conf. on Textures of Materials (1981)，To be published.
7) 渡辺：材料科学：17(1980)，77.
8) T.Watanabe："Creep and Fracture of Engineering Materials and Structures", Pineridge Press (1981)，263.
9) 森，石田，加藤：日本金属学会誌，41(1977)，326.

U.D.C.〔582.542.1-145.086.3〕:621.385.833.28

ソルガム属植物葉身構造の走査電子顕微鏡による観察

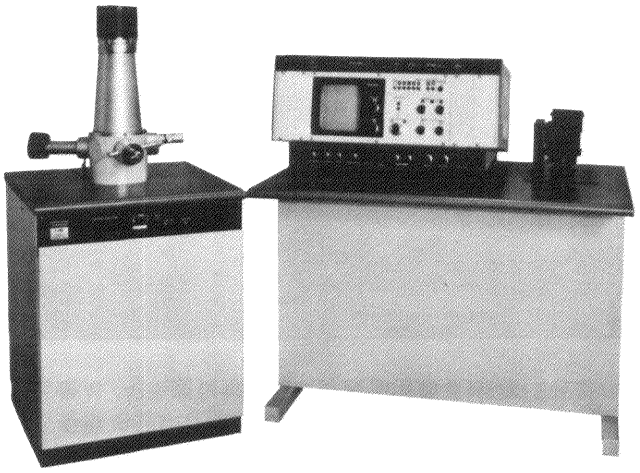
樽本　勲*　松本　健次**

1. はじめに

ソルガムと言っても知らない方が多いと思うが，ソルガムはトウモロコシ・米・麦類・大豆に次いで世界第5位の穀実作物であり，わが国の畜産に用いられる濃厚飼料の$\frac{1}{3}$がマイロという商品名で輸入されているソルガムの穀実でまかなわれている。また50代以上の方には「こうりゃん」・「あまきび」といった和名の方がなじみの深い作物で，その出穂前までの草姿はトウモロコシに類似する。このソルガムの葉に雨や打水がかかった時に，サトイモやキャベツの葉のように強い表面張力をもつ水滴を生じ水をはじく葉と，アオキや白菜の葉のように水が葉面全体に付着，あるいは大きい不整形の水滴が付着する葉，との2種類があり，また前者の特性が後者に対し優性に遺伝することが樽本(1980)により報告されている。後者の特性を持つ葉は黄緑～鮮緑色でつややかな光沢を持つことから光沢葉(g)，前者の葉は青緑色で光沢のないことから非光沢葉(G)と呼称されている。この一対の遺伝子の優劣性(*gl*/*Gl*)のちがいが葉身の消化率の高低(樽本ら，1981)にも関係することが明らかになった。筆者らはこれらの差異の解明のために葉身の表面および横断面を走査電子顕微鏡により観察し，二，三の知見を得たので，ここに報告する。

2. 材料と方法

ソルガム（*Sorghum bicolor*（L.）Moench）の3品種，SC112(*gl*)，Rancher(*gl*)，在来東近(*Gl*)を冬季に温室内で栽培し，第6葉令時に第2・5葉を，また第12葉令時に第11葉を，それぞれ光沢性についての調査の後に採取した。葉身採取後，葉面観察用には5㎜角の葉片，横断面観察用には葉脈に垂直方向に1㎜幅の葉片を鋭利なカミソリで切り取り，2.5%のグルタールアルデヒド液に2時間浸漬し固定した。次いでアルコール系列にて脱水した後，日立臨界点乾燥装置(HCP-1)で試料を乾燥し，真空蒸着装置の中で炭素と金の二重蒸着を施し，日立S-430形走査電子顕微鏡で葉上面(adaxial surface)および横断面(cross section)の観察を行なった。



S-430形日立走査電子顕微鏡

3. 結果および考察

(1) 葉面構造

図1～9および**図13**は供試3品種の第2，第5，第11葉の上面の微視構造(電子像)を示す。また**表1**は各葉の光沢性検定結果と電子像から観察した葉面上のepicuticular wax（クチクラ上に分泌されたロウ)および手茸の分布程度を示す。

供試した3品種の第2葉はすべて非光沢葉(G)であり，樽本(1980)で報告したように*gl*遺伝子の形質発現はされておらず，第2葉葉面上には星状のepicuticular waxが密生していた(**表1**，**図1～3**，**図13**)。SC112の第5葉は光沢葉(g)に変化し，観察視野の$\frac{1}{4}$～$\frac{1}{5}$の細胞上にしかepicuticular waxは観察されなかった(**図4**)。しかし，Rancherでは依然第5葉で*gl*遺伝子の形質発現はされず，在来東近の第5葉と同様に非光沢葉(G)に止まり，その微視構造は第2葉におけると同様であった(**表1**，**図5～6**)。*gl*遺伝子を持つSC112とRancherの葉は9葉以後の葉で完全な光

表1　供試3品種の第2，5，11葉の光沢性および葉身上面のepicuticular waxと手茸の分布

品種	第2葉			第5葉			第11葉		
	光沢性(1)	Wax(2)	手茸(3)	光沢性	Wax	手茸	光沢性	Wax	手茸
SC112	G	5	1	g	3～4	2	g	3	3
Rancher	G	5	1	G	5	2	g	2～3	3
在来東近	G	5	1	G	5	1	G	5	3

(1)非光沢葉(G)と光沢葉(g)は，水を噴霧することにより判別。
(2)Epicuticular waxの分布：1(1%以下)，2(5%前後)，3(20%前後)，4(50%前後)，5(80%以上)。
(3)手茸の分布：1(なし)，2(まれに存在)，3(かなりの頻度で存在)。

*農林水産省　草地試験場　牧草部　農博　　**日製産業株式会社　理化学機器センター

沢葉(g)になる。したがって，上記2品種の第11葉は光沢葉と判定され，**図7**，**8**に示すように⅕以下の細胞上にまばらに糸状・板状のepicuticular waxが，また縦列細胞間げきの一部に塊状のwaxが観察されるのみであった。一方，*Gl*遺伝子をもつ在来東近は第11葉でも依然として非光沢葉(G)と判定され，その微視構造は**図9**に示すように，在来東近の第2・第5葉のそれと同様であった。パールミレット(*Pennisetum glaucum*)やパニカム属(*Panicum spp.*)の一部には葉面上の手茸の密生により水をはじく特性を示す場合があるが，**図4**～**9**の電子像から明らかなようにソルガムでは手茸の密度は低い。したがって，ソルガムでは上記の結果のように葉面に星状のepicuticular waxが密生していることにより非光沢葉では水がはじかれ，一方，葉面のepicuticular waxの減少することにより光沢葉では水がは

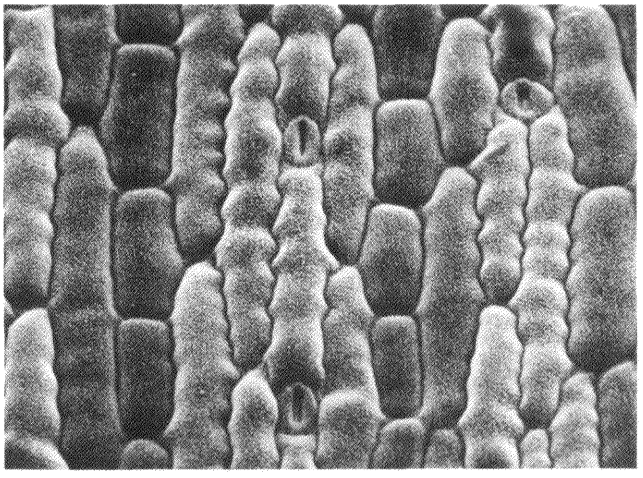


図1　SC112の第2葉(上面)　×500

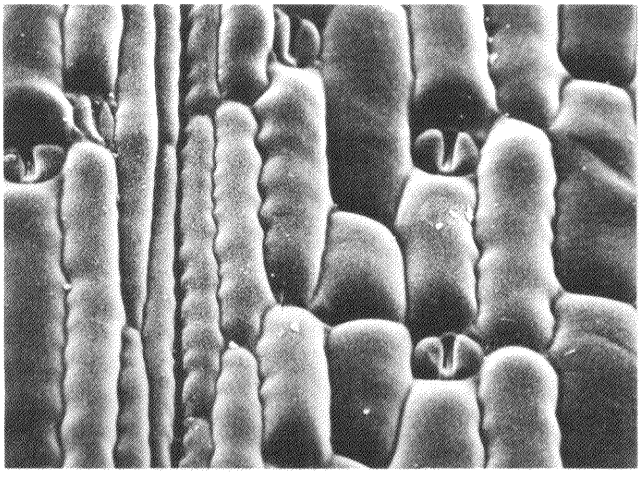


図2　Rancherの第2葉(上面)　×500

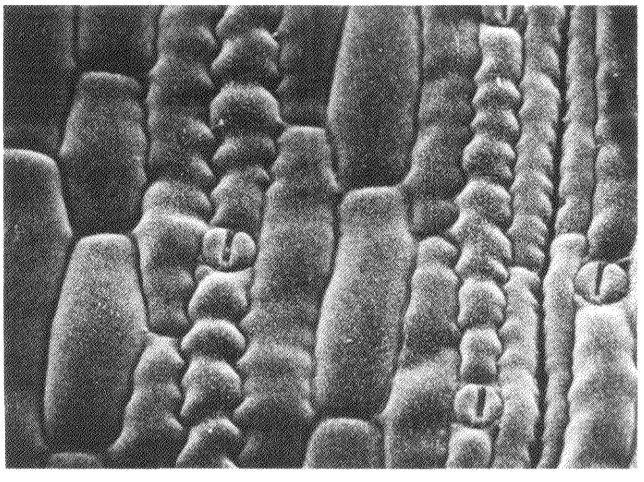


図3　在来東近の第2葉(上面)　×500

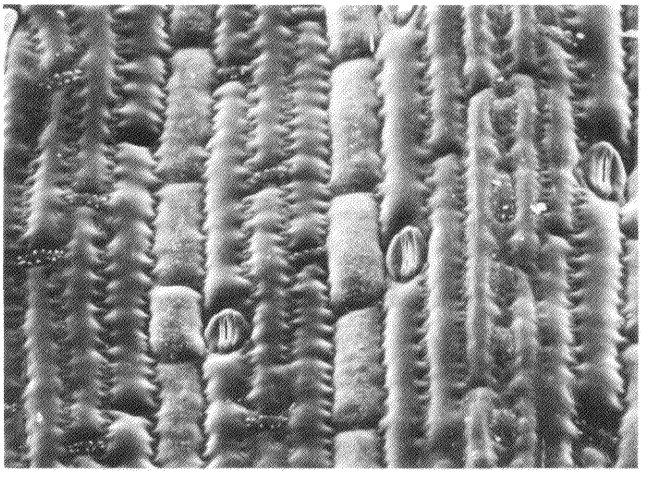


図4　SC112の第5葉(上面)　×500

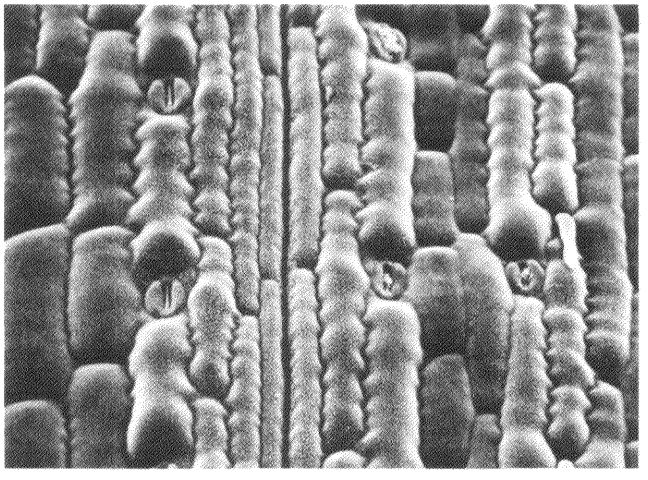


図5　Rancherの第5葉(上面)　×500

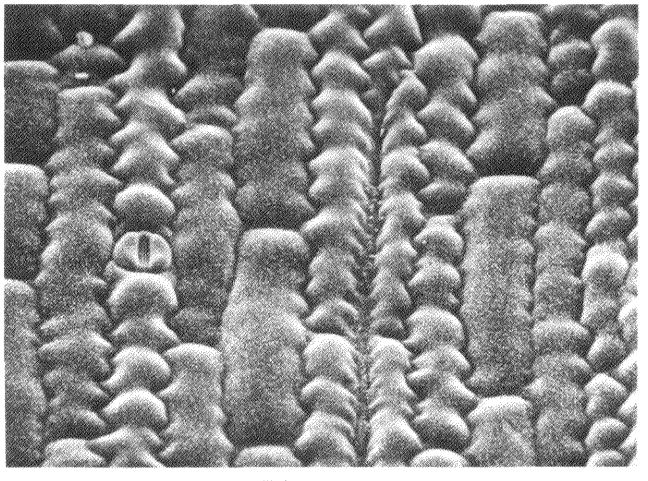


図6　在来東近の第5葉(上面)　×500

じかれなくなると考察される。また，非光沢葉の青緑色の葉色は葉面上に密生するepicuticular waxによる日光反射の影響，一方，光沢葉における光沢ある黄緑～鮮緑色の葉色はクチクラ外壁の露出によるものと考えられる。

(2) 横断面

図10～12にSC112，Rancher，在来東近の第11葉の横断面電子像を示す。非光沢葉(在来東近：**図12**)のクチクラの外壁は，カミソリ切断で容易に折れ曲がるほどに柔らかい構造を持ち，またその外壁の厚さは光沢葉(SC112：**図10**，Rancher：**図11**)のそれと比較し，かなり薄いと観察される。

クチクラ上に分泌されるepicuticular waxは外環境に対する障壁(barrier)のひとつであり，またクチクラ自体もまた同様の機能を持つ。樽本ら(1981)は，ソルガム葉身のセルラーゼ酵素による分解試験において，非光沢葉が光沢葉

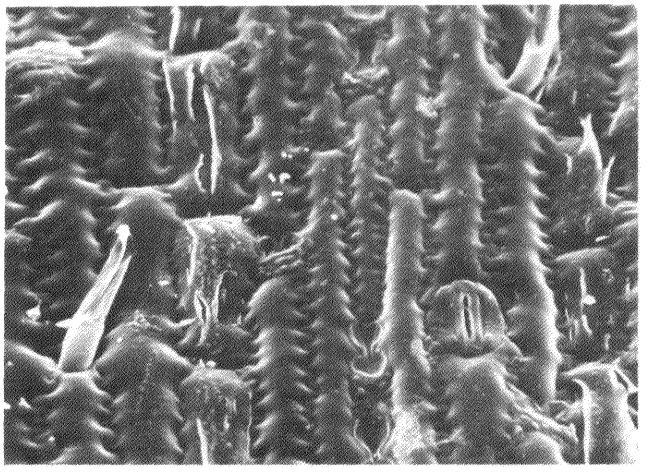


図7 SC112の第11葉(上面) ×800

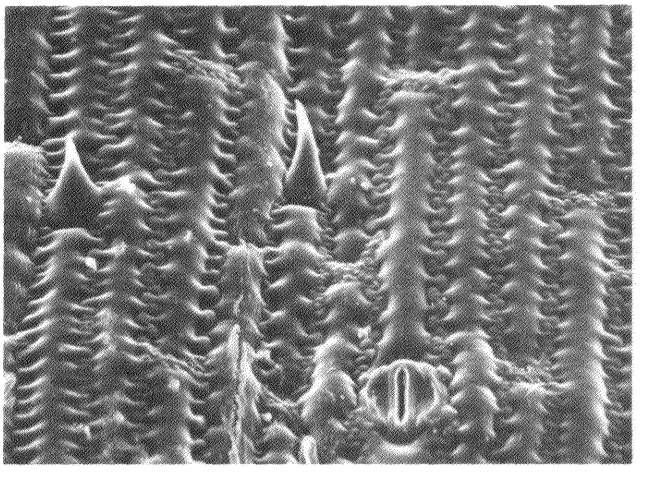


図8 Rancherの第11葉(上面) ×800

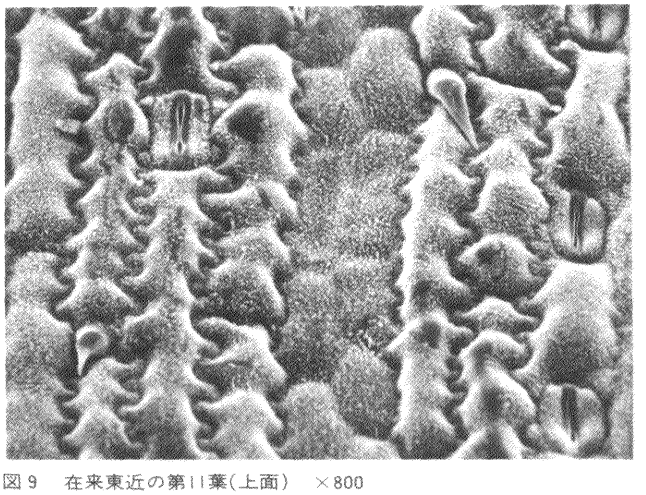


図9 在来東近の第11葉(上面) ×800

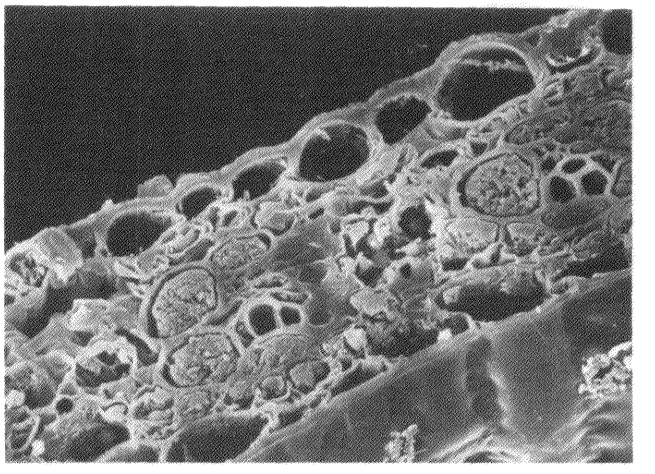


図10 SC112の第11葉(横断面) ×1000

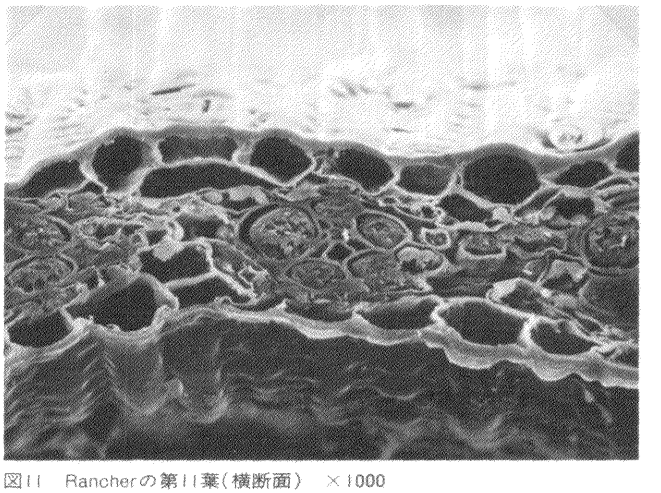


図11 Rancherの第11葉(横断面) ×1000

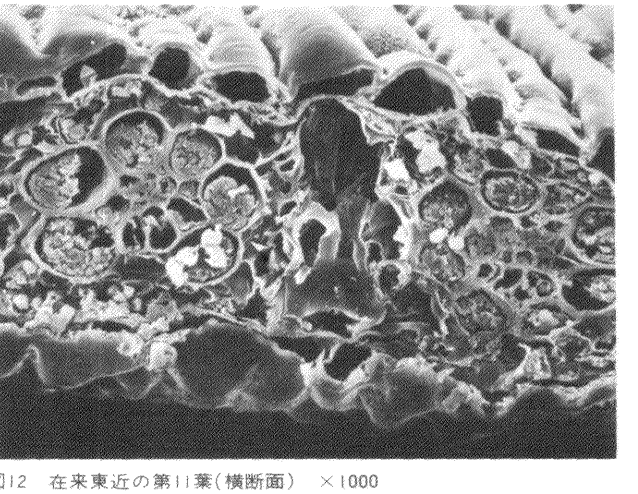


図12 在来東近の第11葉(横断面) ×1000

図13　在来東近の第2葉(上面)　×2500

よりも分解率が高いことを報告している。この結果は，セルラーゼ酵素の侵入と分解に対して，epicuticular waxは少ないが，厚く堅固なクチクラ外壁を持つ光沢葉の方が，クラクラ表面に密生するepicuticular waxで防御されるが，薄く柔らかいクラクラ外壁を持つ非光沢葉より防御力が大であった結果によると考察される。同様の傾向が耐干ばつ性や耐虫性においても示されるようであり，現在のところでは，外環境に対する葉表面での防御力としては，epicuticular waxの密生より厚く堅固なクチクラ外壁の方が優性と考えられる。

