

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

HITACHI

MAR.
VOL.38

1996
No.2

目次

巻頭言

巻頭言

機器分析と分析機器 …広川吉之助 -1
報 文

農業高校における走査電子顕微鏡
(SEM) の利用について
……………松山明彦 -3

LC/MSを用いた鎮静・麻酔薬の
血中濃度測定
……………金澤秀子 松島美一 -10

解 説

Natural SEMによる微生物の観察
……………西村雅子 和田正夫
秋葉恒雄 山田満彦
……………久保本健三 -16

汎用HPLC装置によるセミマイクロ分析
……………高木正徳 山田宣昭 -18

学会発表ミニファイル……………14

新製品紹介

U-2001形ダブルビーム分光光度計……………13

M-I200AP/ES LC/MSシステム……………13

FB-4080A形集束イオンビーム加工
観察装置……………21

世界最小のもの差し「標準マイクロ
スケール」……………21

S-3200H形SEM……………24

トピックス

日本分析化学会第44年会……………8

第15回科学機器展(大阪)盛大に開催……………8

日本電子顕微鏡学会第40回シンポジウム開催さる……………9

インターネットホームページ開設のご案内……………9

第6回北京分析測試學術報告会および展示会報告……………9

第6回クロマトグラフィー科学会議開催……………9

第12回イオンクロマトグラフィー討論会……………9

技術資料新刊紹介

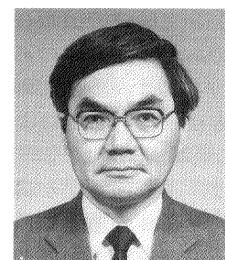
テクニカルデータ

最新版ダイジェスト……………22

機器分析と分析機器

Instrumental Analysis and Instruments for Analytical Use

広川吉之助*



近年、機器分析という言葉で以前程に耳にしなくなった。直接kg原器に基づく重量法以外は広い意味で装置、器具を使用する“機器”分析であることが認識されたのか、それとも近年は、ある2、3の元素を除いて重量分析がほとんど実用されなくなったためであろうか。

私が比較的長く関連を持っていた鉄鋼分野に例を取ると分析試料を溶液化せず、固体のまま比較的大型の分析機器で分析する場合を習慣上、機器分析としている。これはちょうど1960年前後、鉄鋼製錬に転炉が導入され数十秒以内に溶鋼の分析結果が要求されるようになった時、その要求に対応できる分析法としてatomic spectroscopyのうちでスパーク放電発光分光分析と蛍光X線分析が研究され、採用され、応用性を広げて現在に至ったことにもかかわっている。すなわち炭素、硫黄、燐などを始め多元素分析への汎用性と同時分析の迅速性が基本条件であったと思われる。しかも、それらはモデル計算と実験結果が一致しない発光分光分析とモデル計算と実験結果がよく合致する蛍光X線分析であった点に興味がある。その後、発光分光分析法は試料の種類系列ごとに定量のための検量線を作製する層別検量線法が採用され、スパーク放電に対する介在物の影響を逆手にとった、優れた励起法であるPDA (Pulse Height Distribution Analysis) 法が提案されて広く応用され、さらにスパーク放電発光分光によるガス分析なども行われている。一方蛍光X線分析法は鉄基合金に対するdj補正法、 α 係数法、fundamental parameter法などの補正法が提案され、応用され、炭素など軽元素の分析も研究されている。そして現場の炉前分析から1960年以前まで使用されていた吸光光度法など“いわゆる迅速分析”は姿を消した。

その間1950～1960年にかけて原子吸光法、そしてプラズマ発光分光法と原則的には水溶液試料を念頭にした分析法ならびに市販品の分析機器が出現した。原子吸光法は、化学炎による原子化はアルカリ金属などの分析に使用されているが、近年はMassmann炉などに代表される抵抗加熱熱炉による原子化方式が生き残り、プラズマ炎は、化学炎による原子吸光分析が行われていた元素も含めてICPプラズマ炎が発

* 東北大学 教授 工学博士

光光源として広く使われるようになった。前者はmatrix modifierの活用により比較的発光分光分析では励起エネルギーの関係で比較的低感度の元素群に、後者は三重管トーチの採用によりプラズマ中心部への試料導入が図られdynamic rangeが大きく、かつ溶液試料が原則という利点から環境試料を始め多くの試料に応用されてきた。もちろん、personal computerによる操作を含めて、特にICP発光分光法はその広い応用性が喧伝されているためか、水溶液試料でもその中の酸素や水素の分析を始め、すべての元素が非常に正確に分析できると思われたり、応用方法もpersonal computerのソフトに追随して吸光光度法的センスでの使用が多く、発光分光の長所が生かされていない場合が見られる。

面白いことに、最近、発光分光分析の話のある会議で物理専攻と称する人達の前で行ったことがある。「定量のために標準試料群または標準物質で検量線を作製しなければならない」との説明に“それはphysicsではない”といわれ、一方、化学（もちろん、分析化学も含めて）専門という人は研究手段に分析機器を使用しているにもかかわらず、機器分析とくに、その応用は常温溶液反応でない場合が多いためか“化学でない”という人もいる。これは我国における機器分析に対する認識の一端を表しているが、CSIなど分光関係の国際会議に出席してくる外国の人達は、どうであろうか興味のあるところである。

さらに一般の人や分析結果のみを必要とする人達は分析方法はマスコミによる紹介にも問題があるが“天からさずかったもの”のように理解し、機器があり、ボタンをおせば、すぐに結果が得られると思っているようである。すなわち各種機器を取りそろえて展示場のように並べれば化学情報が永久に、かつただちに得られるということになる。そのため、しばしば思いがけないような数値がひとり歩きする。

また一部、大型機器の活用とそれに伴うcomputerのハード、ソフトの発達により学校における分析化学の講義や実験がすぐに実際の役に立つことがなくなってから20年は経ている。各装置が、それぞれの特性を持っているにもかかわらず、単にpush buttonですべての同一種類の機器は同一数値を与えていると思われる現在、歴史的に見て機器分析や分析機器に対して次のような考えは妥当であろうか。

- (1) 分析機器は人体の大きさ以下すなわち卓上型になると広く行き渡る。これはガスクロマトグラフィー、赤外分光、そしてこれは分析機器とはいわないがワープロなどの例が見られる。そして優れた単機能化、小型化はセンサー化につながる。
- (2) Personal computer操作が普通の時代には、テレビや電話機なみの感覚で一定の条件下では誰でも安定なdataを常に得ることができる機器であることが要求される。
- (3) 時代の流れとして(2)の状態を維持するためには、例え

ば発光分光の光源のように分析機器に使用されても、その原理と現象に対する理論的解釈が未解決でblack box化されてもやむを得ない。

(4) (3)のために機器メーカーは、そのblack boxの中身を理解し、その中の問題点を解決し、(2)の事項を満足するような研究と、それを実行する研究者を養成、確保して機器の開発とそのinstruction manualを作製する必要がある。もちろんmanualはもとより、ほとんどの試料に対して基本となるべき分析操作、すなわちgeneral procedureを機器の一部として供給されるべきである。そしてそのgeneral procedureを出発点として、種々の試料への応用が考えられるようにし、できたら具体的事例も組み入れる。これは単なる機器の購入、使用者に、このような要求は困難となっているためである。

(5) もたらされた化学情報は最初、安定的でも時間とともに再現性の良い定量性が要求される。そのため基準物質や標準試料群などの保証と確保が必要である。

(6) 以上のことは分析対象すなわち必要情報が定まり、それに必要な分析方法を開発される場合はもとより、まったく新しい原理で分析方法、分析機器を開発するときにも当てはまる。身近な例としてICP/MSやSIMSなどの時代的変遷例を見ていただけたらわかると思う。

機器による分析が普通となり、分析と名を冠した講座がなくなりつつある昨今、機器分析や分析機器に関して皆さんは“電気が供給されない場合も含めて”どんな考えを持っておられるであろうか。

筆者略歴

広川 吉之助（ひろかわ きちのすけ）

現住所 仙台市泉区高森三丁目4番地23号

1957年 東北大学大学院工学研究科金属工学専攻修士課程修了

1960年 東北大学大学院工学研究科金属工学専攻博士課程修了

1960年 文部教官 東北大学助手（金属材料研究所）

1964年 文部教官 東北大学助教授（金属材料研究所）

1964年～1965年 フンボルト財団留学生としてドイツ連邦共和国、ドルトムント分光化学研究所に滞在

1975年 文部教官 東北大学教授（金属材料研究所）

受賞

1966年 日本化学会進歩賞

1973年 科学計測振興会賞

1975年 日本金属学会功績賞

1986年 日本分析化学会学会賞

1994年 日本鉄鋼協会浅田賞

報 文

農業高校における走査電子顕微鏡（SEM）の利用について
—教育現場での応用例—On the use of SEM at an agricultural high school
—An example of the practical use of SEM at high school classes—

松山 明彦*

（平成7年12月26日受理）

1. はじめに

近年、わが国の農業技術の進歩は著しく、バイオテクノロジーや分析技術の向上によって、これまでの田畑を基盤とした農業から別のイメージの農業生産を可能にしてきた。

そこで、高等学校の農業教育においても、これからの進んだ農業技術を取り入れた生物工学や施設園芸などの専門学科を設置したり、その他の農業に関する学科の教育課程の中にこれら新しい技術の科目や内容を取り入れる学校も多くなってきた。

また、文部省でもそれぞれの学校で特色ある教育づくりという観点から、実験・実習にかかわる施設、設備への充実が実施されており、時代の進歩や産業社会の変化に柔軟な対応ができるようにと先端機器の導入がなされてきている。

神奈川県でも、新しい技術に対応するよう平成3年を皮切りに、走査電子顕微鏡（SEM：Scanning Electron Microscope）の設置が行われてきた。このSEM1台設置に要する費用は、1,000万円を超えるもので重要物品となるため、文部省の国庫補助を受けている。また、平成7年現在で県下農業高校に4台設置されており、教育効果に期待が寄せられている。

しかし、農業高校では主に水分を含んだ生物試料を中心に観察するため、SEM観察を行う際には必ず、試料の固定・脱水・乾燥処理が必要である。このような前処理は、観察の際には大きな制約となり、時に前処理によって試料が変形し本来の姿を失う恐れもあることを認識しておく必要がある。

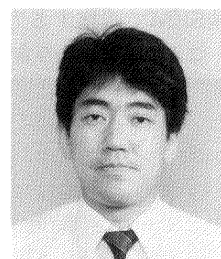
したがって生物試料のSEM観察では、第1に変形の少ない試料をつくること。できれば、生の状態で観察するのが望ましい。第2に前処理が簡単であること。できれば、前処理が省ければさらによい。以上の2点がポイントになる。

本報では、民間企業、公立研究機関、大学で当たり前のように活用されているSEMを農業高校の教育用設備として導入するにあたり、前処理が簡略化できる「低真空モードで観察可能なSEM」と併せて、電子線照射部から発生する特性X線を検出して、同部の元素情報（定性、定量、マッピング）を調べるエネルギー分散形X線分析装置

（EDX：Energy Dispersive X-ray Analyzer）を導入し、より生に近い状態で生物系試料を観察した応用例の紹介と高校教育でSEMをいかに活用していくかについて、生徒達とSEMのふれあいを見守る者として考えてみることにした。なお、機種には次のSEMが設置された。

SEM：日立走査電子顕微鏡/S-2250N

EDX：堀場エネルギー分散形X線分析装置/EMAX-5770



2. 県教科研究会の実習とSEMに対するアンケート結果

本校にSEMが導入されたのを受けて、県下の農業高校生物工学教科教員を対象に、SEMの実技講習会を実施した。開催に先立ち、参加者のSEMに対する意識調査としてアンケートを取り講習会内容の企画に活用した。

アンケート結果を下記に示す。

- ①SEMについて興味はありますか？
・興味ある（100％） ・興味ない（0％）
- ②SEMのことをご存じですか？
・はい（92％） ・いいえ（8％）
- ③「はい」と②で答えた方は操作したことがありますか？
・ある（25％） ・ない（75％）
- ④SEMを学校教育の中で活用できると思いますか？
・できる（92％） ・できない（8％）
- ⑤SEMで観察してみたいものは？
・試料名……花粉、昆虫、植物組織、食品（パン、チーズなど）、微生物（細菌、カビ）、薬品、土壤肥料など
・目的……1) 教材として利用したい。
2) 表面構造の写真を撮影したい。
3) 形態観察をして詳しく情報を知る。

⑥疑問や問題点

- ・実際に使用したことはないが、操作性が難しいのではないかな。
- ・試料作製に手間がかかるのではないかな。
- ・スクリーンが1つでは、集団で見るのが困難。

このように、アンケートの結果からSEMに対しての

関心度が高く、教育的利用価値は理解できるものの、機械の置き場所や数人でしか操作できないなどの意見もあり、導入について慎重にならざるをえない現状もあった。しかし、講習会後の感想として、SEMの操作方法においてはその簡便さにほとんどの方が驚かれており、生徒でも十分に使用できることへの認識は得られた。また、得られる情報の質と量は、参加者たちの今までの認識の枠をはるかに超えたものであり、これからの教育ツールとしてその有効性にほとんどの方が共通の認識を持つことができた。

3. 低真空SEMによる観察方法

生物試料等を従来のSEM試料作製法で観察しようとした場合、固定、脱水、乾燥の手間がかかりその場で像をすぐに見ることができないことは前述に記したとおりである。しかし、低真空中で無蒸着のまま水分を含んだ生物試料を直接SEMで観察する方法がある。

これは、試料の含水状態に合わせて試料室内を低真空状態（10～100 Pa）にし、二次電子の代わりに反射電子を用いて観察する方法で、試料作製から写真撮影に至るまで短時間で、しかもきわめて簡単に操作ができる点ですばらしい手法だと考えられる。特に、前処理によって試料変形が生じていた試料や、含水状態のまま観察しなくてはならない試料については画期的な方法といってよい。このような低真空SEMの出現によって、これまで高真空中での観察が常識であったSEMの世界が、大きく広がるものと期待している。

次に、試料室の真空制御について説明する。SEMの真空度は、試料の含水状態によってコントロールする必要があるが、真空が高すぎると試料の形態を崩してしまう失敗もある。これを防ぐために最近の装置は、真空をコンピュータで自動コントロールするため、オペレータは真空度を希望の数値にセットしておくだけでよい。さらに最近では、ペルチェ素子を使用したクールステージが開発され、試料室内で試料からの水分の蒸発を極力抑えることで、より安定に生の試料観察が可能になってきている。また、真空の切り替えで高真空モードにも即座に変更できるため、二次電子で高解像度に観察を行うことにも対応できる。

