

## ■ ● 目 次 ■

**卷頭言**

電子顕微鏡による形態データは機能研究に重要である  
大隅正子 ..... 1

**報 文**

集束イオンビームによるマイクロマニュファクチャリング  
田中武雄 山田 修 松本弘司 ..... 3

機能性高分子を用いた温度応答性クロマトグラフィーによるタンパク分離  
金澤秀子 ..... 7

黒鉛炉原子吸光法における高感度化への原子化機構研究からのアプローチ：  
ナノ化学反応機構とCd, Pb およびAsの高感度化  
今井昭二 ..... 12

**ラウンジ**

スズメバチの揮発性情報化学物質によるコミュニケーション  
小野正人 ..... 17

**解説**

G-6000形日立ガスクロマトグラフの紹介  
栗田信二 河原井雅子 ..... 19

HD-2300形超薄膜評価装置の紹介  
稲田博実 渡辺俊一 田中弘之  
下山 渡 会沢真二 斎藤浩一郎  
大橋利幸 橋本隆仁 砂子沢成人  
中村邦康 ..... 22

HPLCポストカラム誘導体化法を用いた応用例  
石川昌子 鈴木裕志 岩渕 等  
横倉武文 白崎俊浩 ..... 25

学会発表ミニファイル ..... 28

お知らせ ..... 31

**新製品紹介**

・ Bal-Tec社RES101形イオンミリング装置 ..... 32

**卷頭言****電子顕微鏡による形態データは機能研究に重要である**

**Electron microscopy, an important method for the functional analysis of biological macro-molecules**

大隅 正子\*



「21世紀においてはゲノムの機能研究が一層重要となり、それに伴って、機能分子と生物の形態とを結び付け、それらを可視化する科学技術の発展が急務である。」そんなことを考えながら、マドリードから2時間を掛けて、サラマンカのバス停に降り立った私は、真夏の午後の強い陽射しを浴びて、石畳の道をガラガラとスーツケースを引きずりながら、ホテルに辿り着きました。この旅行は、サラマンカ大学で開催された、International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesisに出席するためのものでした。文部科学省から認可されたオープン・リサーチ・センターの3年目の報告書を出発の前日にやっと大学に提出してきた私は、かなり疲れており、まだこの国際会議への対応よりも、日本の、そして世界の、生命科学における電子顕微鏡学的研究の現状を憂える気持ちと、この分野の若手研究者の育成が急務であるとの考えが、頭の中を一杯に占めていました。

サラマンカ大学は1218年に創立され、やがてローマ教皇が、ボローニャ、パリ、オックスフォードとともに、四大大学の一つに認定した、由緒ある大学です。この大学の創立当初は教会で講義がなされ、現在の大学は15世紀の建造物といわれています。12世紀に建てられた旧大聖堂も大変に印象的でしたが、この大学を見学した時、創立当初の講義室が今もそのまま保存されており、昔の講義風景が偲ばれました。また、創立当初の膨大な蔵書を収蔵している大学図書館を見学した時には、スペインの学問的なゆとりと偉大さを感じました。

ところで、生物学の主流の研究は従来、形態に重点をおいた細胞生物学や発生学と、生体物質とその機能を解明する生化学や分子生物学に分かれていますが、それぞれの分野の研究が独立に進められ、両者を結び付けることが困難でした。しかし、近年の分子生物学的技法の発展により、特定の形態形成に関わる分子の機能を検出し得るまでに技術が進歩しました。また、電子顕微鏡や蛍光顕微鏡などに関するハードおよびソフト面での技術の進歩により、両者の接点を探る研究が可能となり、これに応え得る高度な総合的画像形成、解析技術が進歩して、それらを生命科学・医学などの研究に利用し得るレベルにまで至りました。

しかしながら、実際の研究分野においては、その技術が生体の機能と超微構造とを結びつける研究に充分に生かされておらず、このことが生命科学・

医学研究における大きな問題点であり、それは、生物の超微構造と機能を有機的に結び付ける力量を持った研究者や技術者が極めて少ない現状に一因します。その理由として、分子生物学の隆盛に伴って、若手研究者は技術の習得に時間を必要とする形態分野に進むことを好まず、簡単に技術の取得ができ、すぐに論文を作成できる生化学分野へと流れて、超微構造生物学の研究者が激減していることが挙げられます。

この現象は、日本電子顕微鏡学会（現顕微鏡学会）の会員数の減少に具体的に示されております。その結果、権威ある国際学術雑誌においても、不正確で、レベルの低い電子顕微鏡学的データで機能分子を可視化したとする研究結果が数多く発表されています。私の所属する細胞生物学会や酵母遺伝学フォーラムでの発表を例にしても、多くは簡単な蛍光顕微鏡のデータ止まりです。ある酵素が「膜」に局在すると報告しても、それが、膜の中か外か、あるいは、2枚のリーフレットのどちらに存在するのかわからないのが現状です。先日の酵母細胞研究会例会でも、同じ経験をしました。スライドに酵母細胞の輪郭と核の位置らしい部位に、リング状に光っている像を示しながら、あるタンパク質が、細胞膜と小胞体にあると説明されていたのを見て、私は嘆かわしく思い、胸を痛めました。

この傾向は、わが国のみならず、海外の先進国においても同様です。サラマンカ大学での国際会議においても、口頭発表のなかで、まともなレベルの免疫電子顕微鏡写真を示した演者は、パストール研究所のLatge博士のみでした。酵母の胞子細胞壁形成について発表したある演者の透過電子顕微鏡の超薄切片像は、40年前のまだ初心者であった私のよりもひどい写真でした。休憩の時に、固定法や胞子の単離法が不十分であることなどをコメントしても、彼はその意味が全くわからないようでした。つい先日、3年前に招聘したユトレヒト大学の、Bruno Humber博士に会った時にこの話をし、「さすが、パストール研究所の方だけは、良い免疫電子顕微鏡像を示しました」と讃めたところ、なんとその写真は彼が提供したものとわかり、お互いに苦笑していました。そして、ヨーロッパでも、生物分野でしっかりした電子顕微鏡のデータを出せる研究者が少ないと嘆き合いました。

電子顕微鏡による細胞構造の新しい発見が続いた黄金時代はどうに過ぎ、簡単にマスターできるような手法を用いた論文が氾濫しているのが現状であるといえます。生物分野ではトモグラフィーが新しい電子顕微鏡を用いた解析法として主流となっていることを、昨年のダーバンにおける国際電子顕微鏡学会でも実感しました。しかし、新しい解析法を用いても、その基礎となる電子顕微鏡写真（固定から始まる試料作製法を含めた）が明確でなければ、仕事は意味のない「お遊び」となってしまうと、Brunoさんと意見が一致しました。

この深刻な問題を如何に解決していくべきでしょうか。ナノテクノロジーの分野では、国の大型予算によって設置された超高压電子顕微鏡を拠点として、産

学官が一体となって、新しい「物作り」に向かっております。それはとても素晴らしいことだと思いますが、それと並行して、技術習得に時間の掛かる生物系研究者が、正しいデータを出せる拠点作りが今こそ必要なのではないでしょうか。それには、われわれのような先輩が、後輩の生命科学・医学研究の方法論に関する専門的助言、超微構造研究技術の提供と支援、さらに研究成果に対する厳しい評価をすることが必要であると考えます。一方では、彼らの研究の基盤整備を助け、高い水準の技術者と研究者とがネットワークを結び、その技術を有機的に活用して、生命科学の発展に寄与せねばならないとの強い思いに、私は今駆られています。

### 著者略歴

大隅 正子（1935年3月17日生）

「所属・専門」

日本女子大学、帝京大学医真菌センター・細胞生物学

「学歴・職歴」

1957年3月 日本女子大学家政学部家政理学科二部生物農芸専攻卒業  
1957年4月 日本女子大学家政学部家政理学科二部助手  
1962年7月 アメリカ南イリノイ大学生物学研究所および微生物学部門研究助手（至1963年9月）  
1965年4月 日本女子大学家政学部家政理学科二部専任講師  
1965年12月 医学博士（東邦大学）  
1970年4月 日本女子大学家政学部家政理学科二部助教授  
1975年4月 日本女子大学家政学部家政理学科二部教授  
1980年10月 オランダフローニング大学微生物および電子顕微鏡学部門客員教授  
1992年4月 日本女子大学理学部物質生物科学科教授  
日本女子大学大学院人間生活学研究科 人間発達学専攻教授  
1996年4月 日本女子大学大学院理学研究科 物質・生物機能科学専攻教授  
2000年4月 日本女子大学総合研究所所長（至2001年3月）  
2001年4月 日本女子大学理学部部長（至2003年3月）  
学校法人日本女子大学理事（至2003年3月）・評議員  
2002年6月 財団法人日本科学映像協会評議員  
2002年7月 酵母遺伝学フォーラム名誉会員  
2003年3月 日本学術振興会国際生物学賞委員会審査委員会委員  
2003年4月 帝京大学医真菌センター教授  
2003年5月 日本女子大学名誉教授、現在に至る

「受賞歴」

1981年5月 日本電子顕微鏡学会瀬藤賞受賞  
1983年5月 第3回女性科学者に明るい未来をの会・猿橋賞受賞  
1994年10月 日本医真菌学会賞受賞  
2002年5月 紫綬褒章受章  
2002年9月 日本植物形態学会学会賞受賞

## 報文

### 集束イオンビームによるマイクロマニュファクチャリング

Micro-manufacturing by Focus Ion Beam

田中 武雄<sup>\*1</sup> 山田 修<sup>\*2</sup> 松本 弘司<sup>\*3</sup>



Source : LMIS)として、Ga<sup>+</sup>イオンが用いられている。LMISは、真空中でGa（融点：29.3℃）を加熱溶解させ、高電界を印加してイオンビームを得る。

ミリングなどのナノ加工に際しては、加速電圧を30kV一定とし、可変絞りによりビーム径を変化させた（ビーム直径10nm～1μm、ビーム電流1pA～13nA以上、電流密度15A/cm<sup>2</sup>以上）。また、W（タングステン）をマイクロCVD蒸着するデポジット機能を用いて、Wの微細構造堆積と加工部品の接着を行った。試料観察は走査イオン電子顕微鏡（SIM：Scanning Ion Microscopy）および走査電子顕微鏡（SEM：Scanning Electron Microscopy）により行った。

微少部品の3次元加工ならびに加工した微少部品の組み立てには、FB-2000Aに備わっているマイクロサンプリング機能を利用した。本来、この機能は、透過型電子顕微鏡（TEM：Transmission Electron Microscope）観察のためにFIB装置内で切り出した微小サンプルを摘出してCuキャリアに置き直して、薄片試料に仕上げるためのシステムである。この機能は、FIB内で加工した超微細部品をハンドリングするためのマニピュレータとして非常に重要な役割を果たす。

#### 3.FIBの基本的な機能

FIBには、「観る（Observation）」、「削る（Sputtering）」および「つける（Deposition）」の3つの基本的な機能があり、同一ビームで3つの機能を使い分けることができる。

「観る」機能は、走査イオン電子顕微鏡（SIM：Scanning Ion Microscope）像観察である。イオンビームを試料に照射すると、試料表面から2次電子および2次イオンが発生する。これらをサンプル近傍に取り付けられている2次電子検出器により検出することでSIM観察が可能になる。このSIM像はFIB加工を行

#### 1.はじめに

筆者らが所属する研究センターには、現在、2台の集束イオンビーム（FIB：Focused Ion Beam）装置が備えられている。目的は、新素材開発に必要な透過型電子顕微鏡観察のための薄膜試料作成を高速処理するためである。しかしながら、薄膜試料作成を続けるうち、筆者らは薄膜試料作成よりも、像分解能10nm以下（FB-2000A）や6nm以下（FB-2100）というスペックに興味が向くとともに、その加工性については、旋盤やフライス盤などを用いて機械加工を行っているような感覚を持つことができた。このことがきっかけでFIBによるマイクロマニュファクチャに挑戦することになった。

ナノ加工や超微細加工技術は、リソグラフィなどの半導体集積回路の製造技術の極限追求により発達してきたことは周知のことであり、FIB技術も、イオンビーム・リソグラフィあるいはマスクレスイオン注入の微細加工手段として開発されてきた<sup>1-4)</sup>。筆者らは、創造的なものづくりを行う上で、旋盤やフライス盤などのような機械加工に近い感覚で微細加工ができるFIBは、通常の半導体製造技術では困難な複雑形状の製品開発に応用できるのではないかと考えている。特に、日立ハイテクノロジーズ社製FIB装置に備わっているマイクロサンプリング装置は、マイクロ加工した部品のハンドリングに必要なマイクロマニピュレータとしての重要な機能を示唆するもので、今後のマイクロマニュファクチャを進める上で、非常に大きな役割を果たすと考えられる。

本報告では、「FIBを使えば何を創ることができるのか」を調べるために、主としてFB-2000Aを用いて行った基本的な加工実験とマイクロユニバーサルジョイントの作成事例を紹介する。

#### 2.集束イオンビーム（FIB）加工装置の構造と特徴

本研究に用いた日立ハイテクノロジーズ社製集束イオンビーム（FIB）加工観察装置FB-2000Aの外観を図1に、同装置のイオン光学系の構成図を図2に示す。同装置では、液体金属イオン源（Liquid Metal Ion

\*1 大阪産業大学工学部機械工学科 教授 博士（工学）

\*2 大阪産業大学教養部物理学教室 教授 工学博士

\*3 大阪産業大学工学部交通機械工学科 教授 工学博士



図1 株日立ハイテクノロジーズ製集束イオンビーム(FIB)加工観察装置FB-2000Aの外観

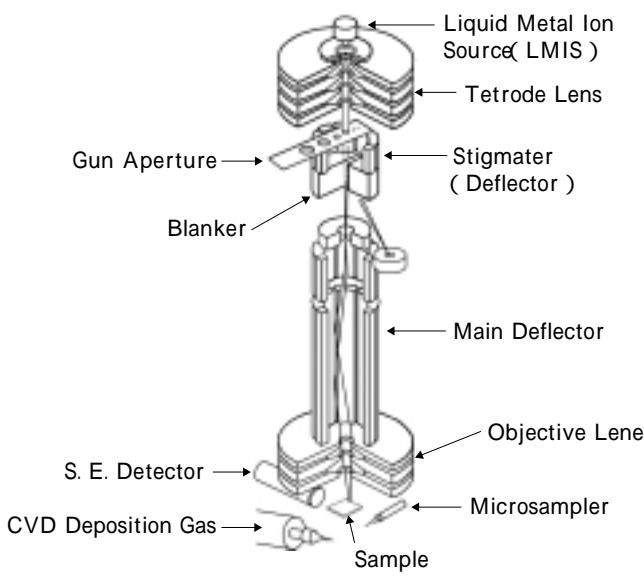


図2 FB-2000Aのイオン光学系の構成図

ながら観察ができる。その操作性は走査電子顕微鏡(SEM: Scanning Electron Microscope)とほぼ同等に容易であり、本装置では最高28万倍の倍率が得られる。

「削る」機能として、ビーム直径10nm~1μmの細く絞ったビームを試料に当てるとき原子のスパッタリングにより微細加工ができる。また、本装置には任意形状加工機能が備わっており、制御用コンピュータからCADデータ入力することにより、円形や四角形などの他、それらの組み合わせによる複雑形状の微細加工が可能になる。

「つける」機能として、マイクロCVD(化学気相堆積: Chemical Vapor Deposition)堆積加工ができる。サンプル近傍にタンゲステンデポジット用のマイクロノズルを挿入し、真空チャンバー内に反応ガスW(CO)を導入する。同時にイオンビームを照射することにより、これらの元素のCVD堆積が生じる。これにより、表面保護、接合、微小堆積などが可能になる。このマイクロCVDについては、イオンビームを走査させた領域にだけ堆積が行われるので、マスクを作製する必要がなく、任意の局所領域に選択的な微細堆積ができることが大きな特徴である。

#### 4.FIB加工例

##### 4-1 シリコンへの数10~数100μmの深溝加工

FIB加工の最大の特徴の一つは数10~数100μmの深

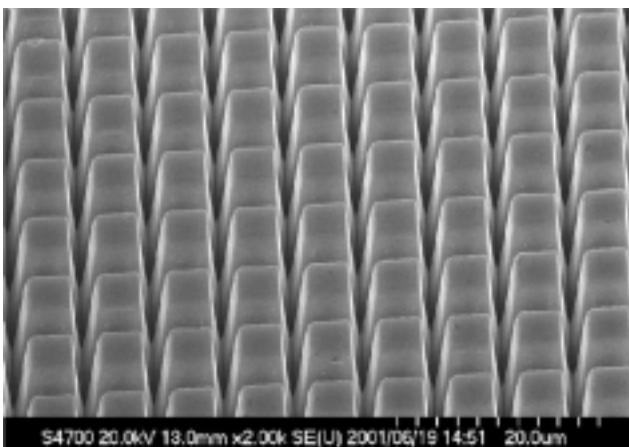


図3 深溝加工を行ったシリコン・ウエハーのSEM像(FIB加速電圧30kV, 電流2.4μA, 絞り500μm, ビーム径1μm, アシストガスなし)

溝加工が可能な点である。Ga<sup>+</sup>イオンビームによる非常に優れた切削性が現れた例を図3に示す。図3は、シリコン・ウエハー表面に加速電圧30kV、電流2.4μA、絞り500μm(ビーム径1μm)、ビーム電流10~13nAで深溝加工を行った場合のSEM像である。加工した溝幅は2μm、溝の深さは約10μmであった。また、数100μmの深溝加工も可能であった。

#### 4-2 鉄系材料の深溝加工

図4に鉄系金型材にFIB加工した例を示す。サンプルは溝幅10μm、溝深さ10μmで加工したものである。通常、半導体製造プロセスにおけるドライエッチングでは、シリコンのような半導体、あるいは、アルミニウムやチタンのような金属材料に対して、フッ素系あるいは塩素系のエッティングガスが用いられるが、被エッティング材が鉄の場合には、フッ素あるいは塩素との反応生成物の蒸気圧が低いためエッティングされにくい。筆者らは、FIBによる鉄系材料への加工性に注目して、現在、鉄系微細金型への応用についての検討を行っている。

#### 4-3 ナノ堆積とナノドリリング

FIB装置の用途の一つとして、半導体集積回路の不良箇所を修復するための微小堆積法がある。本研究においてこの微細堆積法を試みた結果、図5に示すように、約200nmの幅でタンゲステンをCVD堆積させることができた。