4.おわりに

走査電子顕微鏡を用いての微視構造の観察により，光沢性遺伝子により発現される可視特性や酵素による分解率の差異の原因をほぼ解明しえた。

筆者の一人は，日長，試験圃場をうろつき回り，頭中のミニコンに内蔵された遺伝情報と表現型の結びつきを糧に，より良い品種をと選抜を続けている育種家であるが，このたびのように良き共同研究者を得，遺伝子ー可視特性から遺伝子ー微視特性への視点を開くことが出来たことに感謝している。

■参考文献

1) Tarumoto, I：Japan. J. Breed, 30, 237(1980)。
2) 樽本勲，正岡淑邦，井沢弘一：育雑，31（別冊-1），166，(1981)。

U.D.C.535.343.32-2.087:〔547.977:581.132〕

アロフィコシアニンの吸収スペクトル解析

三室　守**　村上　明男**　藤田　善彦*,**

1. 序

フィコビリン蛋白は，開裂したテトラピロールと，アポ蛋白が共有結合したものである。この色素蛋白は，藍藻，紅藻，クリプト藻等に見い出され，その光合成系で，光エネルギーを捕獲し，光化学反応中心と呼ばれるクロロフィル a -蛋白質複合体へその励起エネルギーを供給する光合成色素である。この光エネルギー捕獲色素は，反応中心に比べて100～200倍量存在し，その色素間の励起エネルギー転移効率は，各色素間の距離，遷移モーメントの配向，吸収スペクトルと蛍光スペクトルとの重なり合い等の因子により決められる。こうした光合成色素系でのエネルギーの流れを考える際には，各構成成分の性格を明確に把握することが解析の第一歩となる。この観点から我々は，フィコビリン蛋白の吸収スペクトル解析から，発色団の電子状態の規定因子の探索，理論計算を用いた発色団の分子内立体構造等について検討を進めている。ここではフィコビリン蛋白の一種アロフィコシアニンについての解析を紹介する[1)]。

2. 材　料

アロフィコシアニンは，藍藻Anabaena cylindricaから，硫安分画，イオン交換カラムクロマトグラフィーにより，分離・精製した。

3. 装置の概要

分光測定では，分解能，波長精度が高く迷光の少ないことが必須条件なので，我々は日立340形分光光度計を用いた。更に，付加機能を持たせるためにキーボード付属装置を付けている。必要に応じて，外部のホストコンピューターとして，HP9845Sを用い，キーボード付属装置との間で，分光光度計の制御，データ転送を行なわせている（**図1**参照）。

測定は室温（25℃）で行ない，通常サイドオンフォトマルチプライヤーを用いる。バンドパスは1nmを超えることはない。測定する試料は特に記さない限り，10mMリン酸緩衝溶液（pH6.0）である。

4. 蛍光の影響

アロフィコシアニンは蛍光性色素であるから，濃い試料を測定する場合などは蛍光の吸収スペクトルへの影響が懸念される。そこでこの点を第一に検討してみた。アロフィコシアニンは蛋白質濃度に依存して吸収スペクトルが変化するので（後述），一定濃度の試料（8 μM，1.6Mショ糖溶液）について，スペーサーを用いて光路長を変化させ吸光度を測定した。濃いショ糖溶液を用いたので，光路長を変化させる毎に，ベースラインの再補正を行なった。**図2**に結果を示す。最も吸光度の高い651nmにおいて，吸光度2.0までは測点は直線にのる。線形回帰法により求めた相関係数

キーボード付属装置を装着した340形日立自記分光光度計

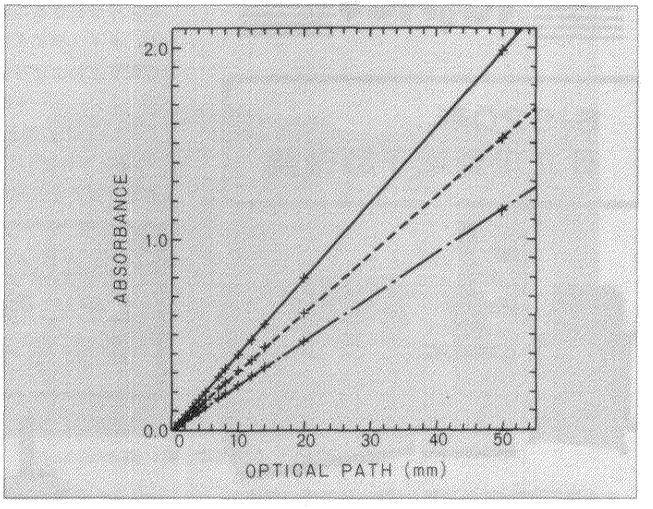


図2　吸収スペクトルに対する蛍光の影響の検討　＋印は実測値を，直線は線形回帰法により求めた回帰直線を示す。実線：651nm，破線：620nm，一点鎖線：595nm

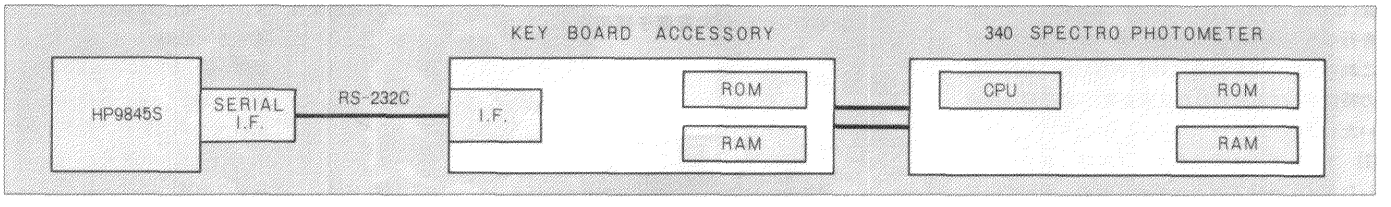


図1　装置の概要

*東京大学　海洋研究所　　**基礎生物学研究所

は，0.99999，F比は2,500,000以上であり，99.9%の信頼性で直線とみなしうる。こうした高い信頼性は，500～700nmの波長領域においても確保され，我々の測定条件（通常A_{651}≦0.5）では，蛍光の影響はほぼ完全に除かれている。これは同時に，装置の示す測定値の信頼性(特に，ディジタルログ変換機能の信頼性)をも示すものである。

5. 結　果

図3にアロフィコシアニンの吸収スペクトルを示す。651nmに特徴的な吸収極大を示し，623，595nmに肩が認められる。これらの吸収帯はいずれも発色団フィコシアノビリンに由来する。651nmの吸光度は，溶液の物理化学的条件に依存して大きく変化する。色素蛋白の場合，発色団の電子状態は，(i)発色団間の相互作用，(ii)発色団－ペプチド鎖間の相互作用，のいずれかにより決定されると考えられる。そこで651nmの吸光度変化を指標として，以下の解析を進めた。

(1)　蛋白質濃度による変化

蛋白質濃度を82μM(A_{651}≦2.0(1mmセル))から希釈するに従い(**図3**)，651nmの吸収強度が低下し，41nM(2,000倍希釈(100mmセル))ではもはや極大を示さず肩となり，極大波長も青方偏移して649nmとなる。この変化は可逆的であり，希釈溶液をコロジオンバッグ等により濃縮することにより，スペクトルは元へもどる。この変化に関与する成分は差スペクトルにより求められる(**図4**)。差スペクトル測定に際してはキーボード付属装置の補助ベースライン記憶モードを用いることにより，オリジナルなベースラインを消すことなく容易に測定が可能である。濃度低下により減少する成分は，651nm付近に極小を示す対称性の良い成分で，増加成分は610nmより短波長側に存在し，少なくとも2つの成分の存在が観察される。

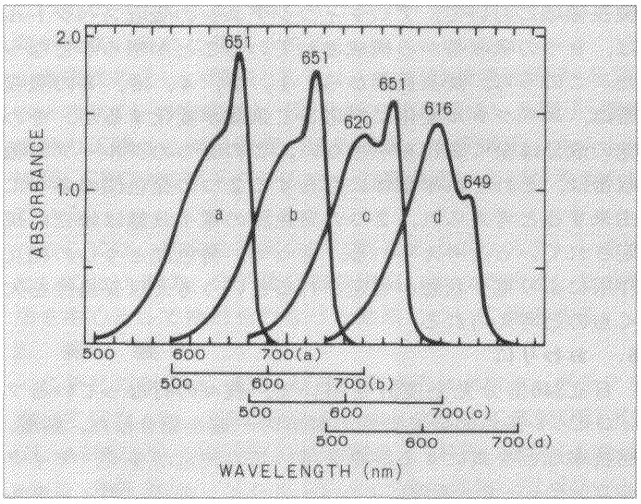


図3　蛋白質濃度に依存したアロフィコシアニンの吸収スペクトル変化
a：82μM，b：4.1μM，c：410nM，d：41nM，b，c，dのスペクトルはそれぞれ，2倍，20倍，20倍に描いてある。

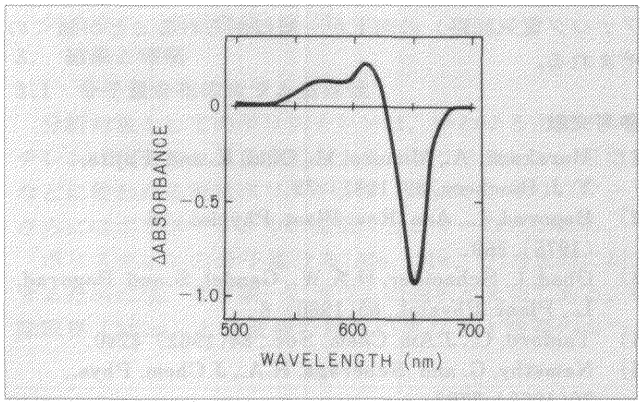


図4　蛋白質濃度変化による差スペクトル　図は，図3のdのスペクトルからaのスペクトルを引いて求めた。

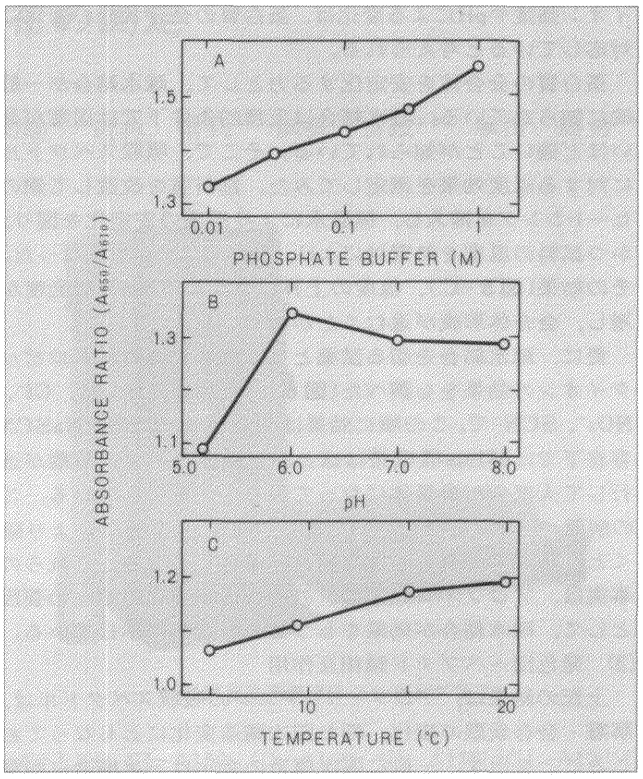


図5　物理化学的条件変化による吸光度比の変化　A：リン酸緩衝溶液(pH6.0)の濃度変化，B：トリス・マレイン酸緩衝溶液のpH変化，C：温度変化(10mMリン酸緩衝溶液)による吸光度比を示す。

これ以降，我々は(C)のスペクトルに対応するアロフィコシアニン濃度(0.4μM)を標準条件とした。この条件下では，アロフィコシアニン三量体が主成分となる。

(2)　物理化学的環境による変化

イオン強度，pH，温度等の条件変化はアロフィコシアニンの吸収スペクトルに大きな影響を与える。イオン強度の増加(**図5－A**)は，651nmの吸収強度の増加をもたらし，1Mリン酸緩衝溶接中では，約30倍の蛋白質濃度変化に対応するスペクトル変化が観察される。イオン強度の増加は，アロフィコシアニンの会合体形成を促進することが知られている[2]。pHの効果(**図5－B**)は6.0以上では大きくないが，pHを低下させ，アロフィコシアニンの等電点（pI4.6）に近づけると651nmの吸収強度は急激に減少する。Ohadら[3]の報告によると等電点に近いpHでは，アロフィコシアニンは単量体として存在する確率が高いとされている。従って，

イオン強度やpHによる変化は，蛋白質の会合状態の変化に対応していると考えられる。

蛋白質の会合体を安定化する力として，疎水結合が一般的に知られている。疎水結合は生理的条件下では温度が高いほど強いことが知られている。そこで，吸収スペクトルに対する温度効果を測定してみた。試料室を改造して銅のヒートシンクを挿入し，恒温水により温度の安定化を図り，かつ試料の温度を熱電対により，同時モニターを行なった。その結果(**図5-C**)，温度の上昇につれて651nmの吸光度が増し，会合体形成が進むことが判明した。

更に，疎水結合を切る試薬として知られるカオトロピックイオンの効果をも調べた(**図6**)。用いたイオンは，Cl^-，NO_3^-，SCN^-で，この順に効果は強くなり，0.25M NaSCN存在下では651nm吸収帯はほとんど検出されず，解離が進行して大部分が単量体になっていることを示している。この解離・会合反応は可逆的であり，NaSCNを透析により除くと，吸収スペクトルは対照とほぼ等しくなる。これらの事実は，アロフィコシアニンの会合体安定化の第一の要因として，疎水結合が効果をもつことを端的に示している。

(3) 発色団－ペプチド鎖相互作用

上記の結果は，アロフィコシアニンの吸収スペクトルは，解離・会合状態の変化，即ち四次構造変化にともなっておこることを示す。一般に四次構造の変化は三次構造に影響を与えていると考えられるので，アロフィコシアニンの吸収スペクトル変化は，本質的には蛋白質の三次構造に依存すると考えるのが妥当であろう。とすると発色団は直接ペプチド鎖の立体構造に影響される，即ち，発色団-ペプチド鎖相互作用が第一義的要因と考えられる。だが，三次構造変化により誘起される発色団間の相互作用による電子状態の規定という考えも完全には否定できない。なぜなら，単量体の場合でさえ，二分子の発色団が存在することが知られているからで，この点の検討を異なる手法を用いて行なった。

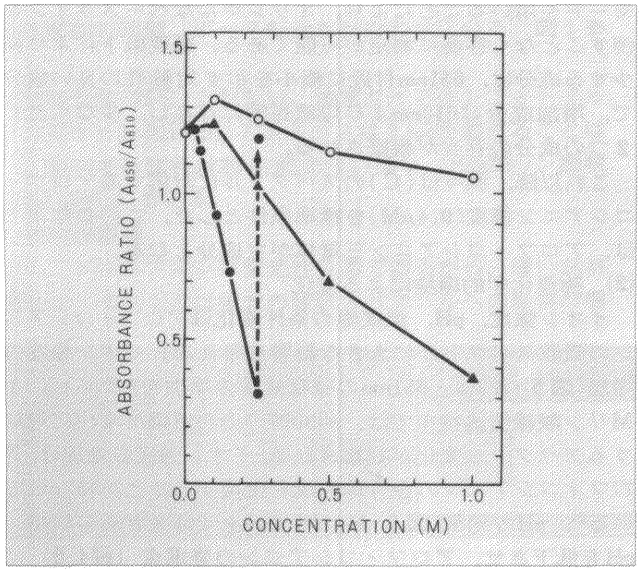


図6 アロフィコシアニンの吸光度比に対するカオトロピックイオンの影響 ○：NaCl，▲：$NaNO_3$，●：NaSCN・破線は，0.25 M NaSCNを透析で除いた後で吸光度比の回復を示す。