このような低真空SEMの進歩は、観察対象が含水試料の多い農業高校の実験、実習においては大変有効で、SEMという新しい教育器材の活用範囲として、パーフェクトではないが、利用の可能性を大きく広げていくものと考えられる。

4. 低真空SEMの観察例

4.1 低真空SEMによるファレノブシスの種子発芽観察

コチョウランの名で親しまれているファレノブシス（学名）は、熱帯産の単茎性着性ランである。花の咲き方は、日本人に大変好まれ、カトレアと並んで人気の高い洋ランの1つである。種子の大きさは0.6 mm前後と微小で、発芽の養分を持たない特殊なつくりになっている。また、1つの子房内にできる種子数が多いことが特徴で、1果あたり数万から数十万粒にも達する。

このファレノブシスについて、無菌培養を試みた。培地は、寒天培地に無機塩類と糖を加え25℃、16時間照明、2000Luxの条件下で同一シャーレ内で行い、SEM観察の

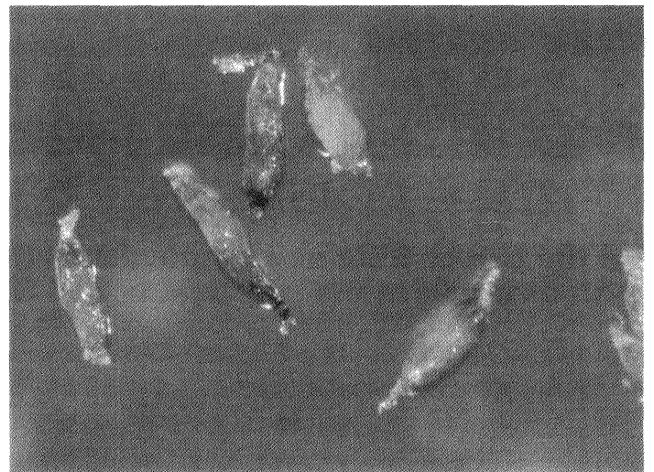


図1

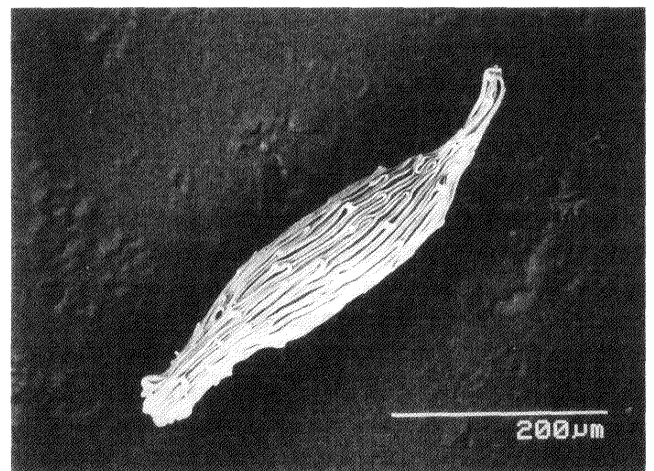


図2

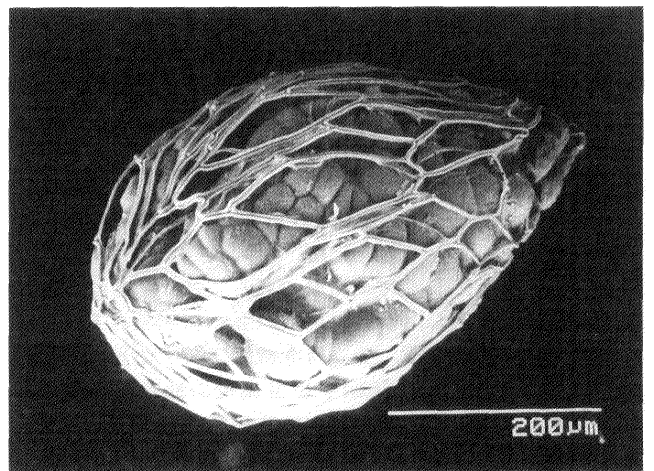


図3

ためシャーレから試料を取り出し、短時間に低真空SEMで観察し撮影を行ってみた。

光学顕微鏡（図1）とSEM（図2）で種子を比較観察すると表面構造の鮮明さは、明らかにSEMの方が優れており、種子の表面にあるネット形状がはっきりと確認されている。

播種後10日目には、中央付近にある胚の部分に肥大が見られ、播種後20日目では、胚がよく発達しネットの部分が大きく開いている状態が観察できた（図3）。

さらに、播種後30日目には、胚の分裂組織がネットから飛び出し、肉眼でも緑色のプロトコーム（PLB）を観察することができた。

なお、この発芽経過については、培地中の糖の種類と濃度を変え「走査電子顕微鏡を用いたファレノプシスの発芽に関する研究」と題して、平成6年度日本学生科学展県審査で入賞することができ、東京ドームで開催された世界ラン展の会場でパネル出展した。

4.2 低真空モード（反射電子）と高真空モード（二次電子）の比較

SEMで生物試料を観察するにあたり、直接サンプルを入れ低真空モードでバラの花弁を撮影したものが図4である。水分を含んだ状態でも表面構造を見ることができるが、長時間の観察では、やはりサンプルからの脱ガスにより試料の変形が生じてしまう。このように低真空SEMは、最適な真空度を保ったとしても、試料からの脱ガスを完全にゼロにすることはできず、徐々に水分は蒸発していくものと理解しておいた方がよい。前述したクールステージは、このような水分の蒸発をかなり防ぐもので、その利用価値はあるものと考えられる。したがって、ここに示した試料の場合は、従来から行われてきた、固定、脱水、乾燥といった前処理を行ってから観察するのが適当であり、高真空下で二次電子像を観察することで、より鮮明な映像を見ることができる。図5と図6は、葉の断面と花粉管の発芽を観察した二次電子像であるが、表面の微細構造がよりリアルに観察されている。

4.3 生徒によるSEM観察例とその考察

SEMを使った授業は、生物工学選択（3年次）で実施

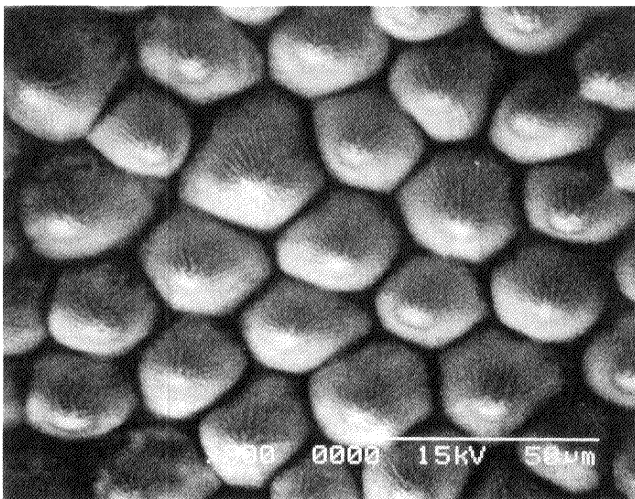


図4

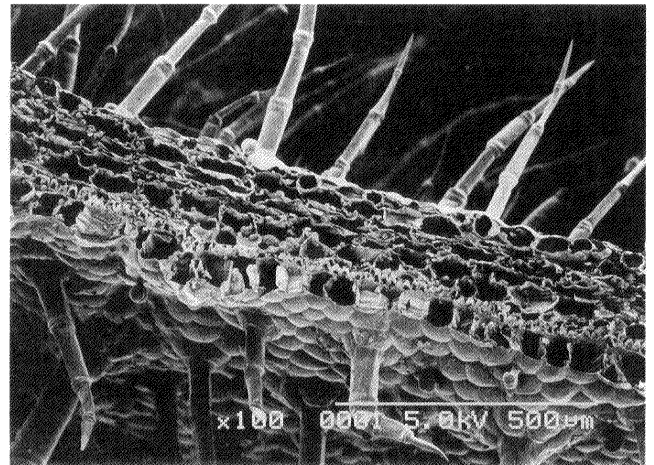


図5

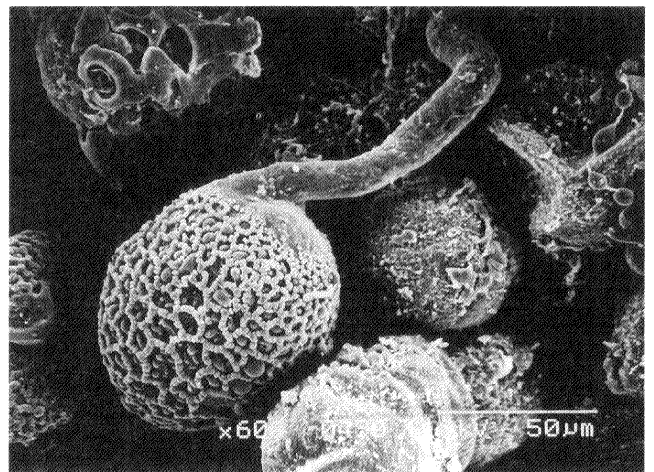


図6

している。自由題目で各自がテーマを決めパネルを作製し、学校祭で展示発表を行った。その時、生徒の記念としてSEM文集をつくり配布した。ここでは、写真のすべてを紹介できないので、その一部を紹介し生徒のSEMに対する意見、感想を列記する。

テーマ：草花の花粉（図7）

今回は、花の花粉の形態を観察し、植物の生命の素晴らしさを改めて感じました。材料が細かいため、試料を作るのに苦労しましたが、電子顕微鏡を自分で操作して観察することは、農業高校の授業の中では珍しい取り組みであり、とても楽しい学習だと思いました。〔園芸科学科A〕

テーマ：各種調味料（図8）

今回は、家庭にある身近な調味料を観察しましたが、肉眼ではみんな同じに見えるものが、ひと粒ひと粒を電子顕微鏡で観察するとそれぞれみんな違った形や大きさをしていくことがわかり、とても勉強になりました。軽い気持ちで観察しましたが、今までに見たことのない発見ができました。〔園芸科学科B〕

テーマ：各種布（図9）

あわただしく始まった電顕での観察は、私にとって普段なじみの薄いものだったため、なかなか操作がうまくいか

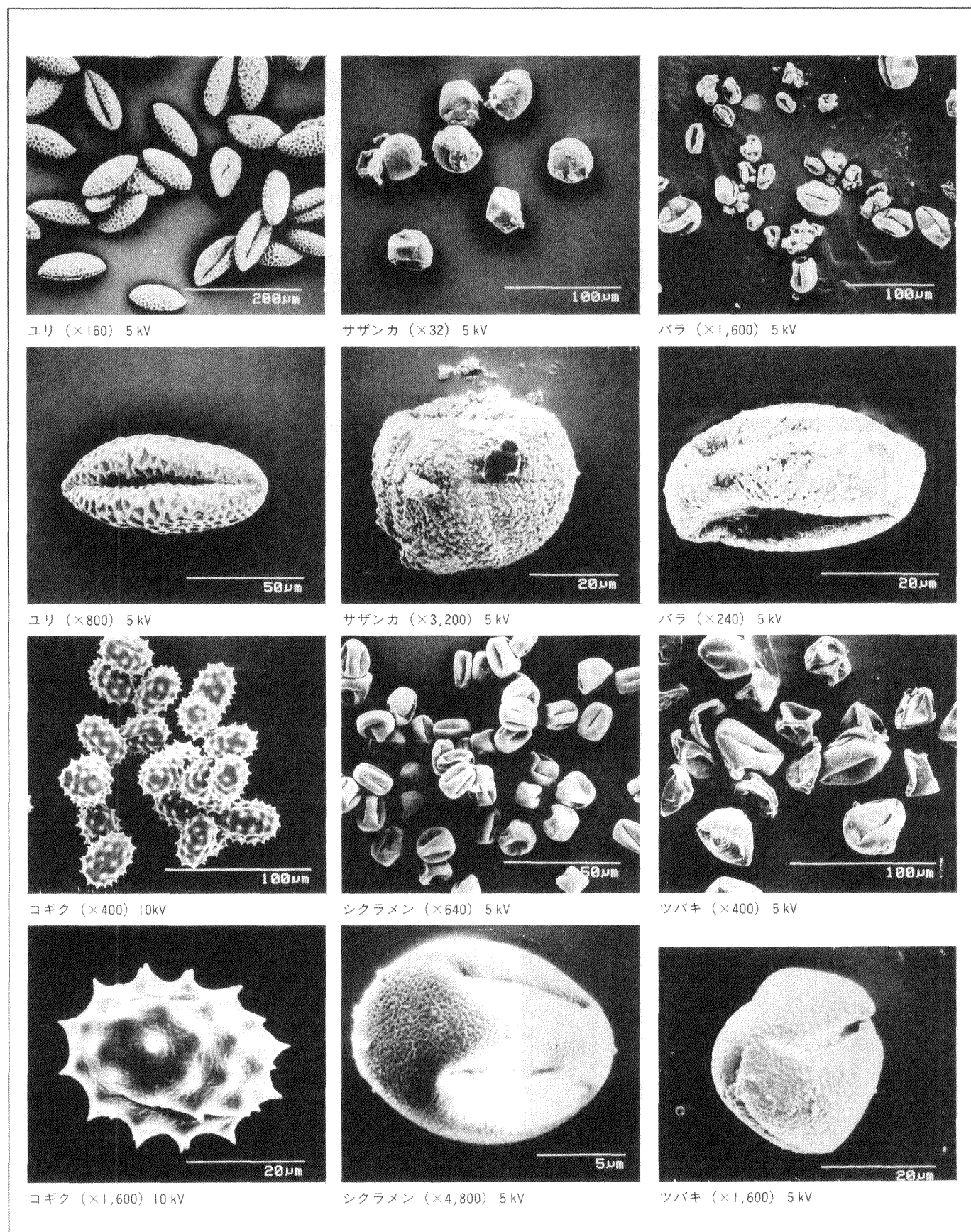


図7 草花の花粉

注：ここに示す写真 (P6～8) の倍率は撮影時の直接倍率を表示したものです。写真はレイアウトの都合上縮小されておりますので正しい倍率は写真中にあるミクロンバーをご参照ください。