図6は、図5に示したタンゲステン構造体に直径25nmと直径80nmのナノホールを穿孔した例である。

#### 4-4 マイクロ部品の3次元加工とハンドリング・組み立て

微細加工された部品は、多くの場合、何らかの方法でピックアップし、移動した後、組み立てられて製品

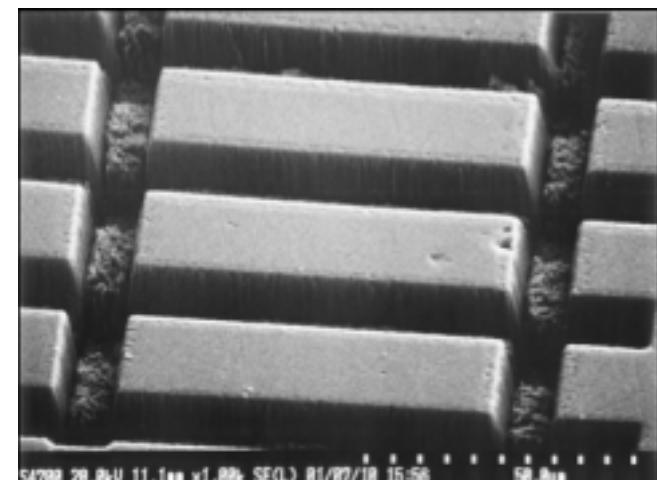


図4 深溝加工を行った金型用鉄鋼材料のSEM像(FIB加速電圧30kV, 電流2.4μA, 絞り500μm, ビーム径1μm, アシストガスなし)

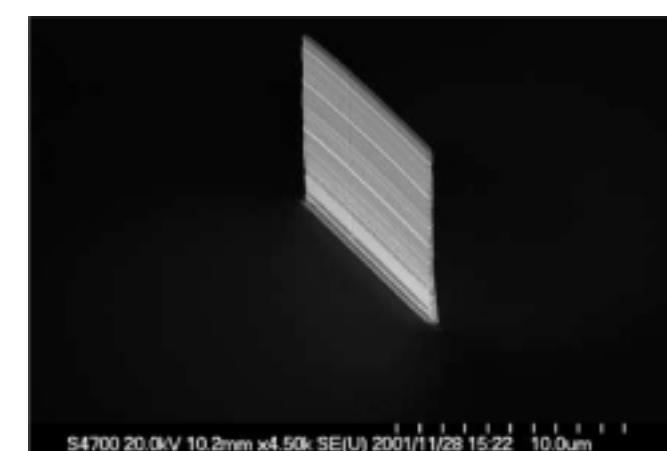


図5 タングステンデポジションにより堆積した構造体のSEM像(厚さ約200nmのW膜を幅10μm, 高さ10μmに堆積させた。)

に仕上げることを考えなければならない。そこで、本研究では、FIB装置に備わっているマイクロサンプリング機構を利用したマイクロ部品加工と、組み立てのためのマニピュレートの可能性<sup>4)</sup>について検討した。

図7に、マイクロサンプリング機構を利用して、線径25μmのアルミニウム細線から3次元構造体を切削加工し、さらに、組み立てを行う過程を示す。加工サンプルの回転は専用ホルダーを用いることにより行い、加工部品のハンドリングにはマイクロプローブを利用した。

これらの機能を用いて、線径25μmのアルミニウム細線をFIB加工して微細機械要素部品を製作した後、マイクロプローブを用いて図8に示すマイクロユニバーサルジョイントを組み立てることができた。この加工例はFIBがマイクロマニュファクチャに有効な手法であることを示唆している。

図9はさらに微細な1μmサイズのアルミニウム細線をFIB加工した微少部品の組み立て工程を示す。

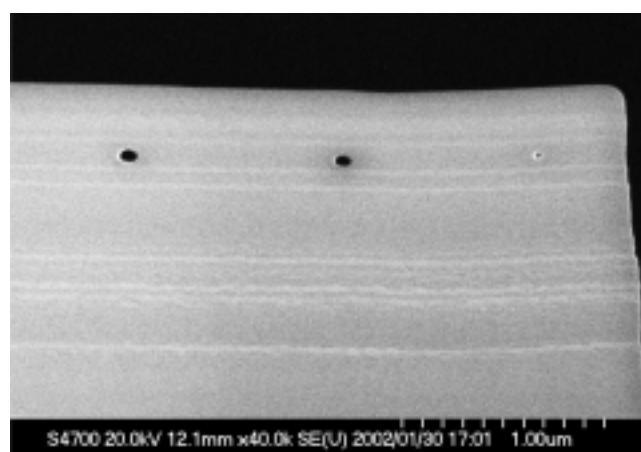


図6 図5に示したW構造体にナノ穿孔を行った場合のSEM像(直径約80nmおよび25nmのナノホール(左端))

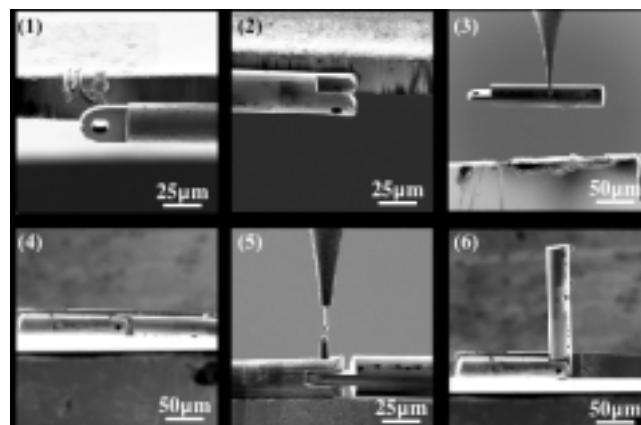


図7 線径25μmのアルミニウム細線から3次元構造体を切削加工、組み立てを行う過程。

## 5. おわりに

これまでにも、FIB装置をうまく利用して、例えば、AFMチップ<sup>5)</sup>、マイクロ工具<sup>6)</sup>、マイクロ切削工具<sup>7)</sup>、光学レンズ<sup>8)</sup>などへの応用が試みられている。特に近年には、超微細立体構造<sup>9)</sup>を形成する技術への応用が大きな注目を集めている。

筆者らの結果が示すように、FIBによるナノ加工特性とマイクロマニピュレータを利用することにより、かなり複雑な構造の微細機械要素のが可能であることがわかる。今後、さらにマイクロものづくりを進めるためには、装置の加工自由度を上げる必要がある。例えば、サンプルステージやマイクロサンプリング軸の自由度を上げることができれば、面白いものづくりができる。

筆者らの挑戦が多少でもマイクロものづくりの参考になれば幸いである。

## 【参考文献】

- R. L. Seliger and P. A. Sullivan: Reg. Tech. Conf. Photopolym., Vol. 1979, 225 (1979)

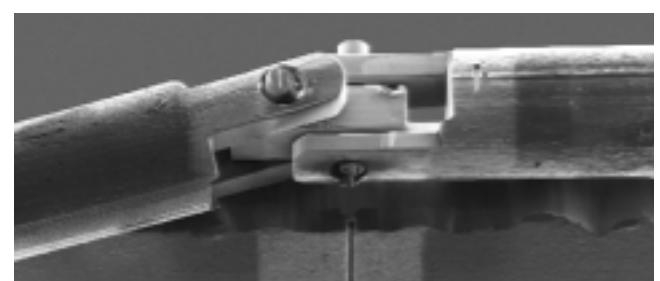


図8 FIB加工とマイクロサンプリング機能を駆使して製作したマイクロユニバーサルジョイント

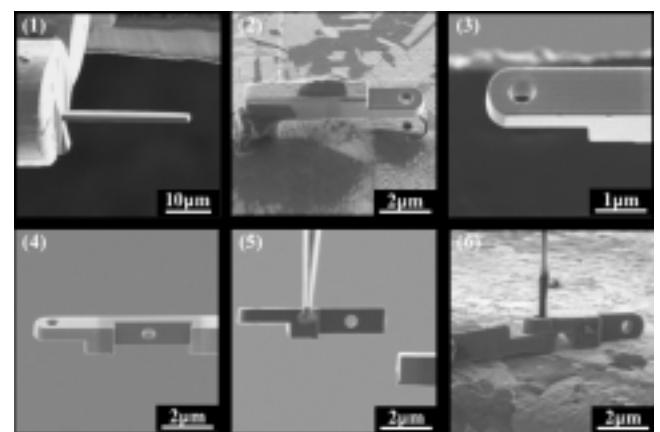


図9 幅1μmの構造体の作製と、マイクロサンプリング機能を利用して500nmサイズの穴とピンの嵌合の過程。

- R. L. Seliger and W. P. Fleming, J. Vac. Sci. Technol., Vol. 10, 1127 (1973)
- V. E. Krohn and G. R. Ringo; Appl. Phys. Lett., Vol. 27, 479 (1975)
- R. Clampit, K. L. Aitken and D. K. Jeeries, J. Vac. Sci. Technol., Vol. 12, 1208 (1975)
- 大西 毅, 石谷 亨; 真空, 第34巻, 第12号, 861 (1991)
- R. A. Lee and P. J. Wolpert, Proceeding from the 25th International Symposium for Testing and Failure Analysis, (1999) 327
- M. J. Vasile, R. Nassar and J. Xie, J. Vac. Sci. Technol. B, Vol. 16, 2449 (1998)
- D. P. Adams, M. J. Vasil, G. Benavides and A. N. Campbell, Precision Engineering, Journal of the International Societies for Precision Engineering and Nanotechnology, Vol. 25, 107 (2001)
- F. Yongqi and B. K. A. Ngai, Opt. Eng., Vol. 40, 511 (2001)
- 松井真二, 皆藤 孝, 藤田淳一, 石田真彦, 落合幸徳, 精密工学会誌, Vol. 67, No.9, 1412 (2001)

## 機能性高分子を用いた温度応答性クロマトグラフィーによるタンパク分離

Separation of Proteins by Temperature-Responsive Chromatography using Functional Polymers

金澤 秀子\*

によって自由に変えることができ、しかも、狭い温度範囲で制御できる。

この機能性高分子をシリカ担体に修飾し、高機能表面をもつHPLC充填剤を開発した(図1-d)。このような高機能表面では、温度刺激により表面の性質が高分子の相転移温度であるLCSTより低温では親水性、高温では疎水性に可逆的に変化する。

## 3. 温度応答性クロマトグラフィー

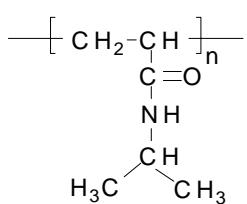
温度による分離選択性の制御はGCでは多用されているが、LCではこれまであまり重要視されてこなかった。この理由として溶質の保持に対して温度による影響よりも、溶媒による影響の方が大きいことなどがあげられる。すなわちLCでは移動相を変化させることで保持時間を制御することができるために溶媒プログラミングが主に用いられている。

一般に、カラム温度を高くすると、溶媒粘度が下がり、それに伴い移動相中の溶質の拡散速度が増加し、保持が減少することが知られている。本システムでは、従来のクロマトグラフィー分離とは逆に温度上昇により保持時間が顕著に延長する。高分子の転移温度に基づいて、低温側での保持時間の減少、高温側での延長が確認されたことなどから、分離担体表面に修飾した高分子の性質が分離に大きく反映されることを実証している。このシステムを用いることにより、例えばプロテインシーケンサーなどに広く使われているPTH-アミノ酸の分離も水のみを用いて行うことが可能であった(図2)。新しい手法として、外部からの温度刺激により充填剤表面の性質を変化させ、結果として固定相と試料との相互作用を制御する従来のHPLCの概念にはない新しい分離システムである(図3)。また、分離機構は高分子の相転移温度LCSTを境に変化している可能性が示唆された。現在までに高分子の疎水性が増すほど保持時間が大きくなること、また、疎水性の高い試料ほど温度による影響が大きいことから本システムにおける分離機構には疎水性相互作用が大きく関与

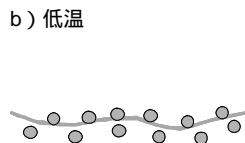


\* 共立薬科大学 創薬物理化学講座 助教授(薬学博士)

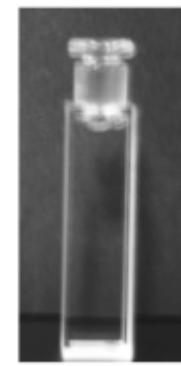
a) Poly N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) の構造



b) 低温



c) 高温



d) 温度応答性充填剤 (PNIPAAm修飾シリカゲル担体)

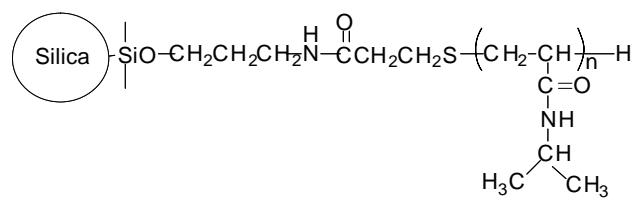


図1 PNIPAAmの構造と性質, PNIPAAm修飾充填剤

していることが明らかとなっている。本システムでは、水系の単一移動相で、ステロイド医薬品、アミノ酸、ペプチドなどの分離が可能である。例えば、タンパク質などは、PNIPAAmの相転移温度である32 ℃以上では、疎水性相互作用で固定相表面に吸着するが、温度を下げるとき固定相表面の高分子鎖が水和して脱着させることができる。また、純水のみまたは水系の移動相を用いるため環境試料や生体試料中の微量物質の分離定量など高感度分析が必要な際に問題となる有機溶媒によるバックグラウンドがないなどのメリットがある。

#### 4. 温度グラジエント

さらに温度応答性高分子の外部温度刺激による鋭敏で可逆的な性質変化を利用し、本システムでは従来のHPLCにはない新しい手法として温度グラジエント法についても検討を行った。すなわち移動相の組成を変化させるのではなく、外部温度により固定相表面の性

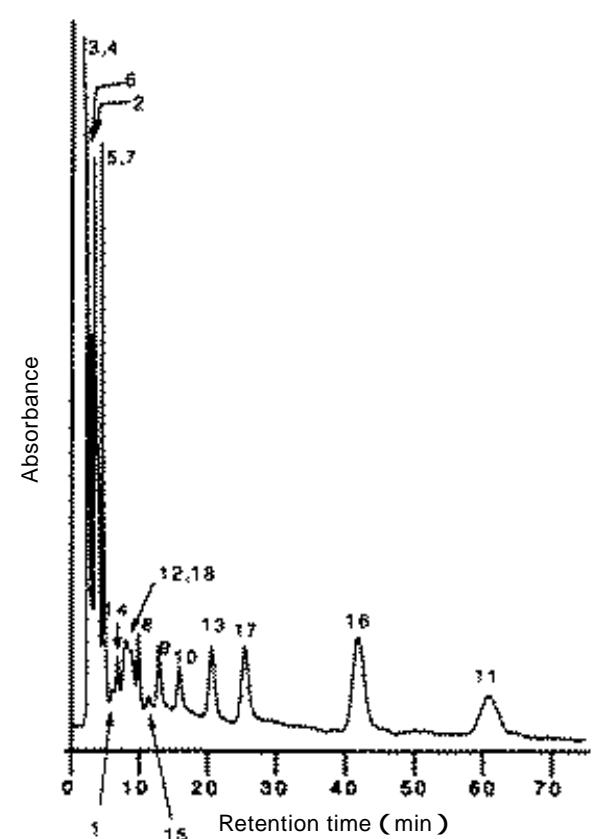


図2 水移動相によるPTH-アミノ酸の分離

ピーカーNo. 1. Ala, 2. Asp, 3. Asn, 4. Cys, 5. Glu, 6. Gln, 7. Gly, 8. His, 9. Ileu, 10. Leu, 11. Lys, 12. Met, 13. Phe, 14. Pro, 15. Thr, 16. Trp, 17. Tyr, 18. Val. HPLC条件 カラム温度: 25 ℃, 流速: 1.0mL/min, 検出: UV254nm, 移動相: 純水。

質を変化させることにより、水系単一移動相で性質の異なる複数の溶質の分離を達成することが可能であると考えた。図4に示すように、温度を切り替えることによって純水のみの移動相で従来の溶媒グラジエントと同様な結果が得られている。

このようなシステムにおいては、表面の親水・疎水転移の応答速度が重要なファクターとなる。これまでの研究ではこの高機能表面の外部からの温度刺激による応答速度について客観的なデータを収集し、応答速度を示す指標を数値化した結果、作成した機能性表面の応答速度は非常に速いことを確認している。

通常のHPLCで用いられている溶媒グラジエントのデメリットとして、初期条件への復帰時間が長いこと、溶離液の調製が必要であること（グラジエント条件の設定が必要）などがあげられるが、これに対して本システムの温度グラジエントのメリットとしては、短時間で初期条件へ復帰可能、設定温度への追従性が高い、溶離液の調製が不要（誤調製がない）、グラジエントポンプが不要（イソクラティックな条件での分離が可能）、再現性、定量性が良いなどが考えられる。

報文：機能性高分子を用いた温度応答性クロマトグラフィーによるタンパク分離

[4149]

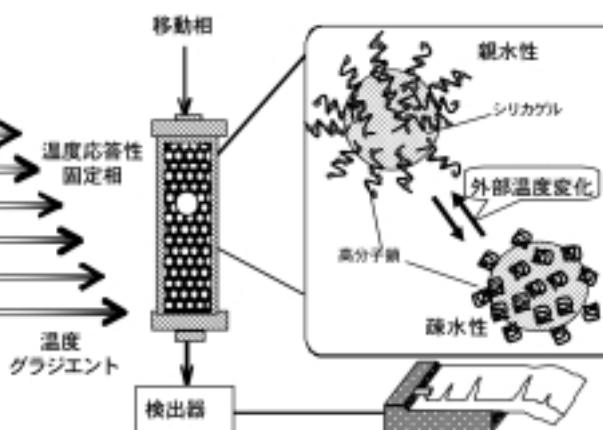


図3 温度応答性クロマトグラフィー概念図

#### 5. タンパク分離への応用

一般にタンパクの分離には、逆相系クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーなどの分離モードが用いられるが、温度応答性クロマトグラフィーは従来の逆相系クロマトグラフィーと疎水性クロマトグラフィーの両者の分離モードの特徴を併せ持つ。逆相系クロマトグラフィーはC18などの疎水性の固定相に、有機溶媒を含む水系を移動相として、対象物質の疎水性の違いを利用して、分離する手法で、低分子からペプチドの分離に広く利用されている。しかし、有機溶媒を用いるために、対象物質の変性の懼れがあり、必ずしもタンパクなどの分離に適しているとはいえない。通常タンパクの分離には、主に移動相としてアセトニトリルを含んだ低pHの緩衝液等が用いられるが、アセトニトリルはタンパクの変性を生じ、トリフルオロ酢酸を用いた標準的な緩衝液などの酸性条件下では多くの酵素の活性を損ねることが知られているため、ほとんどのタンパクの分離において避けることが望ましい。温度応答性クロマトグラフィーでは、タンパクの構造を安定化する塩を含む水系の環境で分離を行うため、生物活性を維持したままで行うことが可能である。水系の単一移動相によりペプチドやタンパクの分離が行える<sup>2,4)</sup>。疎水性クロマトグラフィーは、対象物質の表面の疎水性の違いに基づいて分離精製をする方法であり、タンパクの分離に用いられる。分離には高塩濃度によりタンパクを変性させ疎水性残基の表出により、分離担体表面と相互作用させて、移動相の塩濃度を徐々に低くしながら溶出させる方法である。