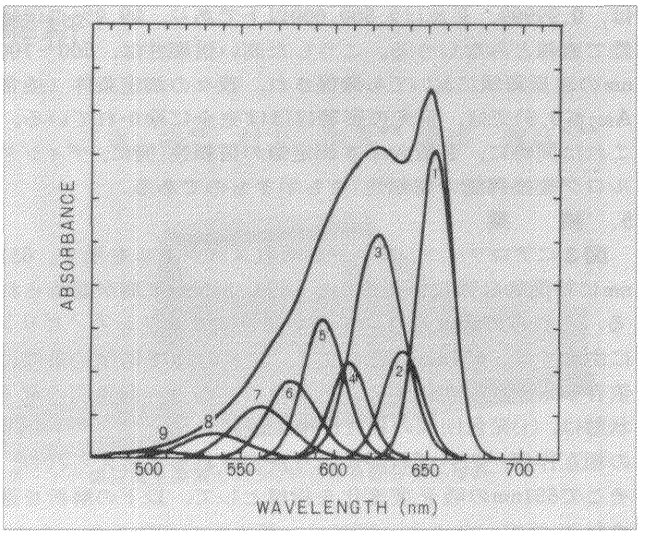


図7 アロフィコシアニンの吸収スペクトルの波形分析。

吸収スペクトルの波形分析の結果(**図7**)[6]，470～720nm波長領域において，アロフィコシアニンの吸収スペクトルは，9つの吸収帯から構成されていることが明らかとなった。このうち，長波長側から，1，2，4，6，8の吸収帯は，スペクトル変化に対応して強度が変化するが，その他の成分は全く変化を示さない。この2つのグループの吸収帯は，それぞれ単量体に存在する2つの発色団の各々に由来すると考えられ，2つの発色団の電子状態は独立に規定されていると考えられる。従って，発色団どうしの相互作用により電子状態が規定されるという考えは妥当性を欠くものと考えられる。

6. おわりに

日立340型分光光度計を用いて，我々の行なっているフィコビリン蛋白の分光特性の解析の一端を紹介した。粘度，屈折率などを異にする溶媒を用いての測定が多く，マイクロコンピューター処理によるベースライン補正，ディジタルログ変換は，一連の測定の中で遺憾なくその威力を発揮した。今後の分光光度計では，マイクロコンピューター制御が標準になると思われる。しかし，センサーとしての性能が第一義的に重要であり，センサー自身の性能（光学系，アナログ電気回路）の向上が一層はかられることが強くのぞまれる。

参考文献

1) Murakami, A., Mimuro, M., Ohki, K. and Fujita, Y. J. Biochem., 89(1981) 79.
2) Bogorad, L., Ann. Rev. Plant Physiol., 26 (1975) 369.
3) Ohad, I., Schneider, H.A.W., Gendel, S. and Bogorad, L., Plant Physiol., 65(1980) 6.
4) Tanford, C., J.Am. Chem. Soc., 84(1962) 4240.
5) Nemethy, G. and Scheraga, H.A., J.Chem. Phys., 36(1962) 3382
6) Mimuro, M., Murakami, A. and Fujita, Y., Arch. Biochem. Biophys. in press.

U.D.C.541.24.08:543.544.4:678.746.222

GPCによるポリスチレンの分子量分布の測定

向山　吉之*　杉谷　初雄*　近角　信利*　浜野　吉政**　塚田　勝男**

1. 緒　言

テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）やクロロホルムなどの汎用溶媒に可溶な高分子材料を対象とした分子量分布の測定は，分析機器やデータ処理装置などの進歩により，高速ゲルパーミェーションクロマトグラフィー（ＧＰＣ）を利用して簡便，迅速に行なわれるようになった。さらに，汎用有機溶媒に不溶な試料でも可溶化する適当な単一又は混合溶媒系を見い出せば，必ずしも高温に限らず常温付近でも測定可能となりつつある。

しかし，実際に品質管理などにＧＰＣを利用する場合には，適当な標準物質がなかったり，あったとしてもＧＰＣクロマトグラムから算出される数平均分子量（Mn），重量平均分子量（Mw），分散度（Ｄ）などに再現性が乏しかったり，真値からのズレが心配なために，単にパターン比較に終っているケースもある。特にオリゴマー領域の分析でこの傾向が大きいものと考えられる。

再現性の乏しい理由としては，主に(1)装置的因子（流量，ベースラインの安定性），(2)分析方法に関係した因子（標準試料の正確さと測定濃度，試料濃度と感度補正，カラムの種類，GPCクロマトグラムからの算出法）などが考えられている。

ここでは，代表的な高分子材料であるポリスチレンを例としてとりあげ，分子量分布の測定について前述した分析法を中心として検討を行なった結果について報告する。

2. 実　験

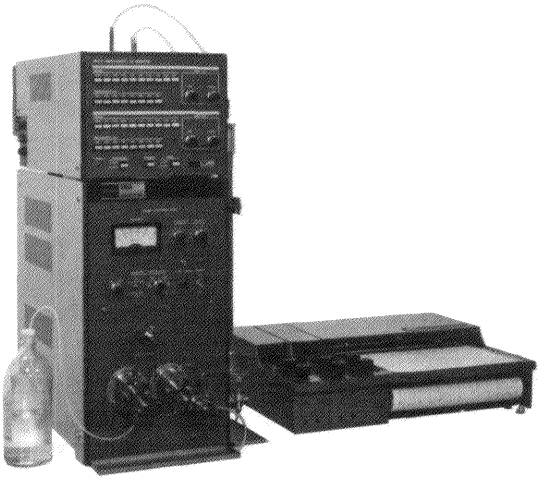
ＧＰＣの測定は，635A形日立高速液体クロマトグラフを用いて行なった。GPC用カラムは日立化成工業製GELKO GL-A100シリーズを用いた（溶離液：THF，流量：1.0ml/min）。分取用カラムとしては日立化成工業製GELKO GL-P220を用いクロロホルムを溶離液として測定した。検出器はＵＶ（日立Ｍモニター）又はRI（ＬＤＣ社製）を用い，ポリスチレン標準物質としてはNBS706を使用した。検量線作成用ポリスチレンは分子量既知の市販品（プレッシャーケミカル，東洋曹達）を用いた。

3. 結果と考察

3.1 分子量分布のカラム依存性

分析対象としてのポリスチレンは，いわゆる市販ポリスチレンに代表される重合度の大きいポリスチレン，可塑剤などに使われる液状ポリスチレン（スチレンオリゴマー）さらにはポリスチレン中の微量オリゴマーなどがある。

ポリスチレンの分子量分布（Mn，Mw，D）を正確に測定するためには，まず第一にカラムの選択が大切である。排除限界（Mlim）と検量線の傾きの異なる4種類のカラム



635A形日立高速液体クロマトグラフ

（GELKO GL-A150，GL-A160，GL-A170，GL-A100M）各1本を用いて測定したNBS706の測定結果を**表1**に示した。これらの結果は，Mnに大きな違いはないものの，Mlimが小さい程Mwが大きくなる傾向を示した。特にGL-A150のMwが大きく，再現性の悪い理由としては，ピーク位置（Mp）がMlimに近くテーリングしたGPCクロマトグラムのためと考えられる。GL-A160，GL-A170，GL-A100Mについては，各ＧＰＣクロマトグラムも比較的左右対称のパターンを示し，Mn，Mw，Dにもそれ程大きな違いはなか

表1 Calculation of Molecular Weight Averages from GPC Chromatograms

Polystyrene Standard(NBS706)
(Light Scatteringによる)
Mn：122800
Mw：257800
D　：2.10

CONDITION
INSTRUMENT HITACHI635A
SAMPLE Polystyrene(NBS706)
COLUMN 8 mmID×500mmL, RT ℃
COLUMN PACKING GL-A150, A160, A170, A100M
SOLVENT THF
FLOW RATE 1.0ml/min
DETECTOR RI
SENSITIVITY 8
CHART SPEED 10 mm/min

Grade		GL-A150	GL-A160	GL-A170	GL-A100M
Exclusion limit(Mlim)		5×10^5	5×10^5	5×10^7	5×10^7
Measurment (n)		6	6	6	6
$\overline{Mn}$		1.32×10^5	1.36×10^5	1.26×10^5	1.32×10^5
$\overline{Mw}$		3.01×10^5	2.61×10^5	2.46×10^5	2.59×10^5
D(Mw/Mn)	$\overline{x}$	2.27	1.93	1.95	1.97
	σ	7.89×10^{-2}	1.61×10^{-2}	1.81×10^{-2}	1.60×10^{-2}
	$\frac{\sigma}{\overline{x}}$ (%)	3.47	0.83	0.93	0.81

$\overline{x}$：Average，σ：Standard deviation of the mean

*　日立化成工業（株）・茨城研究所
**（株）日立製作所・那珂工場

った。しかし，検量線の直線性を考慮すればGL-A100M（ミックスゲル）の方が多様な試料に対して適用能力が大と考えられる。

3.2 分子量分布の試料濃度依存性

一般的に試料濃度によってＧＰＣクロマトグラムが変化し，このことがMn，Mw，Dに影響を及ぼすといわれている[1]。そこでGL-A100Mについての試料濃度依存性を調べた。試料濃度を一定にして注入量を変化させて測定したNBS706の試料量と，ＧＰＣクロマトグラムとの関係を**図1**に示した。試料量1.2mgまではＧＰＣクロマトグラムに変化がないが，2.4mgになると低分子量領域の方へシフトすることがわかる。次に検量線を作成するための標準ポリスチレンの試料量と溶出容量との関係を調べて**表2**に示した。特に分子量1.8×10^6のポリスチレンの溶出容量が0.01～0.16mgの試料量の違いで変化することがわかる。この傾向はＲＩ検出器においても同様であった。

NBS706の試料量や検量線作成用の標準ポリスチレンの試料量の変化によって，分子量分布の測定値（Mn，Mw，D）がどの程度影響されるかについて調べた結果を**表3**に示した。**表3**の結果は，標準ポリスチレンの濃度を0.01mgから0.16mgにすることでMnが約７％，Mwが約16％各大きくなり，NBS706の試料量が2.4mgになると1.2mg以下の場合に比べてMn，Mw共に約16～22％小さくなることを示している。

また，ベースラインの設定の仕方によって，分子量分布の測定結果がどの程度影響を受けるかについて調べた結果を**表4**に示した。分子分布量の測定に用いる溶出時間を，11.5～18.0分と10.5～17.0分の２つで比較した場合に，Mwではあまり差が生じないが，Mnでは前者の方が約４～７％小さくなることがわかる。すなわち，ベースラインの設定の仕方も測定値に大きな影響を与える因子である。

以上の結果から，品質管理に用いるような再現性のよい分子量分布の測定を行なうためには，カラムの選択を含めた装置条件を一定とした上で，さらに(1)検量線作成用の標

表2　標準ポリスチレンの試料量と溶出容量との関係

分子量＼試料量	0.01mg	0.04mg	0.16mg
1.8×10^6	11.03ml	11.18ml	11.34ml
2.0×10^5	13.51	13.56	13.57
4.28×10^4	15.27	15.31	15.31
1.02×10^4	17.09	17.13	17.10
2.8×10^3	18.31	18.33	18.31

検出器：UV(250nm)，カラム：GELKO A100M

表3　分子量分布の試料濃度依存性

標準PS	平均分子量	NBS706(0.9%wt/V)試料量			
		0.6mg	0.8mg	1.2mg	2.4mg
0.01mg	Mn	1.20×10^5	1.19×10^5	1.19×10^5	9.97×10^4
	Mw	2.68×10^5	2.56×10^5	2.54×10^5	2.13×10^5
	D	2.24	2.14	2.14	2.13
0.04mg	Mn	1.25×10^5	1.24×10^5	1.24×10^5	1.04×10^5
	Mw	2.88×10^5	2.75×10^5	2.73×10^5	2.28×10^5
	D	2.31	2.21	2.21	2.19
0.16mg	Mn	1.29×10^5	1.28×10^5	1.27×10^5	1.06×10^5
	Mw	3.12×10^5	2.97×10^5	2.94×10^5	2.44×10^5
	D	2.42	2.31	2.31	2.30

ベースラインの設定：11.5～18min
検出器：UV(250nm)，カラム：GELKO A100M

表4　ベースラインの設定と試料量別平均分子量の関係

ベースライン	平均分子量	NBS706(0.9%wt/V)試料量			
		0.6mg	0.8mg	1.2mg	2.4mg
11.5	Mn	1.20×10^5	1.19×10^5	1.19×10^5	9.97×10^4
～	Mw	2.68×10^5	2.56×10^5	2.54×10^5	2.13×10^5
18(min)	D	2.24	2.14	2.14	2.13
10.5	Mn	1.29×10^5	1.27×10^5	1.24×10^5	1.04×10^5
～	Mw	2.70×10^5	2.58×10^5	2.55×10^5	2.14×10^5
17(min)	D	2.09	2.03	2.05	2.05

検出器：UV(250nm)，カラム：GELKO A100M

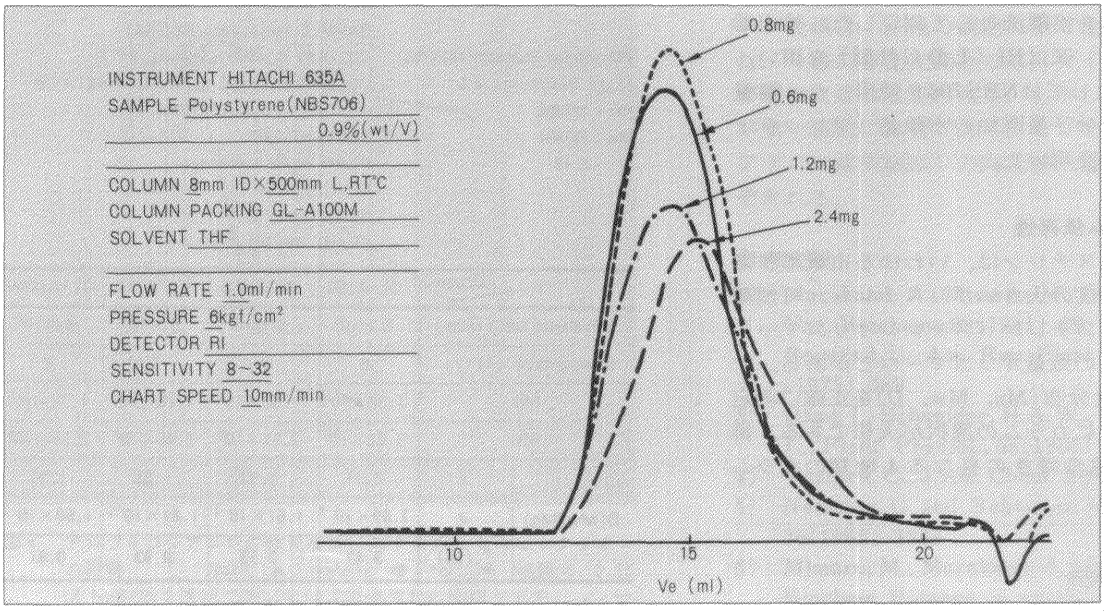


図1　GPC Chromatograms of Polystyrene as a Function of Sample Load

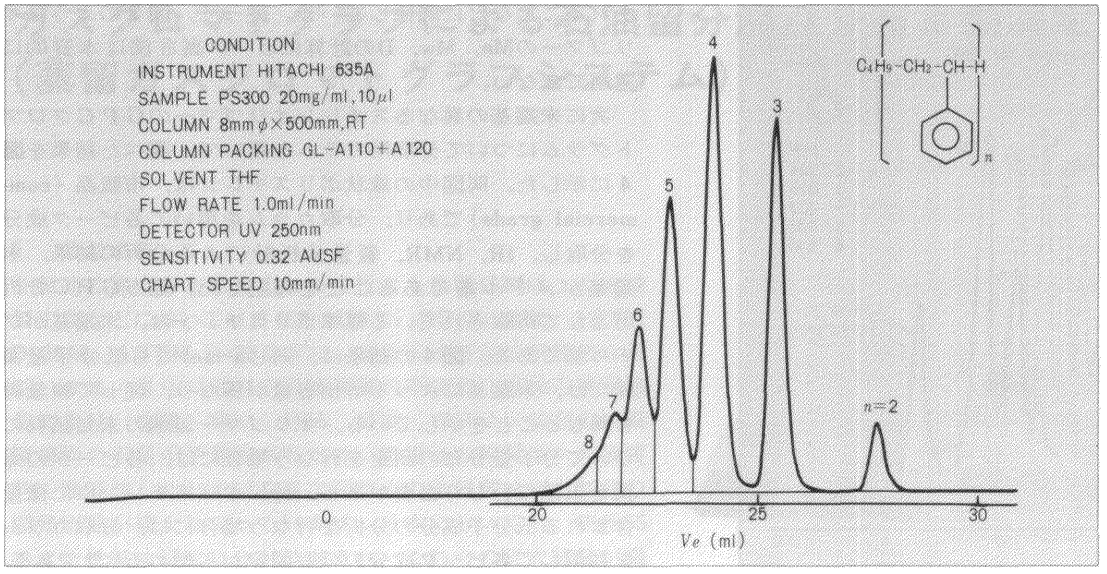


図2 GPC Chromatogram of Polystyrene Oligomer

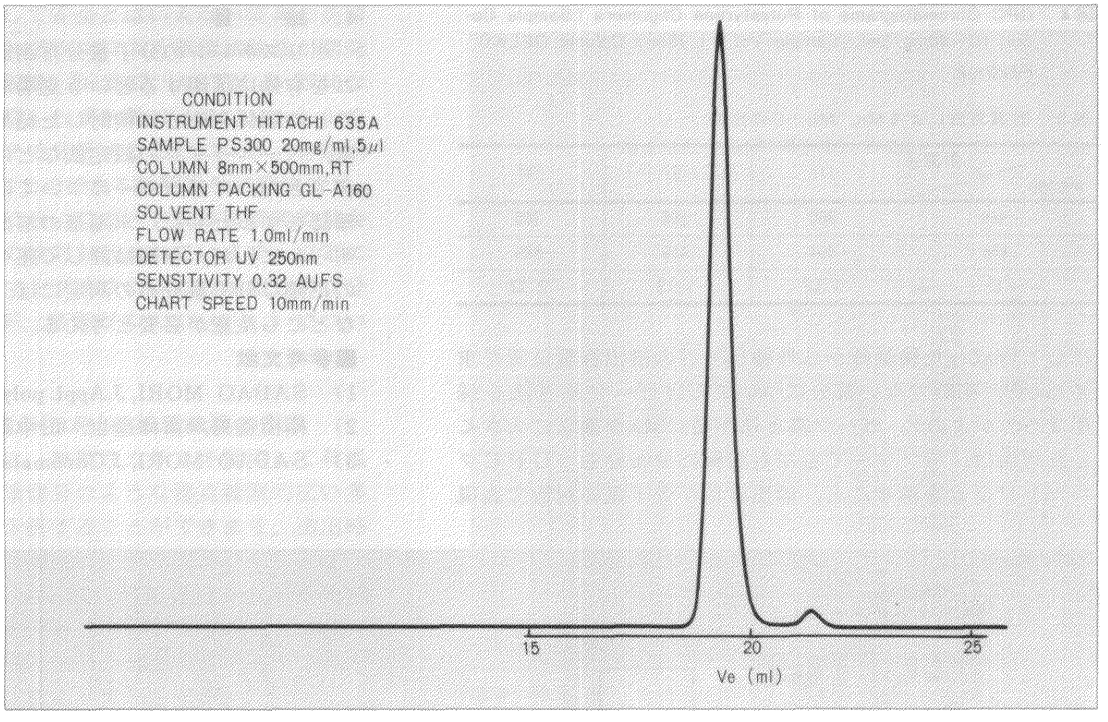


図3 GPC Chromatogram of Polystyrene Oligomer

準試料量，(2)分析用試料量，(3)ベースラインの設定方法なども慎重に決める必要のあることがわかった。詳しくは述べなかったが，その他試料注入量や標準試料の変質，検量線の経日変化などにも気をつけることが大切である。