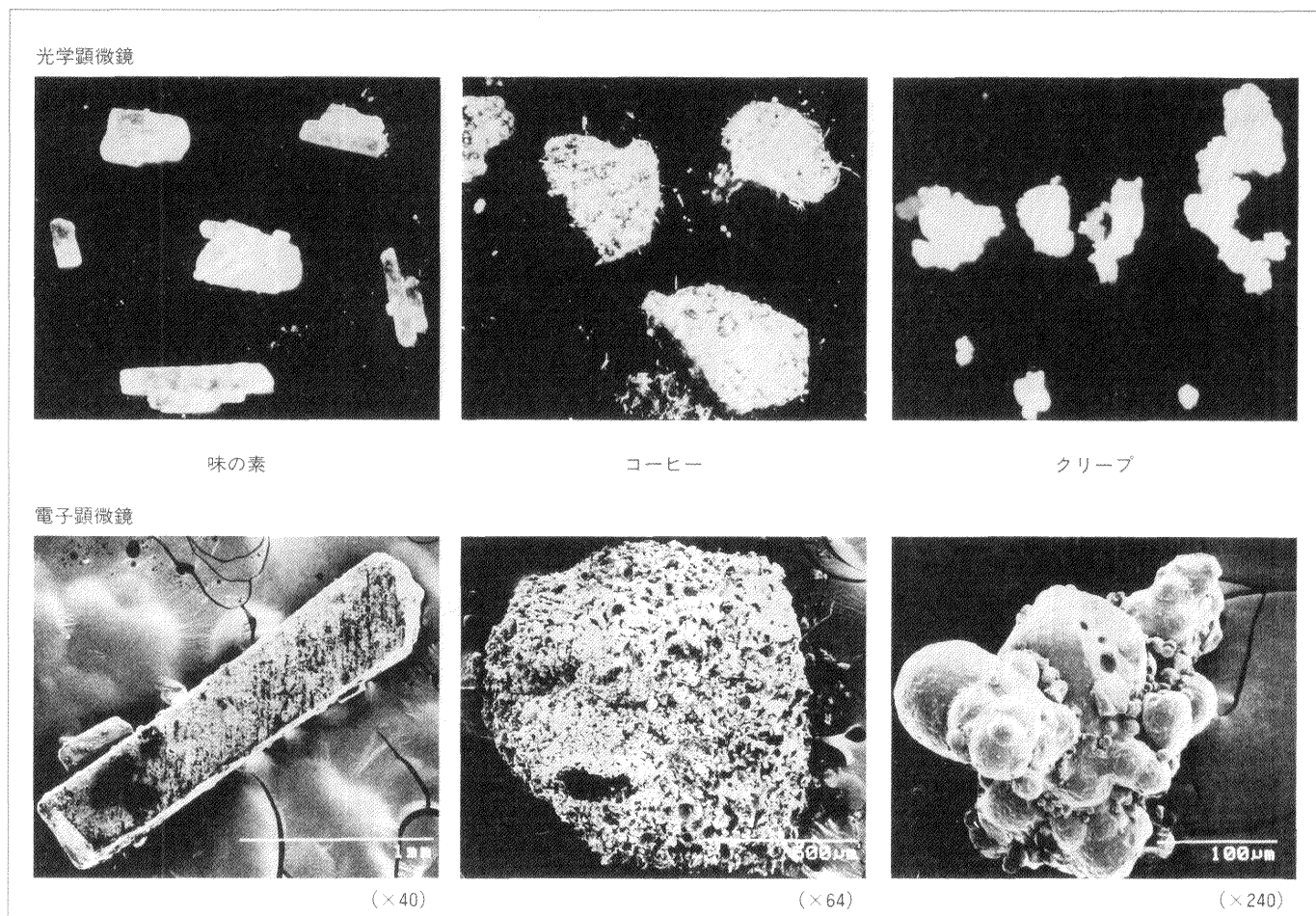


図8 各種調味料

ず、時間ばかりかかってしまいました。しかし、今回の経験は、私にとってこれからきっと良い思い出として残るものと思います。〔園芸科学科C〕

5. まとめと今後の期待

SEMは、今まで光学顕微鏡の倍率でしか判断できなかったものが、より高倍率にしかも立体的に観察できることで多くの情報が得られ、より科学的に構造や形態を分析する上では、必要不可欠な要素をもっている。

また、水分を含む生物試料も低真空中で観察できるために、試料の前処理が不要でそのまま見ることが可能となった。装置における操作方法も簡素化されており、自動焦点機能、自動非点補正機能、自動明るさコントラスト調整機能、自動真空度設定機能などで、初心者でも比較的短時間に使えるような装置である。

電子顕微鏡というと、なんだか難しそうなイメージもあるが、「百聞は一見にしかず」とはまさにSEMのことを指すのかもしれない。

現在、生物工学選択（3年次）授業や農業クラブ活動で使用しているが、生徒たちも楽しそうに興味深く取り組み中でも選択授業では、放課後も残って自主的に写真撮影を行っている。また、昨年は日本学校農業クラブ全国大会の研究発表の部において、「植物性廃油からの肥料化に関す

る研究」と題した発表でSEMとEDXを使いデータの参考資料として活用し、最優秀賞を獲得する機会にも恵まれた。

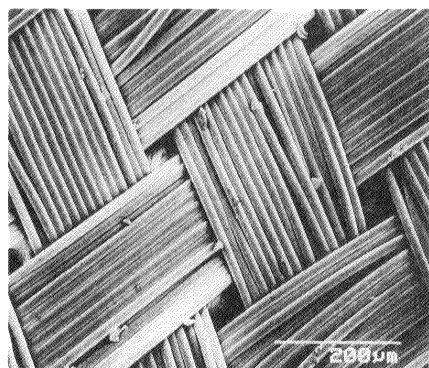
今後は、課題研究などにおいても十分に利用できるものと思われるが、SEMはあくまでも研究を進めていく上で1つの手段として使う装置であるように感じている。したがって、生徒たちの自由な発想からテーマを見つけ、必要に応じてミクロの世界を体験できるすばらしいチャンスが、今の高校教育に導入され始めていることをうれしく思っている。

農業の新しい時代の対応として、生徒の興味、関心を高め自信と経験、さらには感動を与える上でSEMが1つの教材として活用でき、企業のニーズにあった視野の広い職業人の育成に貢献できることを期待している。

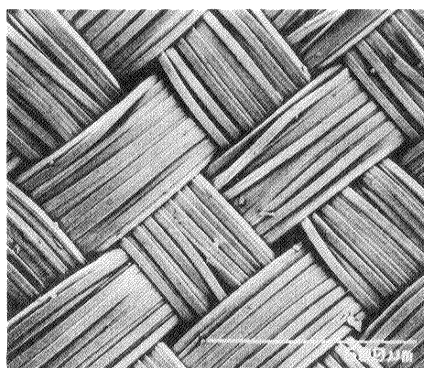
最後にこの報文をまとめるにあたり、ご指導ならびにご助言をいただいた東陶機器（株）小倉基礎研究所分析室の青島利裕氏、東京農業大学総合研究所電子顕微鏡室の斉藤紀子氏に対しここに記して感謝の意を表す。

参考文献

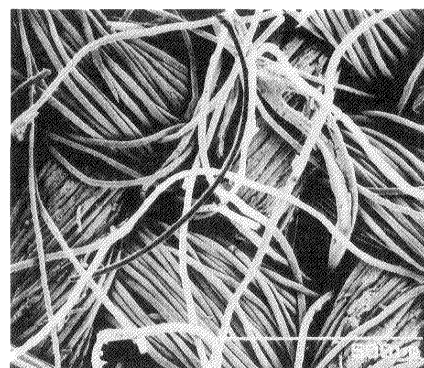
- 1) 走査電子顕微鏡の基礎と応用、日本電子顕微鏡学会
- 2) 種谷真一、木村利昭、相良康重：食品・そのミクロの世界
- 3) 日立SEM読本
- 4) 朝倉健太郎：顕微鏡のおはなし、日本規格協会



ポリエステル (×150)



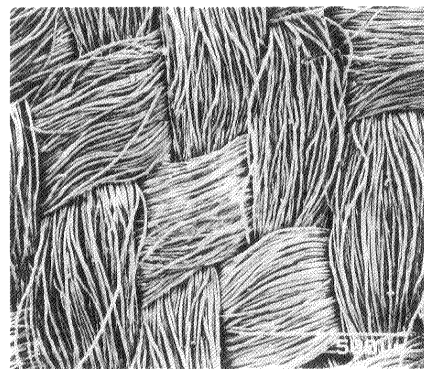
ナイロン (×100)



アクリル (×100)



アセテート (×150)



シルクフローラ (×150)

図9 各種布

Topics

日本分析化学会 第44年会

日本分析化学会の年会が'95年9月28日から30日まで3日間、北海道大学旧教養部において開催された。

今回の参加登録者数は1,333人で口頭発表は510件（特別講演/受賞者講演を除く）、ポスター発表は127件、ワークショップは9件、そして日立関係者の発表件数は13件であった。

なお、日立関係者の有功賞の受賞者

は次のとおり。（敬称略）

松本健次、飯塚勇、仲田光宏、秋元了吉、木村忠、若葉茂（神道千秋 記）

第15回科学機器展 （大阪）盛大に開催

第15回科学機器展は'95年11月15日から4日間、大阪のインテックス大阪にて、34,000名の入場者を迎えて開催された。

日立からは、S-3200N走査電子顕微鏡、液体クロマトグラフ、LaChromの分析情報システム、ネットワーク、マルチメディアシステム、LC/MSおよびU-2001分光光度計の新製品に加え、発光分析装置、水質分析関連機器

を出展し、多数の見学者よりカタログを請求される盛況さであった。

併設の新技术説明会にも参加し、多数の顧客が聴講され、日立分析機器の機能、特長、利用技術の豊富さをご理解いただいた。

（山本秀雄 記）



第15回科学機器展のLaChrom HPLC展示コーナー

Topics

日本電子顕微鏡学会 第40回シンポジウム 開催さる

日本電子顕微鏡学会の第40回シンポジウムが'95年10月12日、13日の2日間、札幌市の北海道大学医学部で開催された。

今回のテーマは「超ミクロの動きを見る」—画像化技術の進歩—で、近年の電子顕微鏡シンポジウムで論じられてきた、電子顕微鏡および各種ニューマイクロスコープなどの画像入力装置の進歩に加えてこれらの画像科学に共通の問題となるコンピュータによる画像化、画像処理、画像解析技術に焦点をあてた発表が行われた。

当社日立研究所の本本は「イメージングフィルタによる元素分布の定量観察」と題し、高輝度の電界放出形電子顕微鏡とイメージングフィルタを組み合わせた装置を用いて、高い空間分解能でのEELS元素分布像を示し、今後の元素分析や定量解析の有力なツールとして大きな注目を集めた。

また、瀬藤賞を授賞した4人の研究者の受賞講演もあり、生物系、非生物系ともにそれぞれの専門分野での画像化技術を駆使した応用研究が発表された。なお、今回のシンポジウムには約200名の研究者が参加した。

(茂木忠一 記)

第6回北京分析試験 学術報告会 および展示会報告

'95年11月21日より25日まで中国の首都北京において中国最大の学術報告会兼展示会が実施された。学術報告会には世界各国より約500名の先生方が参加され、7分野に分かれて積極的な発表が行われた。

一方、展示会には日本や欧米を中心

とした海外企業が77社、中国国内企業が66社が出展し、期間中の来場者数は約30,000人で、非常に活気があった。展示会で注目されたのは、中国の分析機器の品質向上である。中国の著しい経済発展の様子はマスコミを通し知るとおりであるが、分析機器分野でもこの流れを感じることができた。

第7回は上海で開催される予定で、さらに活気に満ちた展示会が期待される。
(高橋秀明 記)

インターネット ホームページ開設 のご案内

日立製作所計測器事業部および計測器関連グループでは、皆様にリアルタイムでお役に立つ情報をお届けするためインターネットホームページを開設しましたのでご案内申し上げます。ぜひお気軽にご利用ください。

《各社ホームページのアドレス》

(株) 日立製作所計測器事業部
<http://www.hitachi.co.jp/Div/keisokuki>

“エレクトロニクス、健康、環境”
の分野をテーマとして技術・製品
情報をお届けします

日製産業 (株)
<http://www.nisseisg.co.jp>
“バイオ、エレクトロニクス、環境、新素材、臨床検査”の分野を
テーマとして最新技術情報をお届けします

日立計測器サービス (株)
<http://www.hisco.co.jp>
製品に関する部品・サービスネ
ットワーク情報をお届けします

(荻嶋信雄 記)

第6回 クロマトグラフィー 科学会議開催

'95年10月18日から20日の3日間、東京のヤクルトホールで開催された。一般、特別、招待講演を含め38件の発表があり、参加者は約250名であった。

発表は、生体関連物質の分離法、セミミクロ、LC/MS、キャピラリー電気泳(えい)動などが中心であったが、従来の技術に工夫を加えることで高感度化、高選択性、分離向上などクロマトグラフィーの新展開を思わせる内容になっていた。

日立グループからは、招待講演「LC/MSの現状と今後の展開」を中央研究所の坂入、一般講演を計測器事業部の高木と日立計測テクノリサーチセンタの石川が行った。

充填(てん)剤やハード面の開発から医学薬学分野の応用まで多岐にわたり、活発な討論が行われた。

(石川昌子 記)

第12回イオンクロマト グラフィー討論会

第12回イオンクロマトグラフィー討論会が、10月30、31日の2日間、山梨大学で開催された。

今回は山梨大学の鈴木先生の本会長として最後の討論会ということで、武藤義一先生(東大名誉教授)をはじめ、約70名の参加があり、内容も特別講演(1件)、技術賞受賞講演(1件)を含め、20件の研究発表が行われた。

最近の傾向として、いわゆるポストカラム反応法(カラムで成分分離後、発色試薬を加えて可視紫外、蛍光などで測定する手法)が増加してきている。

日立からも「ポストカラム反応法によるフッ素イオンの定量とその改良」の題目で発表を行った。上水、環境水などでフッ素イオンの分析は難しいものの一つとされており、そうした面から、本発表は注目を受けた。

(高橋秀夫 記)

報 文

LC/MSを用いた鎮静・麻酔薬の血中濃度測定

Determination of Medetomidine and other Anaesthetics in Plasma by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

金澤 秀子* 松島 美一**

(平成7年12月8日受理)