従来の逆相系クロマトグラフィーと疎水性クロマトグラフィーでは、分離のために分離担体の固定相の疎水性は一定のまま、移動相の組成を変化させて、その移動相の極性を変化させて、対象物質を溶出させるが、温度応答性クロマトグラフィーは移動相として有機溶媒を全く用いない单一の水系溶媒のまま、温度を変化

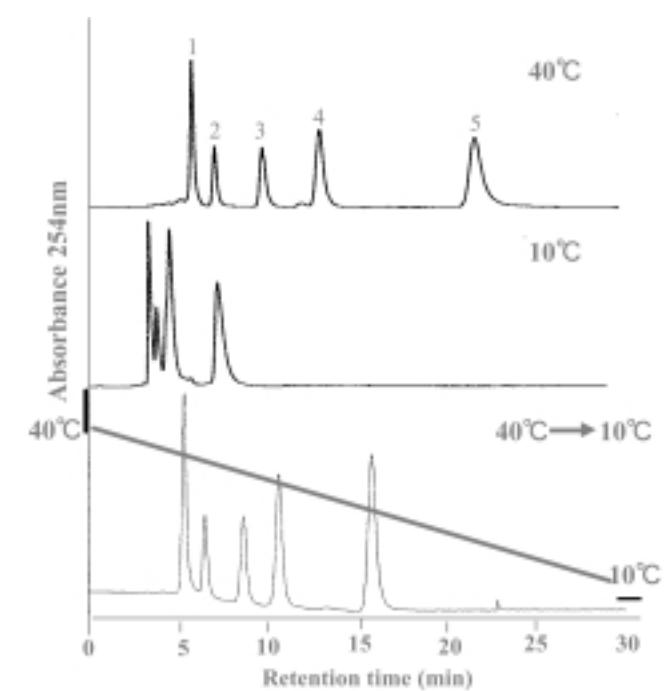


図4 温度グラジエントによる分離例

試料: 1) Hydrocortisone, 2) Prednisolone, 3) Dexamethasone, 4) Hydrocortisone acetate, 5) Testosterone, HPLC条件 カラムサイズ: 4.6mmI.D × 150mm, 流速: 1.0mL/min, 検出: UV254nm, 移動相: 純水。

させることにより固定相の表面の極性を制御することで、逆相系クロマトグラフィーと同様の分離を行うことが可能である。

さらに、疎水性クロマトグラフィーと同様に一定の高塩濃度溶媒を用いて、温度の変化により、担体表面の極性を変化させる分離も可能である。従来の疎水性クロマトグラフィーでは分離条件を確立するためにはC4, C8などの疎水度の違う分離担体を複数用意する必要があったが、本システムでは一本のカラムで、温度により、分離担体の疎水度を自由に変更可能であるため、最適な分離条件を簡単に確立することができる。

図5に温度によるキモトリプシンノーゲンの溶出制御の例を示した。キモトリプシンノーゲンは50 ℃では全く溶出されないが、温度を下げることにより一定の時間に溶出させることができた。図6にペプチドやタンパクの保持に及ぼす温度の影響を示した。アミノ酸残基30前後の3つのペプチド、インシュリンA鎖、B鎖とエンドルフィンフラグメント1-27の分離をNaCl水溶液の単一移動相を用いて行った結果、LCST以下の5 ℃では分離しないが、40 ℃では良好に分離され、外部温度変化による分離制御が可能であった。溶出順序は、ペプチドの疎水性を反映していた。本システムは、リボヌクレアーゼやキモトリプシンノーゲンなどの低分子量のタンパクからオボアルブミン、カタラーゼ、アルブミンのような高分子量のタンパクの分離にも応用可能である。タンパクの保持時間は、固定相

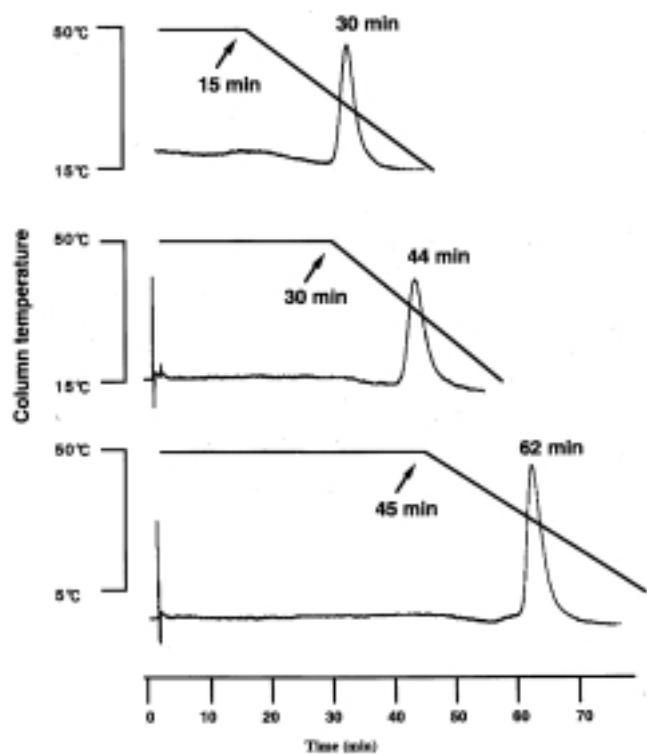


図5 キモトリプシノーゲンの温度による溶出制御

HPLC条件 流速：1.0mL/min, 検出：UV280nm, 移動相：NaCl水溶液。

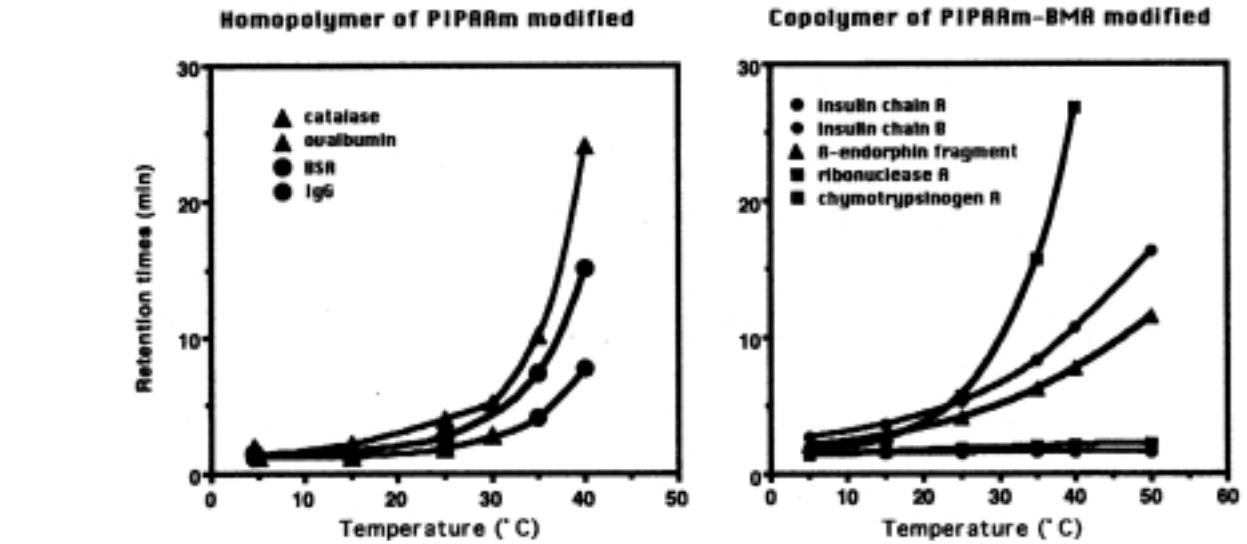


図6 ベプチドやタンパクの保持に及ぼす温度の影響

HPLC条件 流速：1.0mL/min, 検出：UV215及び280nm, 移動相：NaCl水溶液。

に用いた高分子の疎水性が高いほど増加するため、疎水性の高い高分子量のタンパクの場合には、PNIPAAmのホモポリマーを修飾した充填剤を用いる。逆にタンパクの安定性のために低温で分離したい場合は、低い温度でも保持の大きい疎水性度の高い共重合体を修飾した固定相を用いる。ペプチドやタンパク質試料のクロマトグラフィーでは、疎水性物質が固定相に強く吸着してしまうため、カラムの性能が悪くなってしまう場合がある。このような場合、通常の逆相モードでは、高濃度の有機溶媒で洗浄しなくてはならないが、本システムでは、5の水で洗浄することにより固定相表面が親水性となるため吸着していた物質を洗浄することができる。これは、本システムの特徴であり、通常の逆相モードと大きく異なる点である。

このように本システムでは、臨床現場で用いられている医薬品類からインシュリン、エンドルフィン、キモトリプシノーゲン、リボヌクレアーゼ、カタラーゼ、BSA、IgGなどのタンパクまで分離が可能である。また環境ホルモン（ビスフェノールA<sup>9)</sup>や農薬なども水のみで分離することができる。現在、さらに温度とともにpHにも応答する充填剤を開発し、アミノ酸や核酸の分離に成功している<sup>11)</sup>。

## 6. ナノデバイスへの応用

本研究による高機能表面では、タンパクの吸脱着のコントロールが可能であり、また外部刺激により試料との相互作用を制御するため水系での分離が達成され生体関連成分の活性を損なう有機溶媒を必要としないことから、生体材料およびタンパク機能解析のための分離法として極めて有用なシステムが実現する。

高機能分離素材を開発しナノデバイスに応用することにより、従来困難とされていたミクロ化システムにおける流量制御および試料注入制御が可能となる。ゲノム解析終了後、解明された遺伝子から発現する膨大なタンパクの機能解析と利用が重要な課題となるが、従来の分離システムでは、液相微小空間での流路の洗浄方法に限界があるためタンパクの吸着が大きな問題となる場合が多い。この問題点を解決した新しい分離システムの開発が強く望まれている。現在、我々はキャピラリーカラムやチップ上で、タンパク質混合物および複合体の消化物を分離同定するプロテオミクス解析等への応用について検討している。

## 7. 結語

以上、本研究では、これまでのHPLC分離で行われていた移動相組成変化による分離制御とは大きく異なった、温度により分離選択性を制御する新しいシステムを構築した。本システムは、外部温度により固定相表面の性質を変化させ、溶質との相互作用をコントロールする全く新しい概念のクロマトグラフィーであり、医学、薬学、農学など様々な分野への応用が期待される。

## 謝辞

本研究は、東京女子医科大学先端生命医科学研究所岡野光夫教授との共同研究であり、本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金の援助を得て行った。

## 発表論文

1. H.Kanazawa, K.Yamamoto, Y.Matsushima, N.Takai, A.Kikuchi, Y.Sakurai and T.Okano, Anal.Chem., 68, 100-105 (1996)
2. H.Kanazawa, K.Yamamoto, Y. Kashiwase, Y.Matsushima, A.Kikuchi, Y.Sakurai and T.Okano, Anal.Chem., 69, 823-830 (1997)
3. 金澤秀子、松島美一、薬学雑誌, 117, 10-11, 817-824 (1997)
4. H. Kanazawa, T. Sunamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, T. Okano, Anal.Chem., 72, 5961-5966 (2000)
5. H.Kanazawa, K.Yamamoto, Y.Kashiwase, Y.Matsushima, N.Takai, A.Kikuchi, Y.Sakurai and

- T.Okano, J. Pharm. Biomed. Anal., 15, 1545-1550 (1997)
6. H. Kanazawa, Y. Matsushima, T. Okano, Trends in Analytical Chemistry, 17, 7, 435-440 (1998)
7. K.Yamamoto, H.Kanazawa, Y.Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, T. Okano, Chromatography, 21, 209-215 (2000)
8. H. Kanazawa, Y. Matsushima, T. Okano, "Advances in Chromatography vol.41" ed. by P.R.Brown and E.Gruhka, Marcel Dekker, New York, pp311-336
9. K.Yamamoto, H.Kanazawa, Y.Matsushima, K. Oikawa, A. Kikuchi, T. Okano, Environmental Sciences, 7, 1, 047-056 (2000)
10. H. Kanazawa, E. Ayano, T. Sunamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, T. Okano, Anal.Sci. 18 (1) 45-48 (2002)
11. C. Sakamoto, Y. Okada, H. Kanazawa, E. Ayano, T. Nishimura, M. Ando, A. Kikuchi, T. Okano, J. Chromatography A, in press
12. H. Kanazawa, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 46-48 (2004)

## 黒鉛炉原子吸光法における高感度化への原子化機構研究からのアプローチ：ナノ化学反応機構とCd, Pb およびAsの高感度化

Approach to Development of Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry from Atomization Mechanism Study: Nanoscopic Chemical Reaction Mechanism and Enhancement in Limit of Detection for Cadmium, Lead and Arsenic

今井 昭二\*

### 1.はじめに

黒鉛炉原子吸光法は、一滴程度の試料溶液をたばこのフィルター程小さい黒鉛管状炉に導入後、乾燥・灰化( $<1000$ )そして原子化(最大2800)することによってナノグラム(ng)レベルからピコグラム(pg)の超微量元素を原子固有の共鳴線吸収により高選択性を持った吸光度法である。システム設計およびエレクトニクスなど光・工学的に飛躍的な進歩を遂げ、以前に増して高感度化と高精度化が進んだ。試料から原子蒸気を発生させる黒鉛炉においても構造、材質および加熱方式など様々な特徴的な発展を遂げている<sup>1)</sup>。しかしながら、様々な物理的および化学的な干渉や前処理が問題である。

鉛などのようにマトリックスとの反応で気化しやすい化学種が生成して原子化の前段階で気化消失したり、耐熱性元素などのように黒鉛と反応して耐熱炭化物を生成すること、または、還元による気化および共存塩による高蒸気圧種の生成など化学反応が黒鉛炉内で感度・精度および信頼性に影響を与える。このような影響を回避する目的でマトリックス修飾剤<sup>2)</sup>が研究されて来たが、試料の内容によって修飾剤の選択方法の改良や新たな修飾剤の開発が続いている。試料の種類および求める情報は広がり、それに対応した分析方法も多数必要となる。ケーススタディの性格を持つこの分野において原子化機構研究からのアプローチ<sup>3-5)</sup>が分析法の開発への理論的な指針を与えると考えられる。

標記分析法において、黒鉛炉の温度条件、前処理方法、マトリックス修飾剤などの検討が吸光度データとシグナルプロファイルを中心にして行われ、最終的には標準試料の分析で信頼性が確認されるプロセスを踏む場合が多い。本稿では、視点をかえて黒鉛炉内部での化学反応を微視的な考察から物理化学的および表面科学的にアプローチするメリットと応用性および結果として得られた水試料中の鉛、カドミウムおよびヒ素のpptレベルの直接分析法について述べる。

### 2.有機物マトリックスの特性と挙動

初期にはグルコースおよびスクロースなどが還元作用を有することから添加剤として利用されてきた。また、最近はアスコルビン酸も鉛をはじめ様々な元素に対して有効な修飾剤として感度向上や干渉抑制効果を示すことが報告されている。その作用機構を理解する上で、加温溶液状態での分子自身の還元性、600K程度における熱分解によって生成する還元性ガスおよび1000K付近での最終的な表面酸化物の脱離と炭化水素基の熱分解により発生した還元性ガスの影響が考えられてきた。しかし、黒鉛炉内がアルゴンガス雰囲気という条件から活性炭が生成することもあり、1100K以上での活性炭の化学的特徴と構造変化の影響も無視できない場合がある。

実際にグルコース溶液をパイロリティックグラファイト(PG)炉において640Kで灰化を行った場合、7%の残差があった。1230Kでは、2%に減少した<sup>6)</sup>。スクロースおよびアスコルビン酸では、それぞれ2および<2%，32および22%であり、化合物によって残差の生成状況が大きく異なる。そのことが作用機構にも影響すると考えられる。

大気中において1170Kでのバルク熱分解において生成した活性炭の細孔分布をBET法で求めた結果を示した。3nm以下の細孔が発達している。また、表面積はアスコルビン酸、グルコースおよびスクロースにおいてそれぞれ698, 683および624m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>であった。InおよびGaにおいて、アスコルビン酸では7.2および9.9倍、スクロースでは4.3および3.4倍の感度向上が観測されるとも活性炭の影響である。

また、PG炉においてアスコルビン酸溶液を灰化後、試料導入口からAr<sup>+</sup>レーザーをマクロモード(光束径100μm/試料面において2mW)で照査し測定されたラマン散乱スペクトルを図1にまとめた<sup>7)</sup>。生成した炭素残差のラマンスペクトルが、カーボンブラックのような非晶質炭素から灰化温度の上昇によってPGに近づ