3.3 スチレンオリゴマーの分析

オリゴマーの各成分を，分離のよいガスクロマトグラムのように測定条件を選ぶことで完全分離できれば，Mn，Mw，Dの算出は容易である。しかし，**図2**のポリスチレン300(PS300)やこれよりもさらに高分子側の分離が不十分なＧＰＣクロマトグラムの場合には，ＧＰＣとしてのデータ処理が必要となる。データ処理方法としては次の3つが考えられる。

(1) 排除限界の高い高分子用カラムを用いて，未分離のＧＰＣクロマトグラム(**図3**)を得て，一般的なピーク高さ法でMn，Mw，Dを算出する方法

(2) ピーク間面積法（**図2**に示すように，ピーク成分の含有量をピーク間の谷とベースラインとで囲まれた面積で代表させる方法）

(3) ピーク高さ法（分離の状態に無関係に一般的なＧＰＣクロマトグラムに適用している計算方法を利用する方法）

PS300についてこれらの各計算方法の適用結果を**表5**に示した。

表5は，(1)又は(2)の計算方法がオリゴマーの分析には適しており，特に各ピーク成分ごとの組成分析という点では(2)が最適であることを示している。ピーク間の谷がＧＰＣクロマトグラム上明瞭でない場合には，明瞭な部分を基本

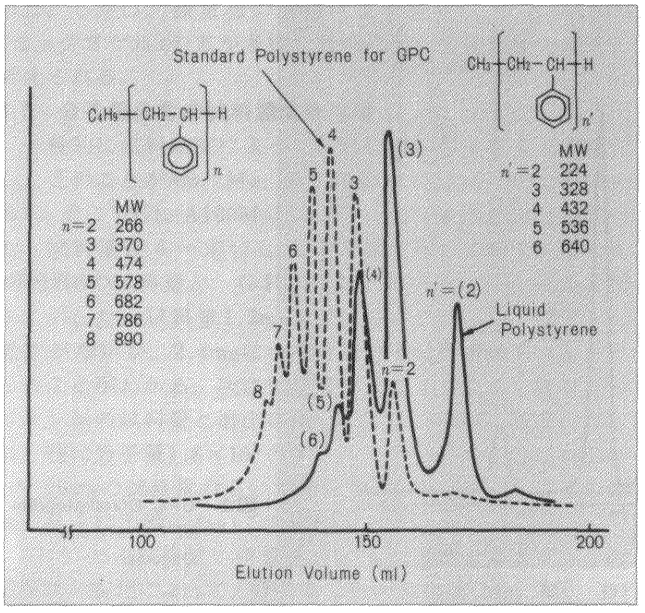


図4 GPC Chromatograms of Polystyrene Oligomers (Sample Conc：10～40mg/5ml, Sample Vol.：1.75ml) Column GELKO P220×2

表5 計算方法によるMn, Mw, Dの比較

計算法 / PS300	(1)	(2)	(3)
Mn	360	368	380
Mw	404	416	886
D	1.12	1.13	2.33

にして作成した検量線から外挿して谷の溶出容量位置を求めるか[2]，明瞭でない部分についてだけピーク高さ法を採用するのがよい[3]。ピーク高さ法が特にMwを異常に大きくした理由は，モノマーでも左右対称の分布をもつＧＰＣクロマトグラムを示すこと，溶出容量が分子量の対数で表現されることなどに関係している。従って，**図2**のようなオリゴマーのMn，Mw，Dの計算にピーク高さ法は本質的に適用できない。

次に末端基の異なるスチレンオリゴマーのＧＰＣクロマトグラムについて分取用カラムを用いて，調べた結果を**図4**に示した。同図中の液状ポリスチレンは，市販品（commercial grade）であり，分取カラムを用いて各ピーク成分を分取し，IR，NMR，質量分析計による分析の結果，末端基がメチル基であることを確認した。他方ＧＰＣ分析用として市販されている標準ポリスチレンは，末端基がブチル基である。**図4**の結果は，同じn-merでも低分子量領域では，末端基によって溶出容量が異なり，従って検量線も異なることを示している。オリゴマー領域の未知試料について分子量分布の測定を行なう場合には，各ピークの帰属を正確に行なう必要がある。特にポリスチレン中に微量含まれる低分子成分の分析を行なう場合には，分取カラムを利用して各ピーク成分の分取同定から始めるべきである。発泡ポリスチレン中の低分子成分の分析例を**図5**に示した。

4. 結　言

ポリスチレンの分子量分布測定に関して，ＧＰＣ用カラムを有効に活用するという立場から，主に再現性と分析条件との関係を中心に検討した結果，カラムの種類，試料濃度，ベースラインの設定法などについての知見を得ることができた。オリゴマーについては，分子量分布の計算法の確認をすると共に，末端基の溶出容量に及ぼす影響などを明らかにした。今回は詳しく述べなかったが，オリゴマーの正確な分子量分布の測定には，検出感度の分子量依存性などにも注意が必要と考える。

■参考文献

1) SADAO MORI, J.Appl. polym. Sci., 20, 2157 (1976).
2) 柘植盛男，宮林達也，田中誠之：日化，1972，800.
3) SADAO MORI, J.Chromatsgr., 156, 111 (1978).

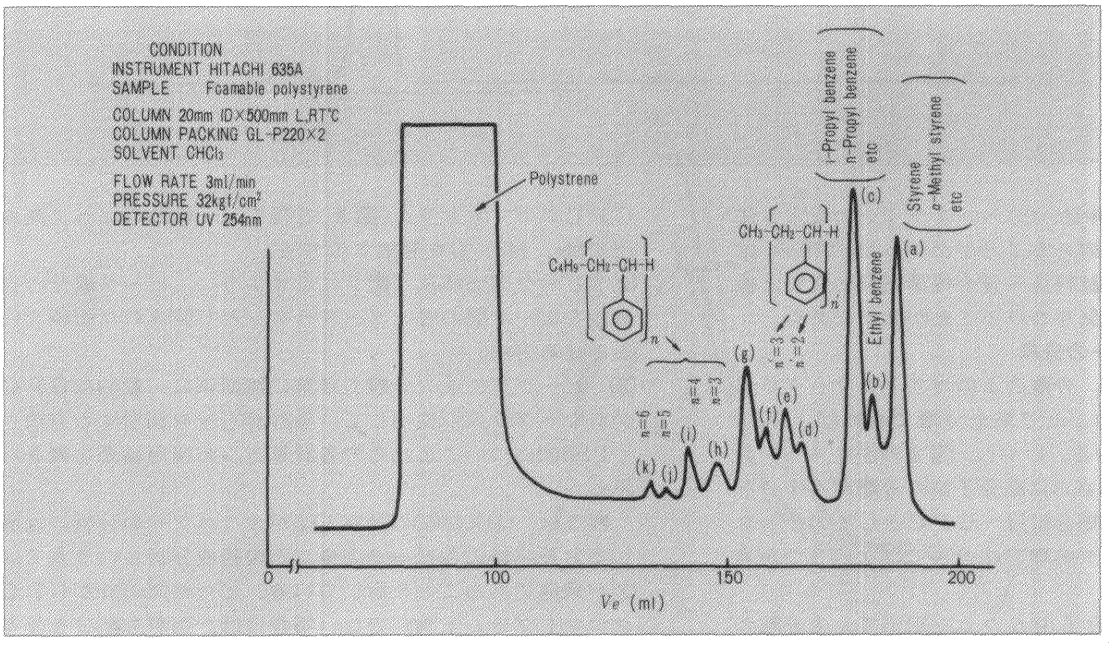


図5 GPC Chromatogram of Foamable Polystyrene

U.D.C.〔543.544.42.084.83.087.9:681.322-181.48〕:〔665.6/.7.035.3:536.423.1〕

ガスクロマトグラフによる石油留分沸点分布自動測定システム（蒸留ガスクロマトグラフシステム）

永井　久晃*　藤井　芳雄*　岡崎　勉*

1. はじめに

製品の沸点分布を知るために行なう蒸留試験は，石油精製工業などにおいては重要な試験で，JIS K-2254，ASTM D-2892，ASTM D-86などに，細かくその方法が決められています。さらに最近の石油資源の不足や，原油の重質油化により，今後，特に，灯油，軽油，ガソリンなどの中軽質燃料の不足が予想されるため，重質油の軽質油への改質や，他資源，たとえば石炭などからの中軽質油相当製品の開発研究が盛んとなっています。日本においても，昭和55年に新燃料油研究組合が結成され，これらの研究開発が開始されました。このような情勢の中で，面倒な手間と大量の試料を要し，しかも決して安全とはいえない従来の蒸留試験法に代るガスクロマトグラフによる蒸留試験法が開発されました。これは，ASTM D-2887，ASTM D-3710などに決められている方法で，わずか数マイクロリットルの試料をガスクロマトグラフで分析することにより，自動的に試料の沸点分布を知ることのできる画期的な試験法です。日本においても石油学会においてガスクロ蒸留研究委員会が設けられ，この試験法の検討が行われています。以下に日立の開発したガスクロマトグラフによる石油留分沸点分布自動測定システム（以下，蒸留ガスクロという。）について紹介します。

2. 測定原理

2.1 溶出時間(R.T.)と沸点(B.P.)の校正曲線の作成

ガスクロマトグラフでは，無極性カラムを使用して昇温分析することにより，石油留分のような沸点範囲の広い多成分混合試料を沸点順に分析することができます。溶出時間(R.T.)と沸点(B.P.)との関係の一例を**図2**に示します。ノルマルパラフィンnC_6～nC_{44}21種の混合標準試料を実試料を測定すると，同じ条件で昇温分析して各成分の溶出時間(R.T.)を求め，溶出時間と沸点の関係を求めて，これをマイクロコンピュータに記憶させておきます。

2.2 試料測定と沸点分布性状の算出

2.2.1 補正面積百分率法

ガソリン，灯油，軽油などのようにガスクロマトグラフ分析に供した試料が全部溶出してくる場合は，ASTM D-2887あるいはASTM D-3710にしたがい，補正面積百分率法で行ないます。

その方法のあらましは次の通りです。

(1) クロマトグラムの一定時間間隔時間積分による溶出量と溶出率の計算

溶出量はクロマトグラムの面積に比例すると考えられますので，ベースライン上の全面積を求めます。そのために，

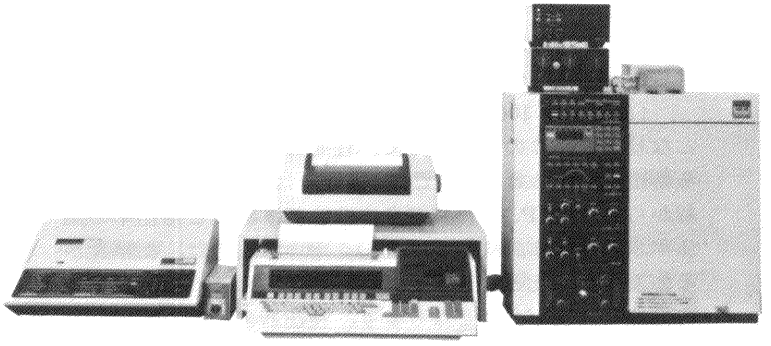


図1　日立蒸留ガスクロマトグラフシステム

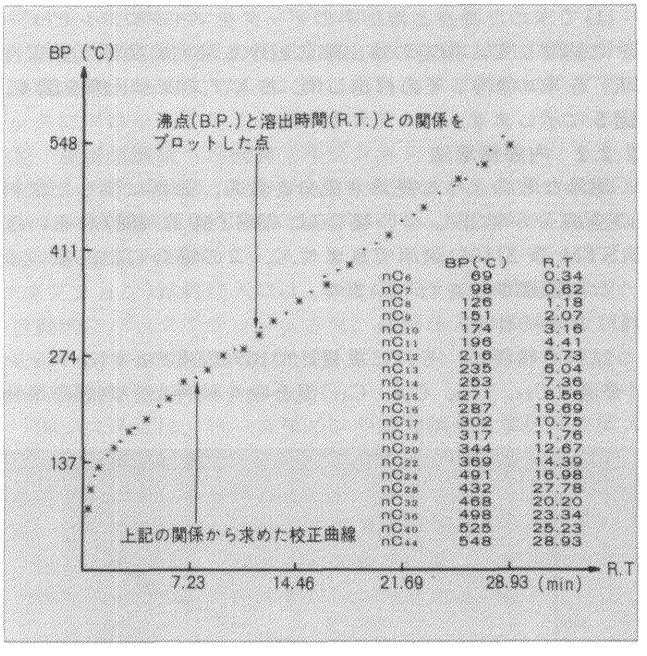


図2　沸点(B.P.)と溶出時間(R.T.)の校正曲線

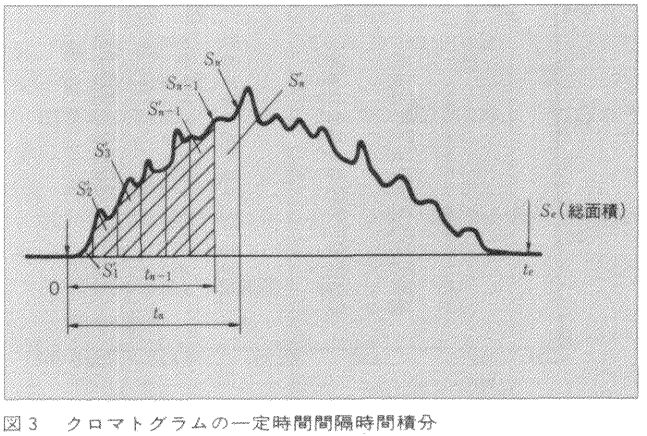


図3　クロマトグラムの一定時間間隔時間積分

*㈱日立製作所　那珂工場　光学装置設計部

ベースライン上のクロマトグラムを一定時間間隔（通常は0.1分程度）で時間積分し，それらを次々と積算していきます。即ち，式(1)に示すように任意の時間分割点t_nにおける面積の合計値S_nは

$$S_n = S_1' + S_2' + S_3' + \cdots\cdots S'_{n-1} + S'_n \quad \cdots\cdots(1)$$

$$S_e = S_1' + S_2' + \cdots\cdots S'_n + S'_{n+1} + \cdots\cdots S'_{e-1} + S'_e \quad \cdots(2)$$

同様に，クロマトグラムの総面積値は式(2)のS_eとなります。

したがって，任意の時間分割点t_nにおける溶出率は

$$(S_n/S_e)\times 100 \ (\%)$$

となります。このようにして，任意の時間分割点t_nにおける溶出率を求めることができます。t_nは2-1で求めた校正曲線から沸点(B.P.)に換算できますので，沸点と溶出率の関係が求まります。検出器にFIDを用いる場合は，面積比がそのまま重量比となります。容量比を求めるには，重量／容量換算係数が必要となります。検出器にＴＣＤを用いる場合は，面積を容量あるいは重量に換算する容量換算係数あるいは重量換算係数が必要となります。

(2) 沸点分布性状（蒸留性状）の算出

(1)で求めた沸点と溶出率のデータをマイクロコンピュータで整理して，指定の溶出率における沸点の関係（蒸留性状）を求めます。その打出し例，およびプロット例を**図4**，**図5**に示します。

2.2.2 内部標準法

原油などのような高沸点成分を含み，分析に供した試料の全成分が溶出しない場合は，ASTM D-2887あるいはASTM D-3710は適用できません。この場合には，次のような内部標準法を行ないます。

(1) 試料の作成

○試料を精秤し，それに重量比で10%程度のn-パラフィン（普通はC_{14}，C_{15}，C_{16}，C_{17}）混合物を精秤し，内部標準物質として加える。

○これをマイクロシリンジでサンプリングできる程度に二硫化炭素で希釈する。

○同時に試料だけをマイクロシリンジでサンプリングできる程度に二硫化炭素で希釈する。

(2) 試料の測定

(1)で作成した内部標準物質の入った試料と入らない試料を，それぞれ分析して，2.2.1の(1)の補正百分率法と同様にして，ベースライン上のクロマトグラムを一定時間間隔で，時間積分します。

(3) 理論総面積の計算

(2)で求めた二つのクロマトグラムの時間積分値から，次のようにして，理論総面積を求めます。

図6，**図7**，にそれぞれ内部標準物質を添加した試料と添加しない試料のクロマトグラム例を示します。

$$T = B + B' = \left(A_{IS}\times\frac{B-B_{IS}}{A-A_{IS}} - B_{IS}\right)\times\frac{S}{I} \quad \cdots\cdots(3)$$