1. はじめに

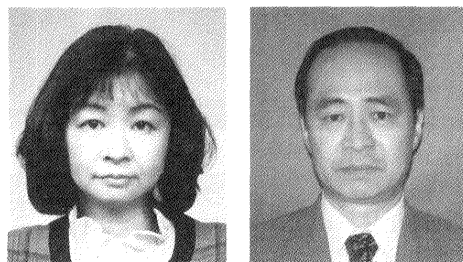
近年、特に臨床薬学の発展に伴い、薬物の有効性・安全性をより科学的に追求するための薬物動態解析法の充実が求められている。すなわち、医薬品の的確な選択と適正な使用のためには、薬物の薬効・薬理作用のみならず副作用・毒性も含めた薬物体内動態の定量的な解析に基づいた医薬品情報が必要である。薬物血中濃度モニタリング (Therapeutic drug monitoring: TDM) は、薬物療法における最適な薬物投与計画を設定するために使用されている。本稿では、われわれの最近の研究の中で鎮静・麻酔薬の血中薬物濃度測定に高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) を応用した例について紹介する。

外科において麻酔は手術方法とともに重要な課題であり、麻酔法の進歩に伴い、より困難な疾患に対しての治療が行われるようになってきた。しかし現在でも麻酔によるトラブル (事故) は、皆無ではなくより安全な方法が求められている。

最近の麻酔法では、種々の薬剤を少量ずつ併用することにより、最少の副作用で最も優れた麻酔効果を得ようとするバランス麻酔という概念が提唱されている。これは麻酔の安全性と応用性を拡大するため、単一の薬剤、麻酔法のみによって手術麻酔期を得るのではなく、鎮静剤や麻酔薬をはじめとする複数の薬剤を組み合わせることで、これらの持つ長所を最大限にいかし、その一方でそれぞれの副作用を最小限に抑えようとするものである。この結果使用する薬剤の数が増加し、従来の単一薬剤における経験のみでは、おのおのの薬物動態を予測することが難しくなり、代謝および代謝物の問題が複雑となった。手術時の麻酔状況の把握や薬剤安全性の評価のためには、体液中薬物濃度の解析は重要であるが、実際にはこのような多剤を分離・測定する方法は確立されていない。

我々は、バランス麻酔の中で組み合わせて用いられる麻酔薬、鎮静薬、鎮痛薬、抗コリン薬などの薬剤およびこれらの主要な代謝物を、すべて一つのシステムの中で同時に測定することを目的としてLC/MSを用いた分析法を確立した¹⁾。

その結果多成分系においても高感度な検出ができると同時に、分子量や構造情報が得られるため代謝研究に最適であることが明らかとなった。各薬剤とも1~100 ng/mlレベルまでの分析が可能であり、個々の代謝物をそれぞれ区



別して正確に分析測定できる。

薬物動態解析においては、血中濃度の測定などが重要となる。従来法では、一般的に用いられる紫外・可視吸光検出法で十分な吸収を示さない薬剤や、血中濃度が低いために測定が困難な薬剤があるなどの問題点が挙げられる。また構造の類似する物質、特に代謝物を複数同時に測定することは困難であるため、いくつかの測定法を組み合わせる必要があった。

我々の方法では、目標とする薬剤のすべてが一つのシステム内で同時に分析可能であり、各薬剤の主要代謝物についても、構造解析を含めて正確に分離同定および測定ができる。

2. 鎮静・麻酔薬の同時分析

今回使用した8種類の医薬品の構造式を図1に示す。メデトミジン (Medetomidine)、キシラジン (Xylazine) は、かなり強い鎮静薬で近いうちにメデトミジンが主流になると考えられている。アチパメゾール (Atipamezole) は、メデトミジン、キシラジンの拮抗薬でかなり優れた覚醒効果がある薬剤である。ブトルファノール (Butorphanol) は、麻薬指定されていないオピオイド系の鎮静

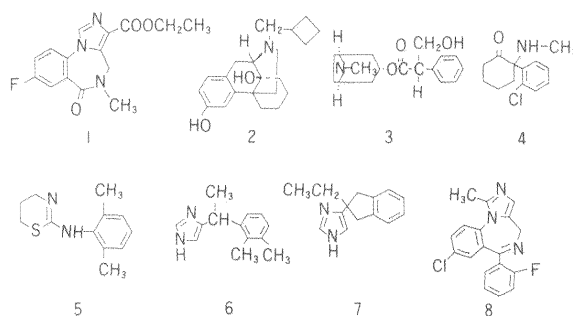


図1 使用した鎮静・麻酔薬の構造式

1.フルマゼニル 2.ブトルファノール 3.アトロピン 4.ケタミン 5.キシラジン 6.メデトミジン 7.アチパメゾール 8.ミダゾラム

* 共立薬科大学 薬品物理化学教室 講師 薬学博士

** 共立薬科大学 薬品物理化学教室 教授 薬学博士

薬で術中術後の鎮静に使用する。ミダゾラム (Midazolam) は、ヒトではかなり強い催眠作用があり、premedicationとして用いられる新しい薬である。動物ではあまり作用は強くないが、ほかの薬剤と組み合わせると相乗作用を示す。フルマゼニル (Flumazenil) はミダゾラムなどのベンゾジアゼピンの拮抗薬でかなり新しい薬である。ケタミン (Ketamine) は作用の早い解離性麻酔薬で筋弛緩作用や鎮痛作用 (内臓痛) が十分でないので、メドミジンなど他の薬剤と組み合わせて用いる。ヒトでは小児で包帯の交換時などに使用される。アトロピン (Atropin) は気道分泌、唾液分泌などを抑え徐脈防止など術前の前処置薬として用いる。内部標準物質としてはデトミジン (Detomidine) を用いた。獣医学領域ではこれらの医薬品は組み合わせて用いられているが、これらの薬物の体内動態などについては不明な部分も多い。またこのうちの一部の薬剤については、ヒトでも組み合わせて用いている。

LC/MSの分析条件

装置：日立LC/APCI-MS M-1000

カラム：Hitachi gel #3056 (150×4 mmI.D.)

移動相：メタノール-0.1M酢酸アンモニウム

流速：1 ml/min

脱溶媒温度：399℃

霧化部温度：260℃

図2は各薬剤の全イオンクロマトグラムとマススペクトルである。8種類の薬剤は、メタノール-0.1M酢酸アンモニウム (60:40) の溶離条件で15分以内で良好に分離した。おのおのの擬分子イオン $[M+H]^+$ がベースピークとして観察され、多少ブロードと思われるピークでも、分離検出が可能であった。また、L.Vourilehtoら²⁾は、誘導体化したメドミジンをGC/MSを用いて負イオンモードで検出しているが、LC/APCI-MSを用いた我々の方法では、いずれの薬剤も負イオンモードでは、良い結果が得られなかった。

SIM (Selected Ion Monitoring) 測定の結果、各薬剤は0-500ngの範囲でマスキロマトグラムのピーク面積と注入量との間に直線性が得られ、検出限界は、10-50 pg (S/N=3) であった。血漿に薬剤を添加した試料による回収率は、フルマゼニル、ブトルファノール、アトロピン、ケタミン、キシラジン、メドミジン、アティバメゾール、ミダゾラムで、それぞれ84.5, 73.1, 106.7, 84.0, 97.4, 95.4, 96% (n=3) であった。

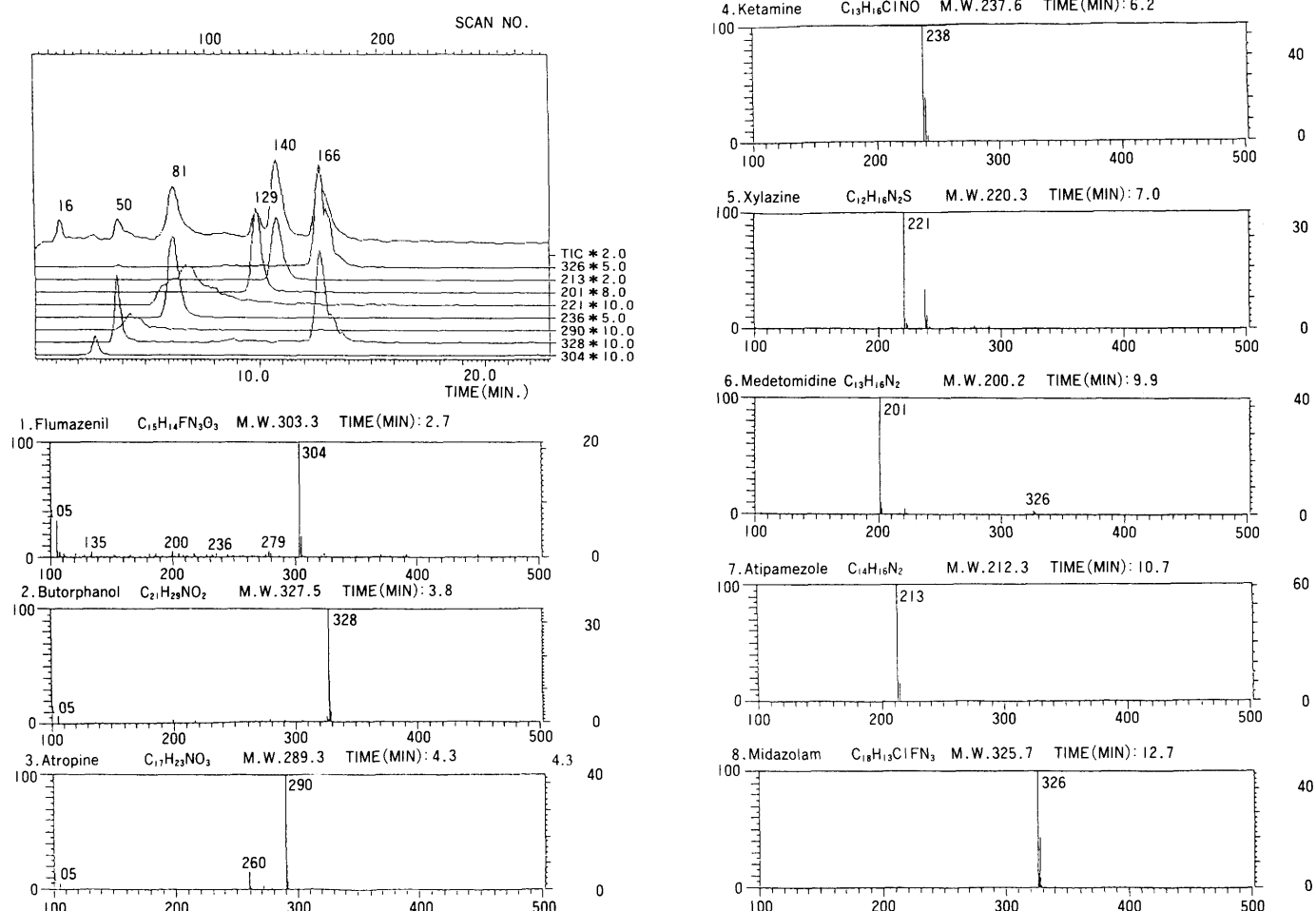


図2 8種の医薬品の全イオンクロマトグラムとマススペクトル

表1. 各薬剤の薬物動態パラメーター

Drug	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (min)	CL (mL/min·kg)	t _{1/2} (min)	V _d (L/kg)
Medetomidine ^b	23.4	9.2	22.0	57.3	1.82
Atipamezole ^c	88.9	10.0	20.4	61.9	1.82
Midazolam ^d	500.7	5.0	12.1	97.6 ^e	1.70 ^f

^a Data are represented as mean value (n=6 each).

^b Pigs were given medetomidine at a dose of 40 µg/kg.

^c Pigs were given atipamezole at a dose of 160 µg/kg.

^d Pigs were given midazolam at a dose of 0.2 mg/kg.

^e t_{1/2} in the β-phase.

^f V_d in the β-phase.

3. メデトミジンおよびその他の鎮静・麻酔薬の血中濃度測定³⁾

メデトミジンは鎮静・麻酔剤として現在獣医学領域で用いられ、ヒトでの使用も検討されている。メデトミジンは紫外可視領域に有意な吸収がなく、発蛍光性もない。このため一般的に用いられている紫外吸収や蛍光を利用する測定法の適用が困難である。GC/MS法が報告されているが、揮発性誘導体化のために複雑な操作を必要とする。

メデトミジンの鎮静作用は、その拮抗薬であるアティパメゾールにより迅速に遮断される。これらの薬剤をブタに投与し、薬剤の血中濃度変化をLC/MSで追跡し、その薬物動態について検討した。さらにこれらと組み合わせて使う可能性のあるベンゾジアゼピン系のトランキライザーであるミダゾラムの薬物動態についても検討した。

血中濃度測定は、メデトミジン、アティパメゾール、あるいはミダゾラムをブタの頸部筋肉内に投与し、一定時間ごとに採血し、血漿中の各薬剤濃度をデトミジンを内部標準物質として測定した。

生体試料の調製：各血漿試料には内部標準としてデトミジンを添加し、固相抽出法を用いて抽出、濃縮する。減圧下で溶媒留去後、溶離液に溶解し試料とした。

この試料をLC/MSにより分離、同定、定量を行った。

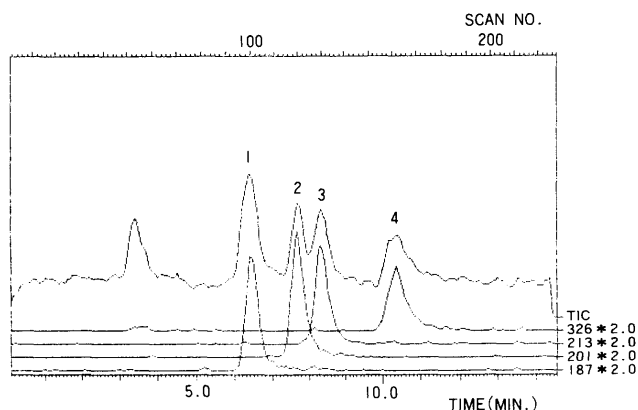


図3 ブタ血漿中のメデトミジン(2), アティパメゾール(3), ミダゾラム(4), およびデトミジン(1)のマスキングクロマトグラム

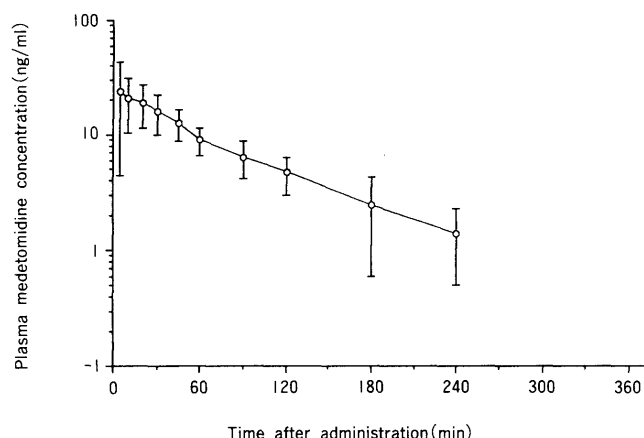


図4 メデトミジンの血中濃度推移曲線

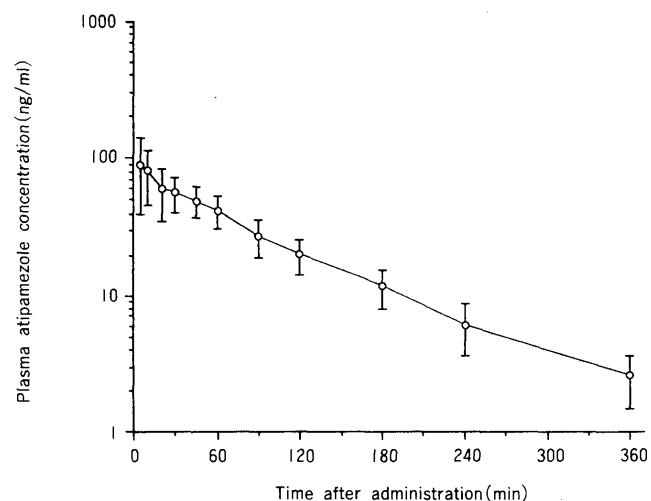


図5 アティパメゾールの血中濃度推移曲線

図3は、ブタの血漿中のメデトミジン、アティパメゾール、ミダゾラム、およびデトミジンのマスキングクロマトグラムである。メタノール-0.1M酢酸アンモニウム (65:35) の溶離条件で10分以内で良好に分離した。

m/z201, 213, 326および187のSIM測定でのクロマトグラムから、それぞれのピーク面積を計算し、デトミジンとのピーク面積比と血漿に添加した薬剤濃度から検量線を作成した。血液試料からの定量における検出限界は、1-2 ng/mlであった。

