

### 巻頭言

## 「大きな夢，小さな夢，そして我欲へ！」

[Big dream, small dream and finally ego!]

武蔵野大学薬学研究所・  
プロテオミクス客員教授

今井 一洋



最近，日本人の心をわくわくさせたニュースは，京大の山中教授のノーベル賞受賞であろう。業績等については，既に周知のことでありここには書かない。私が感銘を受けたのは教授の夢を追う姿である。

古来，人は幸福について深い関心を寄せてきた。それは多くの人は人生に幸せを求めているからである。私も10代の半ば頃，W・B・ウルフの「どうしたら幸福になれるか」(岩波新書)を読み，悩み多き現実から幸せの世界に入るための著者の方策に納得したものである。しかし，現在は，夢(将来実現させたいと思っていること，願望)を実現させたときの充実感こそが，人生の幸せを一番感じる時である，と思っている。思うに，山中教授は現在自らの夢を達成したという幸福感を味わっていることであろう。

人は皆若い頃には，いわゆる幸福感を求めるというのではなく，何か大きなことを成し遂げたいという夢を持っていると思う。そしてそれに向かって邁進するのだ

が，年を取るにつれ実現が難しくなって，現実に対応するものに変貌し，夢は小さくなって行く。最後には，自分にとって得になるようにしたいという我欲のみが願望として残るのが一般的である。しかし，山中教授は違う。彼は患者を治癒したいという夢を達成するために外科医を志し，さらに病の根本からの治癒を達成するには研究が必要であると考え，研究に打ち込み，iPSを求め確立した。彼の現在達成した夢の実現は，大きな夢の実現に行き着くための一里塚である。患者の根本治療に行き着くのは先のことであり，最終の夢の達成には多大な時間を必要とする。山中教授はそこに行き着く迄努力をするという。このように，彼はいつまでも大きな夢を追いかける偉大な人であり，多くの人がそのように出来る訳ではなく，私が感銘を受けた理由である。

私も人並みに大きな夢を持っていたが，だんだん小さな夢に変わってきた。しかし，我欲にのみ捕われる程，

## CONTENTS

### ■巻頭言

- ・「大きな夢，小さな夢，そして我欲へ！」  
今井一洋……………1

### ■報文

- ・Combination of Dynamic Hollow Fiber Liquid-phase Microextraction with a Hitachi L-2000 HPLC for the Determination of UV Filters in Cosmetic Products  
Hongyun Yang Haifang Li Masahito Ito  
Jin-Ming Lin Guangsheng Guo Mingyu Ding ……3
- ・質量分析によるラット脳ドーパミンの高感度定量 成田和巳……………10
- ・TEM-EELSによるリン酸鉄リチウムにおけるLiイオン移動機構の解明  
寺田尚平 平野辰巳  
湯浅豊隆 山田淳夫……………16

### ■解説

- ・日立UH5300形ダブルビーム紫外可視分光光度計の特長と測定例  
堀込純 栗田浩二  
和久井隆行 玉島孝弘……………22
- ・日立偏光ゼーマン原子吸光度計ZA3000シリーズツインインジェクションテクノロジーのご紹介  
坂元秀之 米谷明 山本和子  
三浦和代 戸辺早人 西村崇……………26
- ・IM4000形イオンミリング装置のオプション機能紹介  
高須久幸 許斐麻美 上野敦史  
武藤宏史 岩谷徹……………30

- ・SU3500用新型低真空検出器(UVD)の特長と応用

西村雅子 海老根裕太 片根純一  
塩野正道 坂上万里 振木昌成……………37

- 学会ミニファイル……………42

- テクニカルデータ発行ミニファイル……………47

### ■新製品紹介

- ・日立高速液体クロマトグラフ Chromaster5000シリーズ反応LCシステム……………49
- ・日立120 kV TEM HT7700型の標準デジタルカメラ高精細化……………50
- ・ZONEサンプルクリーナー……………51
- S.I.naviのご紹介……………52