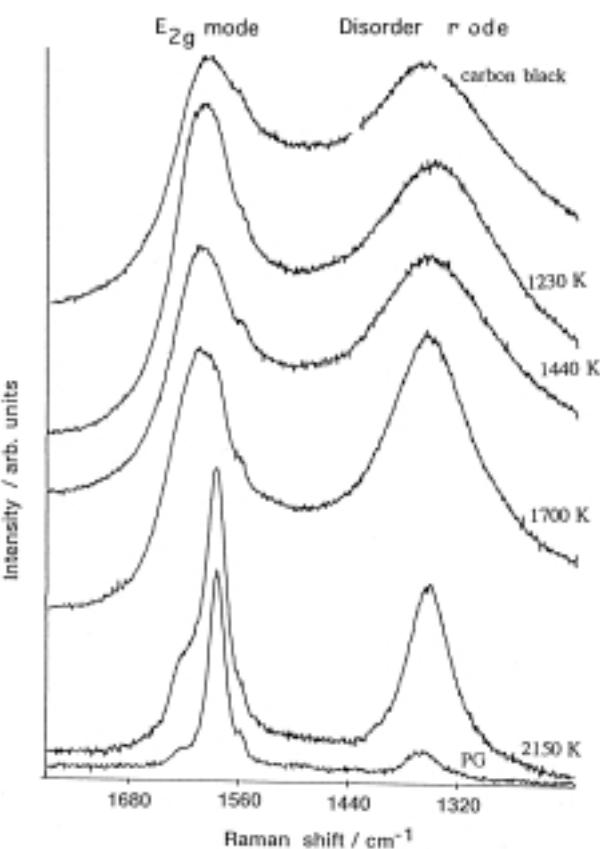


図1 アスコルビン酸溶液を種々の温度において灰化したときのPG炉内壁ラマンスペクトル(Ar<sup>+</sup>レーザー, 100μm)

くことがわかる。また、顕微モード(光束径10μm/2mW)において、2150Kの灰化後も炉内壁の窪みに10μm程度の非晶質炭素の存在が直接証明される。原子化サイクルを重ねると残差は増加して低配向性PG層が形成されていることが確認された。1473Kで1.5nm以下の細孔が、1773Kで2nm以下のスリット状のウルトラミクロ孔が大きく減少し、1873Kにおいても3-4nmの細孔は変化しない。

### 3.金の原子化の活性化パラメーターと炭素マトリックスの構造

Auは、炭素とは特別な相互作用を持たない元素である。PG炉表面においてAuは、灰化段階で形成したクラスター(微小液滴)から原子化する特徴を有する。しかし、検出限界付近および活性点密度が増加したPG表面では、単原子分散することも特筆する性質である。この中間体の形状(クラスターサイズ)とそこから発生する原子蒸気発生の活性化パラメーターにはKelvin式から示唆されるように相関関係が成立する。また、単原子状のAuと炭素表面の吸着相互作用はファンデル・ワールス力に依存しているので、炭素材の被相互作用表面積との相関関係が存在すると考えられる。

本報において日立製Z-8000型偏光ゼーマン補正黒鉛炉原子吸光装置に通信機能と黒鉛炉の温度モニターを

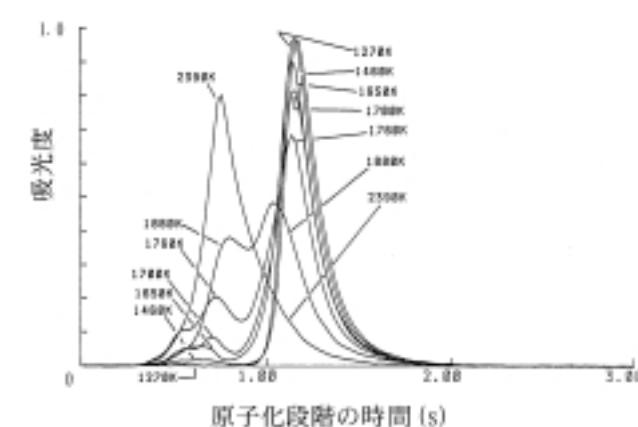


図2 5%アスコルビン酸溶液を灰化後Au標準溶液を導入した時の原子化段階における吸光度プロファイル。  
Au, 50μgL<sup>-1</sup>, 20μL。アスコルビン酸の予備灰化温度, 1270 2300K。

付属させたラボメイドPCシステムを構築することによって、原子化時の吸光度 時間プロファイルと温度 時間プロファイルをFDに保存でき活用範囲が広がった。熱電対と放射温度計で温度校正を行った。

図2は、アスコルビン酸溶液の灰化・放冷後に導入したAu標準溶液の原子化シグナルを測定したものである。測定後、FD中のアスコルビン酸の灰化温度を変化させたときのシグナルを重ね書きした。クラスターから原子化したAuの共鳴線吸収が低温側(第1ピーク)に観測される。高温側のシグナル(第2ピーク)が、アスコルビン酸から生成した活性炭に単原子分散したAuの原子化シグナルである。アスコルビン酸の灰化処理温度の上昇に従って単原子状のAuは減少し、クラスターから原子化するAuの割合が増加することがわかる。さらに、固体反応速度論を基礎とした解析により求められるAuの原子化の活性化パラメーターからある程度の考察が可能である<sup>8,9)</sup>。

PG表面、スス状炭素表面、種々の灰化処理温度(<900, 1003, 1473, 1700-2150K)で加熱した活性炭表面に単原子分散したAu原子の原子化反応は1次反応であるが、活性化エネルギーは99±8から325±11kJ mol<sup>-1</sup>まで様々であった<sup>7)</sup>。気体分子の吸着挙動から求められる各炭素材料の表面フラクタル次元(D)が、本報の炭素材料と同等のものについて求められている。D=2は、ユーフリット次元で表現される平面との相互作用を示す。D=3は、立方体を示す。2~3の間では、凹凸の程度を表すことになる。上記の炭素表面のDは、それぞれ2.07±0.01, 2.25±0.09, 2.80±0.16, 2.7および2.6である。活性化エネルギーとDとの間には、図3の直線関係が成立した。これをもとに、未知炭素材料に単原子分散した金原子の原子化の活性化エネルギーを求めることによって表面の特性が評価できる可能性が生まれた。

\*徳島大学総合科学部自然システム学科 助教授 理学博士

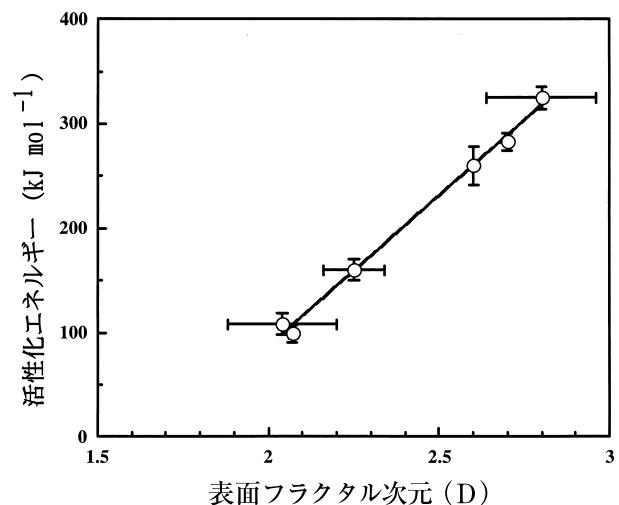


図3 単原子分散したAuの原子化の活性化エネルギーと活性炭の表面フラクタル次元のプロット

#### 4. 耐熱炭化物処理後のPG炉の特性

WおよびZrなど耐熱炭化物を形成する元素によるPG炉の表面処理の歴史は長い。処理溶液に炉を浸しながら減圧して溶液を浸透させる手法を用いることが多い。ここでは、簡易処理として $0.1\text{mol L}^{-1}$ 溶液40-100 $\mu\text{L}$ の一定量をPG炉に導入して通常の原子化サイクルで加热<sup>10)</sup>することで得られた新たな効果について述べる。

図4は、耐熱元素で処理した後、縦方向にPG炉を切断して炉の試料室内部を中心から0.5nm間隔で試料導入口の中央を0として30回転させながら顕微ラマンによりグラファイト固有のラマン散乱(Gバンド)の測定を行った結果を示している。Hf, Ti, WおよびZrにより処理したPG炉を用いた。W処理では、他の3元素に比べ処理後のGバンド強度が小さく、かつ、均等な強度が観測された。これは、表面処理効率が良好であり試料室内が炭化物による均質な修飾が行われたことを示す。PGの構造性の指標となるDバンドとGバンドの強度比( $I_D/I_G$ )はPG炉に比べ増加し、表面処理後はミクロ的には構造性が劣った黒鉛相が炭化物処理面と共存していることを示す。

図5に見られるように、Hf, Ti, WおよびZr処理したPG炉中のInの原子化の活性化エネルギーは $I_D/I_G$ 比の増加に伴って減少した。処理表面における黒鉛相の構造性の低下によって形成される活性点などの反応中心がInの酸化物中間体の還元を促進しているものと考えられる。このように、PG炉表面の炭化物相と活性化された黒鉛相が混在することで、吸着性と反応性が向上する特性がある。

#### 5. W処理PG炉によるCd, PbおよびAsの大容量試料導入

高感度化は、固相抽出、溶媒抽出および共沈分離など化学的前処理によってマトリックスからの分離と分

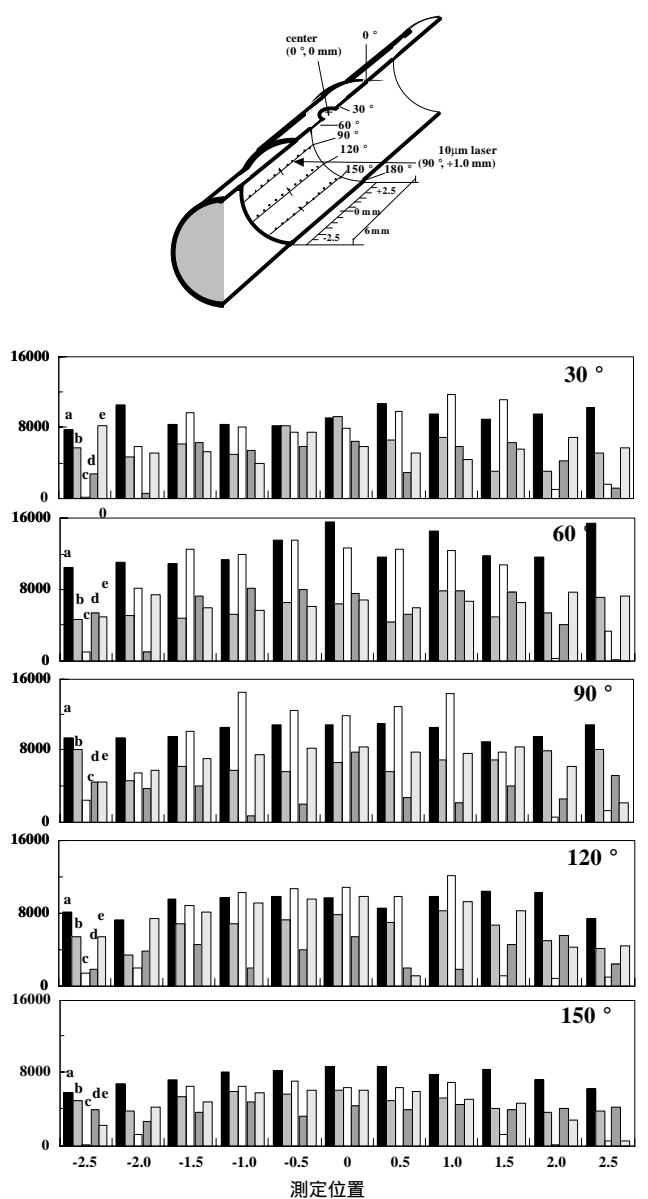


図4 表面処理したPG炉内壁の黒鉛のGバンドのラマン強度と測定位置

a PG炉, b Hf-PG炉, c Ti-PG炉, d W-PG炉, e Zr-PG炉。

析対象元素の濃縮が利用されることが多い。黒鉛炉原子吸光装置が高度化している現在では、炉内濃縮およびマルチ注入による試料導入が利用されることもある。長い処理時間と作業時間の問題、試薬や実験環境からの汚染、増加するマトリックスによる化学干渉など問題点も少なくない。試料量は再現性の観点から通常20-40 $\mu\text{L}$ が用いられることが多い。黒鉛炉の構造から最大100 $\mu\text{L}$ まで導入可能であることから大容量導入の可能性を考えた。

W処理を行ったPG炉に10~100 $\mu\text{L}$ まで種々の体積を導入し乾燥状態を観察した結果を図6に示した。すべての体積で乾燥によって試料溶液は試料室の中心に集まつた。Cd 1 mg L<sup>-1</sup>の溶液を乾燥後、試料室底面か

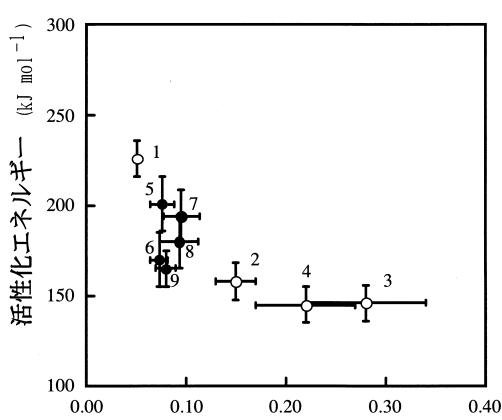


図5 ラマン散乱における黒鉛炉内壁のDバンドとGバンドの強度比とInの活性化エネルギーのプロット

炉：1, PG炉；2, Hf-PG炉；3, Ti-PG炉；4, Zr-PG炉；5, NPG炉；6, Hf-NPG炉；7, Ti-NPG炉；8, W-NPG炉；9, Zr-NPG炉。

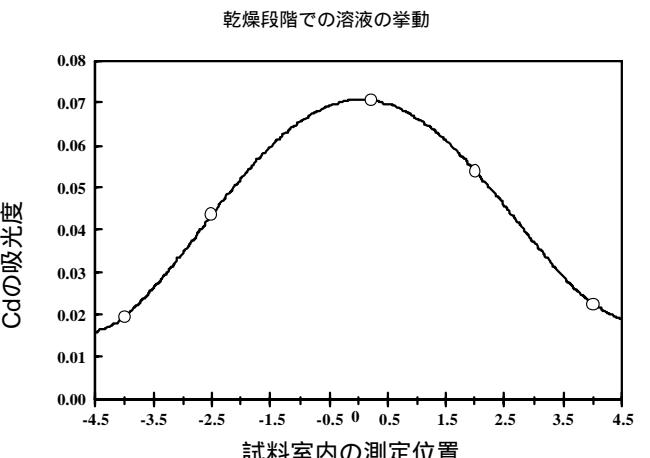
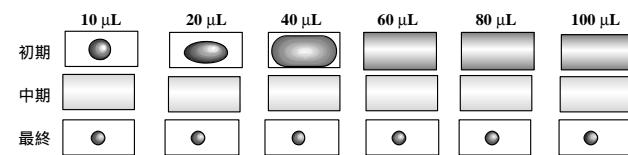


図6 W-PG(A型)炉の試料室内での試料溶液の乾燥状態とその内壁上のCd分布

ら採取した直径1mm深さ0.8mmのコアー中のCdを測定したところ中心部へCdが集まっている様子がよくわかる。このことから、W-PG炉において試料溶液中の溶存成分は炉の中心に効率よく集まり、再現性の良好な20 $\mu\text{L}$ 導入時と同じような再現性が得られることが想される。

Cd, PbおよびAsの試料溶液の100 $\mu\text{L}$ 導入時の吸光度と再現性を表1にまとめた<sup>11~13)</sup>。加熱回数が50回を超えるとPG炉においても十分な再現性が得られる。または、乾燥時間を長くするなどの対応を取る。通常乾燥条件において、使用開始直後に再現性が劣る場合がある。炉内部を観察すると試料溶液と炉表面との界面に気泡が発達することが観察される。W-PG炉では気泡

は発生しなかった。W処理した場合、炉表面の親水性が高まり試料の広がりが大きくなるが液層の厚みが減少して気泡の発生がなくスムーズな乾燥が進んでいる結果である。また、W処理により使用開始直後から良好な再現性が得られ、測定数300回(最高550回)まで続いた。10~100 $\mu\text{L}$ まで導入した体積と観測された吸光度には良好な直線関係が成立する。PG炉表面の改質の寄与が大きい。

表2は、干渉抑制実験の結果を示した。実試料を、水道水、降水および河川水などを想定し、その中の主要イオン種について検討を行った。Cd, PbおよびAsを分析元素として選び、化学修飾剤には最適化された濃度のPdを用いた。分析元素が低濃度であるにも関わらず良好な干渉抑制効果が確認された。

表3に検出限界、感度、標準偏差、検量線範囲、灰化温度(許容、最適)および添加回収実験などをまとめた。検出限界(3σ)はCd, PbおよびAsにおいて、それぞれ2.5, 20および22ng L<sup>-1</sup>であった。添加回収実験のための水道水、河川水、降雪、雨水および霧水などそれぞれ試料の複数個を用いた。これらの水試料に一定量の標準溶液を混合することによりCd 60ng L<sup>-1</sup>, Pb 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ , As 2, 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ を添加した試料を作成し、Pd修飾剤を用いて最適条件で検量線法によって測定したところ、表5に示すとおり良好な回収率が観測された。

マトリックス修飾剤にリン酸塩系の修飾剤を用いた場合、ピーク高さ法によって水道水、河川水および降雪のCdおよびPbをそぞれぞれ最適灰化温度360および600 °CにおいてPd修飾剤と同等の干渉抑制能と低い検出限界で分析できることがわかつてき<sup>14)</sup>。

#### 6. まとめ

黒鉛炉原子吸光法の高度化が進むに従って、PG表面とのナノレベルの相互作用、共存物質との相互作用およびピコグラムレベルの元素の挙動がシグナル強度や形状に反映されやすくなる。多種多様なマトリックス修飾剤、水素化物発生、クロマトグラフィーなどとの連携による発展や装置の性能向上などとともに、炉の表面やそこで起こる物理化学現象についての理解が今後の発展において大きく寄与することを期待している。

#### 参考文献

- 1) B. Welz and M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, 1999, Wiley-VCH Verlag.
- 2) J. Sneddon, *Advances in Atomic Spectrometry* Vol. 4, 1998, JAI Press Inc.
- 3) 今井昭二, 表面, 1998, 36, 646-653.
- 4) 今井昭二, 岩本悦郎, ぶんせき, 1999, 947-953.
- 5) 今井昭二, 分析化学, 2000, 49, 719-733.