ここに　T：理論総面積

A：内部標準物質を加えた試料の総面積

B：内部標準物質を加えない試料の総面積

A_{IS}：内部標準物質を加えた試料の内部標準物質が溶出している区間の面積

B_{IS}：内部標準物質を加えない試料の内部標準物質が溶出している区間に相当する時間帯の面積

S：試料量

I：内部標準物質量

B'：内部標準物質を加えなかった試料のうち溶出してこなかったと予想される面積

(2)で得られたデータをデスクトップコンピュータに送り，式(3)に従って自動的に理論総面積Tを試算します。

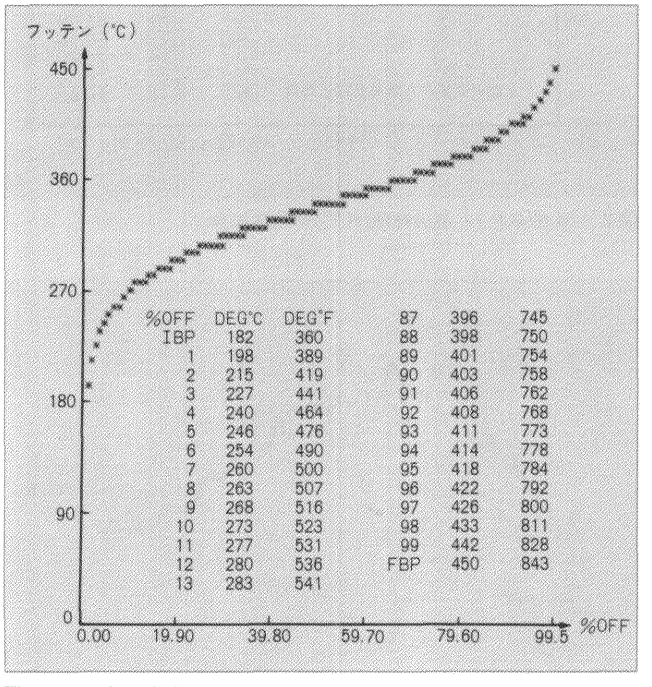


図4　1%毎の蒸留性状

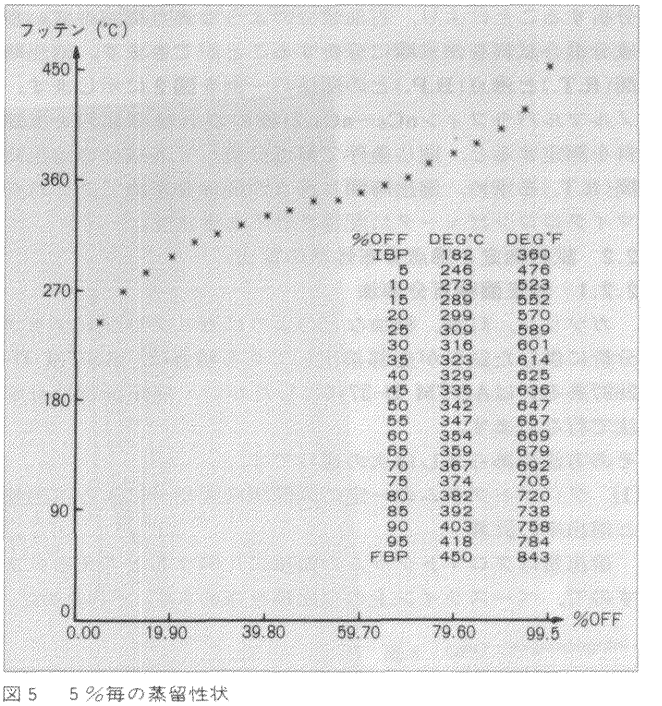


図5　5%毎の蒸留性状

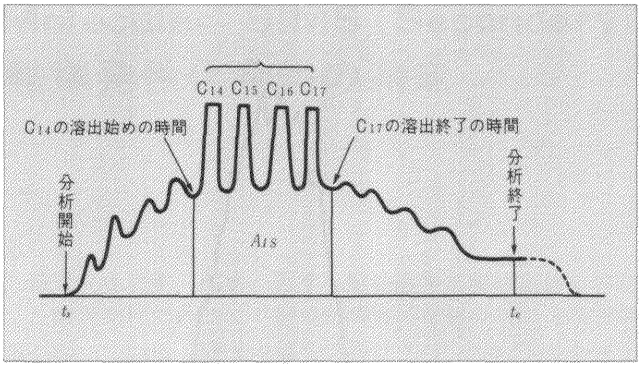


図6　内部標準物質を添加した試料のクロマトグラム

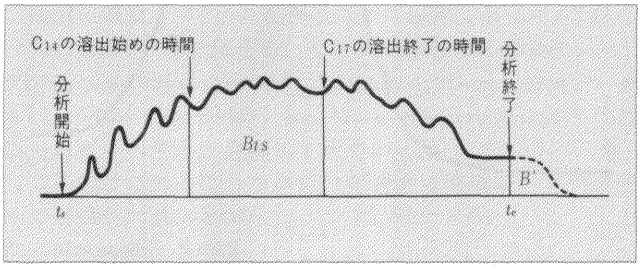


図7　内部標準物質を添加しない試料のクロマトグラム

(4)　溶出率，沸点分布性状の算出

溶出率は，**図7**の内部標準物質を加えない試料のクロマトグラムの時間分割点t_eまでの面積値Bを理論総面積Tで除して求めることができます。

沸点分布性状の算出は，理論総面積値Tに対する沸点と溶出率との関係から**2.2.1**の(2)と同様にして求めます。

図8に内部標準法による溶出率と沸点との関係（蒸留性状）の打出し例およびプロット例を示します。

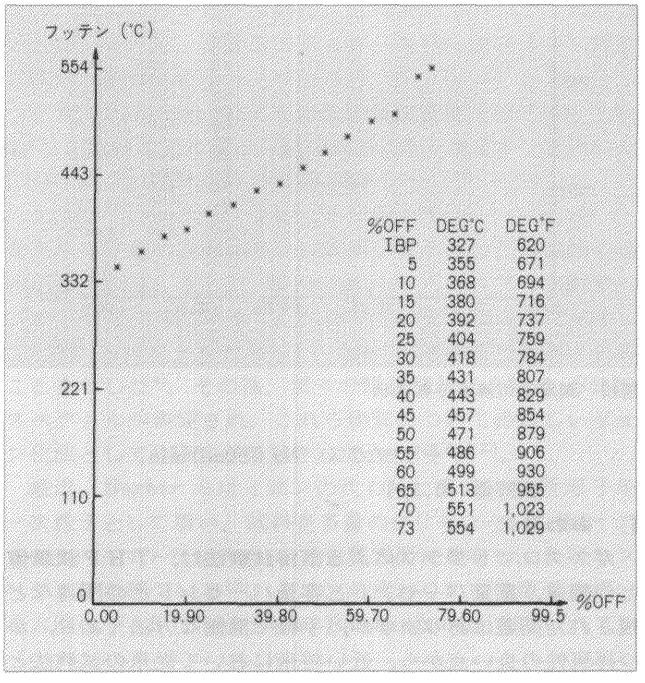


図8　内部標準法による5％毎の蒸留性状

3.　装置の構成

(1)　663-30ガスクロマトグラフFIDまたはTCD付

(2)　834クロマトデータ処理装置

時間積分機能および上位コンピュータデータ転送機能追加

プリンタプロッタ付

(3)　室温付近カラム恒温槽コントローラ

(4)　カラム恒温槽自動冷却装置

(5)　インジェクションバックフラッシュ装置

(6)　ディスクトップコンピュータ

蒸留ガスクロソフト付

4.　装置の特長

(1)　正確なベースライン補正を行なうことにより，精度の良いデータが得られます。

蒸留ガスクロでは400℃近い温度まで昇温分析を行ないますので，ベースラインのドリフトを避けることができません。本システムでは，ベースラインのドリフトを記憶させておき，試料分析結果から，それを差し引く方式にしてありますので，正確なデータが得られます。

(2)　データの打出しと同時に，その結果をX-Yプロッタにプロットできます。

溶出時間と沸点との校正曲線，あるいは試料の沸点分布性状の算出結果は，プリンタに打ち出すと同時にX-Yプロッタにプロットすることができます。

(3)　蒸留試験値への換算（オプション）

本システムには，蒸留ガスクロで得られた結果をASTM D-86の蒸留試験値へ換算するプログラムが含まれています。

(4)　試料注入口のバックフラッシュによるクリーニング（オプション）試料注入口は，663-30のタイマ設定により，自動的にバックフラッシュさせ，試料注入口に残った試料を追い出すようにしています。

(5)　再計算機能

本システムは，ベースラインや時間積分計算区間を変えての再計算が可能ですから，クロマトグラムを見た上で，最も正しいデータを得ることができます。

(6)　ピーク高さでの時間分割計算機能

本システムは，パラメータの変更により，ピーク高さでの時間分割計算が可能ですから，たとえば，ＧＰＣ用としても利用可能です。

(7)　通常のクロマトデータ処理機能

本システムは，パラメータの変更により，通常のクロマトデータ処理装置としても使用可能です。

5.　測定例

(1)　灯油の分析例

図9に灯油のクロマトグラムを，**図10**に沸点分布性状を示します。

(2)　潤滑油の分析例

図11に潤滑油のクロマトグラムを，**図12**に沸点分布性状を示します。

分析条件は(1)，(2)共通

分析条件

Instrument

ガスクロマトグラフ　日立663-30FID付

クロマトデータ処理装置　日立834クロマトデー

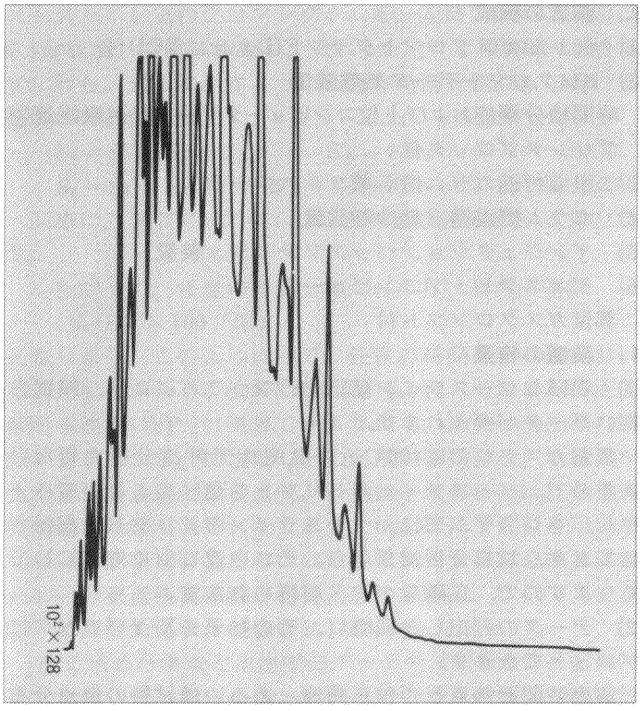


図9　灯油(0.3μl)の分析

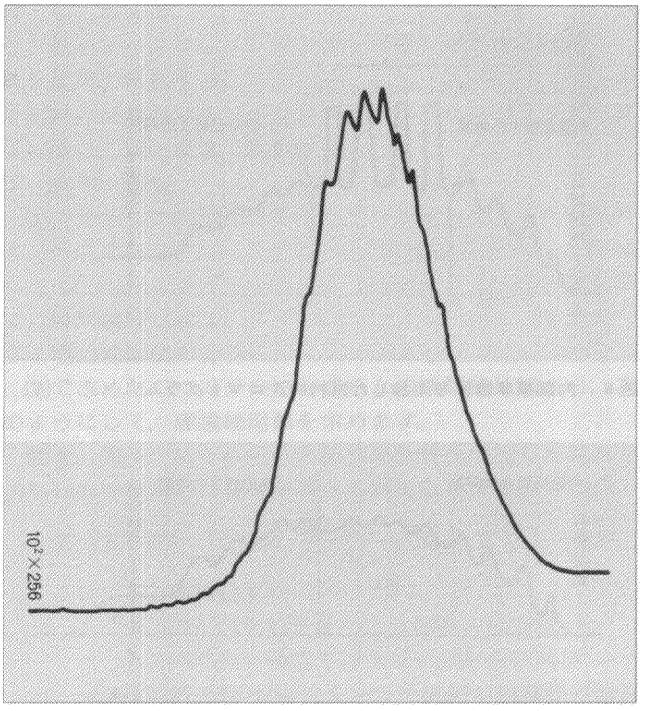


図11　潤滑油(0.3μl)の分析

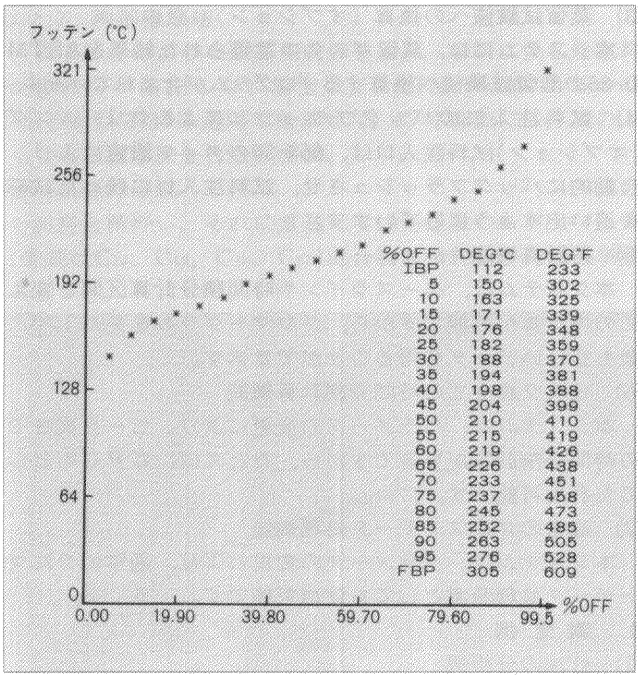


図10　灯油の沸点分布性状

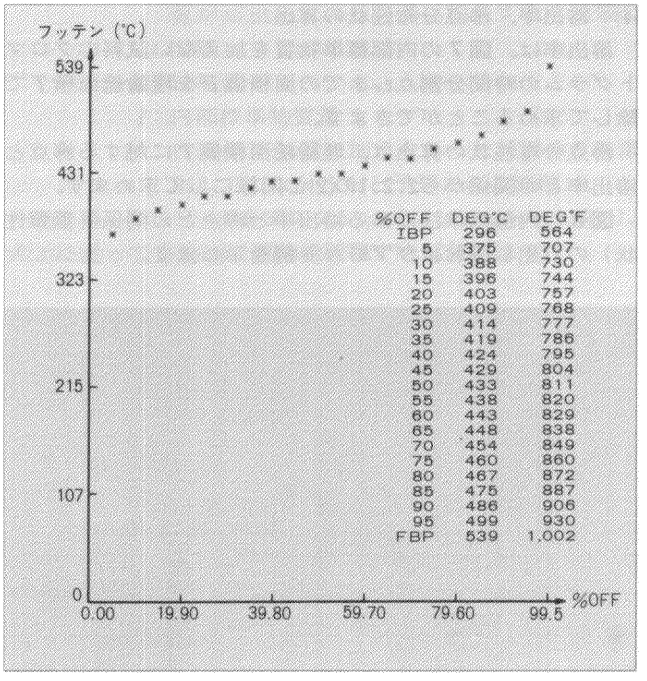


図12　潤滑油の沸点分布性状

タ処理装置
デスクトップコンピュータ　Canon BX-1
カラム　5%OV-1 on chromosorb W AW DMCS 80/100
3 mmφ×1 m (SUS)
温度　注入口，FID　370℃
カラム　50～350℃　10℃/min
350℃　10min　Hold
キャリヤガス　N_2　50ml/min
試料量　0.3μl

6. おわりに

ガスクロマトグラフによる蒸留試験法は，TBP試験値との関連，重量パーセントと容量パーセントとの関連など残された問題はありますが，手軽で簡便な方法であり，かつ再現性の良い点から，近い将来において従来の試験法と併用して大いに利用されることが期待できます。

U.D.C.543.51:537.534.8:〔547.918+547.964.4+577.16+577.18〕.06

Molecular SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry)による難揮発性化合物の測定

神原　秀記*

1. 序

最近，生化学，薬学，医学分野の進歩に伴い生体に関連した難揮発性で熱的に不安定な物質の質量分析が大きな課題となっている。従来の質量分析計で用いられている電子衝撃イオン化（EI）あるいは化学イオン化（CI）法ではイオン化に先立って試料を気化する必要があり，これら難揮発性物質の質量スペクトルを得ることは困難であった。これら試料に適したイオン化法としてFD（Field Desorption）[1]，PD(Plasma Desorption)[2]，LD(Laser Desorption)[3]，あるいはSIMS(Secondary Ion Mass Spectrometry)[5)~7)]といった新しい手法が発展してきている。

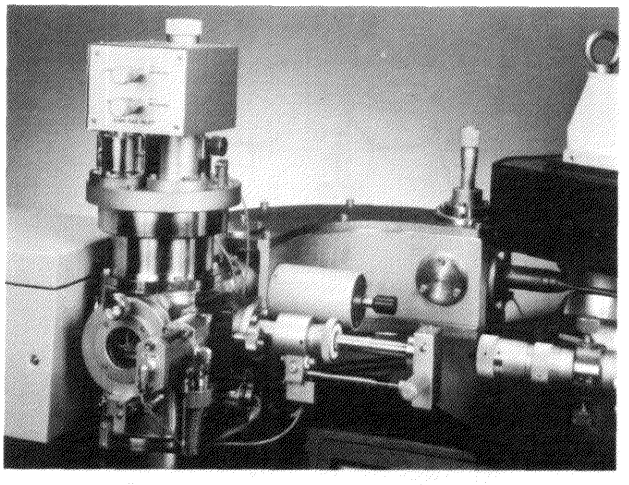
ここではこれらのうち取扱いが非常に簡単で，スペクトルの再現性の良いSIMS法について紹介する。

2. Molecular SIMS

加速されたイオンあるいは中性粒子を固体表面に照射して得られる二次イオンを質量分析するSIMS（Secondary Ion Mass Spectrometry)は，固体の元素分析法として発展してきた[8]。この手法では固体の微少領域について元素の三次元分析が可能で，その装置はIon Micro Analyzer (IMA)とも呼ばれている。元素分析を目的としたSIMSではイオンを10～20keVに加速し，数10μA/cm^2～1mA/cm^{2}の高い電流密度で固体をスパッタしながら，その組成元素の分析を三次的に行なう。しかし，分析したい対象がターゲット表面に極微量しか存在しないときや壊れやすい物質のときには，このような過激な条件を用いることはできない。表面に付着した試料は，短時間でスパッタされ記録できないのと高い密度とエネルギーを持ったイオンの照射で試料が破壊されるためである。

一方，Benninghovenらは低い電流密度（10^{-9}～10^{-8}A/cm^2）と低いエネルギー（1～3keV）の一次イオンを用いたSIMSにより固体表面の情報が得られることを示した。この条件下では一次イオンによる固体のスパッタ速度は遅く，表面単原子層の情報あるいは表面に吸着された有機物の情報が得られる。さらにBenninghovenらは，アミノ酸やペプチドなど生体に関連した難揮発性物質を銀表面に塗布してSIMSスペクトルを測定し，MH^+が高感度で観測されることを示した[4]。その後，種々の難揮発性化合物のSIMSスペクトルが測定され，これら物質についての新しいイオン化法としてSIMSが着目されてきた[5,6,8~12]。