歳を取ってはいない。私は十年程前に、分析化学の一分野としての生命分析化学<sup>1)</sup>を提案した。生体分子の量的変動を把握して生命活動を理解しようとする分野である。この分野を、人口に膾炙したものにするのが私の現在の夢である。そのためには、分野の内容を自ら示さねばならず、現在奮闘中である。

以前より光分析に興味があり、化学発光・蛍光発光に関する研究を続けてきた。例えば、化学発光反応を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のポストカラム検出法として使用して、化学神経伝達物質のカテコールアミン類 (CA) の超高感度 (サブフェモトモル) 分離・定量に成功した。これを生命分析化学研究に適用した。生体恒常性 (ホメオスタシス) 維持機能を知りたいと考えたときに、通常は僅かな変動が閾値内で起こり、変動を捉えるのは難しい。そこで、血圧降下薬を動物に投与 (負荷を懸ける) し血圧を下げると、生体は圧受容体反射が働き元の血圧に戻そうとする (恒常性を保つ) ため、交感神経機能が大きく働きCAが増量し血中に漏れ出てくる。それを前記方法で定量的に測定し、変動解析を行い、生命維持に必要なホメオスタシスの一種である血圧調節機構の一部を解明でき、治療への示唆を与えることができた<sup>2)</sup>。

タンパク質は本来無蛍光分子である。これに、長年開発してきた発蛍光試薬 (それ自身は無蛍光で反応後に蛍光物質に変わる試薬) と化学反応させると蛍光タンパク質に変化する。これを蛍光検出器付きHPLCにて分離・検出する方法を開発した。すなわち、試料AとBを別々に反応させて得た蛍光タンパク質混合物を、HPLC分離・検出後、得られたクロマトグラムを比較し、同じピークで高さ比が変動したタンパク質ピークのみを分取し、これを酵素水解しnano-LC-MS/MSに付すと、分解ペプチドのアミノ酸配列が分かり、データベース照合すると、元のタンパク質の同定が出来るというプロテオーム解析法である。これは、従来、外国メーカーが推奨する二次元電気泳動—MS/MS解析法やMS/MSによるショットガン解析法に比べて、再現性のある定量的プロテオーム解析法である。そのため、乳がん、大腸がんのバイオマーカーを見いだすことが出来た<sup>3, 4)</sup>。さらに、共同研究者の一番ヶ瀬講師が発案した新たな戦略にも組み込むことが出来た。生体内にあるスーパーオキシド消去酵素 (SOD1) をノックアウトした細胞は、スーパーオキシドの細胞内恒常性が破綻する。最終的にアクチンフィラメントの分解、微小管重合の分解が進み、細胞骨格が破壊され死に至るが、生体内ではそれに対抗して、アクチンフィラメントの形成と重合を促進するタンパク質が増加する様子を定量的に明らかに出来た。他に明らかになった変動タンパク質の流れを統

合して、システムバイオロジー構築に向けての一助とすることが出来た<sup>5)</sup>。このような生命分析化学研究に多くの方が参加され、活躍されることを期待している。

ところで、我々は、装置として蛍光・発光検出器、HPLC、MS/MSを主として使用してきた。最近、感じることは、昔に比べ、国内計測器メーカーの夢がなくなってきたのではないかという懸念である。単に海外メーカーの改良に合わせて、それに追随することで満足している (我欲に走る) 国内メーカーが多いのではないか。その原因の一つは、新たな投資をする程の余力がないため、真似する方が得策であるということかもしれない。しかし、日本の国力を増すためには、独自のものを作るという気構えを持ち続けなくてはならない。各メーカーの創業時の大きな夢はどうなったのか？あまりにも現状に甘んじてはいないか？眼前の利益だけで満足していないか？我々弱小グループのささやかな要望 (10時間以上継続使用できるHPLCの作製、簡便なHPLC直結MS/MSの作製) も無視されているのが現状である。どうか国内メーカーには、いつまでも大きな夢を持ち続けて、日本人に感銘を与えて欲しいと思う。