表1 大容量(100μL)試料導入におけるPG炉のタンクステン処理の影響

元素	炉の条件	温度(°C)	時定数(s)	Pd修飾剤 (5μL)	ピーク面積	RSD(%)	ピーク高さ	RSD(%)
Cd (200 ngL <sup>-1</sup> )	PG炉	150	360	2560 <sup>c</sup>	0.1	なし	0.0368 ± 0.0013	3.8
		150	360	2560 <sup>c</sup>	0.1	2000 mgL <sup>-1</sup>	0.0645 ± 0.0117	18.3
	W-PG炉 <sup>d</sup>	150	360	2560 <sup>c</sup>	0.1	なし	0.0554 ± 0.0010	2.0
		150	360	2560 <sup>c</sup>	0.1	2000 mgL <sup>-1</sup>	0.0765 ± 0.0005	0.7
Pb (5 μgL <sup>-1</sup> )	PG炉	150	960	2560	0.02	なし	0.0741 ± 0.0137	19
	W-PG炉	150	960	2560	0.02	なし	0.0628 ± 0.0008	1.3
As (4 μgL <sup>-1</sup> )	PG炉	150	310	2560	0.2	なし	0.0199 ± 0.0023	11
		150	570	2560	0.2	1000 mgL <sup>-1</sup>	0.0845 ± 0.0023	2.7
	W-PG炉	150	570	2560	0.2	なし	0.0946 ± 0.0015	1.6
		150	570	2560	0.2	1000 mgL <sup>-1</sup>	0.1196 ± 0.0021	1.7
		150	570	2560	0.2	1000 mgL <sup>-1</sup>	0.1138 ± 0.0031	2.7

a 温度はPt-Rh熱電対および放射温度計での計測；b 30秒間の通常乾燥；c 光温度制御装置ON；d W処理PG炉。

表2 大容量試料導入による主要イオンの干渉のPdマトリックス修飾剤による抑制効果

共存塩	Cd(0.2 μg L <sup>-1</sup> )		Pb(5 μg L <sup>-1</sup> )		As(4 μg L <sup>-1</sup> )	
	濃度 <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	相対吸光度 (ピーク高さ)	濃度 <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	相対吸光度 (ピーク面積)	濃度 <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	相対吸光度 (ピーク面積)
Absence		1.00		1.00		1.00
NaCl	100	0.92	100	1.02	200	1.01
NaNO <sub>3</sub>	100	0.95	100	1.06	200	1.02
N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	100	0.93	10	0.94	200	1.01
KCl	100	0.94	100	0.99	200	1.01
KNO <sub>3</sub>	100	0.98	100	1.00	200	1.03
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	0.97	10	0.99	200	1.03
MgCl <sub>2</sub>	20	0.97	100	0.99	200	1.00
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	100	1.06	100	1.07	200	1.01
MgSO <sub>4</sub>	100	1.04	5	1.06	200	1.04
CaCl <sub>2</sub>	100	0.92	100	1.07	200	1.01
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	100	0.98	100	1.00	200	1.03

Pd修飾剤(5μL) : a, 2000 mg L<sup>-1</sup> Pd; b, 1000 mg L<sup>-1</sup> Pd; c, 1000 mg L<sup>-1</sup> Pd; d, 陽イオン濃度。

表3 W処理PG炉における大容量試料導入によるCd, Pb, およびAsの分析特性と添加回収実験<sup>a</sup>

分析特性	元素	検出限界	感度	吸光度	RSD(%)	波長(nm)	ランプ	灰化温度(°C)	許容最大最適
Cd	2.5ppt	0.50pg	1% 吸收	ピーク高さ	< 2	228.8	中空陰極ランプ	480	360
Pb	20ppt	12pg	characteristic mass	ピーク面積	< 2.5	283.3	中空陰極ランプ	1250	960
As	22ppt	13pg	characteristic mass	ピーク面積	< 3	193.7	中空陰極ランプ	1170	570
実試料による添加回収実験	元素	添加量	回収率(%)	水道水	河川水	降雪	降雨	霧水	
Cd	60ppt	101-104	97-102	104-110					
Pb	2ppb	100	97	96-106	106		102-104		
As	2ppb	97-98	101-103	100-104					

a. Pd修飾剤は表2と同じ； b. 温度はPt-Rh熱電対および放射温度計での計測値。

- 6 ) S. Imai, M. Harada, Y. Nishiyama and Y. Hayashi, Anal. Sci., 1998, 14, 769-778.
- 7 ) S. Imai, Y. Nishiyama and Y. Hayashi, J. Chem. Res. (S) 1998, 218-219.
- 8 ) S. Imai and Y. Hayashi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1992, 65, 871-875.
- 9 ) S. Imai, M. Minezaki, Y. Hayashi and C. Jindoh, Anal. Sci., 1997, 13, 127-130.
- 10 ) E. Iwamoto, H. Shimazu, K. Yokota, T. Kumanomaru, J. Anal. Atom. Spectrom., 1992, 7, 421.

- 11 ) S. Imai, K. Yamamoto, A. Yonetani and Y. Kikuchi, J. Anal. Atom. Spectrom., 2003, 18, 515-518.
- 12 ) S. Imai, K. Fujikawa, A. Yonetani, N. Ogawa and Y. Kikuchi, Anal. Sci., 2000, 16, 162-167.
- 13 ) S. Imai, Y. Kubo, A. Yonetani, N. Ogawa and Y. Kikuchi, J. Anal. Atom. Spectrom., 1998, 13, 1199-1202.
- 14 ) 今井昭二 ら 第64回分析化学討論会 講演要旨集。

## ラウンジ



## スズメバチの揮発性情報化学物質によるコミュニケーション

Communication by volatile semiochemicals in hornets

小野 正人\*

“スズメバチ”と聞いてその毒針を連想し、背筋を震わせる人はいても、生態系における彼らの重要な貢献を評価する方は少ないのではないだろうか？一匹の女王蜂とその娘である多数の働き蜂を中心とした血縁集団（コロニー）を生存の単位とし、高度な社会生活を営むスズメバチは、確かに巣内で育てられている無防備な幼虫、蛹を守るために強力な防衛戦略を進化させているが、一方で樹木に危害を与える害虫の捕食者として生物界のバランスを保つキーストーンでもある。21世紀は共生の時代といわれており、地球上の多様な生物との共存の道を探ることが、我々人類の生存にも大きく関わってくることが認識され始めている。私はそういった意味で、わが国において一年間で20名以上の死者を出すと恐れられているスズメバチとヒトとの摩擦の回避策を検討してきた。スズメバチは、刺して血を吸わねば産卵できない蚊や蚋と異なり、刺さないで生活できればそれに越したことはない。つまり、“刺す”という行為は、あくまで巣を攻撃されたと認識されたときに敵から防衛するために行われる最終的な手段である。そこで、スズメバチの巣に近づいたときに起こる統制のとれた防衛行動がなぜ起こるのかを解明することで、逆に共存の方策が見出せるのではないかと考え、研究を展開してきた。その結果、スズメバチが我々の言葉に相当する情報として“化学物質”を使用していることが明らかとなり、統制のとれた防衛行動を制御する情報化学物質、すなわち警報フェロモンが巣門周辺で門番の働き蜂から噴射される毒液中に含まれるアルコールやエステルの混合物であることが明らかにされた。本稿では、昨年夏英国のネイチャー誌に掲載された研究成果を中心に“スズメバチ語”的解説作業を紹介したい。

スズメバチの毒液の成分に関しては、その激しい痛み、腫れ、患部組織の破壊、あるいは蜂毒アレルギー、アナフィラキシーショックという観点から多くの研究者によって調べられ、タンパク質を破壊するフオスフオリパーゼA<sub>2</sub>を代表する酵素類、マストパランのようなペプチド、ヒスタミンやセロトニンを代表するアミ

ン類などが、カクテルのように混合されたものであることが明らかにされている。それらの蜂毒成分は、その標的がスズメバチの天敵としての我々哺乳類であることを強く示唆するものである。以上の成分は通常では気体になりにくい高分子物質であり、生体に注入されたときに大きなダメージをもたらすものである。その一方で、敵の襲来を他個体へ知らせる情報化学物質は、敵を発見した個体から空気中に発散され、気体となって素早く巣内の多くの仲間に危険の到来を知らせる機能をもつ揮発性の低分子化合物である可能性が高い。そこで、溶媒などを使用せずに毒液中から揮発する成分を直接捕集して分析できる固相マイクロ抽出法（SPME）を適用して、オオスズメバチを始めとする日本産全種のスズメバチ属の毒液中に含まれる揮発性の警報フェロモン成分の分離、同定、合成、生物検定を行った。

最初に取り組んだのは世界最大のスズメバチ種である死傷例も多いオオスズメバチの警報フェロモンの解明である（図1）。3匹分の働き蜂の蜂毒から揮発する成分をSPMEで捕えてガスクロマトグラフ質量分析装置



図1 威嚇するオオスズメバチ

\* 玉川大学農学部昆虫機能利用学研究分野 助教授 農学博士

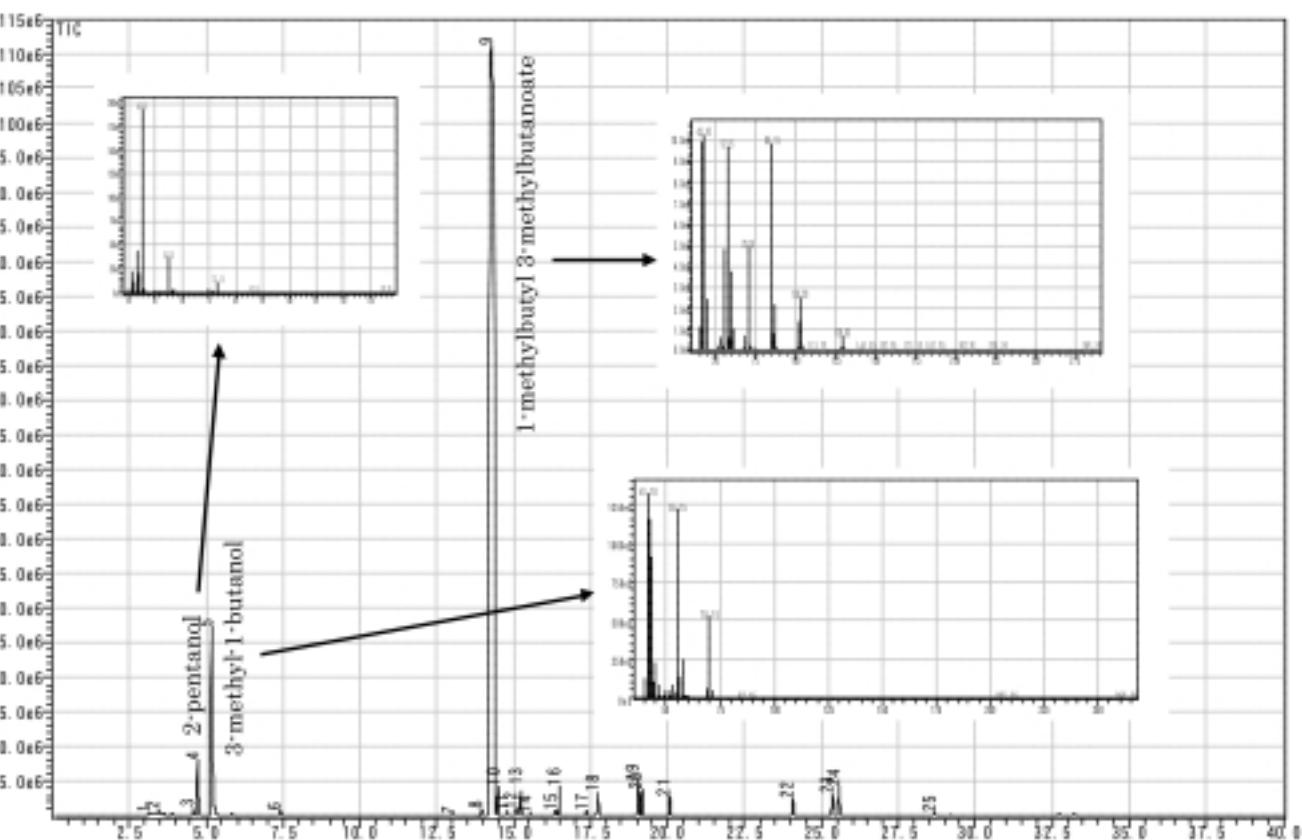


図2 オオスズメバチ蜂毒から検出された揮発性化合物

2-pentanolと1-methylbutyl 3-methylbutanoate(イソ吉草酸1-メチルブチル)には(R)と(S)が含まれていた。

で分析すると20以上のピークが検出された。それらのうちの主要な3ピークの成分を鏡像異性体を含めて合成し、各々2-pentanol, 3-methyl-1-butanol, 1-methylbutyl 3-methylbutanoateと同定した(図2)。ジエチルエーテルで希釈した約一匹当量分の化合物をろ紙に処理して、野生のオオスズメバチの巣門に近づけ、巣内から噴出してくる働き蜂の行動を定量化する検定を行った結果、2-pentanolを活性の主体とするものの3-methyl-1-butanolと1-methylbutyl 3-methylbutanoateの3種の物質が混合された時に、強い警報フェロモン活性をもたらすことが明らかにされた。

日本に分布している他の6種スズメバチの蜂毒中に含まれる揮発性化合物の分析結果とそれらの生物検定の結果は未発表であるが、オオスズメバチと同様にアルコール、エステル、あるいはケトンなどの成分が同定されている。それらの中には、私たちの生活に身近な化合物も含まれている。しかしながら、現在までのところ彼らの警報フェロモンは単独の化合物ではなく、複数成分系と考えられる点、例え相乗作用をもたらす化合物のブレンドになってしまって巣の近くでのみ警報フェロモンとしての活性をもつ点などから過剰に神経質に

なる心配は無いものといえよう。それでも、類縁化合物との構造活性関連の可能性を考えると、実験結果は、スズメバチの巣に近づく可能性のある際には、香りの強いものを身に付けることに対して十分用心した方が無難であることを強く示唆していると思われる。

それらの化合物の中には、化合物間の組み合わせが変わったり、巣の近くから離れた場所などによって、警戒信号になったり、餌場を仲間に知らせるシグナルになるなど状況によって、全く異なる意味をもつてゐるものもある。その様子は、まるで文字の組み合わせで意味が変わってくる我々の言葉とよく似ている。彼らの触角から情報として入力された化学物質の信号が、どのようにして「小さな脳」の中で処理されて適応的な行動として表現されてくるのかという点に関する研究の展開は、基礎と応用の両面で大変期待され、遺伝子発現という観点から21世紀COEプロジェクトの課題として鋭意取り組んでいる。

## 解説

## G-6000形日立ガスクロマトグラフの紹介

Introduction of Model G-6000 Hitachi Gas Chromatograph

栗田 信二\* 河原井 雅子\*\*

## 1.はじめに

非放射線電子捕獲検出器(Nr-ECD: Non radioactive-Electron Capture Detector), 非水素炎有機物検出器(NFOD: Non Flame Organic Detector)を搭載可能なG-6000形ガスクロマトグラフを発売した(図1)。

従来の放射線ECDは環境(水・大気・土壤)中の揮発性有機化合物や農薬の分析、食品中の残留農薬分析、環境中やトランスオイル中のPCBの分析などに広く使用してきた。しかし、 $^{63}\text{Ni}$ 放射性同位元素が使用されていることから放射性障害防止法に係る届出・管理が必要で、使用上の制約が多くあった。Nr-ECDは放射線を用いないことから制限が除外され簡単に使用できる特長がある。

またNFODを使用すると、FID(Flame Ionization Detector: 水素炎イオン化検出器)で検出器ガスとして使用されていた水素を用いずに有機物を測定することが可能である。水素は可燃性ガスのため、安全対策として設置場所や使用条件の限定があったが、NFODは水素を使用しないため、いつでもどこでも簡単に使用することができる。

ここではNr-ECD、NFODの原理と測定例及び、G-6000形のその他の特長について紹介する。

## 2. Nr-ECDの原理

放射線ECDでは、キャリアーガスである窒素N<sub>2</sub>が $^{63}\text{Ni}$ の線によりイオン化され、このとき放出された電子によりベース電流が得られる。ここにカラムから溶出



図1 G-6000形日立ガスクロマトグラフ

\* 株日立サイエンスシステムズ 医用・分析システム設計部

\*\* 株日立サイエンスシステムズ 那珂カスタマーセンタ分析医用部

してきた親電子性試料が入ると、電子を取り込み陰イオンとなり、ベース電流が減少し、これが信号電流として検出される。

一方Nr-ECDの場合は、ドーパントガスであるキセノンXeが放電ガスの光量子のエネルギーによりイオン化され、このとき放出された電子によってベース電流が得られる。このイオン化の部分が異なるだけで、この後の試料の電子捕獲の過程は放射線ECDと同様の原理で検出される。なお光量子のエネルギーによるイオン化には実績のある日立の光イオン化技術が応用されている。これは日立独自の技術である大気圧下でのDCグロー放電により光量子を得るもので、これまでもPID(Photo Ionization Detector: 光イオン化検出器)に応用されていた。PIDのイオン化の原理は、放電ガスヘリウムHeがグロー放電エネルギーにより励起状態である2量体となり、これが基底状態(2He)に遷移する時に光量子を出し試料分子をイオン化するというものである。表1に希ガスの種類とその放電によって発生する光エネルギーを示す。これらの原理に基づき設計されたNr-ECDの構造は図2(a)のとおりである。

## 3. Nr-ECDによる測定例

図3にNr-ECDと放射線ECDによる塩素系農薬標準試料各100pgの測定例を示す。シグナル対ノイズ比ピークの分離度とも放射線ECDと同等(当社比)であることがわかる。

図4にPCB(KC-300, 400, 500, 600の等量混合物、各2ng)のクロマトグラムを示す。任意の4ピークについて連続5回の再現性を調べたところ、変動係数CV=2.3~3.4%とスプリットレス注入として良好な再現性が得られている。

表1 希ガスの種類とその放電によって発生する光エネルギー

気体	発生する光の波長 [nm]	発生する光のエネルギー [eV]	イオン化可能な物質
キセノン	147	9.6	アミン類など
クリプトン	123	10.6	有機物
アルゴン	107	11.6	有機物
ネオン	74	16.7	無機, 有機物
ヘリウム	58	20.6	無機, 有機物