最近，Barberらはイオンの代わりに高速の中性原子を一次粒子として用い，試料を多量のグリセロールと混合(グリセロールマトリックス)して金属表面に塗布し，良好なスペクトルを得ている[13]。イオンの代わりに中性原子を用いる方法はFAB(Fast Atom Bombardment)と呼ばれている[14~17]。一次粒子にイオンを用いても中性原子を用いても得られるスペクトルはほとんど同じであるが，二次イオンの加速電圧が高い場合には中性原子衝撃が有利と言える。一次粒子にイオンを用いると，一次イオンの衝撃エネルギーに加えて二次イオンの加速エネルギー分だけ一次イオンの加速電圧を上げる必要があるからである。



SIMS装置を装着したM-80形日立二重収束GC質量分析計のイオン源部

グリセロールマトリックスの使用により一次イオン電流を増加することができ，試料を含んだグリセロール層を高速度でスパッタしながら二次イオン分析が可能となった。一次イオン電流の増加に伴い二次イオン電流も増加するので測定が容易になった。グリセロールマトリックス下では化学イオン化に似たプロセスが起きており，また，イオン化過程自体もグリセロールを使用しないdry surfaceの場合よりも穏やかと考えられる。

グリセロールマトリックスの場合とdry surfaceの場合とでは，イオン化のプロセスの違いを反映してスペクトルが変化することもあり興味が持たれる[18]。

3. 実験装置の概要と操作

日立M-80二重収束質量分析計に一次イオン源を装着し，直接導入プローブに金属基板(銀)を保持した試料ホルダを取り付けて試料の導入に用いた。試料を塗布した金属基板は通常の分析に用いられるEIイオン源内にセットされ，二次イオンに対しEIモードの場合と全く同じイオン光学系が用いられるのでイオンの透過率が高い。一次イオン源はイオン源ハウジング内に組み込まれており，試料を保持した基板の前方から表面をイオン照射できるようになっている。装置の詳細図は複雑になるので割愛するが，以前に報告したものと基本的には同じである[11]。

二次イオンの加速電圧は3kVで一次イオンの衝撃エネルギーは5keVであった。全イオンモニタで測定された二次

* 日立製作所　中央研究所　第4部

イオン量はグリセロールマトリックスを用いた場合 0.5～2×10^{-9}A であり，グリセロールマトリックスを用いない dry surfaceの場合には0.3～1×10^{-10}Aであった。dry surfaceでは一次イオン量を多くすると試料が短時間にスパッタされ消失してしまうため少ないイオン照射が行なわれ，このため得られる二次イオン量も少なくなる。

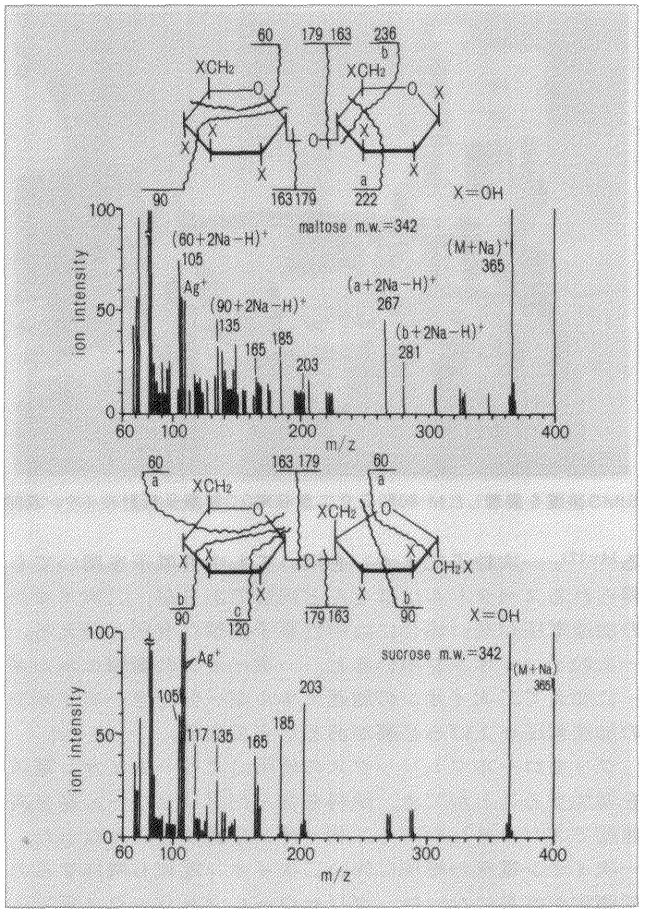


図1 sucrose および maltose の SIMS スペクトル(NaCl共存, dry surface)

水・メタノール溶液に 1μg/μℓの濃度で試料を溶かし，0.5～1μℓを採取して金属表面に塗布した。グリセロールマトリックスの場合には，更に0.5～1μℓのグリセロールを加えて良く混合した。

4. SIMSスペクトルの特徴

4.1 糖および配糖体

糖類は熱に弱く難揮発性であるため，EIなど従来のイオン化法で分子イオン種を測定することは困難である。FDスペクトル中にはMH^+あるいは$(M+Na)^+$などの分子イオン種が観測されるが，フラグメントが少なく同じ質量を持った異性体を識別することはできない。たとえば，sucrose, maltoreあるいはcellobioseの質量数は342であり，FDスペクトル中には$(M+Na)^+$が非常に強く観測されフラグメントはほとんど無い。一方，SIMSスペクトル中には分子イオン種に加え，種々のフラグメントが観測されるためこれら異性体を識別できる[11]。図1はNaClを共存させたときのsucroseとmaltoseのSIMSスペクトルである。分子イオン種は$(M+Na)^+$でいずれも同じであるが，フラグメントイオン種に大きな差があることがわかる。sucroseのSIMSスペクトル中にはm/z203のグリコシド結合開裂によるフラグメントが強く観測される。一方，maltoseのSIMSスペクトル中にはこのイオン種はほとんど観測されず，m/z267に強いフラグメントが観測された。これは糖リングの開裂にNa^+付加およびHとNaの交換が起こって生成したと考えられる。

図2および図3にstachyoseおよびrutinのSIMSスペクトルを示す。アルカリ金属塩が多量に共存しない場合には$(M+Ag)^+$のような銀の付加したイオンが現われる。これは質量数が2だけ異なるほぼ強度の等しい2つのピークを与えるので，分子量の同定に都合がよい。この他に$(M+Na)^+$が観測されたが，MH^+は観測されなかった。また，分子構造情報を含んだフラグメントが多数観測されている。

4.2 ペプチド

dry surfaceで測定したペプチドのSIMSスペクトル中にはMH^+および$(M+Ag)^+$などの分子イオンに加えて構造情報を含んだフラグメントが観測される[12]。しかし，グリ

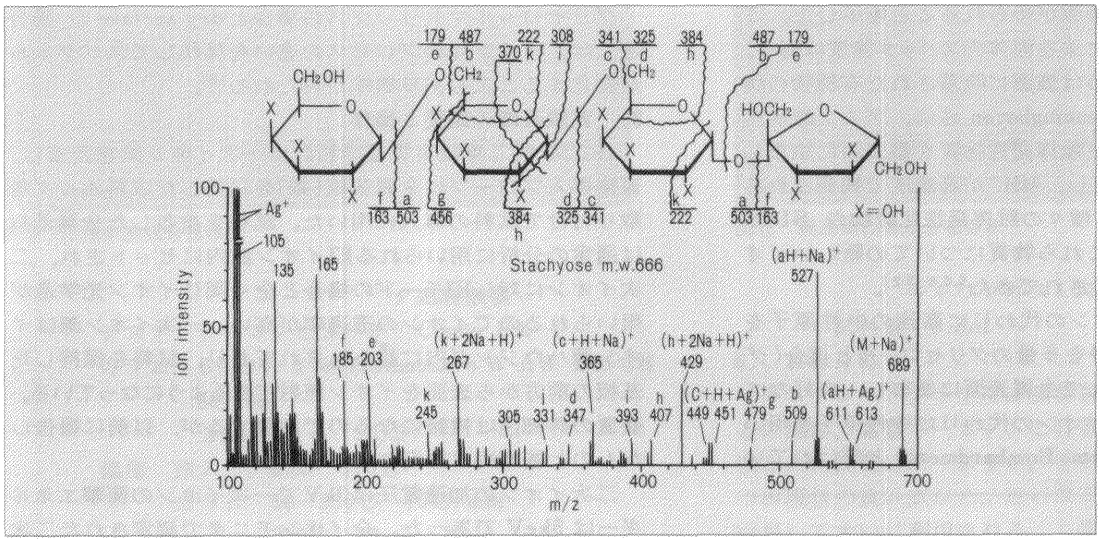


図2 stachyose の SIMS スペクトル (dry surface)

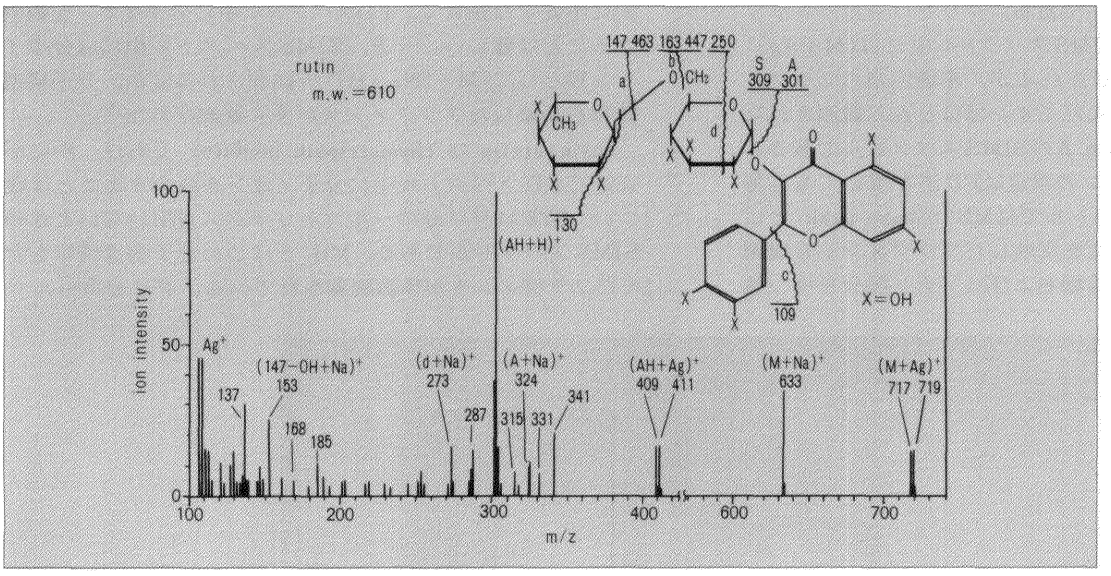


図3 rutinのSIMSスペクトル(dry surface)

セロールを含まぬdry surfaceの場合にはペプチド分子が大きくなるにつれ，分子イオン種の観測が難しくなってくる。グリセロールマトリックスを用いるとこの難点は解消する。**図4**はeledoisin related peptideのSIMSスペクトルをU.V.レコーダで記録したものである。**図5**は〔Val-5〕angiotensin IIのSIMSスペクトルでMH^+をbase peakとして構造情報を多数含んだフラグメントが観測されている。ペプチドのSIMSスペクトル中にはこれらのイオンに加えて，分子イオンよりも大きな質量を持ったイオン種が観測されることがある。これらのイオン種はグリセロールの量などの実験条件によって増減し，グリセロールとペプチドの反応生成物と考えられる。

4.3 抗生物質

抗生物質には難揮発性で熱に弱いものが多く，EIあるいはCIはもちろんFD法を用いても分子イオンの観測が容易でないものが多い。これらについてもSIMSスペクトルは，分子量および分子構造情報を与える。以下，いくつかの抗生物質のSIMSスペクトルを示す。

図6 はグリセロールマトリックスを用いて測定したneomycinBのSIMSスペクトルである。MH^+をbase peakとしてm/z455に三糖由来のイオンが，m/z323に二糖由来のイオンが観測された。m/z277のイオンはグリセロールのク

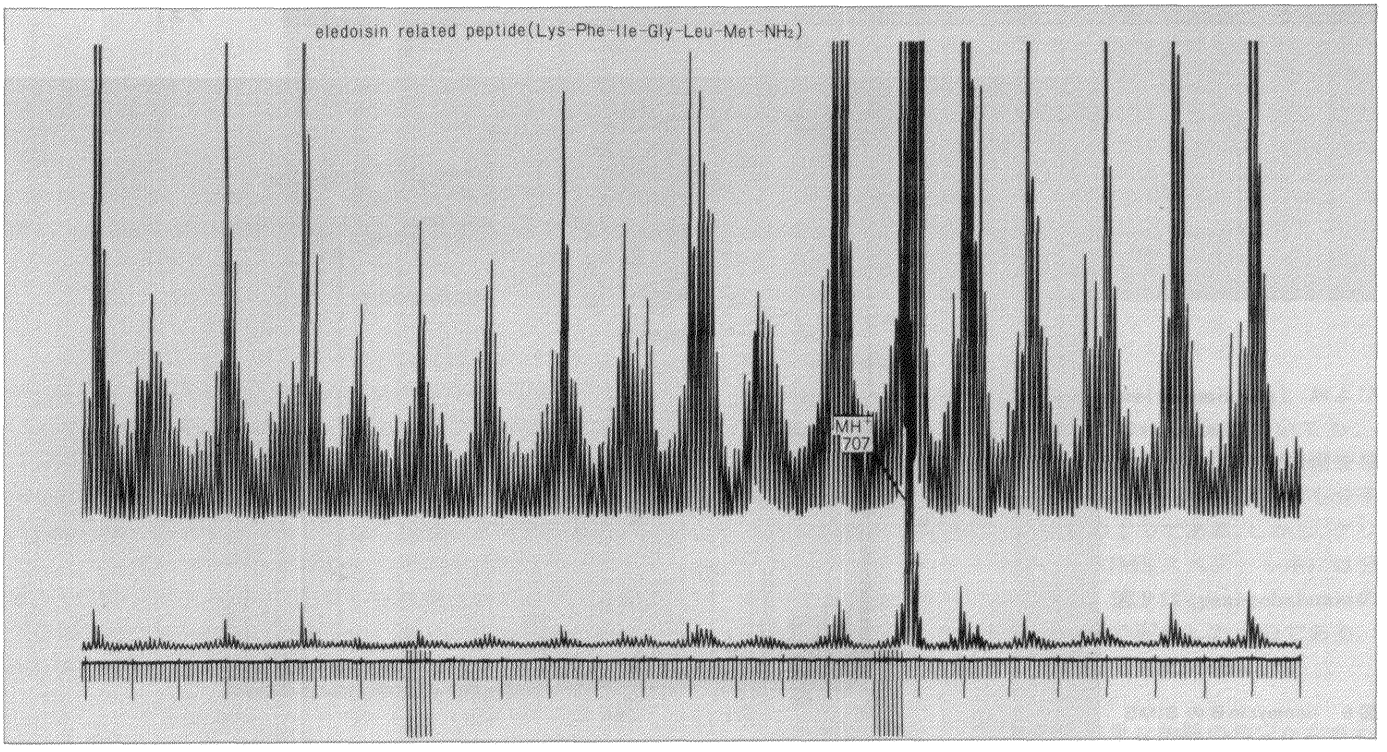


図4 eledoisin related peptide のSIMSスペクトル(分子イオン領域，グリセロールマトリックス)

ラスタイオン(Glycerol^{3}H$^+$)である。グリセロールマトリックスを用いないときのSIMSスペクトル中には(M+Ag)$^+$あるいは(M+Na)$^+$が観測されるが，単糖由来のフラグメント以外に構造情報を含んだイオンはほとんど観測されなかった。**図7**はlividomycin AのSIMSスペクトルである。lividomycin Aの分子イオンの測定はFD法を用いても容易ではないが，SIMSスペクトルではMH$^+$がbase peak として観測できる。また，構造を反映したフラグメントも観測される。phosphoramidonは糖およびペプチド部分を持つ熱的に不安定な物質で，FDスペクトル中に分子イオンを観測することは難しい。一方，SIMSスペクトル中には分子イオン種として(M+2Na−H)$^+$が観測されるほか，分子構造情報を反映したフラグメントが多く観測された[19]。

chymostatin は chymotripsin inhibitor であり，熱に不安定でFD スペクトル中に分子イオンを観測することは難しい。**図8**はグリセロールマトリックスを用いないときのSIMS スペクトルである。MH$^+$をはじめ分子構造情報を含んだフラグメントが多数観測されている。グリセロールマ

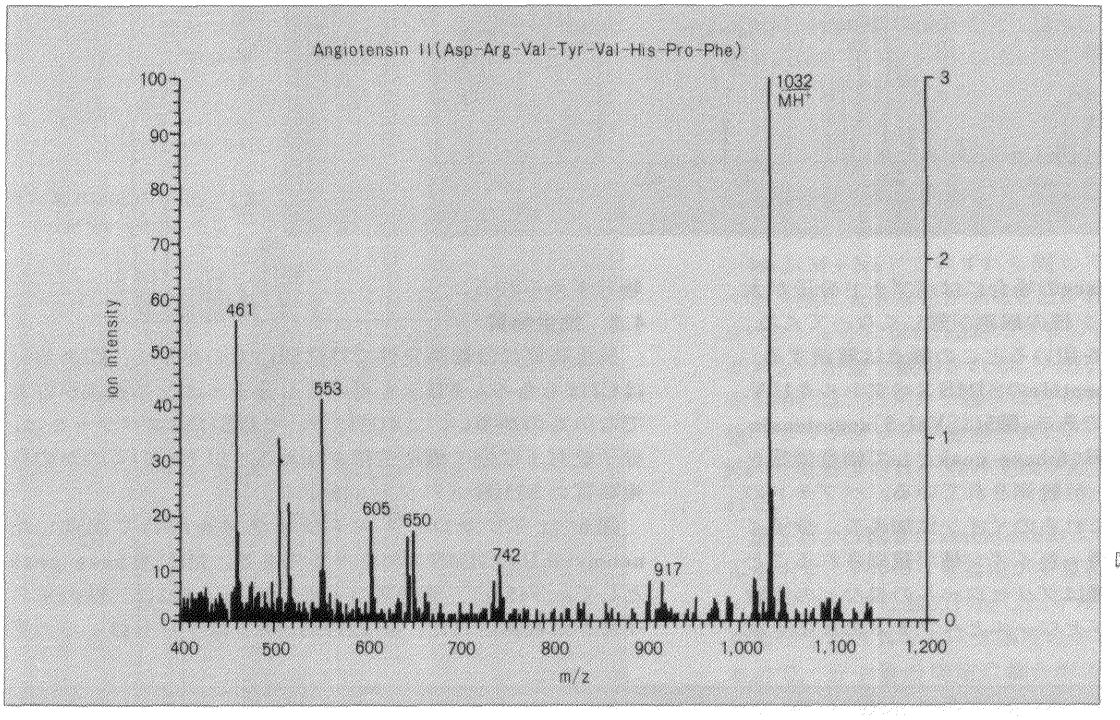


図5 〔Vol-5〕angiotensin II (asp-arg-val-tyr-ual-his-prs-phe) のSIMSスペクトル(グリセロールマトリックス)