#### 参考文献：

- 1) Kazuhiro Imai, Analytical Sciences, 14, 257-264 (1998).
- 2) Kazuhiro Imai, Makoto Tsunoda, et al., Proceedings of Japan Academy, 75, Ser.B, 224-227 (1999).
- 3) Tomoko Ichibangase and Kazuhiro Imai, Biological Pharmaceutical Bulletin, 35, 1393-1400 (2012).
- 4) Akiyo Koshiyama and Tomoko Ichibangase, et al., Biomedical Chromatography, DOI: 10.10021 bmc. 2811 (2012).
- 5) Tomoko Ichibangase, Yasuhiro Sugawara et al., PLOS ONE, e45483 (2012). <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045483>

#### 著者略歴

**今井 一洋** (いまい かずひろ)

東京大学薬学部卒業 (昭和40年) 後、同薬学部助手、同助教授、同教授、同大学院薬学研究科長を経て定年、東京大学名誉教授。その後、武蔵野大学薬学研究所長、同薬学部長を経て定年、現在、武蔵野大学薬学研究所・プロテオアナリシス客員研究部門客員教授。

賞 罰：

平成 9年10月 平成 9年度日本分析化学会賞受賞  
平成11年11月 マドリッド・コンプルテンセ大学名誉博士号受章  
平成15年 3月 平成14年度日本薬学会賞受賞  
平成15年 3月 ゲント大学名誉博士号受章

## Combination of Dynamic Hollow Fiber Liquid-phase Microextraction with a Hitachi L-2000 HPLC for the Determination of UV Filters in Cosmetic Products

Hongyun Yang<sup>1,2</sup>, Haifang Li<sup>2</sup>, Masahito Ito<sup>3</sup>, Jin-Ming Lin<sup>2</sup>, Guangsheng Guo<sup>1</sup> and Mingyu Ding<sup>2</sup>

### 1. Introduction

Sunscreen cosmetic products are widely used in the world to prevent radiations emitted by solar radiation, and especially UV radiation (UVR) which lead to sunburns and carcinogenesis<sup>[1, 2]</sup>. Sunscreen cosmetic products generally are prepared as creams, lotions, emulsions or sprays. A variety of UV filters are added into the cosmetics as strong absorbers, reflectors or scatters of UVR<sup>[3-6]</sup>. It has been documented that organic UV filters can result in some dermatological reactions during exposure to the sunlight<sup>[7]</sup>, and become environmental pollutants when they are discharged into the living waste water<sup>[8-10]</sup>. Lists of those approved UV filters with their maximum allowed concentrations in commercial products have been set by regulatory authorities in USA, Europe and Japan<sup>[11-13]</sup>. Therefore, it is necessary and urgent to establish convenient quantification methods for determination of UV filters in cosmetic products.

In recent years, various pretreatment and analytical methods have been used to determine UV filters<sup>[14, 15]</sup>. Based on the literature, liquid-liquid extraction (LLE)<sup>[16, 17]</sup> and solid-phase extraction (SPE)<sup>[18-20]</sup> as the most commonly sample pretreatment methods have been used to extract UV filters. Other extraction techniques such as cloud-point extraction<sup>[21]</sup>, supercritical fluid extraction<sup>[22]</sup>, microwave assisted extraction<sup>[23]</sup> have also been proposed for concentration of UV filters. The extraction pretreatments always combine with high performance liquid chromatography (HPLC)<sup>[21-27]</sup>, liquid or gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)<sup>[16, 21, 28-30]</sup> or size-exclusion liquid chromatography<sup>[31]</sup>.