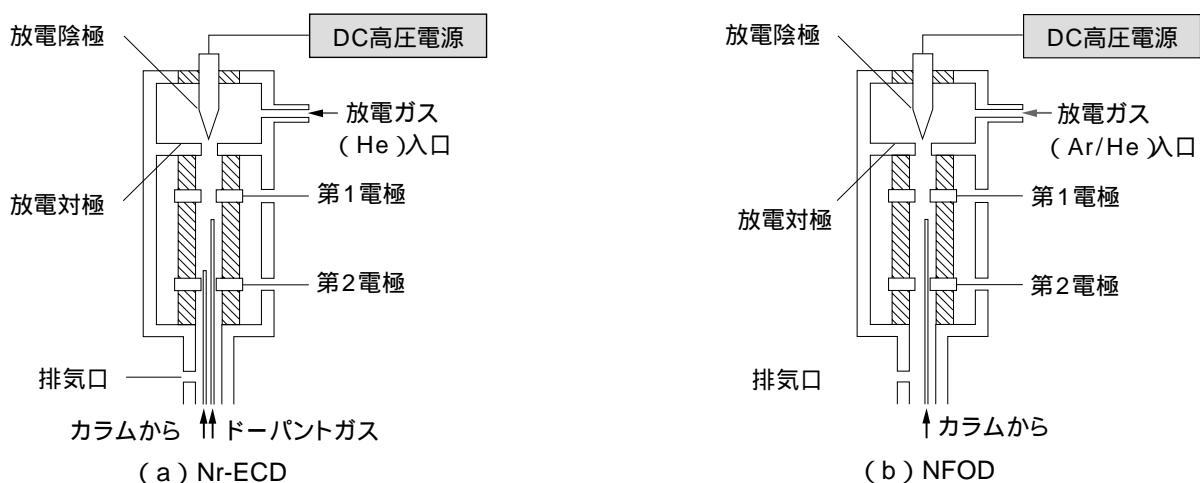


図2 Nr-ECDとNFODの構造

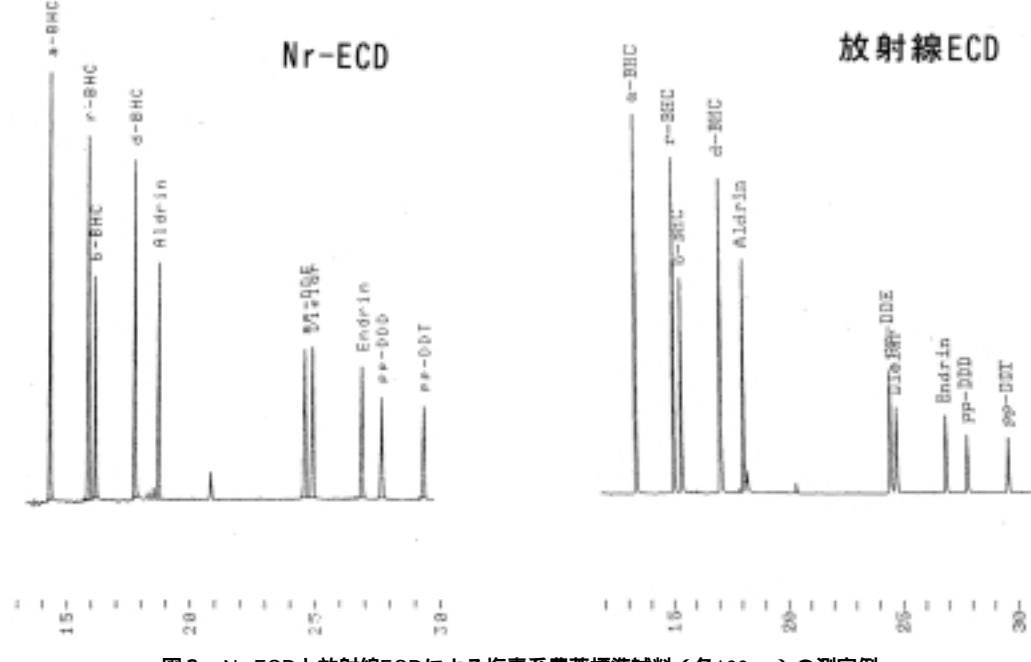


図3 Nr-ECDと放射線ECDによる塩素系農薬標準試料(各100pg)の測定例

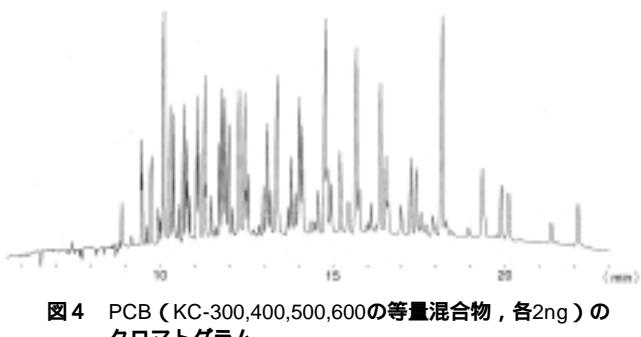
測定条件 カラム：DB-17, 30m, 0.25mm i.d., 0.25μm  
カラム温度：50 (1min)- 180, 25 /min  
- 260 (5min hold), 10 /min  
Inj./Det. : 200 /300, splitless

表2 イオン化ポテンシャルの例

物質 (無機物)	イオン化 ポテンシャル [eV]	物質 (有機物)	イオン化 ポテンシャル [eV]
N <sub>2</sub>	15.6	プロパン(C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> )	11.1
O <sub>2</sub>	12.1	ベンゼン(C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )	9.2
CO	14.0	ジメチルアミン(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH	8.2
CO <sub>2</sub>	13.8	トリメチルアミン(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N	7.8
H <sub>2</sub> O	12.6	エタノール(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	10.5

#### 4. NFODの原理

PIDの原理を応用することにより、水素炎を用いずに有機物を検出することが可能となる。表2に代表的



測定条件 カラム：無極性カラム, 30m, 0.25mm i.d., 0.25μm  
カラム温度：50 (1min)- 200, 20 /min  
- 260 (10min hold), 3 /min  
Inj./Det. : 230 /250, splitless

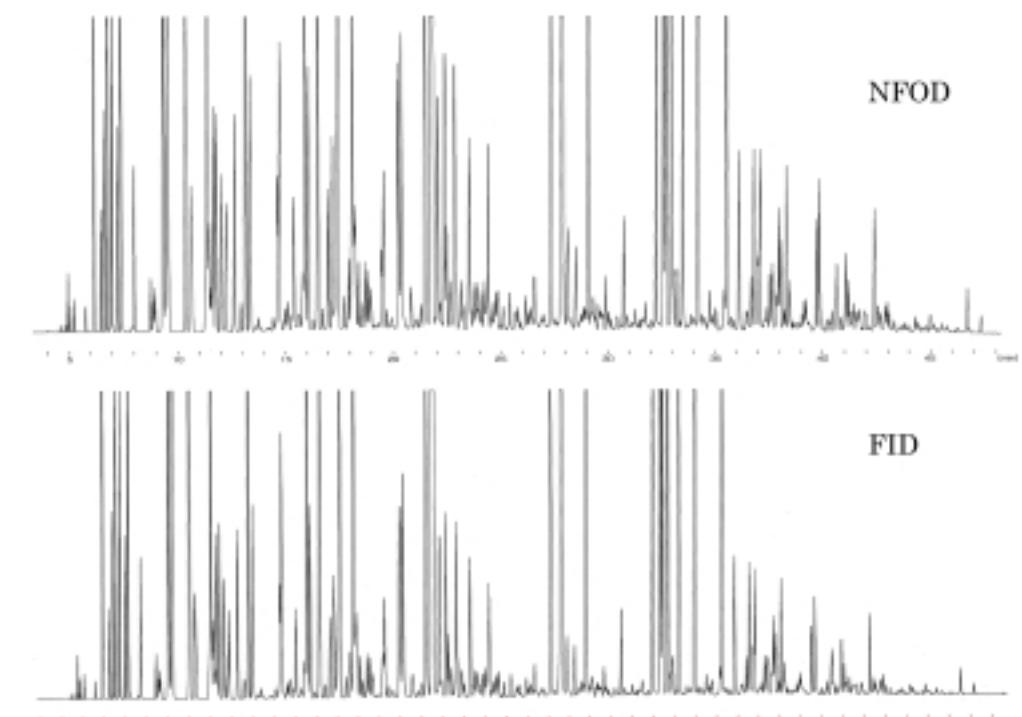


図5 NFODとFIDによるガソリンの測定例

測定条件 カラム：TC-1, 60m, 0.25mm i.d., 1.0μm  
カラム温度：40 (10min)- 250, 4 /min  
Inj./Det. : 250 /300, split1 : 50

な物質のイオン化ポテンシャルを示す。これより無機物を検出せずに有機物のみをイオン化するためには、11.1(プロパン)と12.1eV(O<sub>2</sub>)の中間値である11.5eV付近のエネルギーを供給すればよいことがわかる。表1より放電ガスはAr (11.6eV)が最適であると判断できる。試料を直接イオン化するので、ドーパントガスを導入する必要は無い。これらの原理に基づき開発されたNFODの構造は図2(b)のとおりである。

#### 5. NFODによる測定例

図5にNFODとFIDによるガソリンの測定例を示す。多成分試料でも高分離分析が可能で、FIDと同等以上の感度であることがわかる。

図6に芳香族化合物の測定例を示す。ピーク2, 5, 6はアミン類で吸着しやすい成分であるが、高沸点成分であってもシャープなピークが得られている。

#### 6. G-6000形のその他の特長

Nr-ECD, NFODの他にも検出器ラインナップはFID, ECD, TCD, PID, FPDと充実している。本体は新開発のDFC(デジタルフローコントローラ)を標準搭載し、圧力・流量・線速度の3つのモードでのプログラミングが可能である。またカラムオープンの冷却降下時間は450 50まで6分以内(室温20)と2倍高速(当社比)となり、分析スループットが向上し

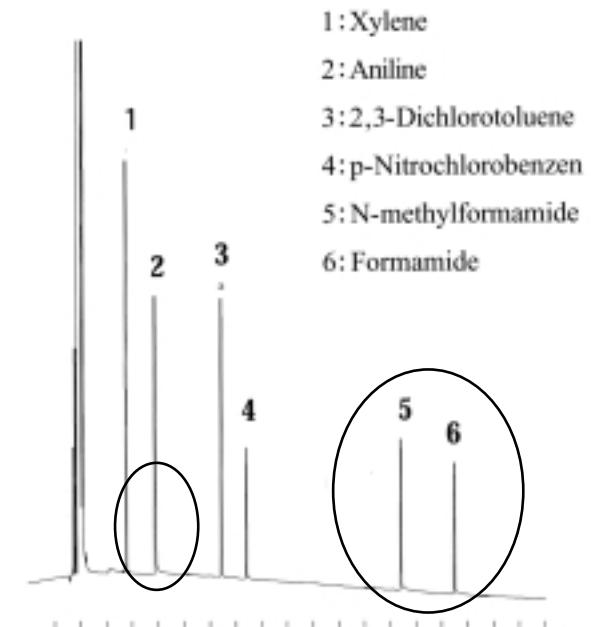


図6 芳香族化合物の測定例

測定条件 カラム：TC-1, 30m, 0.25mm i.d., 1.0μm  
カラム温度：50 - 315, 10 /min  
Inj./Det. : 250 /300, split1 : 50  
サンプル：100mg/l, 1 μl

た。さらに、データ処理システムとしてEZChrom Elite(オプション)を採用しクライアント/サーバーシステムに対応し、ネットワーク上の管理も可能である。

## HD-2300形超薄膜評価装置の紹介

### HD-2300 Ultra Thin Film Evaluation System

稻田 博実<sup>\*</sup> 渡辺 俊一<sup>\*</sup> 田中 弘之<sup>\*</sup> 下山 渡<sup>\*</sup>  
会沢 真二<sup>\*</sup> 斎藤 浩一郎<sup>\*</sup> 大橋 利幸<sup>\*</sup>  
橋本 隆仁<sup>\*</sup> 砂子沢 成人<sup>\*</sup> 中村 邦康<sup>\*\*</sup>

#### 1.はじめに

半導体やMEMSデバイスの高集積化が進む中で、透過走査電子顕微鏡(Scanning Transmission Electron Microscope以下STEMと略す)を用いた簡単かつ高スループットな観察、評価の要求が高まっている。このようなニーズに応えるためにSTEM専用機である超薄膜評価装置HD-2000<sup>1)</sup>の後継機種としてHD-2300を開発した。

開発されたHD-2300では以下の性能の向上が図られている。

格子分解能の向上

光学系長時間安定性の向上



図1 HD-2300形超薄膜評価装置

\*株日立ハイテクノロジーズ

\*\*株日立製作所中央研究所

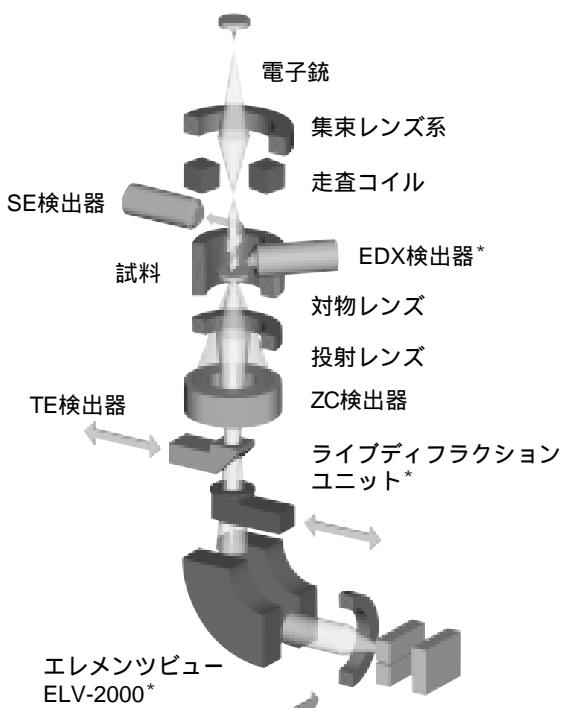


図2 HD-2300光学系概略図 (\*印はオプション)

いる。FIBシステムFB-2100との試料リンクを可能にしたFIB共用ホルダも準備され、作製・観察時の試料の取扱いに便利である。操作パネルの簡素化、大型液晶モニタの標準装備、GUIをFE-SEM(S-5200)と統一するなどにより、快適な操作環境を実現している。

図2に電子光学系の概略図を示す。電子源から放出された電子は集束レンズ系により試料上に焦点を結ぶように照射される。電子線は試料上を走査し、試料からの二次電子は二次電子(SE)検出器、散乱電子はZコントラスト(ZC)検出器、透過電子は透過電子(TE)検出器でそれぞれ検出され、像を形成する。さらにオプションとして、電子線回折像とZC像を同時に観察するライブディフラクションユニット、リアルタイムに元素マッピングを行うエレメンツビュー(ELV-2000)<sup>2)</sup>、EDX分析装置、EDXドリフト補正機能<sup>3)</sup>などが準備されている。

#### 3.仕様

表1にHD-2300の主な仕様を示す。HD-2300では光学条件の変更により、保証する格子分解能が0.235 nmから0.204 nmに向上した(図3)。電子源にはショットキー電子源を搭載し光学系の安定化と操作性の向上を図った。またコールドFE電子銃もオプションで準備しており、高エネルギー分解能や高感度分析が必要なユーザに対して提供することが可能である。

#### 4.自動調整機能

HD-2300ではSTEMとして初めて自動軸調整機能を

表1 HD-2300の主な仕様

項目	仕様
加速電圧	200kV
格子分解能	0.204nm
電子源	ショットキー電子源 コールドFE電子源*
試料傾斜角	30°(標準ホルダ)
EDX立体角	0.3 Sr*
操作性	日立SEM共通GUI 自動調整機能
観察画像	HV SE像、ZC像、TE像 電子線回折像* EDXマッピング像* EELSマッピング像*

(\*印はオプション)

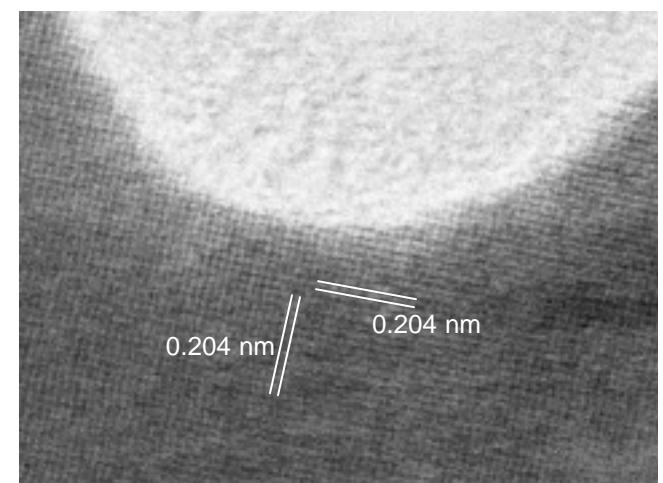


図3 金単結晶の格子像

TE像観察倍率: 400万倍

表2 HD-2300の自動調整機能

調整項目	機能名称
電流中心軸合わせ	SE alignment
非点補正像逃げ補正	Stigma alignment
TE像視野中心合わせ	Bright area centering
焦点合わせ	Auto focus
非点補正	Auto stigma

搭載した(表2)。装置の電子光学軸調整を行う機能として、SE alignment, Stigma alignment, Bright area centeringの3つの機能を搭載している。またAuto focus, Auto stigmaで、焦点合わせ、非点補正を自動化した。自動調整機能は、日立が開発したPC-VIPS画像処理システムを用いてソフトウェア上で動作する。FE-SEM S-5200や測長SEM S-9000シリーズで実績ある自動化機能をベースに開発した。