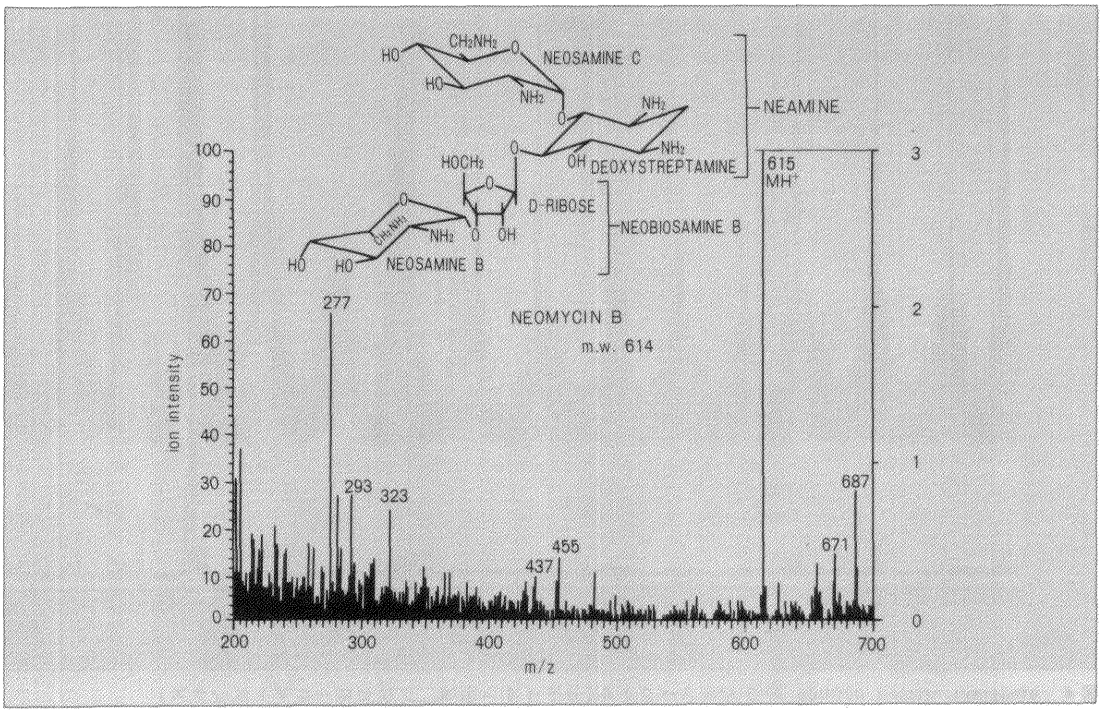


図6 neomycin B の SIMS スペクトル(グリセロールマトリックス)

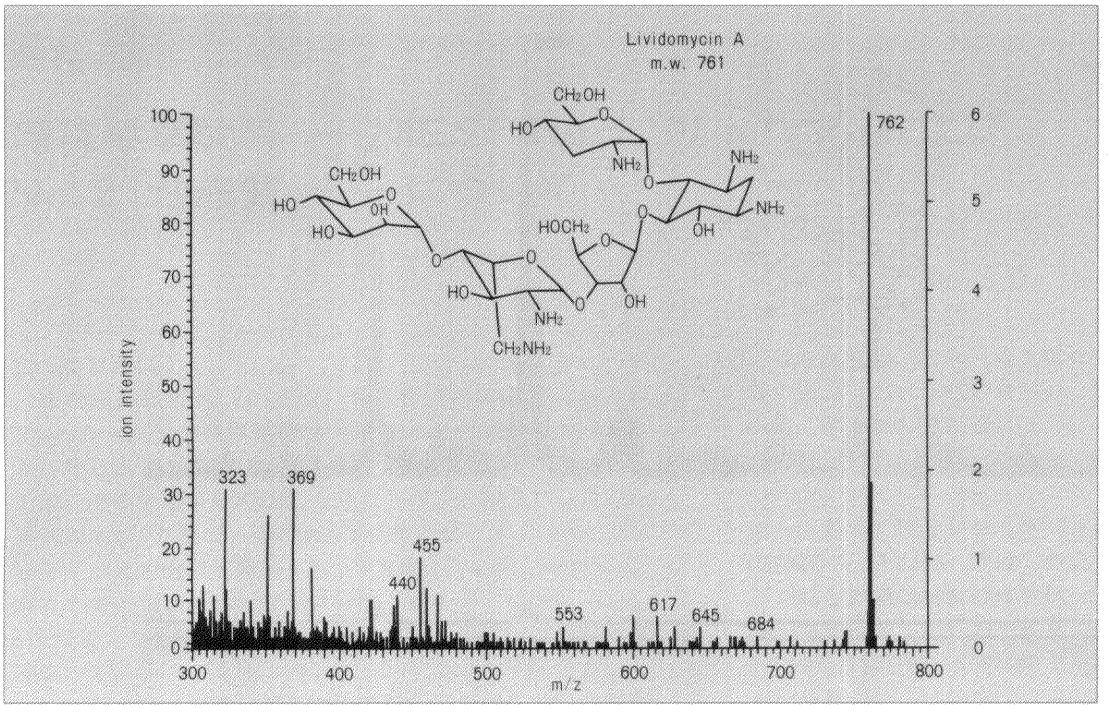


図7 lividomycin AのSIMSスペクトル(グリセロールマトリックス)

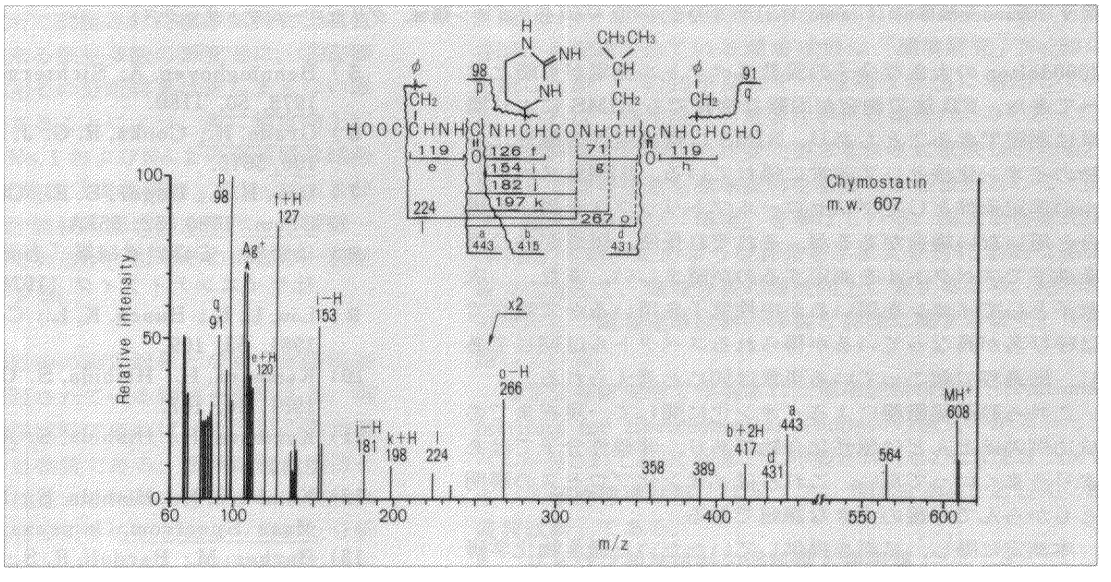


図8 chymostatinのSIMSスペクトル(drysurface)

トリックスを用いるとMH^+のイオン強度は非常に増大するが，分子イオンよりも大きな質量域のm/z640あるいは700にイオンが強く観測された。これらイオンの強度はグリセロールの量などと関係があり，m/z700はchymostatinとグリセロールのクラスタにH^+が付着したもの，m/z640はchymostatinとグリセロールの反応生成物と考えられる。このようなグリセロールと試料との反応生成物はペプチド類のSIMSスペクトル中にしばしば観測されており，未知化合物の同定を行なうときの1つの難点と言える。このような場合には，グリセロールを添加しないときのSIMSスペクトルや他のマトリックス素材を用いて測定したSIMSスペクトルを合わせて測定することが望ましい。

4.7 Vitamin

thiamine(vitamin B_1)，riboflavine(vitamin B_2)，およびcyanocobalamin(vitamin B_{12})などのvitaminについても，SIMSスペクトルは有効な分子量および分子構造情報を与える。これらのうちcyanocobalaminはFD法によっても分子イオンの観測が容易でない物質の1つである。しかし，グリセロールマトリックスを用いたSIMSスペクトル中には分子イオンがはっきり観測できる。図9はcyanocobalaminのSIMSスペクトルをU.V.レコーダで記録したものである。MH^+がはっきり観測されていることがわかる。

5. 結　言

これまでSIMS法では比較的簡単な物質の測定がなされていたが，グリセロールマトリックスの使用により1000～

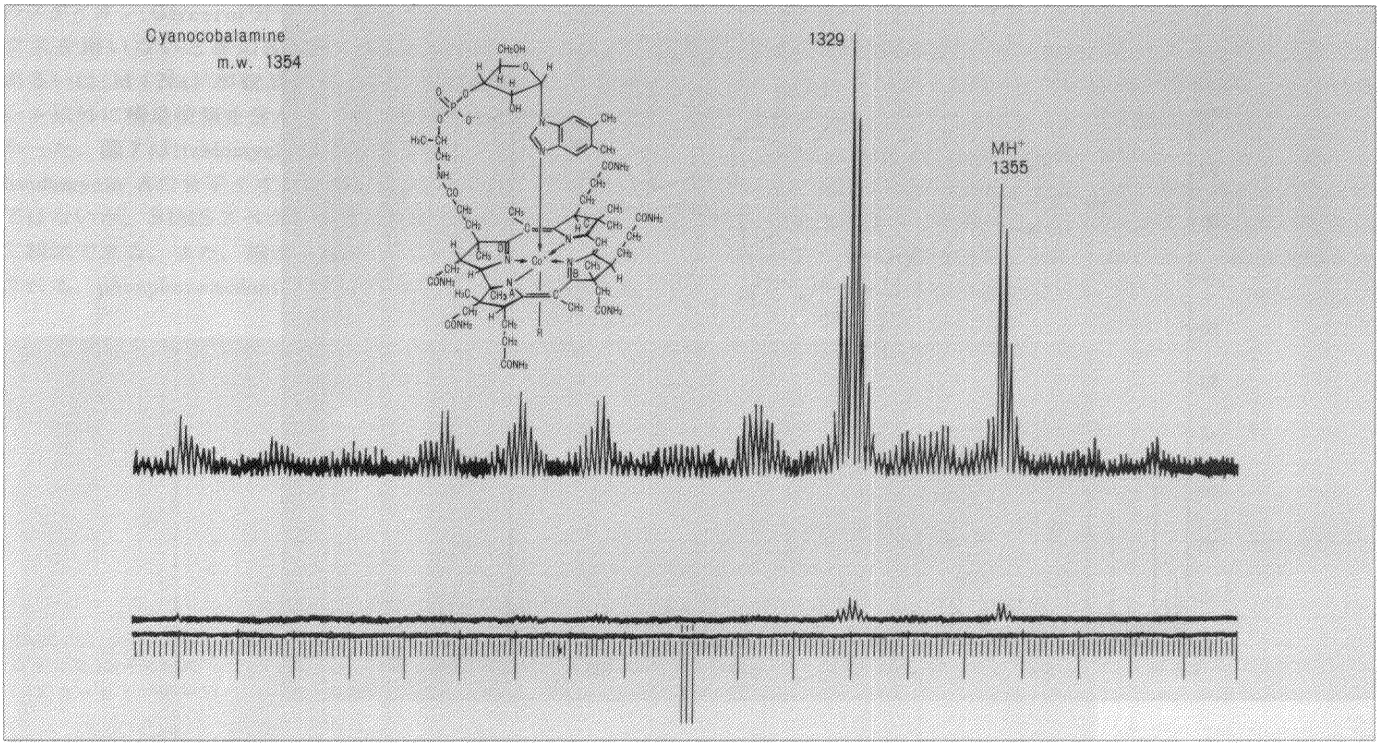


図 9　cyanocobalamin(vitamin B_{12})のSIMSスペクトル(分子イオン領域，グリセロールマトリックス)

3000daltonの大きな分子の質量スペクトル測定が可能となってきた。FD法で測定が困難な物質でもSIMSにより簡単に測定できることもあり，SIMSは難揮発性の極性化合物のイオン化法として非常に優れている。SIMSスペクトルの測定条件としてグリセロールマトリックスを用いる場合と用いない場合があるが，それぞれ長所，短所があり両条件下でスペクトルを測定するのが望ましい。また，一次粒子としてイオンを用いるか中性原子を用いるかで現在では呼び名が異なっているが得られるスペクトルは同じであり，両過程で起こっている現象は同じと考えられる。

これら粒子線衝撃によるイオン化に関して，現在までの成功例のほとんどは極性化合物であり，非極性分子ではあまりうまくいってない。これらはイオン化プロセスの解明ともからんで今後の大きな課題である。

本測定に際し，試料を提供していただいた微生物化学研究所の滝田，長縄両博士および名城大学の鈴木教授および原田博士に感謝する次第である。

■参考文献

1) Beckey, H. D. "Principle of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry", Pergamon : Oxford, 1977
2) Macfarlane, R. D.; Torgerson, D. F. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 1976, 21, 81.
3) Posthumas, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar. H. L. C.; Ten Noever de Breuw, M. C. Anal. Chem. 1978, 50, 985.
4) Benninghoven, A. ; Jaspers, D.; Sichtermenn, W. Appl. Phys. 1976, 11, 35.
5) Benninghoven, A; Sichtermann, W. K. Anal. Chem. 1978, 50, 1180.
6) Grade, H.; Cooks, R. G. J. Am. Chem. Soc. 1978, 100, 5615.
7) Day, R. J.; Unger, S. E.; Cooks, R. G. Anal. Chem. 1980, 52, 557A.
8) 染野檀，安盛岩雄編集「表面分析」P.20～125，講談社サイエンティフィク（1976)。
9) Liu, L. K.; Busch, K. L.; Cooks, R. G. Anal. Chem. 1981, 53, 109.
10) Kambara, H.; Hishida, S. Org. Mass Spectrom. 1981, 16, 167.
11) Kambara, H.; Hishida, S. Anal. Chem. 1981, 53, 2340.
12) Kambara, H.; Hishida, S.; Naganawa, H. Org. Mass Spectrom. (in press).
13) Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. Annual Conf. Mass Spectrom. Allied Topics Minneapolis 1981, pp. 351-352.
14) Surman, D. J.; Vickerman, J. C. J. C. S. Chem. Comm. 1981, 324.
15) Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. J. C. S. Chem. Comm. 1981, 325.
16) Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D. ; Tyler, A. N. Org. Mass Spectrom. 1981, 16, 256.
17) Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. Biomedical. Mass Spectrom. 1981, 8, 492.
18) Kambara, H.; Hirose, H.; Hishida, S. Anal. Chem. (to de published).
19) Kambara, H.; Hishida, S.; Naganawa, H. J. Antibiotics 1982(January, in press).

解　説

環境標準試料——NIES No. 1「リョウブ」および No. 2「池底質」——について

関　政尚*

1. はじめに

環境標準試料については，ＮＢＳ(National Bureau of Standards，米国標準局)他が早くからその開発を進めており，今日までわが国における環境試料の分析に役立ってきたが，その種類は比較的限られている。わが国でも国立公害研究所が，かねてより環境標準試料の研究開発に着手し，昨年よりその成果が発表されつつあることは誠に喜ばしい。現在までに発表された標準試料は，首記の「リョウブ」と「池底質」の２種類であって，更にNo. 3 以降が引続き研究開発中である。

当財団では，国立公害研究所調製の環境標準試料の頒布を通じてこの研究に協力するため，頒布事業を開始している。即ち，国立公害研究所で調製された標準試料を①適当な長年月にわたり，②出来る限り多数の研究者に，③安価に頒布すること，そして④その分析結果は差し支えない限り国立公害研究所に報告することにより，更に精度向上に役立てようとしている。No. 1 およびNo. 2 の環境標準試料については，当財団の機関誌「環境研究」のNo.30およびNo.34に国立公害研究所計測技術部の岡本研作・不破敬一郎両氏によって詳述されているが，以下その内容の一部を２～５項に要約して紹介する。

2. 標準試料の概念

標準試料とは，その物質中の測定対象となるべき特性が正確に定量され，かつ保証されている物質を意味する。例えば元素組成に関する標準試料であれば，その中の各元素の含有量が保証されている物質である。標準試料の用途として，(1) 測定システムを校正するための標準として使われる。すなわち，標準試料を分析することにより用いた分析方法の正確さを検定することができるし，測定機器の校正ができる。(2) 新しい分析方法を開発する過程で，標準試料を使ってその方法の正確さと精密さが判定できるので，新しい分析方法の信頼性を確立することができる。(3) 標準試料を定期的に分析することにより，長期間の分析値の精度管理－特に現場分析において－を行うことができる。

標準試料たるべき必要条件として(1) 測定対象となるべき特性が正確に定量され，かつ保証されていること，(2) 社会的要求の強い試料であること，(3) 均一かつ保存性の良い試料であること，(4) 適当な濃度の元素を含むこと，(5) 10年程度供給できるだけの大量の試料があること，(6) 材料の大量入手が可能で，安価かつ輸送が安全なことが挙げられる。

標準試料は，元来，商工業取引の公正化および円滑化の必要性から生れたものである。例えば，鉄鉱石の輸入において，鉄の含有量が表示値より１％低いだけでも巨額の損害を生じる。このような場合には，鉄鉱石の標準試料を用いて鉄の純度を輸出側と輸入側で検定することが不可欠である。最初にＮＢＳから発行された標準試料は鋳鉄であり(1906年)，その後，鉄鋼，非鉄金属，ガラス，セメント，ゴムなどの標準試料が作られ，現在でも大部分はこうした商工業に関連したものである。