With recent development of microextraction



Prof. Jin-Ming Lin



Dr. Haifang Li

techniques, solid phase microextraction (SPME)<sup>[32]</sup> and liquid phase microextraction<sup>[33]</sup> in terms of high speed, high sensitivity and convenient have been recommended to be more convenient techniques than LLE and SPE. The most widely used extraction materials of SPME are fragile and expensive. Furthermore, carry-over of sample is sometimes difficult to be eliminated for extraction and injection performed in different steps. Single-drop LPME (SDME) methods<sup>[24]</sup> based on a droplet of a few microliters of organic solvent at the tip of a syringe needle have become the most extended approaches. However, the droplet easily dislodges from the needle tip of the syringe during extraction, especially in the case of vigorous stirring.

Hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) technique based on the principle of membrane liquid microextraction<sup>[34]</sup>, is employed as an alternative liquid microextraction. The micropores of hollow fiber can confine organic liquid solvent inside of the hollow fiber, which prevent solvent loss during extraction. The large molecules and extraneous materials in sample can be prevented due to the selective transmission of the micropore membrane. Furthermore, micropore structure increases a large specific surface and supports a more amount of extraction phase volume. HF-LPME is an efficient sampling pretreatment method with many advantages such as simplify, high efficiency and low cost. The HF-LPME can be classified into static HF-LPME and dynamic HF-LPME. The static HF-LPME is performed by jointing a hollow fiber on a microsyringe



needle and immersing into a stirred sample solution<sup>[35]</sup>. Dynamic HF-LPME was developed by continuous injection of sample solution into the extractor to well contact with the acceptor phase, which contribute to high extraction efficiency and shorten extraction time. Ouyang et al<sup>[36]</sup> has introduced the kinetic calibration for automated HF-LPME.

In the present study, we developed a simple dynamic HF-LPME device for pretreatment of five UV filters in cosmetic products, which followed by HPLC analysis. The cannular extractor was assembled to realize continuous-flow microextraction. The sheath structure of the extractor made the sufficient contact between the acceptor phase and aqueous sample and led to high extraction efficiency. The main parameters of dynamic HF-LPME were investigated and optimized. Under the optimized HF-LPME conditions, the proposed dynamic HF-LPME presented good extraction efficiency for five UV filters in cosmetic products.

## 2. Experimental

### 2.1 Reagents and materials

2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulphonic acid (BZ4, >96%), oxybenzone (BZ3, >98%), 2-ethylhexyl-4-dimethyl aminobenzoate (ODP, >98%), 2-ethylhexyl-4-methoxy-cinnamate (OMC, >99%), 2-ethylhexyl salicylate (ES, >99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and were used as standards. The chemical properties of the standards are listed in Table 1.

The solvents of toluene, n-hexane, propylene glycol monomethyl ether acetate (PMA), and dichloromethane were of HPLC grade and were obtained from Sigma-Aldrich (Phillipsburg, NJ, USA). HPLC-grade methanol from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) and de-ionized water purified by a Milli-Q ultrapure purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) were used as mobile phase in HF-LPME. Acetone and other reagents were purchased from Beijing Chemical Works at analytical grade.

The Q3/2 Accurel polypropylene (pp) hollow fiber membrane (600  $\mu\text{m}$  i.d., 200  $\mu\text{m}$  wall thickness, and 0.2  $\mu\text{m}$  pore size) was purchased from Membrane GmbH (Wuppertal, Germany). Disposable flow control valve lines for the visiprep<sup>TM</sup>-DL (1.0 mm i.d., 500  $\mu\text{m}$  wall thickness, and 50 mm length) from Supelco (Bellefonte, USA) were used as external tube. The 10  $\mu\text{L}$  syringe (Shanghai, China) was attached with the hollow fiber to fill in and recover

| Name <sup>a</sup>                           | Structure | Log $K_{ow}$ <sup>b</sup> | $pK_a$ <sup>b</sup> |
|---------------------------------------------|-----------|---------------------------|---------------------|
| Benzophenone-4 (BZ4)                        |           | 0.89                      | -0.7                |
| Benzophenone-3 (BZ3)                        |           | 3.79                      | 7.56                |
| 2-Ethylhexyl-4-dimethyl aminobenzoate (ODP) |           | 6.15                      | 2.39                |
| 2-Ethylhexyl-4-methoxy Cinnamate (OMC)      |           | 5.80                      | -                   |
| 2-Ethylhexyl salicylate (ES)                |           | 5.97                      | 8.13                |