得られた血中薬物濃度の推移曲線をコンパートメントモデルに当てはめ、生体内半減期、分布容積、消失速度定数など薬物動態の評価に必要なパラメータを算出した(表1)。

図4, 5はメデトミジンとアティパメゾールのそれぞれの血中濃度推移曲線である。アティパメゾールはメデトミジンと同様に1-コンパートメントモデルを用いた。これらの薬剤は、筋注後に速やかに吸収されることが明らかとなった。投与後10分で最高濃度に達している。

図6は、ミダゾラムの血中濃度推移曲線である。ミダゾラムは、2-コンパートメントモデルを用いた。

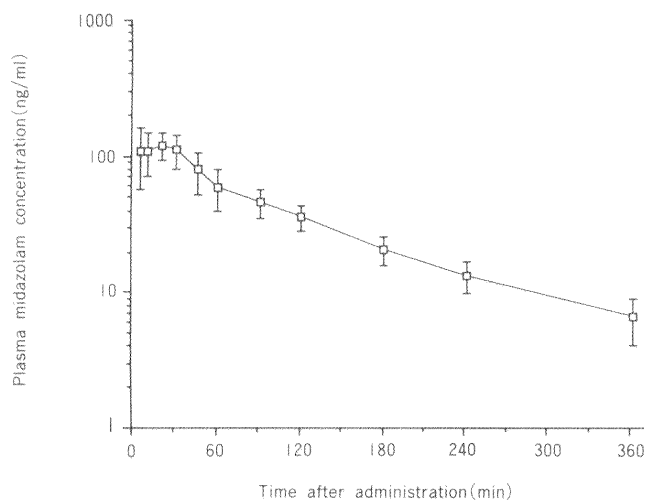


図6 ミダゾラムの血中濃度推移曲線

これらの結果からメドミジンの拮抗薬であるアディパメゾールを投与するタイミングの予測が可能である。また、ミダゾラムを組み合わせる際の投与計画の指標となる。

このように各薬剤の薬物動態を正確に把握することにより、より効果的で安全性の高い麻酔法を行うことが可能となる。

ヒト血中でのミダゾラムの定量についての最近の報告では、HPLC、GCおよびGC/MSを用いた場合で比較した結果、GCでの感度は0.02 $\mu\text{g/ml}$ 、HPLCでは0.1 $\mu\text{g/ml}$

とされており、GC/MSは、定性のみに用いられている。これに比べてLC/MSを用いた我々の方法は、感度面でも良好な結果（1–2 ng/ml ）が得られ、実際に動物実験において血中濃度測定が可能であった。

以上のようにLC/MSは薬物血中濃度モニタリングに最適な装置であり、薬物療法が大きな比率を占めている医療分野においては、必須の技術となりつつあると言える。

4. おわりに

この研究は、東大農学部西村亮平先生、元東大生産技術研究所（現東京医大）の高井信治先生との共同研究で行ったものである。

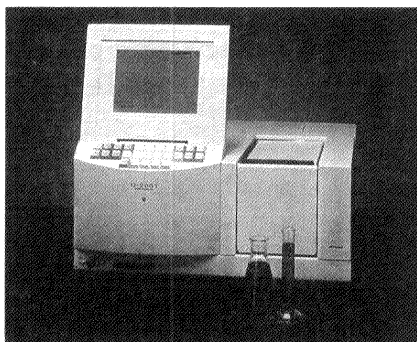
最後にLC/MSの測定およびメンテナンスで大変お世話になりました日立計測エンジニアリング（株）テクノリサーチセンタの高橋利明氏、日立計測器サービス（株）の田川晴通氏に感謝する次第である。

参考文献

- 1) H.Kanazawa, Y.Nagata, Y.Matsushima, N.Takai, H.Uchiyama, R.Nishimura and A.Takeuchi, J. Chromatogr., 631,215 (1993)
- 2) L.Vourilehto, J.S.Salonen and M.Anittila, J. Chromatogr., 497,282 (1989)
- 3) H.Kanazawa, R.Nishimura, N.Sasaki, A.Takeuchi, N.Takai, Y.Nagata and Y.Matsushima, Biomed. Chromatogr., 9,188 (1995)
- 4) J.X.de Vries, J.Rudi, I.Walter-Sack and R.Conradi, Biomed. Chromatogr., 4,28 (1990)

新製品紹介

U-2001形 ダブルビーム分光光度計



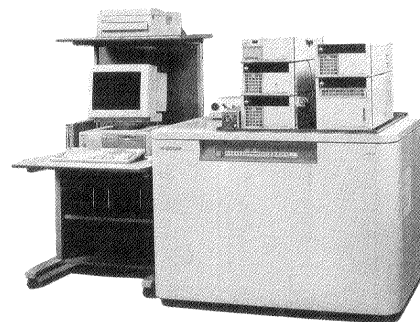
分光光度計は、最先端分野の基礎研究はもちろん品質管理、教育と幅広い分野に使用されています。U-2001形は、光度計の中では中形クラスの装置で、GLP/GMPに対応した高品質のダブルビーム分光光度計です。

ROMカードの挿入でDNA/RNA専用装置に早変わりし、汎用装置でありながら操作の簡便さを図った専用光度計の機能も併せ持っています。

スペクトル測定、時間変化測定、定量演算はもちろんのこと、DNA/RNA測定の純度チェック、濃度計算、Tm値（融解温度）計算など、豊富な機能を持ったソフト（別売）も準備されています。特に微量サンプル付属装置と併用すると最小試料5 μl でDNAの測定ができます。記録計は外付けでA4対応のプリンタが使用できます。

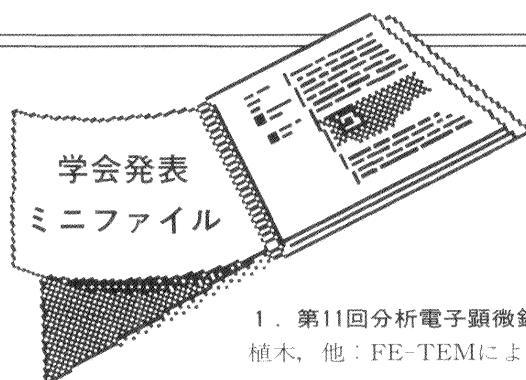
M-1200AP/ES LC/MSシステム

LC/MSは医療、バイオ、環境など幅広い分野の有機分析に利用されています。最近ではLCのディテクターとしてルーチン分析に活用されるようになり、より高感度でしかも使いやすい装置が求められています。日立は大気圧



イオン化法(API法)を用いたLC/MSを1986年に製品化して以来、改良を重ねこれらの要望にこたえてきました。

M-1200AP/ESは、APIイオン源と分析部との間に世界で初めてOFF-AXIS形イオンガイドを装着することによって、従来のLC/MSと比較し1桁のS/Nと感度の改善を図っています。LCシステムは新製品のL-7000シリーズを搭載し、オートサンプリングとの組み合わせによって自動測定も可能です。また、脱塩システムを用いるとこれまで使用できなかったリン酸バッファも使用可能となります。



1. 第11回分析電子顕微鏡討論会(1995. 9. 5(火)～6(水), 工学院大学)
植木, 他: FE-TEMによるEDXマッピングの応用

FE-TEMによれば1 nm以下の空間分解能で微小部の元素分析が可能である。図1はFIB装置で薄膜化されたメモリ断面のSTEM像, O-Kマッピング, およびAl-Kマッピング像である。STEM像では識別できない酸化膜層(矢印)がO-K線マッピング像には明瞭に現れている。

矢口, 他: FIB加工試料形状のEDX分析への影響

銅板上にジルコニアを堆積させた複合材料(P テクニカルデータ最新版ダイジェスト参照)の界面近傍の組成分析を試みた。試料をあらかじめ約50 μm の薄片にした後, 観察部位のみFIB加工により約50 nmの薄膜とすることによって満足できる分析精度を得た。

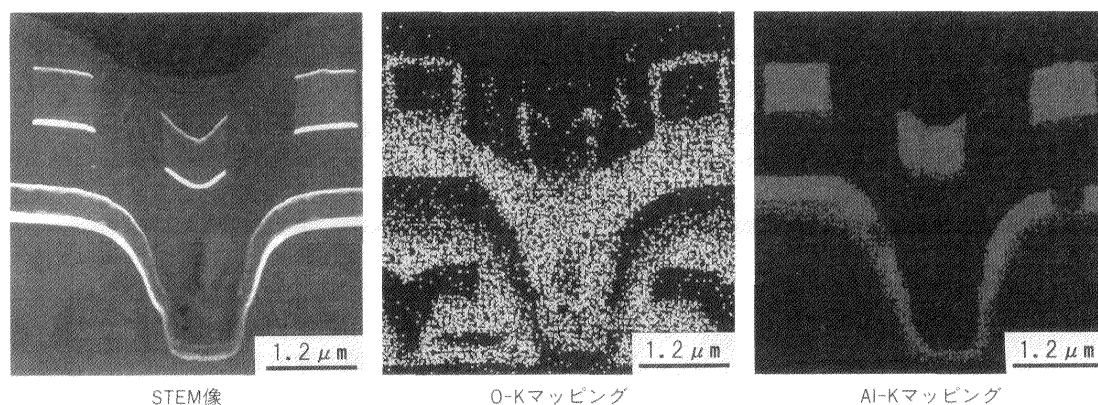


図1 FIB加工したメモリ断面の各種観察像

2. 日本分析化学会第44年会(1995. 9. 28(木)～30(土), 北海道大学)

山本, 他: Baのグラファイト炉原子吸光分析におけるマトリックス修飾剤の効果

ミラネルウォーターの品質規格が改正され, Baの基準値が定められた。Baを正確に分析するためのマトリックス修飾剤としてCaが有効であることをSEM観察, SIMS分析など広範囲の技術を駆使して実証するとともに実試料を原子吸光分析して好結果を得た(図2)。

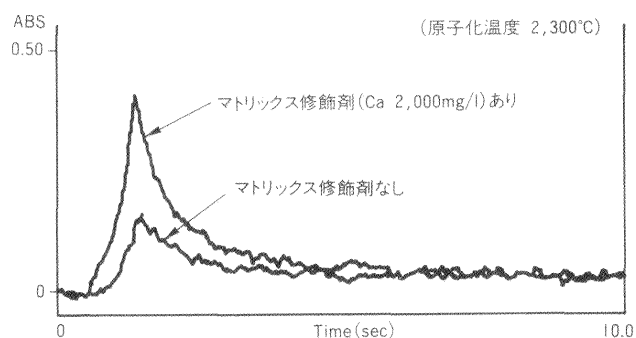


図2 Ba 50 $\mu\text{g/l}$ の原子化プロファイル

高橋, 他: セミマイクロカラムLC-APCI-MSによる
ヘキサメチルメラミン (HMM) の定量分析

最近, 省試薬と高感度分析を目的としたセミマイクロカラム法が注目されている。抗悪性腫瘍薬ヘキサメチルメラミンとその代謝物の分析に応用し, 定量下限0.5 ng/mlを得た。また, 移動層溶媒の消費量は0.1 ml/分であり, 従来法に比べて1/10程度であった (図3)。

保田, 他: 高温炉原子吸光分析におけるPd-In系の
原子化過程の電子顕微鏡による観察

鍋島, 他: エレクトロスプレーイオン化質量分析法
によるアルカリイオン分析

平林, 他: ソニックスプレーイオン化質量分析法に
よる環境関連物質の分析

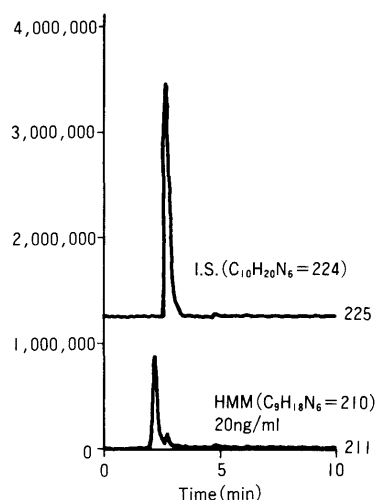


図3 ヘキサメチルメラミン

3. 第6回クロマトグラフィー科学会議(1995.10.18(水)～20(金), ヤクルトホール)

石川, 他: 生薬成分の分析

生薬中の有効成分の多くが糖抱合体であることに着目し, 糖分析法としてすでに確立しているボストラベル法の適用を試みた。人參と甘草を含む漢方薬中のスウェルチアマリン, ギンセノシドなど5成分の検出下限は10～20 ngであった。なお, 反応試薬としてリン酸フェニルヒドラジンを用い蛍光モニタで検出した (図4)。