自動調整機能を光学的に安定なショットキー電子銃と組み合わせて使用することにより、ユーザが実施する光軸調整は1日1回で十分となる。エントリュー

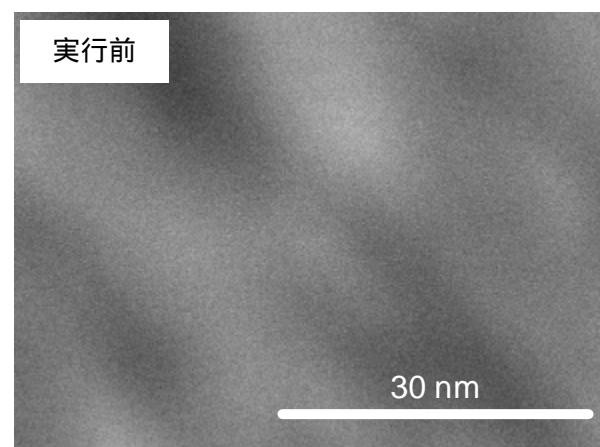


図4 Auto stigmaの実施例  
試料：カーボン膜上の金蒸着粒子 TE像観察倍率：100万倍

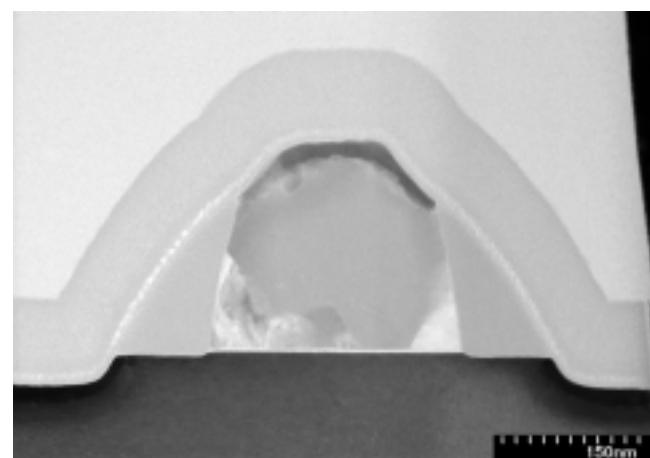


図5 半導体デバイスでの実行例  
TE像観察倍率：18万倍

ザにとって困難な非点補正も、準備された標準試料を用い100万倍程度で1日1回実施すればよく、通常の観察時は焦点合わせのみ行えばよい。

図4はカーボン膜上に蒸着した金蒸着粒子にAuto stigmaを倍率100万倍にて適用した例である。実行後の像にはカーボン膜のアモルファス粒状構造が見られ、約60nmの焦点精度が得られた。

図5は自動調整機能を用いて半導体デバイスを観察した例である。半導体デバイスのような実試料においても、本機能が有効に動作することを示している。

## 5. 分析機能

HD-2300には電子線回折像/STEM像の同時観察機能(ライブディフラクションユニット)、リアルタイム元素マッピング(ELV-2000)、EDXドリフト補正機能の各種分析機能がオプションとして準備されている。

ライブディフラクションユニットは電子線回折パターンとZC像を同時にモニタ上に表示する機能で、試料の局所的な結晶方位を知るために有効なツールである。

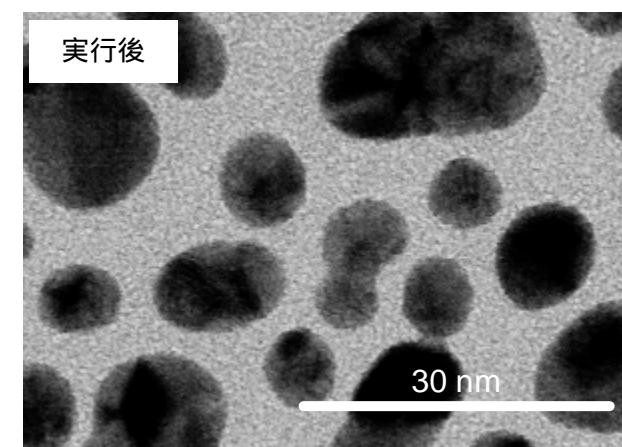


図4 Auto stigmaの実施例

試料：カーボン膜上の金蒸着粒子 TE像観察倍率：100万倍

ELV-2000は鏡体下部に取付けたエネルギーフィルターで弁別した特定の元素のコアロスピーカーにより元素分布像を形成する装置である。HD-2300のモニタ上にはZC像と元素分布像が同時に表示される。特にN, C, O等の軽元素分布像を観察する上で有効な機能である。

## 6. おわりに

STEMを用いた簡単かつ高スループットな観察、解析に対する要求に応えHD-2300を開発した。ショットキー電子銃の搭載で光学系が安定化し、自動調整機能の搭載により操作性を向上した。また、ライブディフラクションユニットやELV-2000などの搭載により分析性能も向上する。HD-2300は半導体分野、MEMS分野においても有効な観察・解析ツールとしてのみならず、従来TEMが得意としていた材料解析分野にも貢献できる装置である。

## 参考文献

- 橋本他，“HD-2000形超薄膜評価装置の開発”，電子顕微鏡，vol.34, Suppl.1, p.200, 1999.
- K. Kaji et al., “Development of a real-time jump-ratio imaging system equipped with STEM”, J. Soc. Electron Microscopy, vol.50, no.1, pp.15-21, 2001.
- R. Tsuneta et al., “A Specimen-drift-free EDX mapping system in a STEM for observing two-dimensional profiles of low dose elements in fine semiconductor devices”, J. Soc. Electron Microscopy, vol.51, no.11, pp.161-171, 2002.
- 稻田他，“新型HD-2300超薄膜評価装置における自動調整機能の紹介”，電子顕微鏡, vol.38, Suppl.1, p.13, 2003.

## HPLCポストカラム誘導体化法を用いた応用例

Model L-2000 Hitachi High Performance Liquid Chromatograph and It's applications.

石川 昌子\* 鈴木 裕志\* 岩渕 等\*  
横倉 武文\* 白崎 俊浩\*

### 1.はじめに

平成15年5月30日付け厚生労働省令第101号により、新しい水質基準が定められ、同告示第261号によりこれらの分析法が示された。今回の改正ではその検査方法にHPLCポストカラム誘導体化法が採用されている。

本報告では、公定法に準拠したHPLCポストカラム誘導体化反応システムを紹介する。

特に、高感度測定が要求される臭素酸分析、シアニオンの分析について解説する。

### 2. HPLCポストカラム誘導体化法

表1に、今回の水道法の改正で、HPLCポストカラム誘導体化法が採用された成分とその検出法をまとめた。

ポストカラム誘導体化法の特長としては、高感度分析が可能であること、選択性の高い分析法であるため、夾雑成分の影響が少ないとある。

この高感度分析を実現するには、検出器の感度、ポンプの安定性、カラムオーブンの安定性などを備えた高性能な液体クロマトグラフモジュールが必要となる。日立高速液体クロマトグラフL-2000シリーズは、感度、安定性ともに優れた性能を発揮し、公定法の感度、精度を満足するシステムとなっている。

表1 測定目的成分とポストカラム誘導体化試薬

目的成分	誘導体化試薬	検出波長	水質基準値(目標値)
臭素酸	臭化カリウム/硫酸	UV 268nm	0.010mg/L
シアニ化物イオン	ビリジンカルボン酸/ピラゾロン	VIS 638nm	0.010mg/L
カルバメート系農薬 <sup>*1</sup>			
メソミル	オフタルアルデヒド	FL Ex 339nm	0.03mg/L
カルバリル		Em 455nm	0.05mg/L
カルボフラン			0.005mg/L
グリホサート <sup>*1</sup>	オルトフタルアルデヒド	FL Ex 339nm	合計して2mg/L
アミノメチルリン酸 <sup>*1</sup>		Em 455nm	
イミノクタジン酢酸塩 <sup>*1</sup>	ニンヒドリン	FL Ex 395nm	0.006mg/L
		Em 500nm	

\*1: 健発第1010004号(平成15年10月10日)

\*株日立サイエンスシステムズ

### 3. 臭素酸分析への応用例

図1に臭素酸分析に用いたポストカラム誘導体化法の流路図を示す。目的成分をカラムで分離後、3方ジョイントで反応液1と混合し、さらに3方ジョイントで反応液2と混合後、反応コイル内で反応を行いUV検出器で検出する。図2に臭素酸の測定例を示す。基準値の1/10の濃度0.001mg/Lの標準試料を感度よく検出でき、S/N = 3から求めた検出下限値は、0.00015mg/Lとなった。実際の水道水の測定データを図2下に示す。水道水から、0.0004mg/Lの臭素酸が検出された。

### 4. シアン分析への応用例

シアニ化物は、従来ピリジンピラゾロン吸光光度法や4-ピリジンカルボン酸ピラゾロン法などによって定量されていた。HPLCポストカラム誘導体化法は、カラムで、シアニ化物を分離後に、4-ピリジンカルボン酸ピラゾロン溶液を混合し反応を行う。そのため、シアニ化物と塩化シアニ化物を同時に定量が可能である。図3にポストカラム誘導体化法を用いたシアニ化物と塩化シアニ化物の分析を示す。図3のクロマトグラムは基準値の1/10の濃度に相当する0.001mg/Lの標準試料のデータである。

S/N = 3から求めた検出下限値は、シアニ化物で0.00008

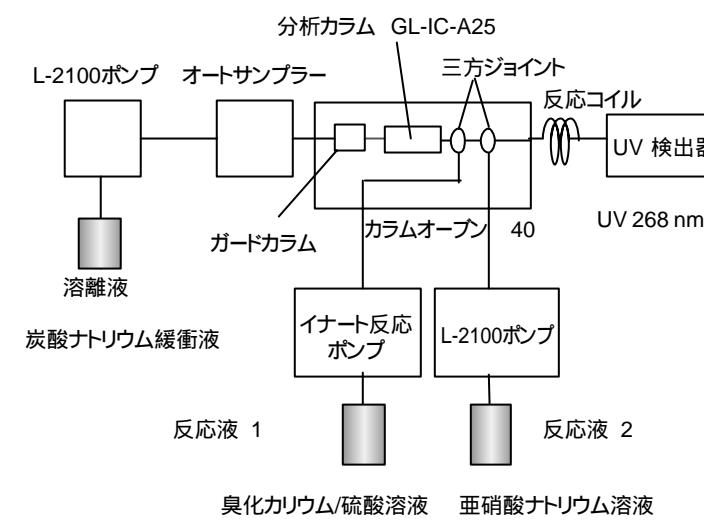


図1 臭素酸分析システム流路図

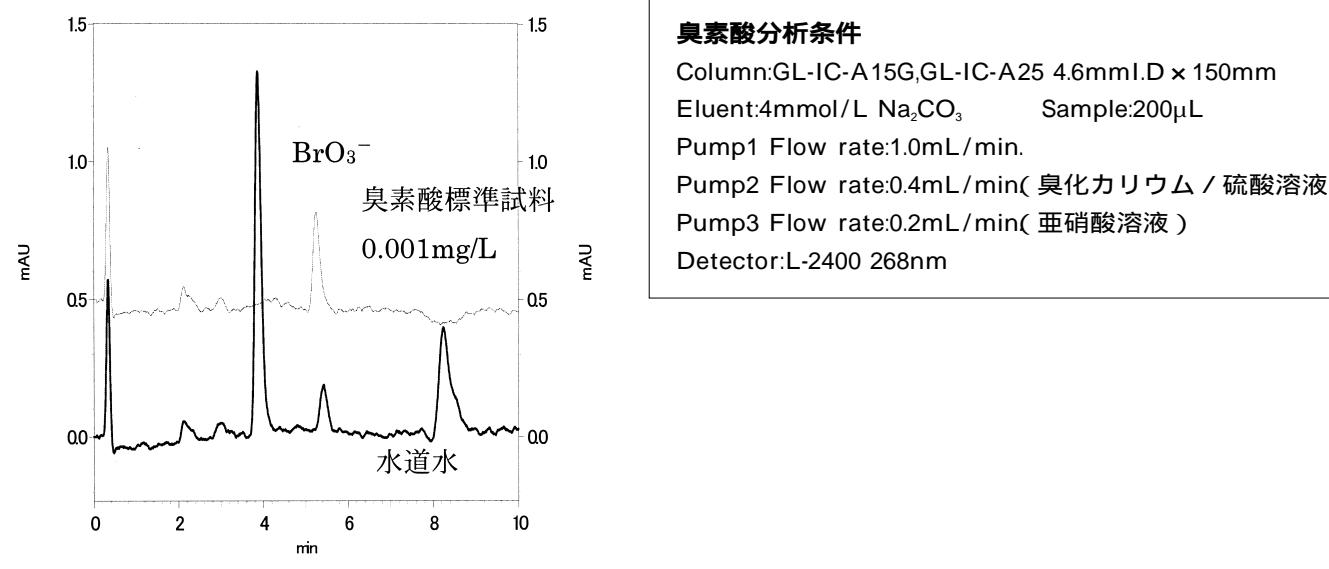


図2 臭素酸の測定例

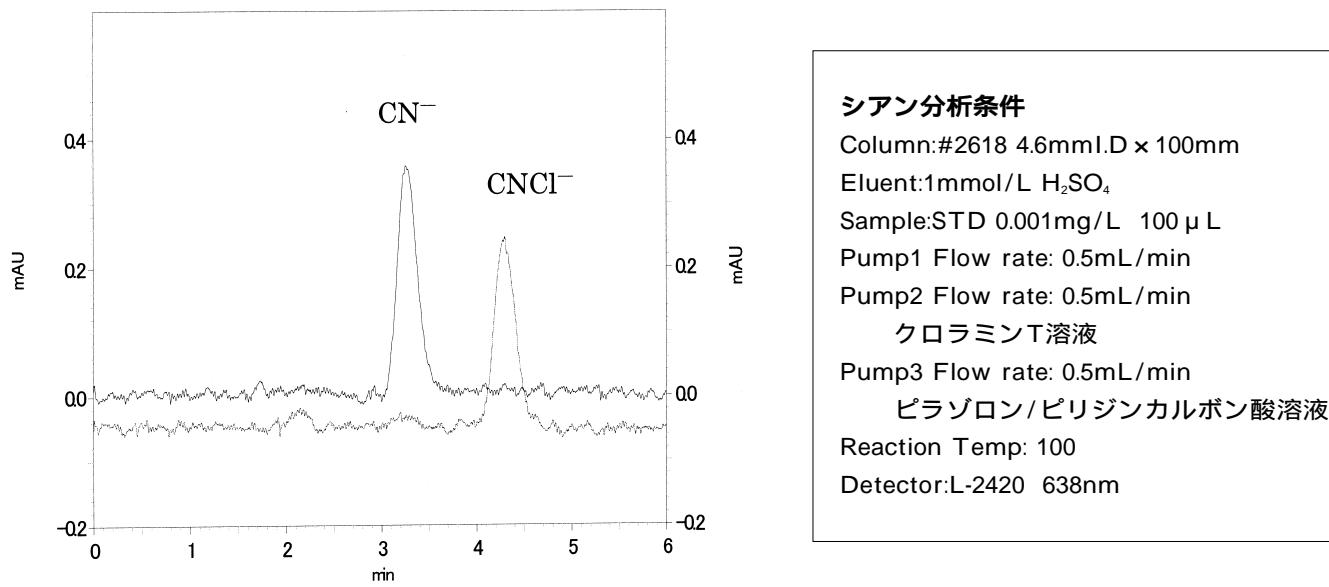


図3 シアンおよび塩化シアン標準試料 各0.001mg/Lの測定例

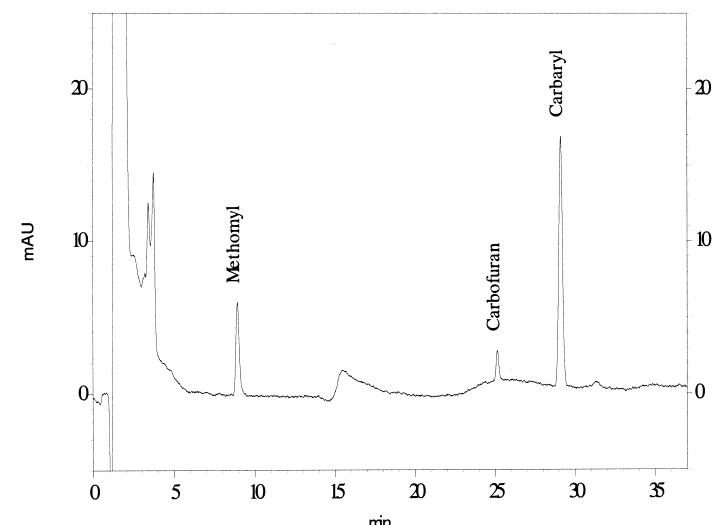


図4 カルバメート系農薬の測定例

Sample:Methomyl 0.3 μg/L, Carbofuran 0.05 μg/L, Carbaryl 0.5 μg/L

mg/L, 塩化シアンで0.00011mg/Lとなり, 高感度に検出できることが明らかとなった。

#### 5. 広がるアプリケーション

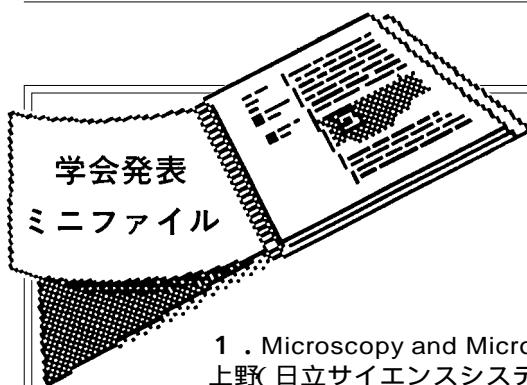
表1に記載したように, 水質分析では農薬の測定においても, HPLCポストカラム誘導体化法が採用された。この公定法では, 農薬は検出値と目標値の比の和で評価することになり, 目標値の1/100濃度まで定量することが規定されている。

このような分析には, 高感度化を実現したL-2480形蛍光検出器を用いることで対応可能となった。図4にカルバメート系農薬の測定例を示す。各成分とも目標値の1/100に相当する濃度を注入した。この結果から, 公定法の規定を満足するシステムであることが判る。

なお, グリホサート, アミノメチルリン酸, イミノクタジン酢酸塩についても, 公定法に基づく分析条件で測定した結果, 十分な感度が得られている。

#### 6. おわりに

HPLCポストカラム誘導体化法を用いた測定には, 高感度, 高精度を有する日立高速液体クロマトグラフ; LaChromEliteが, 威力を発揮する。今回は, 水質関連の応用例を紹介したが, この手法はさまざまな分野に応用可能であり, 今後はさらにアプリケーションの充実を図っていく予定である。



山田満彦 望田康平  
(株式会社日立サイエンスシステムズ)

#### 1. Microscopy and Microanalysis (2003・8/4-7, Texas, USA)

上野(日立サイエンスシステムズ), 他: High temperature in-situ electron microscopy using a dedicated scanning transmission electron microscope.

武藏(日立サイエンスシステムズ), 他: Recent development of UHR and ULV FE-SEM with various signal detection capabilities and its applications.

矢口(日立サイエンスシステムズ), 他: FIB micro-pillar sampling technique for 3D STEM observation and its application.