<sup>a</sup> Name: International Nomenclature for Cosmetic Ingredient (INCI) elaborated by CTFA and COLIPA.

<sup>b</sup> Values obtained from SciFinder Scholar Database, <http://www.cas.org/products/sfacad/>.

the acceptor phase. The 1.0 mL syringe was used to continuously introduce the sample into the extractor. Two micro syringe pumps (Baoding, China) were used to inject the solutions during extraction.

### 2.2 Chromatography

A Hitachi L-2000 HPLC system, supplied by Hitachi High-Technologies (Tokyo, Japan), consisted of a wavelength UV detector (Hitachi L-2400) with a standard flow cell, a quaternary pump with online degasser (Hitachi L-2130), an autosampler (Hitachi L-2200) and a column oven (Hitachi L-2300). The separation was performed on a reversed phase  $C_{18}$  HPLC column (Lichrospher ODS, 5.0  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  250 mm, Merck Millipore, China). The mobile phase was a mixture of methanol-pure water (80:20, v/v). The five filters were separated within 25 min at flow rate of 0.8 mL  $\text{min}^{-1}$ . The column oven was controlled at 40  $^{\circ}\text{C}$  and UV detector was set at 310 nm.

### 2.3 Preparation of standard solutions and cosmetic samples

The stock solution was prepared in methanol weekly. The concentrations of BZ4, BZ3, ODP and OMC were 1000 mg  $\text{L}^{-1}$ , while ES was 5000 mg  $\text{L}^{-1}$ , respectively. And the stock solution was stored in the dark at -15  $^{\circ}\text{C}$  to minimize photodegradation of the

UV filters. The working standard solution (0.1–500 mg  $\text{L}^{-1}$ ) was prepared daily with appropriate dilution of the stock solution with methanol.

All of the cosmetic samples were purchased from local markets. Sample of about 0.010 g was dissolved in 2.0 mL n-hexane completely through ultrasonic at ambient temperature for 5 min, then centrifugated at 5000 rpm for 3.0 min. The supernatant was filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane and nitrogen dried at 60  $^{\circ}\text{C}$ , and then diluted to 100 mL with de-ionized water. The prepared sample solution was stocked for the HF-LPME procedure.

### 2.4 Dynamic HF-LPME device

The extraction device used in this study consisted of external tuber, hollow fiber and microsyringe pump. Fig. 1 shows schematic illustration of the HF-LPME extraction system. Q3/2 Accurel polypropylene hollow fiber was cut into 3.7 cm hollow fiber segments. Those hollow fiber segments ultrasonically cleaned in acetone for 15 min and dried in the air. A disposable flow control valve line for the visiprep<sup>TM</sup>-DL as external tube was installed on the sample injection syringe. Then aqueous sample of 0.6 mL was loaded into the syringe. The hollow fiber attached onto the microsyringe needle was inserted into the visiprep<sup>TM</sup>-DL external tube, and then 10  $\mu\text{L}$  acceptor phase was filled into the hollow fiber. The sample was continuously injected into the extractor