高木, 他: セミマイクロHPLCを用いた微量分析の検討

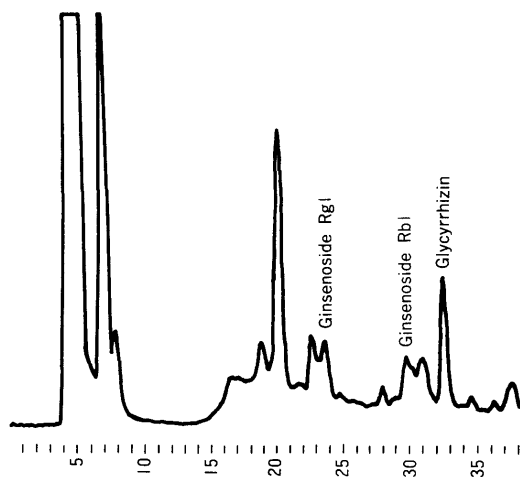


図4 人參と甘草を含む漢方薬

4. 日本分析化学会関東支部創立40周年記念会(1995.11.17(金), 東京簡易保険会館)

仲村, 他: グラファイト炉原子吸光分析におけるマトリックス修飾剤選定法に関する一考察

マトリックス修飾剤選定に金属状態図を用いることを試みた。河川水中Sbの分析に適するものとしてAgが考えられる。実試料に適用し, 定量下限値0.2 ppbを得た。

板東, 他: LC/APCI-MSによる農薬の高感度分析

農薬110種類についてLC-MS測定時のイオン化条件を確立し, 検索用ライブラリーを構築した。また, 各種農薬のフラグメンテーションを調べて検索精度を高めた。

解 説

Natural SEMによる微生物の観察

Observation of micro-organisms by Natural (Low Vacuum) SEM (Scanning Electron Microscope)

西村 雅子* 和田 正夫* 秋葉 恒雄*
山田 満彦* 久保木健三**

(平成7年12月25日受理)

走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope, 以下SEMと略す) は、試料表面の微細構造を立体的かつ高倍率・高分解能で観察する装置として多くの分野で活用されている。しかし、一般的なSEM観察法では、試料を 10^{-4} Paレベルの高真空中に置くとともに、加速された電子ビームを当てるため、生物試料など水や油を含んだ試料においては、観察前に「固定・脱水・乾燥・金属コーティング」といった一連の前処理が必要であった。近年、前処理を行わずに試料を直接試料室に入れ、自然の状態で迅速に観察したいという要求が高まり、これにこたえるため、低真空SEM (Natural SEM, 以下N-SEMと略す) が開発され、製品化されている^{1,2)}。N-SEMの真空度は1~270 Paの範囲で可変でき、一般的なSEMと比較して試料室圧力が大幅に高いため、乾燥に起因する試料の収縮を軽減できる³⁾。さらに、特に水分を多く含む軟弱な試料に対しては、試料温度を低温に保つことにより水分の蒸発や電子ビーム損傷が軽減できるクールステージをN-SEMに装着することにより、長時間観察を可能にした^{4,5,6)}。

ここでは、一例としてN-SEMによる微生物の観察例に

ついて紹介する。図1は味噌の製造に用いられる米コウジを、試料温度 -10°C 、試料室圧力50 Paで観察した例である。蒸した米の胚乳細胞(AC)やその内部の澱粉粒を包んでいる膜 (アミロプラスト: AM)、さらにコウジカビの菌糸 (AO) が澱粉を分解しながら米粒の内側に向かって生育している姿を捉えることができた。図2はソフトコンタクトレンズに付着したカビを、試料温度 -10°C 、試料室圧力50 Paで観察した例である。コンタクトレンズ表面のみならず内部に潜って増殖しているカビ(→)の状態も観察することができた。図3は食中毒原因菌Bacillus cereusを、試料温度 -10°C 、試料室圧力50~70 Paで観察した例である。(a)は寒天培地上に増殖したコロニーであるが、寒天培地の変形を最小限にとどめ、培地からのコロニーの脱落なしに観察できた。さらに(b)はコロニーの一部を拡大した像である。Bacillus cereusは容易に孢子 (楕円形) を形成する好気性菌であるが、分泌物中で栄養型 (円筒形) の状態で増殖している姿を前処理なしに迅速かつ簡単に観察できた。(c)は生米表面の胚乳細胞上でBacillus cereusが増殖している姿を捉えている。

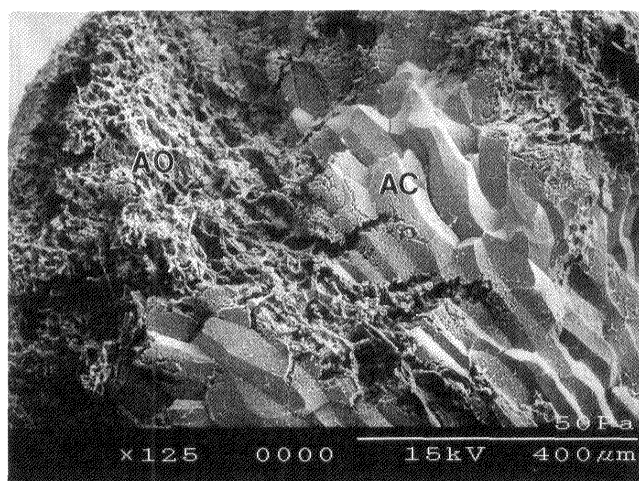
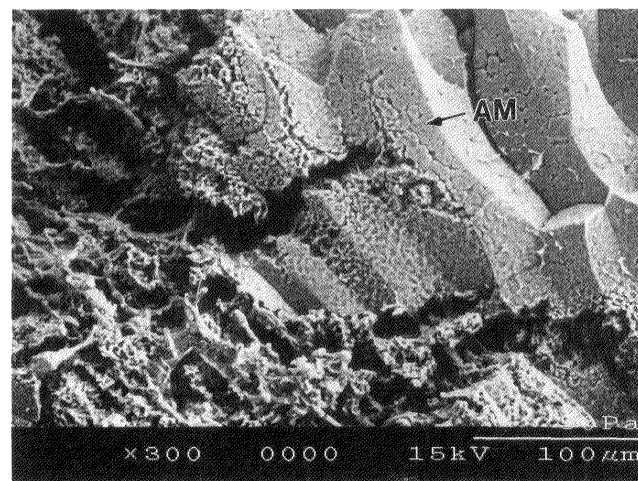


図1 米こうじの観察
AC: 胚乳細胞, AM: アミロプラスト, AO: コウジカビ



* 日立計測エンジニアリング(株)

** (株)日立サイエンスシステムズ

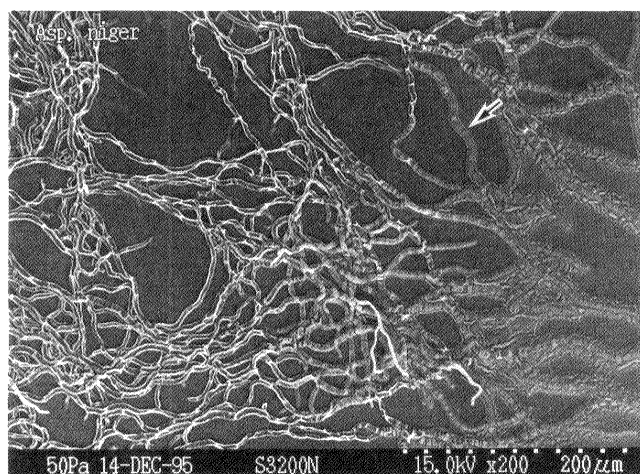


図2 ソフトコンタクトレンズに付着したカビの観察

以上N-SEMの使用により、試料の変形を最小限にとどめ、前処理なしに迅速に観察することが可能となった。これによって、微生物の増殖状況を自然の状態で観察することが可能となったため、従来の試料作製法では得られなかった新しい知見が得られつつある。今後、植物組織や微生物にとどまらず、動物組織の前処理不要の観察手段として活用が期待される。

最後に、資料の提供および技術的なご指導をいただいた金沢大学医療技術短期大学部水上稔先生、大阪大学医学部眼科浜野光先生、茨城県立医療大学小池和子先生に深く感謝の意を表する。

参考文献

- 1) 島倉昌二：医生物走査電顕.11：102（1982）
- 2) Yamada, M., Kuboki, K.:Acta Microscopica. 2：1-13（1993）
- 3) Farley, A. N.:Proc.VII the International Congress for Electron Microscopy:386-387（1990）
- 4) Yamada, M., Ueda, K., Kuboki, K. et al.:Proc. of 51st Annual Meeting of MSA:260-261（1993）
- 5) 森本剛司, 和田正夫, 山田満彦, 外：日本電子顕微鏡学会第50回学術講演会予稿集：239（1994）
- 6) Kuboki, K., Wada, M.:Hitachi Instrument News:20-25（1995）

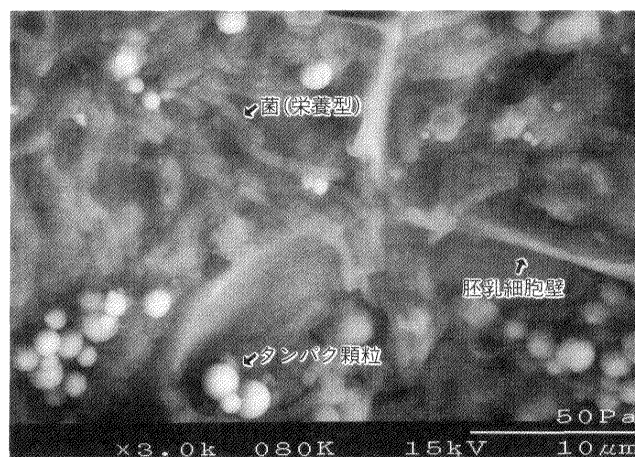
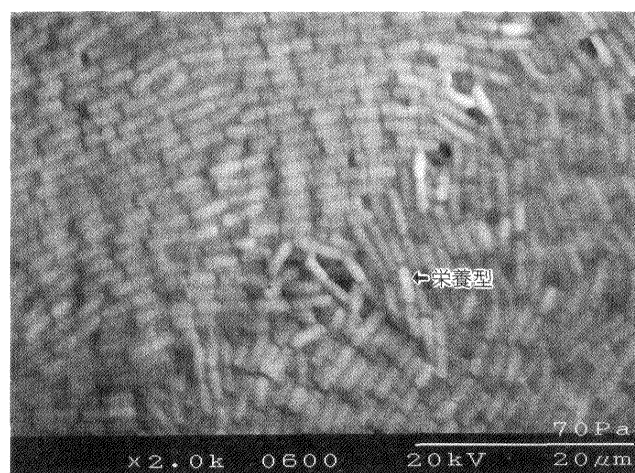
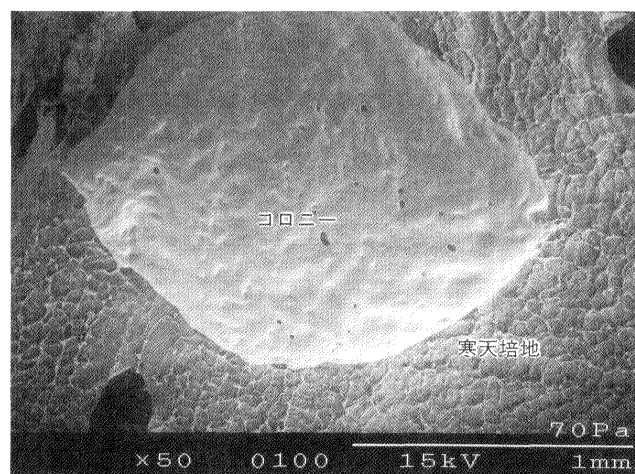


図3 食中毒原因菌Bacillus cereusの観察

汎用HPLC装置によるセミマイクロ分析

Semi-micro Analysis by using Conventional HPLC

高木 正徳* 山田 宣昭*

(平成8年1月18日受理)

1. はじめに

マイクロカラム(カラム内径1 mm以下)やセミマイクロカラム(内径1~2 mm)を用いたマイクロ、セミマイクロHPLCは、コンベンショナルHPLC(カラム内径4~4.6 mm)に比べ次のような長所を有する。

- (1) 移動相溶媒の節減。
 - (2) ピークボリュームの減少による感度増大。
 - (3) 質量分析計と接続する場合の溶媒除去が容易。
- などである。

HPLCのマイクロ化の研究は、古く70年代にScott¹⁾、Ishii²⁾ら多くの研究者により始められ、80年代には装置の改良や応用の研究が盛んに行われた。

しかし、いくつかの長所があるにもかかわらず、その後マイクロ、セミマイクロHPLCは余り普及せず今日に至っている。普及しなかった理由はいくつか考えられるが、低流量域における流量の安定性やオートサンブラによる自動化対応などの技術的問題や消耗品であるカラムの安定供給など周辺技術の条件が満たされなかったことなどが挙げられる。

最近、省エネ、地球環境保護の観点から、溶媒使用量が少なく廃液量を低減できるマイクロ、セミマイクロHPLCが注目されている。装置上の技術的問題も改善され、また、カラムも市販されるようになり普及の条件が整いつつある。

そこで、コンベンショナルHPLCを用い流路系の最適化条件を検討した結果、フローセルやインジェクタなど一部の部品を交換するだけで十分セミマイクロ分析が可能であることがわかったので、以下に報告する。

2. 検討項目

セミマイクロカラムには内径2.1 mm、長さ150 mmのODSカラムを用い、以下の項目について検討した。

- (1) 流路系の最適化とバンド幅の広がり。
- (2) グラジェント溶出法の適用。
- (3) カラム濃縮による大容量試料注入。

3. 流路系最適化の検討

実験には日立高速液体クロマトグラフL-7000シリーズ(LaChrom, 図1)を用い、セミマイクロ分析への適用を検討した。実験に用いたシステム構成を図2に示す。検出器にはフォトダイオードアレイ検出器を使用した。フォトダイオードアレイ検出器はスペクトル情報が得られ、より確実な同定機能を有する為、最近多用されている。セミマイクロ分析においても重要な検出器である。

セミマイクロ分析適用に当たり、コンベンショナルHPLCの変更した点は、

- (1) オートサンブラのインジェクタをセミマイクロ用のレオ

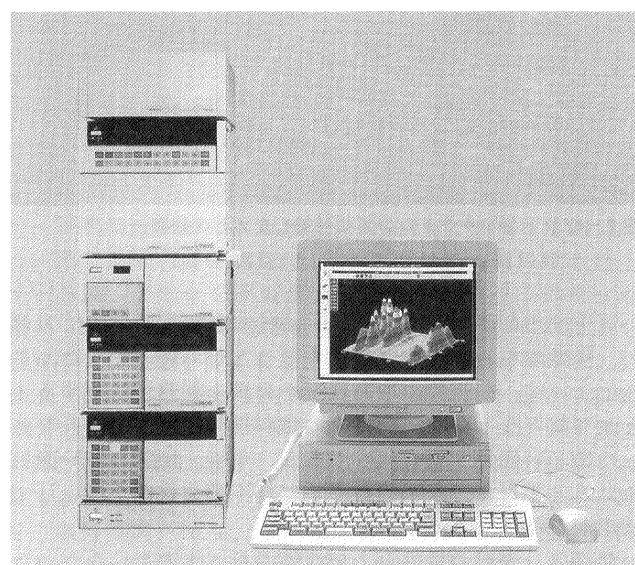


図1 L-7000形日立高速液体クロマトグラフ (LaChrom)