**【要旨】**多くの分野の材料や加工品で構造の微細化が進んでいるが、それらのプロセス評価や故障解析においては従来の薄膜試料から得られる二次元情報のみでは必ずしも十分ではなくなってきた。ここでは、その解決策として数ミクロン角の柱状試料(マイクロピラーサンプル)の作製/観察が可能な透過走査電子顕微鏡(STEM)と集束イオンビーム加工観察装置(FID)共用の3D解析ホルダーを開発し、半導体デバイス観察への応用を試みた。**図1**は円錐形試料ホルダー上に形成されたマイクロピラーサンプルで、**図2**はその拡大されたSTEM像である。STEM像は原理的に色収差の影響を受けないため比較的厚い試料でも像質の劣化が少なく、試料を360°回転しながら任意方向から観察することにより内在する故障部位などを容易に特定できる。

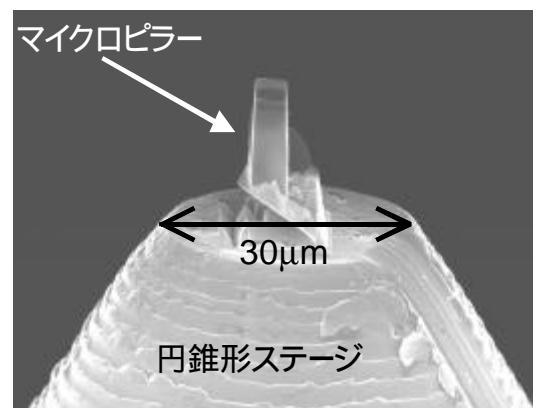


図1 円錐形ステージ上に形成されたマイクロピラーサンプル ( $2\text{ }\mu\text{m} \times 2\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$ 高さ)

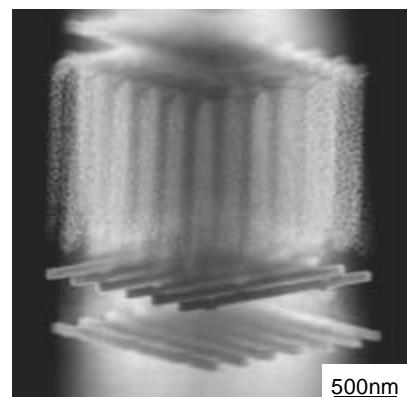


図2 マイクロピラーサンプルのSTEM像

#### 2. SCAN TECH 2003 (2003・9/5, 東京)

渡邊(日立サイエンスシステムズ), 他: SEMによるナノ構造の観察  
多持(日立サイエンスシステムズ), 他: イオンビームによる多様な試料前処理法

#### 3. 第19回分析電子顕微鏡討論会 (2003・9/10-11, 東京)

矢口(日立サイエンスシステムズ), 他: FIB-STEM共用3D解析ホルダーの開発とその応用  
黒田(日立サイエンスシステムズ), 他: Mg合金の低損傷FIB加工の検討

#### 4. International Symposium for Testing and Failure Analysis (2003・11/2-6, California, USA)

矢口(日立サイエンスシステムズ), 他: FIB Micro-pillar sampling of Si devices and its 3D observation.

#### 5. LSIテスティングシンポジウム/2003 (2003・11/5-7, 大阪)

川田(日立ハイテクノロジーズ), 他: ArFレジストパターンのサブナノメータ測長再現精度の検討  
飯泉(日立ハイテクノロジーズ), 他: 測長SEMによる微細パターンのラインエッジラフネス計測

中川(日立サイエンスシステムズ), 他: 半導体デバイスの評価に有効な超高分解能SEMの新機能

**【要旨】**Snorkel形対物レンズを搭載したS-4800形高分解能SEMは、単に分解能の高い像が得られるだけでなく半導体デバイスの評価に有効な新しい機能が付加された。それらは  
1) 試料ダメージを低減し、最表面の微細構造観察を可能にする極低加速電圧観察機能  
2) 試料表面の凹凸情報を組成情報を選択的に検出できる二次電子(SE)/反射電子(BSE)観察機能  
3) 試料内部の微細構造を観察する走査透過電子顕微鏡(STEM)像観察機能  
であり、プロセス評価から故障解析まで幅広い領域で活用が期待される。

ここでは極低加速電圧観察機能の応用例を示す。この機能はエネルギーの高い入射電子線が対物レンズを通過したあと試料の直前で減速させるもので、極低加速電圧(100~500V)において比較的高い分解能が得られる。**図3**はArFレジストパターンを加速電圧100Vで観察した例で、**図4**はこのレジストパターンの幅を加速電圧を変えて15回連続して計測したときの計測値の変化を示す。この結果から、加速電圧100Vではほとんどダメージの影響なくArFレジストパターンの計測が可能であることがわかった。

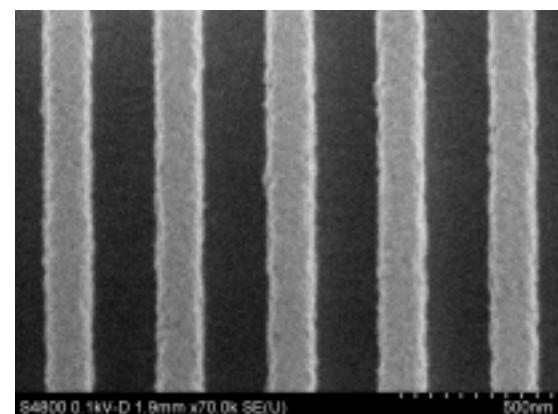


図3 ArFレジストパターンの観察例  
加速電圧: 100V

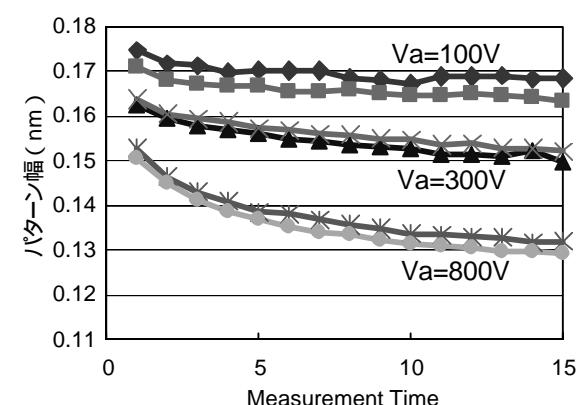


図4 ArFレジストパターン幅の連続計測例  
Va: 加速電圧

黒田(日立サイエンスシステムズ), 他: 3D解析ホルダーの半導体故障解析への応用

渡辺(日立ハイテクノロジーズ), 他: 日立HD-2300形超薄膜評価装置の開発と新機能紹介  
杉本(日立ハイテクノロジーズ), 他: 微細触針真空プローブ付FIBを用いた解析技術報告

#### 6. 日本分析化学会第52年会; (2003・9/23-25, 宮城教育大学)

鍋島(日立ハイテクノロジーズ), 他: ICP-3DQMSを用いた尿中のSeを測定する際に問題となるスペクトル干渉の低減

山本(日立サイエンスシステムズ), 他: ICP三次元四重極質量分析装置による増感剤を用いた尿中金属分析

**【要旨】**労働衛生、健康管理のため、尿中のPb, As, Crなどの金属濃度測定が用いられる。ICP-MSによる測定では、尿中にはNa, Ca, K, Cl, Brなどが%からmg/Lオーダーで存在し、多原子イオンの干渉が懸念される。ICP-3DQMSの測定条件(プラズマ出力、試料導入量、MS/MS条件など)を検討し、Cr, As, Seなどの多くの元素が分子イオンの影響なく測定可能となった。NIES標準試料分解液を分析し、認定値とよく一致した結果を得た。

表1 NIES CRM No.18 ヒト尿の測定結果  
単位: mg/L

元素	As	Se	Zn	Cu	Pb
測定値	0.143	0.061	0.63	0.010	0.0010
認証値	$0.137 \pm 0.011$	$0.059 \pm 0.005$	$0.62 \pm 0.05$	0.010	0.0011

(Cu,Pbは参考値)

米谷(日立サイエンスシステムズ), 他: 黒鉛炉原子吸光法を用いた重油中のヒ素分析における化学修飾剤の検討

坂元(日立サイエンスシステムズ), 他: ICP三次元四重極質量分析装置を用いた堆積物中の鉛同位体比分析



## 7. 第171回液体クロマトグラフィー研究懇談会（2003・10/23、東京理科大学）

伊藤(伸)(日立ハイテクノロジーズ); 糖鎖異性体分析におけるLC/MSの適応

**【要旨】** LC/MSに用いられるイオン化法は試料中のマトリックスや溶離液中の酸や塩でイオン化効率が変化する。これらの影響を抑制する方法を、糖鎖異性体を例として検討した。ポストカラム添加法として、20mmol/Lのアンモニア水溶液を用い、 $[M + H + Na]^+$ の2価イオンとして約2倍の感度向上が得られた。また、カラムスイッチング法による脱塩システムを10方バルブにより構築した。トラップカラムとしてDevelosil C30-UG 4mmID × 10mmLを使用し、H<sub>2</sub>O、MeOHを1min毎に切り替えてステップワイズグラジェントにより脱塩後MSに導入し測定した。通常の測定方法に比べ数倍から一桁の感度向上が得られた。

表2 PA化糖鎖の構造式

Abbreviation	Structure
210.1	GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6 GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3 $\rangle$ Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc-PA
210.2	Gal $\beta$ GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6 GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3 $\rangle$ Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc-PA
210.3	GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6 Gal $\beta$ GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3 $\rangle$ Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc-PA
210.4	Gal $\beta$ GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6 Gal $\beta$ GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3 $\rangle$ Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc-PA

PA : 2-Aminopyridine

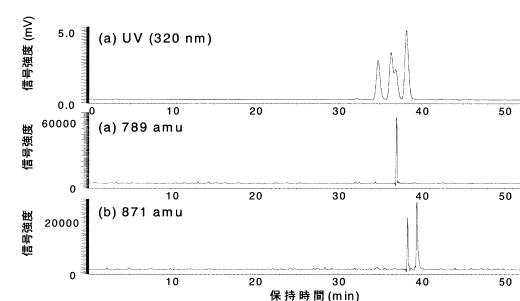


図5 カラムスイッチングによる糖鎖のマスクロマトグラム

**測定条件**  
試料：PA化糖鎖 (210.4) 0.05pmol/ $\mu$ L  
カラム：Develosil C30-UG-5,  
4mm × 10mm (野村化学)  
溶離液：C : H<sub>2</sub>O  
D : CH<sub>3</sub>OH  
D : 0% (0min) 0%  
(0.1min) 50%  
(0.2min)  
流量 : 0.2ml/min  
蛍光検出：励起320nm, 検出400nm

## 8. 第14回クロマトグラフィー科学会（2003・11/11-12、東京理科大学）

石川(日立サイエンスシステムズ), 他; 有機酸分析のセミミクロ化

**【要旨】** 有機酸は、食品中に含まれ、味や風味に大きな影響を与える。分析では夾雑物が多いため分離選択性を重視する。広く用いられているプロムチモールブルー (BTB) を用いたHPLC-ポストカラム誘導体化法を、新規開発したイオン排除モードのセミミクロ用有機酸分析カラムを用いたシステムを構築して検討した。陽イオン交換樹脂5  $\mu$ mを採用し、最適流量0.01cm/sで、ピーク高さ2.7倍、溶媒使用量40%を実現した。BTBポストカラム誘導体化法では標準試料（酢酸）で再現性(CV, n=10)を検討し、保持時間 0.08%, ピーク面積 0.67%と良好な結果が得られた。

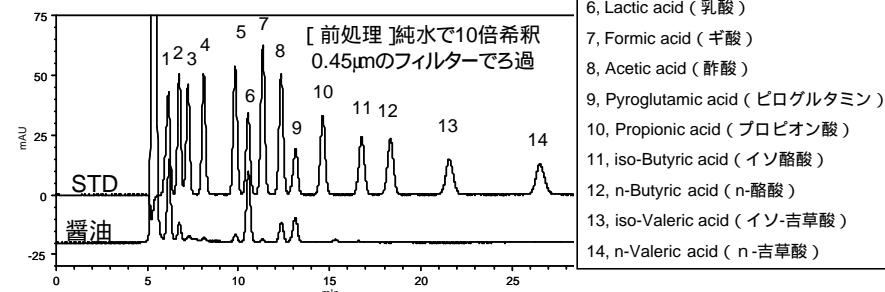


図6 醤油中の有機酸のクロマトグラム

## 会員制情報検索サイト『SINAVI(エスアイナビ)』のご紹介

日頃より、SINews (Scientific Instrument News)をご愛読いただき誠にありがとうございます。

さて、弊社では、皆様のお仕事に役立つ情報検索サイト『SINAVI』を2002年4月より開設しております。現在全国で、約14,000名の会員の皆様にご利用いただいております。

既に会員となっておられる方もいらっしゃるかとは思いますが、改めてご紹介させていただきます。

この『SINAVI』は弊社取扱分析機器全般の会員制検索情報サイトで、お客様の研究分野や担当製品をご登録いただければ、その項目に合致した情報等を、メール配信にてご案内しております。

一般的のホームページでは、掲載されていない情報が満載しております。

では掲載内容について一部をご紹介いたします。



### アプリケーションデータ

弊社で作成したテクニカルデータ等を全件登録しており、各種サンプルにおける分析例の他、目的成分別の検索も可能です。また分析条件、装置構成をご覧いただけます。



### カタログのダウンロード

製品カタログをPDFファイルでご提供しております。印刷も可能です。(一部掲載のない製品もあります)



### 製品詳細情報

仕様、設置条件のほか、測定手法、付属装置の特長、セミナー資料・説明会資料等の情報もご覧いただけます。



### 定価表、標準見積り

装置、付属装置の定価や、標準的な見積りをご覧いただけます。



さらに、アプリケーション、製品情報、製品詳細情報等は、素早く検索ができる検索機能を搭載しております。

### 「こんな時、こんな情報を！」

お客様の知りたいこと、日々のお仕事に役立つ情報を、会員制検索サイト(SINAVI)がサポートいたします。

是非ご入会いただきますよう。よろしくお願いいたします。

ご入会(ご登録)は日立ハイテクノロジーズのホームページで受付けております。

下記URLよりご覧ください。

<http://www.hitachi-hitec.com/science/>  
ログイン後、製品お役立ち情報の会員制サービス紹介にてご案内しております。

## 新製品紹介

### Bal-Tec社RES101形 イオンミリング装置

RES100形の後継機としてRES101形イオンミリング装置を発売しました。RES101は従来機と比較して、Linux OSを採用して、TEM, SEM, FIB試料の前処理、後処理を自動プロセス化で信頼性、操作性を高めた装置です。

#### 主な特長

##### (1) 2個のサドルフィールドイオンガン

高エネルギーで速いミリング  
低エネルギーでクリーニング

##### (2) Linux OSでのコンピュータ制御システム

信頼性のある制御システムで自動  
プロセスレシピ/タッチスクリー  
ン方式

#### (3) 各種試料ホルダー

SEMへの応用

- ・クリーニング
- ・コントラストエンハンスメント
- ・スロープカッティング

TEMへの応用

- ・HR試料
- ・平面観察
- ・断面TEM観察
- ・FIB試料のクリーニング
- ・スパッタリング

#### (4) CCDカメラと光学顕微鏡

サンプル観察とビーム調整に有効

#### (5) 試料ロードロックシステム

高サンプルスループット

#### (6) ユーティリティ

本体寸法

650(幅)×675(奥)×500(高)mm,  
70kg, 100VAC, 50/60Hz, 10A,  
Arガス(純度99.998%以上)



## ◎ 株式会社日立ハイテクノロジーズ

本 社 電話 東京 (03) 3504-7211

四国営業所 電話 高松 (087) 825-9977

北陸営業所 電話 金沢 (076) 263-3480

中国支店 電話 広島 (082) 221-4511

関西支店 電話 大阪 (06) 4807-2551

九州支店 電話 福岡 (092) 721-3511

京都営業所 電話 京都 (075) 241-1591

#### 編集後記

今年も早やニカ月が過ぎました。ナノテク、バイオ、デジタル家電など景気先導のテーマもあり、大手企業の景気が上向いていると報じられていますが、一方、SARSの再発、鳥インフルエンザの流行、米国のBSE(狂牛病)発生など、問題も多く発生しています。なぜ、米国のBSEや鳥インフルエンザがここまで大きく報じられるかを考えると、日本への食料事情に大きく関係しています。皆さんは日本の食糧自給率をご存知ですか? 2002年の報告ではたった40%です(カロリーベース)。ちなみに、英国は61%, ドイツは99%, アメリカは122%, フランスは121%, オーストラリアにいたっては265%です。もちろん食の安全の確保は当然しなくてはならないことですが、もし、このような事態が生じた場合でも対応できるように、国内の自給率の確保などを考えておく必要があるのではないかでしょうか?

さて、本号は、巻頭言に日本女子の大隈先生に電子顕微鏡に関するご意見を、報文として大阪産業大学の田中先生、山田先生および松本先生には「集束イオンビームによるマイクロマニュファクチャリング」、共立薬科大

学の金澤先生には「機能性高分子を用いた温度応答性クロマトグラフによるタンパク分離」、徳島大学の今井先生には「黒鉛炉原子吸光法における高感度化への原子化機構研究からのアプローチ: ナノ化学反応機構とCd, PbおよびAsの高感度化」と題する各アプリケーションをいただきました。いずれの報文も時宜を得た内容で読者の皆様には興味深く読んでいただけるものと思います。解説にはG-6000形日立ガスクロマトグラフの紹介、HD-2300形超薄膜評価装置の紹介、HPLCポストカラム誘導体化法を用いた応用例を紹介します。ラウンジには玉川大学の小野先生に「スマゼバチの揮発性情報化学物質によるコミュニケーション」と題する非常に興味深いお話をいただきました。

(原田 記)

インターネットホームページ

(株)日立ハイテクノロジーズ

ライフサイエンス関連

URL:<http://www.hitachi-hitec.com/science/>

ナノテクノロジー関連

URL:<http://www.hitachi-hitec.com/device/>

本ニュースに関するお問い合わせは、下記、または、(株)日立ハイテクノロジーズの上記各事業所へご連絡ください。

(株)日立ハイテクノロジーズ

販売促進部

〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14  
電話 (03) 3504-7811(ダイヤルイン)  
FAX (03) 3504-7756

(株)日立サイエンスシステムズ

那珂カスタマーセンタ

〒312-0057 茨城県ひたちなか市石川町11-1

電話 (029) 354-1970(代)

HITACHI  
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS  
MARCH, 2004 VOL. 46 No. 2

発 行 2004年3月10日

編集人 原田 勝仁

発行人 小林 紀雄

発 行 株式会社日立ハイテクノロジーズ

〒100-8717

東京都港区西新橋1-24-14

電話 (03) 3504-7811(ダイヤルイン)

印 刷 日立インターメディックス株式会社