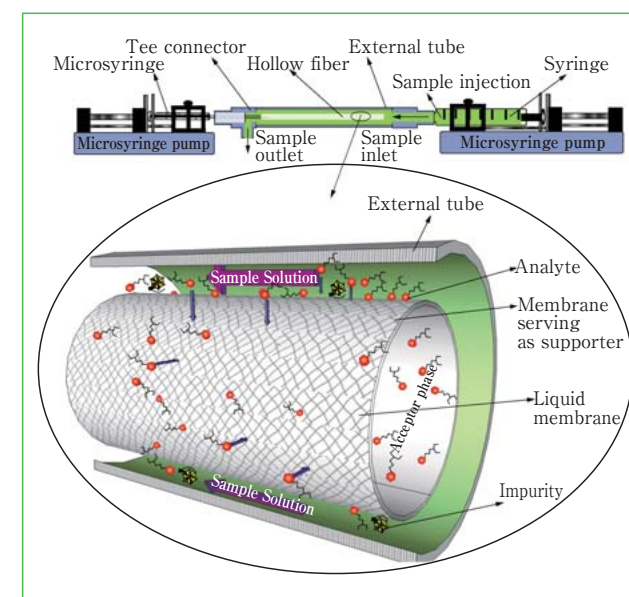


Figure 1 Schematic illustration of HF-LPME method. The cannular extractor was assembled by mounting a hollow fiber inside an external tube with a tee-connector.

by the pump. During the extraction, the analytes in the aqueous sample were largely extracted into the organic solvent by diffusion. The analyze-enriched acceptor phase was directly collected into the micro-syringe after the extraction. Finally, 5.0  $\mu\text{L}$  acceptor phases was used for HPLC analysis. Different acceptor phases and different flow rates were investigated. The extraction was preformed at ambient temperature (25  $^{\circ}\text{C}$ ).

## 3. Results and Discussion

This dynamic HF-LPME relying on membrane liquid microextraction is an excellent technique for extraction. The organic acceptor phase was immobilized in the micropores of the hollow fiber to form liquid membrane. The targets were extracted from the aqueous sample matrix into the organic liquid membrane on the wall of hollow fiber, and then diffused into the lumen of the hollow fiber. The process of mass transfer is shown in Fig. 2.

In this study, in order to optimize the dynamic HF-LPME for the determination of five UV filters in cosmetic products, several parameters controlling extraction efficiency including types of extraction solvent, sample volume, sample flow rate, pH values and ionic strength were assessed. A series of 0.6 mL of sample solution spiked with 5.0 mg  $\text{L}^{-1}$  of ES and 1.0 mg  $\text{L}^{-1}$  of the other four UV filters were extracted in triplicate.

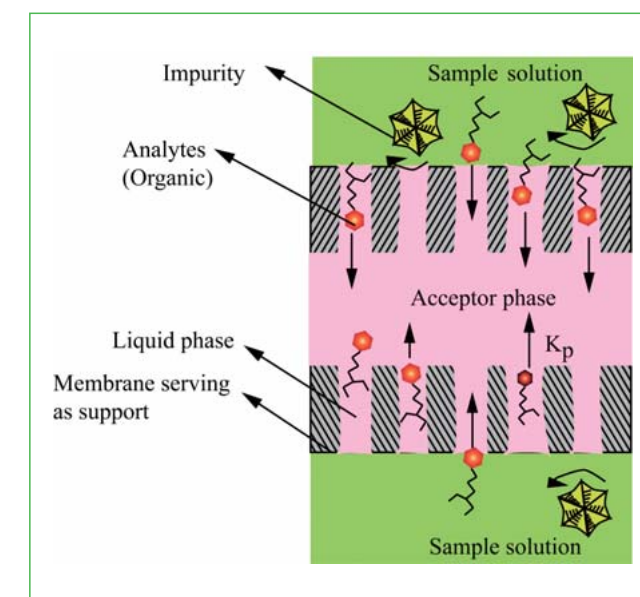
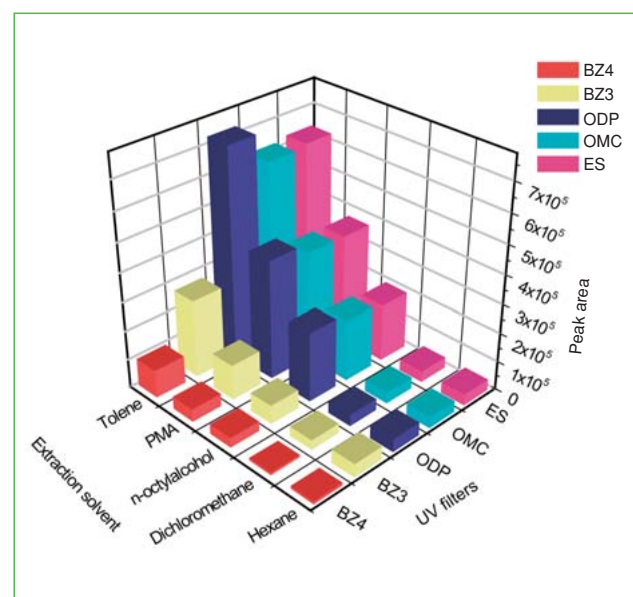