グイン7410に交換。

- (2) 検出器のフローセルを、内径1 mm、光路長5 mm(容量1 μ l)の低容量セルに交換。
- (3) オートサンブラのインジェクタからカラム入口までの配管(L1)とカラム出口から検出器までの配管(L2)を変更。

このうちL1, L2の配管は内径0.1 mmのステンレスパイプを用い、長さ理論段数の関係を検討した。その結果、L1, L2の長さがそれぞれ300 mm, 1,000 mmを越えると理論段数の低下が著しくなった。以下の実験ではL1を300 mm, L2を600 mmにし検討を行った。イソクラティックモードでセミマイクロとコンベンショナルでの理論段数の比較を表1に示す。

4. グラジェント溶出法の検討

グラジェントの方式には高压混合方式と低压混合方式の2方式があるが、装置構成の簡便性を考慮して低压混合方式について検討した。ミキサーには焼結金属フィルタ(死容量200 μ l)を用いた。

- (1) 混合精度

移動相にイオン交換水および0.1%アセトン水溶液を使用し、0.1%アセトン水溶液の比率を5, 10, 50, 90, 95%とステップワイズに変化させ調べた(図3)。混合精度の結果を表2に示す。設定値に対して偏差は $\pm 1\%$ 以内であり、この値はコンベンショナルHPLCの精度と同等であり良好な結果である。

* (株)日立製作所 計測器事業部 科学システム本部

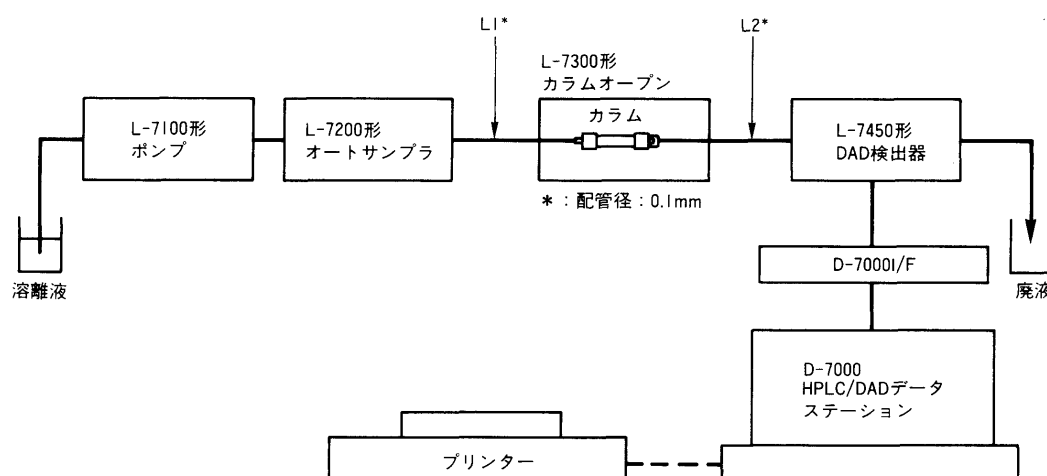


図2 セミマイクロ分析システム構成

(2) グラジエント溶出時のベースライン安定性

A液にメタノール、B液にイオン交換水を用い、流量200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、A/B=80/20で混合した場合のベースラインの安定性を図4に示す。コンベンショナルHPLCと同等の安定したベースラインを示している。

(3) クロマトグラムの再現性

A液にイオン交換水、B液にアセトニトリルを用い、A液100%からB液100%まで30分かけて直線的に組成を変化させ再現性を調べた。結果を表3に示す。保持時間、面積の再現性共良好である。

5. 大容量試料注入と試料濃縮

セミマイクロHPLCではカラムの小型化に伴い、注入出来る試料容量に制限がある。内径2 mm前後のカラムでは1 μl が適量である。希薄な試料の分析で感度が不足した場合、注入試料量を多くして感度を稼ぐ方法はよく使われるが、セミマイクロHPLCではこの方法は直接には適用できない。ここではプレカラムを用い、ここに試料を補集、濃縮する方法で大容量注入の検討を行った。実験に用いたシステムの構成を図5に示す。オートサンプラに高圧6方バルブを組み込み、これを用いてプレカラムのスイッチングを行った。濃縮用プレカラムには内径4 mm、長さ4 mmのODSカラムを用いた。試料には抗菌剤であるスルファモノメキシシ、スルファジメキシシ、スルファメラジン、オキシソリン酸各0.02 mg/lの混合試料を用いた。移動相は、A液にはアセトニトリル/0.05%リン酸水溶液 (10/90)、B

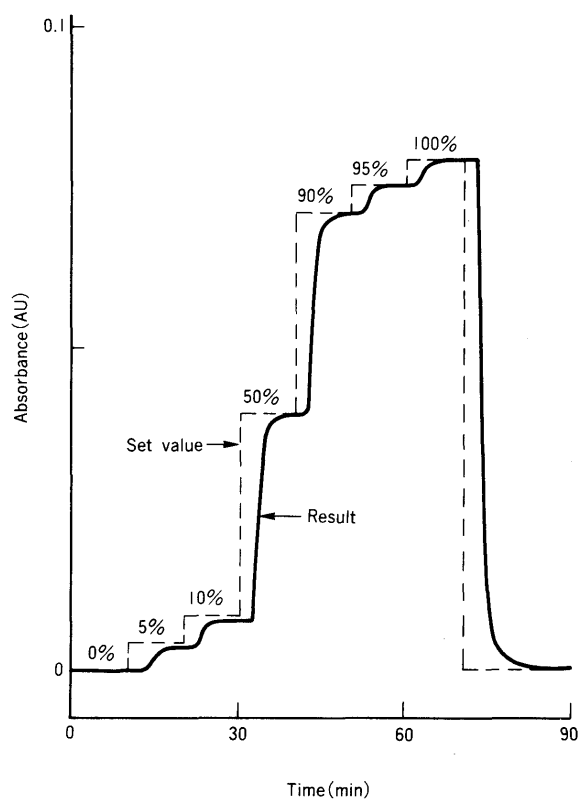


図3 グラジエント混合精度

表1 セミマイクロHPLCとコンベンショナルHPLCの理論段数の比較

システム	セミマイクロ	コンベンショナル
カラム (mm)	2.1×150	4.0×150
流量 (ml/min)	0.2	1.0
セル長 (mm)	5	10
セル容量 (μl)	1	8
理論段数		
ナフタレン (k' =0.4)	7,804	5,934
アントラセン (k' =0.8)	8,718	7,310
クリセン (k' =1.5)	9,404	7,280

表2 低圧混合グラジエントの混合精度

設定値 (%)	セミマイクロHPLC		コンベンショナルHPLC	
	測定値 (%)	偏差 (%)	測定値 (%)	偏差 (%)
5	4.4	-0.6	4.9	-0.1
10	9.2	-0.8	9.8	-0.2
50	49.8	-0.2	50.1	0.1
90	90.2	0.2	90.1	0.1
95	95.1	0.1	94.7	-0.3

表3 グラジェント溶離法による再現性

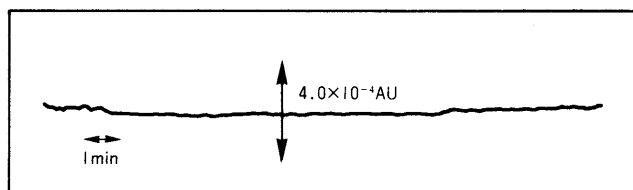
保持時間の再現性 (n=10)

	Benzyl alcohol	Benzene	Toluene
平均値 (min)	13.41	20.98	23.83
SD (min)	0.010	0.012	0.010
RSD (%)	0.076	0.057	0.046

面積の再現性 (n=10)

	Benzyl alcohol	Benzene	Toluene
平均値 ($\mu\text{V} \cdot \text{s}$)	1,186,567	1,369,719	1,479,883
SD ($\mu\text{V} \cdot \text{s}$)	5,147	21,967	15,568
RSD (%)	0.43	1.60	1.05

測定波長 250 nm



測定波長 220 nm

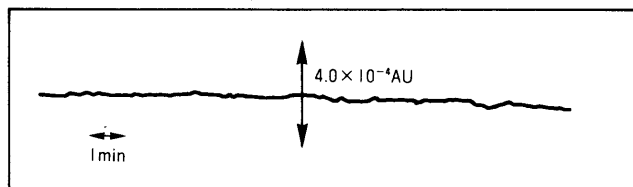


図4 グラジェント混合時のベースライン安定度 (メタノール/水=80/20)

液にはアセトニトリル/0.05%リン酸水溶液 (60/40) を用い、A液100%からB液100%まで10分間直線的にグラジェントをかけた後、B液を10分間送液した。流量は200 $\mu\text{l}/\text{min}$ である。以上の条件下で試料注入量200 μl の場合のクロマトグラムを図6に示す。プレカラムによる濃縮法を用

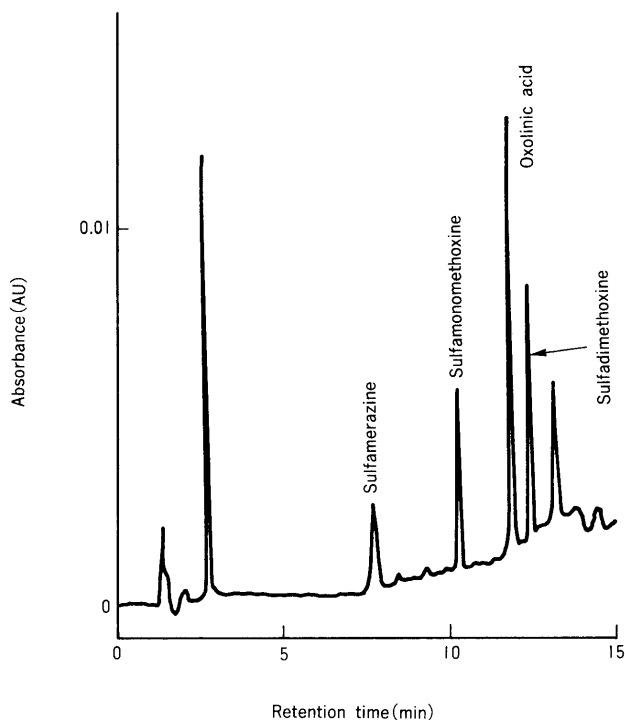
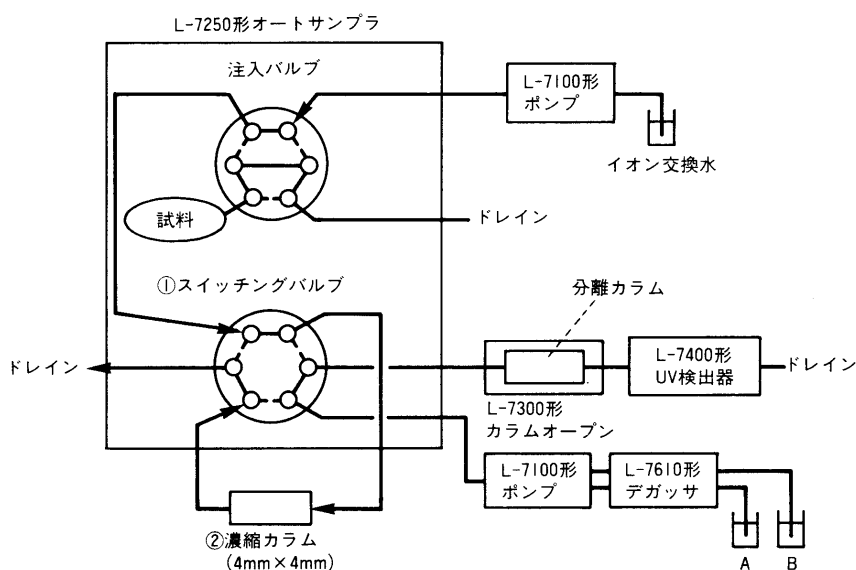
図6 大容量試料注入 (200 μl) 時のクロマトグラム

図5 大容量試料注入のシステム構成 (低圧混合グラジェント付き)

表4 大容量試料注入 (200 μ l) 時のクロマトグラムの再現性

保持時間の再現性 (n=10)

	Sulfamerazine	Sulfa- monomethoxine	oxolinic acid	Sulfa- dimethoxine
平均値 (min)	7.73	10.23	11.76	12.34
SD (min)	0.0126	0.0169	0.0158	0.0170
RSD (%)	0.163	0.165	0.135	0.138

面積の再現性 (n=10)

	Sulfamerazine	Sulfa- monomethoxine	oxolinic acid	Sulfa- dimethoxine
平均値 (μ V $\cdot$ s)	25,334	25,243	62,579	36,778
SD (μ V $\cdot$ s)	229	121	734	1,014
RSD (%)	1.18	0.48	1.17	2.76

いることにより、ピークのプロード化を起すことなく大容量注入分析が可能である。これによりセミマイクロ分析の弱点である試料注入量の問題が解決でき、高感度分析にも適用できる。濃縮から分析までのトータルシステムについての保持時間、面積値の再現性を表4に示す。

6. まとめ

コンベンショナルHPLCの部品の一部を交換することによりセミマイクロ分析が可能である。オートサンプラを用いた自動注入、グラジェント溶出法、ダイオードアレイ検出器の使用などコンベンショナルHPLCで用いられている手

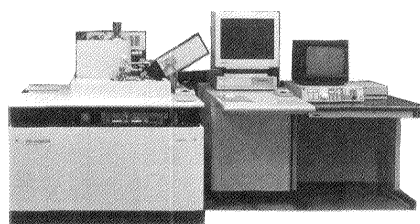
法がそのまま適用できる。試料注入量の問題もプレカラム濃縮法を用いれば大量注入ができ、希薄試料の高感度分析にも使用可能である。内径2 mm前後のセミマイクロカラムを用いる場合は、特別に留意する点もなく、コンベンショナルHPLCと同じ感覚で使用できる。