一方，いわゆる環境に関する標準試料が組織的に作製され始めたのは，1970年代に入ってからである。ＮＢＳから発行されたOrchard Leaves(果樹葉)，Bovine Liver(子牛肝臓)は今や環境分析に欠かせないものである。現在世界各国から配布されている環境試料は「環境研究」No.30に記載したが，この10年間にその種類は急速に増加している。いわば，標準試料の重要性が再認識されたのであって，標準試料はその時代の社会的要求をまさに反映している。ＮＢＳでは今後最も標準試料を必要とする分野として「医学，臨床」および「環境」を挙げている。国立公害研究所(NIES)では，このような背景をふまえ分析化学的な基礎研究に加えて，環境分析の精度向上に資するため，昭和52年度から「環境標準試料の作製と評価に関する研究」を開始している。

国立公害研究所で作製された標準試料はNIES(National Institute for Environmental Studies)の頭文字が入ったラベルが付されており，今までに作製されたものはNIES No. 1 として植物標準試料「リョウブ」，NIES No. 2 として「池底質試料」である。

3. リョウブ標準試料の保証値と参考値

国立公害研究所で現在作製されている標準試料は，その元素組成に関するものである。

標準試料の保証値の決定にあたっては，原則として，その元素は，(1) 絶対分析法による２つ以上の独立した分析値があること，または，(2) ２つ以上の独立した比較分析法による分析値があること，を基準としている。しかし，(1)の絶対分析法のみによって保証値を決定することは，現状では不可能であるので，(2)の様式を用いて，これに絶対分析法による分析値も含めることになる。**表１**にリョウブ試料の保証値を決定した元素と，その分析に用いられた方法を示す。分析方法は測定元素によって異なっており，また各分析協力機関の設備，研究内容を反映している。**表１**より，各元素に対して少なくとも４つ以上の独立した分析方法が用いられていることがわかる。できる限り多くの独立した

*財団法人　環境調査センター　理事

表1 リョウブの保証値を決定した元素と用いられた分析方法

カリウム	(K)	AAS, FES, ICP, XRF, IDMS, INAA
カルシウム	(Ca)	AAS, FES, ICP, XRF, IDMS, INAA, IPAA, Grav.
マグネシウム	(Mg)	AAS, ICP, IDMS, INAA, IPAA
マンガン	(Mn)	AAS, ICP, INAA, XRF, IPAA
亜　鉛	(Zn)	AAS, ICP, XRF, INAA, IPAA
鉄	(Fe)	AAS, ICP, XRF, INAA, Sub.IDA, SP
バリウム	(Ba)	ICP, IDMS, INAA, IPAA
ルビジウム	(Rb)	AAS, FES, XRF, IDMS, INAA, IPAA
ナトリウム	(Na)	AAS, FES, ICP, INAA, IPAA
ストロンチウム	(Sr)	AAS, FES, ICP, XRF, IDMS, IPAA
コバルト	(Co)	AAS, ICP, INAA, SP
銅	(Cu)	AAS, ICP, XRF, IDMS, INAA
ニッケル	(Ni)	AAS, ICP, XRF, IPAA, SP
カドミウム	(Cd)	AAS, ICP, IDMS, INAA, XRF
鉛	(Pb)	AAS, ICP, XRF, IDMS
ヒ　素	(As)	AAS, ICP, XRF, INAA, RNAA, IPAA

分析方法の略語については，表3を参照のこと。

表2 リョウブ標準試料の保証値と参考値

保　証　値		
カリウム	(K)	1.51±0.06 (wt.%)
カルシウム	(Ca)	1.38±0.07
マグネシウム	(Mg)	0.408±0.020
マンガン	(Mn)	0.203±0.017
亜　鉛	(Zn)	340±20 (μg/g)
鉄	(Fe)	205±17
バリウム	(Ba)	165±10
ナトリウム	(Na)	106±13
ルビジウム	(Rb)	75±4
ストロンチウム	(Sr)	36±4
コバルト	(Co)	23±3
銅	(Cu)	12±1
ニッケル	(Ni)	8.7±0.6
カドミウム	(Cd)	6.7+0.5
鉛	(Pb)	5.5±0.8
ヒ素	(As)	2.3±0.3
参　考　値		
リ　ン	(P)	(1,100) μg/g
クロム	(Cr)	(1.3)
セシウム	(Cs)	(1.2)
タリウム	(Tl)	(0.13)
水　銀	(Hg)	(0.056)

数値は乾燥重量あたり。乾燥方法については，試料取り扱い法を参照すること。

分析方法が用いられ，しかも分析値が一致することが，保証値を決める過程で必須となる。

参考値は，分析値は良く一致しているが，1種類のみの分析法によっている元素であり，水銀，セシウム，クロムがこれに相当する。一方，タリウムは同位体希釈法のみによる分析値だけであるが，本法の正確さは良いので参考値に含めてある。また，リンについては吸光光度法，プラズマ発光法の両者とも良く一致した分析値を示すが，試料の処理法，特に分解操作中での揮散の問題が残っているので参考値としてある。**表2**に，リョウブの保証値と参考値を示す。元素組成からみたリョウブ試料の特徴は，マンガン，亜鉛，コバルト，ニッケル，カドミウムの濃度が高いことである。

4. 池底質標準試料の保証値と参考値

池底質標準試料は東京大学・三四郎池の底質を用いて調製したものであり，保証値を決定した方法はリョウブ試料の場合と同じである。**表4**に保証値を決定した元素と用いられた分析方法を示す。**表4**に示すように，池底質試料にあっては，各元素に対して少なくとも3つ以上の独立した分析方法が用いられている。

池底質試料中の保証値を決定した元素については，まず第一に分析値の正確さを優先し，次に環境分析における重要性を考慮した。底質試料は，環境試料の1つとして，各自治体の分析機関で日常的に分析されており，特にクロム，ヒ素，カドミウムはその中でも重要な元素である。従って，これらの元素についての保証値が無い標準試料は，色あせたものになってしまうであろう。池底質試料のクロム，ヒ素，カドミウムに加えて亜鉛，鉛，銅，ニッケル，コバルトについても十分信頼できる分析値が得られ，保証値を決定できたことは大変有意義なことである。また，本試料の元素含有量はいわゆる底質試料の平均的なレベルにあり，この点からも使いやすい試料であると考えられる。

表5に，池底質試料の保証値と参考値を示す。

5. NIES標準試料

国立公害研究所では環境分析の精度向上に資するため，様々な環境標準試料の作製を鋭意進めている。NIES No. 1「リョウブ」，NIES No. 2「池底質試料」に引き続き，NIES No. 3として「クロレラ」を作製した。クロレラは水圏に分布する代表的な緑藻であって，生物試料として興味深いものであり，また，クロレラの分析を通じて間接的に水質の汚染を知ることができる。クロレラは生物学の分野では古くから研究材料として使われており，重金属の吸収や毒

表3 リョウブおよび池底質試料の分析に用いられた分析方法

原子吸光分析法 (AAS)	光量子放射化分析法 (IPAA)
炎光分析法 (FES)	同位体希釈不足当量法 (Sub IDA)
プラズマ発光分析法 (ICP)	吸光光度法 (SP)
ケイ光X線分析法 (XRF)	ケイ光光度法 (SF)
同位体希釈質量分析法 (IDMS)	重量分析法 (Grav)
中性子放射化分析法	容量分析法 (Vol)
(Instrumental) (INAA)	
(Radiochemical) (RNAA)	

表4 池底質試料の保証値を決定した元素と用いられた分析方法

アルミニウム	(Al)	ICP, INAA, SP, Grav, Vol
鉄	(Fe)	AAS, ICP, XRF, INAA, IPAA, SP, Vol
カルシウム	(Ca)	AAS, ICP, XRF, INAA, IPAA, Grav, Vol
カリウム	(K)	AAS, FES, ICP, XRF, INAA
ナトリウム	(Na)	AAS, FES, INAA, IPAA
亜　鉛	(Zn)	AAS, ICP, XRF, INAA
銅	(Cu)	AAS, ICP, XRF, IDMS, INAA
鉛	(Pb)	AAS, ICP, XRF, IDMS, IPAA
クロム	(Cr)	AAS, ICP, INAA, SP
ニッケル	(Ni)	AAS, ICP, XRF, IPAA
コバルト	(Co)	AAS, ICP, INAA, IPAA
ヒ　素	(As)	AAS, INAA, IPAA, SP
カドミウム	(Cd)	AAS, ICP, IDMS

分析方法の略語については，表3を参照のこと。

表5　池底質標準試料の保証値と参考値

保証値			
アルミニウム	(Al)	10.6±0.5	(wt.%)
鉄	(Fe)	6.53±0.35	
カルシウム	(Ca)	0.81±0.06	
カリウム	(K)	0.68±0.06	
ナトリウム	(Na)	0.57±0.04	
亜鉛	(Zn)	343±17	(μg/g)
銅	(Cu)	210±12	
鉛	(Pb)	105±6	
クロム	(Cr)	75±5	
ニッケル	(Ni)	40±3	
コバルト	(Co)	27±3	
ヒ素	(As)	12±2	
カドミウム	(Cd)	0.82±0.06	
参考値			
ケイ素	(Si)	21	(wt.%)
チタン	(Ti)	0.64	
リン	(P)	0.14	
マンガン	(Mn)	770	(μg/g)
バナジウム	(V)	250	
ストロンチウム	(Sr)	110	
ルビジウム	(Rb)	42	
スカンジウム	(Sc)	28	
ランタン	(La)	17	
臭素	(Br)	17	
アンチモン	(Sb)	2.0	
水銀	(Hg)	1.3	

数値は乾燥重量あたり。乾燥方法については，試料取り扱い法を参照すること。

性などに関する基礎研究を行う上で本試料は有用であろう。クロレラ試料は共同分析が終了して現在分析値を集計中である。

環境汚染は最終的には人体に影響を与えるものであり，人体試料こそ最も重要な標準試料となる。通常，採取できる人体試料は血液，尿，毛髪に限られる。血液は最も重要な人体試料として，臨床検査，疫学等で広く用いられている。しかし，重金属の定量は，血液の組成が複雑でその濃度が低いこともあってかなり難しく，分析値の信頼性については疑問の点も多い。特に，高濃度のナトリウムや蛋白質の存在は，分析上常に問題となる。人血液中の重金属は生体の恒常性によって常に一定量に保たれており，ある濃度範囲を越しても(過剰)，以下であっても(欠乏)，健康障害を引き起こす。体内での機能が良く知られている元素(鉄，亜鉛，銅など)に加えて，将来，必須性や毒性が問題になるであろう元素についても血液中のレベルを正しく測定する必要があり，標準試料の確立が急務である。血液中の微量元素測定用の標準試料として作製したものが，NIES No. 4「人血清」である。

NIES標準試料No. 5として調製が完了したものが「頭髪」試料である。頭髪中の重金属の濃度は他の器官と比べて高く，一種の蓄積作用があり，人体試料の中でも血清と並んで重要なものである。頭髪をサンプルとして重金属が人体に与える影響を調べた研究は数多くある。頭髪試料の重要性にもかかわらず，今まで標準試料が作られなかったのは，主として製作上の技術的問題からであった。標準試料として十分に均一な試料を作るためには，試料を細かく粉砕した後に均一化する必要がある。国立公害研究所では頭髪試料の調製には，メノウボールミルによる粉砕法を選んだ。

現在配布されている標準試料の中で，種類が非常に限られている分野として動物，魚介類がある。これらの標準試料を作ることは，技術的にかなり難しいようである。標準試料は最終的な製品として数十キログラム必要なため，試料調製作業は膨大なものとなる。しかし，逆に貴重な標準試料を作り得るわけであり，現在，NIES No. 6として「ムラサキイガイ」を作製している。「ムラサキイガイ」は北半球の海岸に広く分布する貝であり，環境モニタリングの材料として全世界的に用いられている。貝の標準試料としてNBSから「カキ」が配布されているが，環境分析という観点からは「ムラサキイガイ」がずっと重要な地位を占める。調製がうまくゆけば本年度中に試料が完成する予定である。現在の国立公害研究所の標準試料は，元素の含有量について保証値を決定することを目的としているが，将来は有機化合物に関する標準試料も計画している。

6. おわりに

標準試料は広く国際的に使われるべきものであり，この十年間に標準試料の重要性が再認識され，国際機関および各国機関で標準試料のプログラムが新しく開始されている。このような情勢の中で，国立公害研究所は環境分析という立場から環境標準試料の作製を行っている。標準試料を完成していく過程の中で，試料調製法が経験として残され，また様々な分析方法が適用されることにより，各分析方法の評価がなされると共に問題点も明らかにされ，これらのことが関連分野の将来の進歩につながると考えられる。また，わが国独自の標準試料の必要性もあるはずである。

標準試料の保証値を決定するためには，多くの分析機関で様々な分析方法を用いて分析値を得ることが，まず要求される。標準試料の分析には，多くの分析機関で貴重な時間と膨大な労力が費やされており，こうした協力なしには保証値を決定し得ないことを銘記すべきである。標準試料は極めて貴重なものであるので，使用する際には説明書をよく読み，試料採取量，乾燥方法，保存法，有効期間などに注意して大切に取り扱わねばならない。

頒布方法

上記標準試料の頒布方法は，下記の通りです。

(1) 数　　量：リョウブ　500本限定
　　池底質　1,000本限定

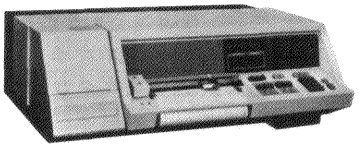
(2) 頒布価格：リョウブ，池底質共5,000円(実費)，原則としてそれぞれ1機関1本とします。内容量はリョウブ14 g，池底質20 g

(3) 申込方法：下記当財団宛，なお送金は郵送又は下記口座をご利用下さい。

三井信託銀行丸の内支店
当財団名義㊖口座　6024536
〒100　東京都千代田区丸の内1-5-1
(新丸ビル)(財)環境調査センター
TEL　03-212-2747

Topics

850形日立分光けい光光度計



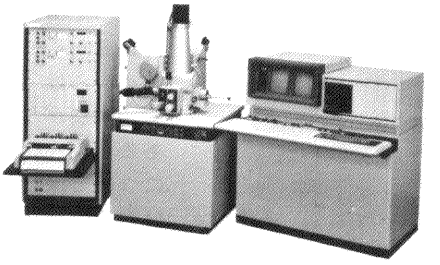
850形日立分光けい光光度計

ルーチンワークに用いられる分光けい光光度計は，感度が最重要視されますが，研究的目的においては，これに加えて様々な性能・機能が要求されます。希土類，気体等を測定対象とする分野及び極低温におけるけい光測定を行なう分野においては，特に高分解能が要求されます。固体試料・混濁試料を取り扱う分野及びデータ処理を用いて極微弱けい光測定を行なう分野においては，低迷光が要求される場合が多くなっています。850形分光けい光光度計は，これらの要求のすべてを満足することを主眼として開発された高性能形分光けい光光度計です。またデータ処理機能の多様性も特長の一つですが，CRTに操作法を表示することにより，多機能機にありがちな操作の煩雑さをも軽減しています。

■主な仕様

1.励起側分光器：前置分光器に無収差凹面回折格子を用いたダブルモノクロメータ
2.分解能：励起側，けい光側とも0.15nm
3.集光光学系：すべてミラー光学系(色収差なし)
4.光源：石英バルブキセノンランプ，オゾン自己解消機構
5.CRT：測定条件表示及び操作法表示
6.データ処理：高精度スペクトル補正，差スペクトル，微分，CTA，リピートスキャン，波数積分(量子収率算出用)，偏光度スペクトル，定量演算，その他

X-650形日立微小部走査X線分析装置



X-650形微小部走査X線分析装置

X-650形は，電子光学技術・X線分光技術と，コンピュータ技術を結集し，高精度・高感度のX線元素分析と高分解能表面観察とを両立させた本格的XMAです。

■特　長

1.低バックグランドX線分光
電磁対物レンズの磁極間隙を通してX線を取り出す方式により，X線分光器への散乱電子の混入を防止し，バックグランドの少ない高精度X線分析を実現しました。
2.ワイドレンジX線分光器
2台のX線分光器により$_{5}$B～$_{92}$Uまでの全固体元素の定性・定量分析ができます。また，エネルギ分散形X線分析システムを装備することにより，迅速定性・定量分析も可能です。
3.高感度X線検出
X線検出器は，軽元素分析用のガスフロー形比例計数管と比較的重い元素分析用のガス封入形比例計数管とを，直列に組み込んだタンデム方式を採用しています。このため，広範囲の元素に対して高い検出効率が得られます。
4.高分解能
高精度電磁レンズによる3段縮小系の採用により，二次電子像分解能60Åが得られ，走査電子顕微鏡としても高性能です。
5.コンピュータ内蔵の像表示部
コンピュータの採用により，操作性が格段に向上しました。例えば，ビント合せ操作・明るさ／コントラスト合せ操作のワンタッチプッシュボタン操作化，非点収差補正操作の簡易化など各種の使いやすい機能を大幅に採り入れました。

■主な仕様

1.二次電子像分解能	60Å保証
2.倍　率	X20～200,000
3.元素分析範囲	$_{5}$B～$_{92}$U
4.加速電圧	1～40kV(1kVステップ)
5.電子光学系	電磁レンズ3段縮小
6.光学顕微鏡	X200
7.試料微動装置	X，Y＝0～25mm Z＝5～30mm 傾斜＝－5°～45° 回転＝360° 試料サイズ50mm径×20mm高(最大)
8.X線取出角	38°
9.像表示	二次電子像，X線像，反射電子像
10.排気系	全自動

〈編集後記〉

■昨年7月に，本ニュースNo.2をお送りして以来，長い間ご無沙汰しておりましたが，ここにNo.3，4の合併号をお届けいたします。発行が遅れまして，誠に申訳ございません。今後は，鋭意定期発行に努力いたします。

■本ニュースは，日立理化学機器をお買上げ頂いた方々には，全てお送りすることになっています。もし，貴殿のお近くに，受取っておられない方がありましたらご一報下さい。直ちに新規に名簿に登録し，以後継続的にお送り致します。

■日立理化学機器による報文のご投稿を歓迎致します。尚，次号より，原稿の受理日は記載致します。

■本ニュースに関するお問合せは，下記へ，または，日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。

○株式会社　日立製作所　那珂工場　応用技術センタ
茨城県勝田市市毛882番地
〒312　電話　水戸(0292)73－2111(代)

○日製産業株式会社　マーケティング部
東京都港区虎ノ門1丁目26番5号第17森ビル
〒105　電話ダイヤルイン東京(03)504－7187

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
WINTER　1981　Vol.24　No.3/4

発　行　昭和57年3月1日
(年4回　発行)
発行人　湯川　清
編集人　中嶋康雄　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