参考文献

- 1) R. P. Scott et al., J. Chromatogr., 125, 271 (1978)
- 2) D. Ishii et al., J. Chromatogr., 124, 157 (1977)

新製品紹介

FB-4080A形 集束イオンビーム加工 観察装置



半導体をはじめとする広い分野で、スパッタリング加工、SIM像観察、デポジションに使用できるFIBです。8インチウェハ全域の加工、観察ができ、レーザ顕微鏡(オプション)で、観察の難しかった平坦化デバイスに対応致します。

<主な特長>

1. 平坦化デバイスに対応
共焦点形レーザ顕微鏡(オプション)の搭載で、平坦化デバイス表面や、その内部構造観察を可能

にしました。

2. 異物/欠陥検査装置とリンケージ
異物加工システム(オプション)で、各種の異物/欠陥検査装置とデータリンクし、異物/欠陥個所を迅速に捉えることができます。
3. シャープなSIM像観察
像分解能10 nmでシャープな断面観察が可能です。
4. 高速加工
2 μ m³/s(0.2 μ m ϕ のFIBでSiを加工)の高速でスパッタリング加工を行えます。

世界最小のもの差し 「標準 マイクロスケール」

本品は測長および汎用走査電子顕微鏡での極微細寸法を計測するときに、装置のキャリブレーションに用いられ、通産省工業技術院計量研究所と日立が共同で開発したものです。

シリコン基板上にラインパターンを干渉露光し、異方性エッチングしたもので、図中に示すような約4,000本/mmのラインの平均ピッチ寸法が



図1 マイクロスケールの外観

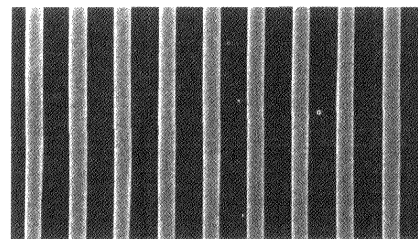


図2 シリコン基板上にラインパターンを干渉露光し異方性をエッチングしたもの。

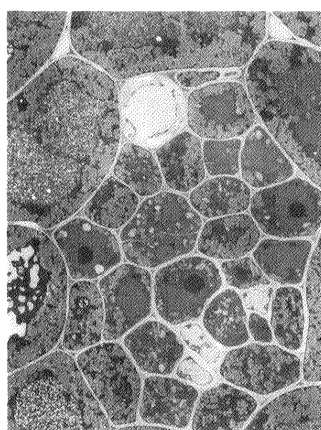
0.240 $\pm$ 0.001 μ mと高精度な微小寸法標準試料です。

また、この平均ピッチ寸法は、計量研究所の微小寸法絶対測定装置ならびに(財)日本品質保証機構の光回折式ピッチ校正装置によりトレーサビリティが確立されている“世界最小のもの差し”です。



テクニカルデータ 最新版ダイジェスト

1. H-7000透過電子顕微鏡によるつなぎ写真の作製 (TEM No.76)



つなぎ写真は広視野を高解像度で観察する上で重要な技法ですが作業の煩雑さが課題とされている。航空写真作製用ソフトウェアの電子顕微鏡写真への応用を試みた。縦横3枚ずつ計9枚から作製したつなぎ写真を示す。きわめて高精度であり、つなぎ目はわからない。

図1 つなぎ写真の打ち出し例 (かいわれ大根)

2. FIBによる金属/セラミックス界面の薄片化とその断面TEM観察 (FIB No.3)

FIBは物理的性質の異なった物質の界面を均一な厚さで加工できることで脚光を浴びている。銅板上にジルコニア (ZrO_2) を堆積させた複合材料をFIBによって薄片化し、界面近傍の微細構造のTEM観察に成功した。

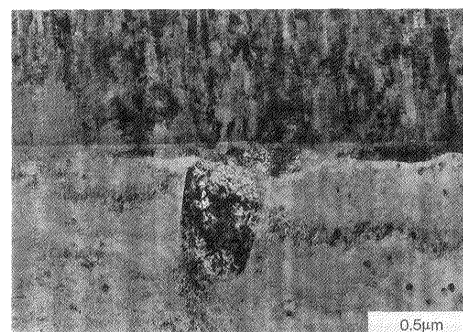


図2 セラミックスと銅基板の界面のTEM像

3. クライオ法を主体とした化粧品品のSEM観察 (SEM No.81)

水分や油分を含んだまま凍結して観察できるクライオシステムを用いて化粧品の観察を試みた。乳液やUVカットクリームなど7種類の化粧品のSEM像が紹介されている。また、前処理や観察法についての実用条件も詳しく述べられている。

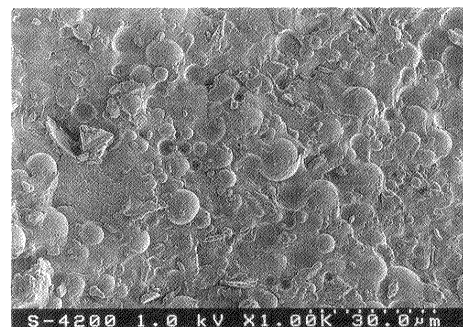


図3 乳液のクライオ観察例

S-4200 1.0 kV X1.00K 30.0μm

4. MIP-MS元素分析装置による有機溶媒の直接分析例 (MIP No.11)

MIP-MS法はプラズマガスに酸素を混入できるため、有機溶媒試料の測定が可能という特長がある。フォトレジスト、ポリイミド樹脂など6種類の有機物試料を適当な溶媒で溶解し、ng/lレベルの微量金属元素を分析した。

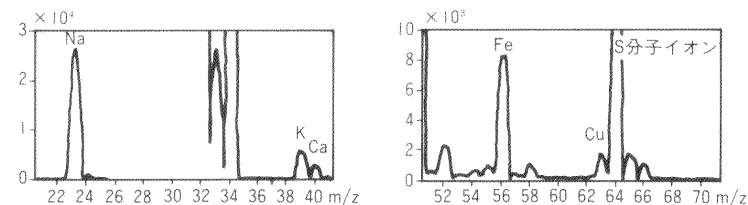


図4 フォトレジスト中微量元素の分析

5. 残留農薬、見逃しません！ 玄米中残留農薬分析 (MS No.62)

GC/3次元QMSシステムの高感度性能を生かして34成分の一斉分析を試みた。玄米中の夾雑物の除去にフロリジルカラムを用い分析精度を高めた。規制の厳しい5成分について基準値0.05 mg/lのマスキロマトグラムを示す。基準値以下を容易に分析できる。

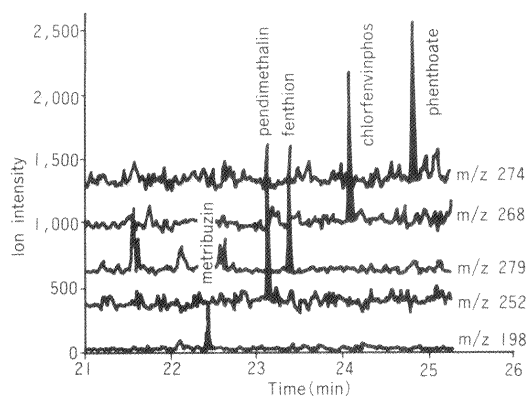


図5 基準値0.05 mg/lのマスキロマトグラム

6. 医薬品の定性確認は三次元検出器で。風邪薬に含まれる薬効成分の分析 (LC No.134)

液体クロマト法では対象成分ごとに最適波長を選ぶことによって信頼性の高い分析ができる。これには各成分のスペクトル特性を知る必要があり、事前検討に長時間を要していた。三次元検出器を用いることによって格段に短縮できる。風邪薬の分析に適用し好結果を得た。

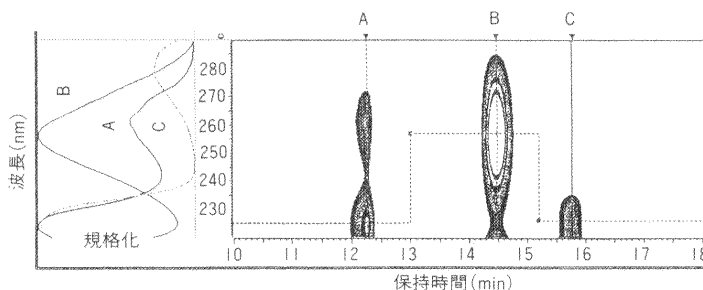
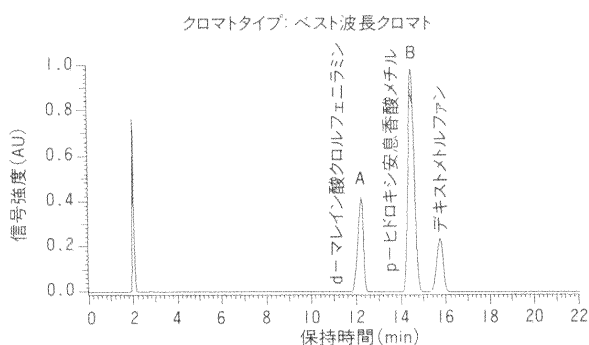


図6 風邪薬の薬効成分のクロマトグラム

7. S-8000シリーズ高分解能FEB測長装置の構成と応用例 (SEM No.82)

8. Atom Tracerの応用例 (SEM No.83)

9. 食肉中の抗菌剤の分析 DADモニタリング (LC No.133)

10. 多元素一斉分析で効率アップ P-4000形ICP発光分析装置測定例 (ICP No.38)

11. 初心者でも簡単!! P-4000形ICP用エキスパートシステムの紹介 (ICP No.39)

新製品紹介

S-3200H形SEM

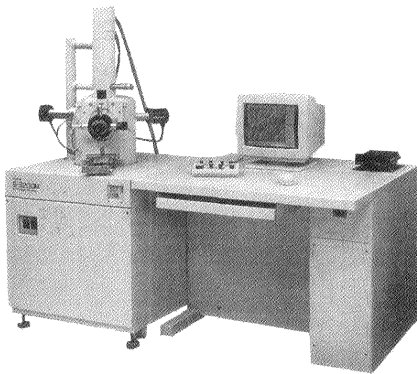


図1 S-3200Hの外観

走査電子顕微鏡（以下SEMと略す）は、生物、材料分野をはじめ、さまざまな分野で研究および品質管理などに利用されています。

特に近年は、SEMの用途が拡大するとともに誰もが簡単に取り扱える操作性と画像処理への展開が可能となるデジタル化が強く求められています。

今回、このようなニーズを意識し

て、日本語表示によるメニューによりOA感覚で操作が行え、高精細画像メモリを搭載した新時代の高機能デジタルSEM、S-3200H形を発売しました（図1）。

主な特長は次のとおりです。

- (1) 日本語表示のカラーメニュー表示とマウスを用いることにより、初めてのSEMユーザーにも容易に操作できます（図2）。
- (2) 17インチ大型モニタの採用で見やすい大画面表示を実現、操作性を一段と向上させました。
- (3) 電子光学系の最適化設計によりこのクラス最高の3.0 nmの分解能を保証。また低加速電圧時の分解能も一段

と向上させました。

- (4) 2種類の試料室の選択を可能としました。大型試料室ではEDX、WDXが同時装着できる構成のため、分析システムへの対応が可能です。
- (5) 2048×1920画素の超高精細画像メモリを標準搭載させました。これにより、アナログ画像の撮影写真と同等の再生写真が得られます。また、光磁気ディスクと組み合わせることで高画質のデジタル画像ファイリングや画像処理が可能となります。
- (6) 従来のフォーカス、明るさ等の自動化機能に加え、フィラメント電流の設定、電子ビームの軸調整を自動化させました。

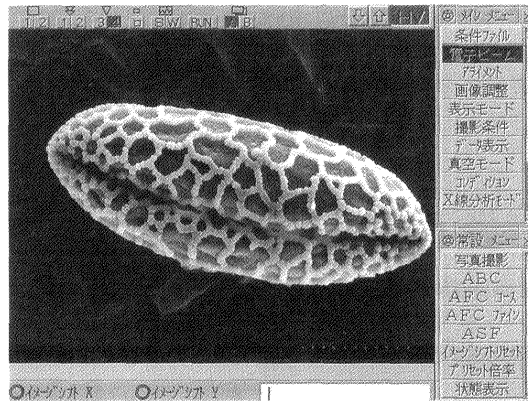


図2 操作メニューの画面

日製産業株式会社

北海道支店 電話 札幌(011)221-7241
東北支店 電話 仙台(022)264-2211
筑波支店 電話 土浦(0298)23-7391
北関東営業所 電話 大宮(048)653-2341
西関東営業所 電話 八王子(0426)43-0080

本社 電話 東京(03)3504-7211
横浜支店 電話 横浜(045)451-5151
新潟営業所 電話 新潟(025)241-3011
北陸営業所 電話 富山(0764)24-3386
中部支店 電話 名古屋(052)583-5841
豊田営業所 電話 豊田(0565)28-5191
関西支店 電話 大阪(06)366-2551

京都営業所 電話 京都(075)241-1591
四国営業所 電話 高松(0878)62-3391
中国支店 電話 広島(082)221-4514
九州支店 電話 福岡(092)721-3501
沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311

<編集後記>

- 巻頭言には、東北大学を本年3月をもって定年でご退官される広川吉之助先生に機器分析と分析機器と題して歴史的な面からご考察を頂きました。特に先生のご専門であられる発光分光分析は大変興味あるお話だと思います。
- 農業高校でのSEMの利用は、学生と一体となり身近なサンプルを観察して、感動を得ている様子がひしひしと伝わってくるように感じました。SEMは大学の研究室に留まらず、農業高校や工業高校で使用され光学顕微鏡の延長になった感を隠し得ません。
- 薬剤は両刃の剣といわれております。薬効の高い物ほど副作用が懸念されます。共立薬科大学の金澤・松島両先生はLC/MSを用いて鎮静・麻酔薬の血液中の濃度をモニタリング

することにより副作用の抑制に関するご研究をされております。

- 本ニュースに関するお問い合わせは、下記、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。
- 日立計測エンジニアリング株式会社
テクノリサーチセンタ
〒312 茨城県ひたちなか市毛882番地
電話 ひたちなか
(029)273-2111(代)
- 日製産業株式会社
科学システム販売促進部
〒105 東京都港区西新橋1-24-14
電話 東京(03)3504-7811(ダイヤルイン)
FAX (03)3504-7756

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
MAR. 1996 VOL.38 NO.2

発行 平成8年3月15日
発行人 大林 秀仁
編集人 塚田 勝男
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部
科学システム本部技術部
〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1(新丸ビル)
電話 東京(03)3214-3122(直通)
印刷所 日立印刷株式会社