Figure 2 Schematic representation of HF-LPME method. The analyte diffuses across a microporous membrane while in contact with an organic acceptor.  $K_p$  is defined as the partition coefficient of the analyte between the aqueous and organic phase.

### 3.1 Effect of selection of acceptor phase

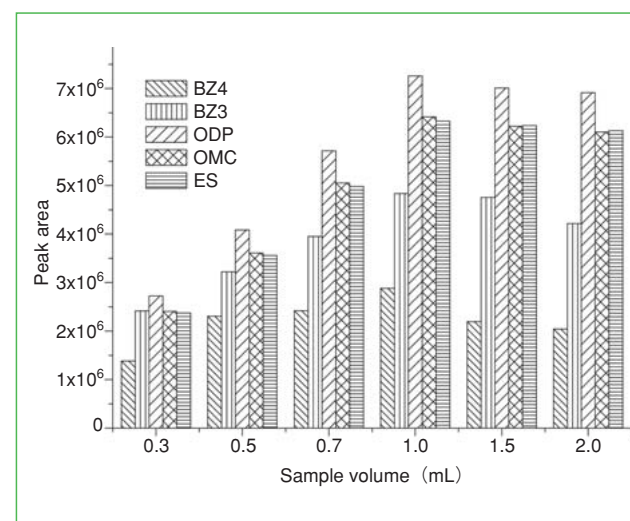
Organic solvent serving as acceptor phase was an essential consideration for HF-LPME. The organic solvent used in HF-LPME must satisfy several criteria. Firstly, the organic solvent should have good affinity for hollow fiber on which thin liquid membrane can be formed. Secondly, the organic solvent should possess a high distribution coefficient for the analytes and be immiscible with water. Thirdly, the organic solvent should provide appropriate extraction selectivity and high extraction recovery. Finally, the organic solvent should be compatible with HPLC analysis. Given on the above consideration, n-hexane, toluene, and 1-octanol, which have been the most commonly used extraction solvents in LPME, were estimated in our study. **Fig. 3** shows the performance of the organic solvents for extraction of five UV filters under identical conditions. The results indicated that toluene was the most suitable as the acceptor phase with the highest extraction efficiency. However, the extraction efficiencies of n-hexane, dichloromethane, 1-octanol and PMA were much lower than those of toluene. The good compatibility of the hollow fiber and the low solubility in water were contributed to a high enrichment factor for UV filters. Furthermore, the hollow fiber could become transparent when it is filled with toluene, which made the operation easier. Thus, toluene was chosen for the further experiments.



**Figure 3** Effects of different extraction solvent on HF-LPME method. Extraction conditions: 0.6 mL of sample containing 25 mg L<sup>-1</sup> of ES, 5.0 mg L<sup>-1</sup> of other four target analytes, extracted by toluene at 3.0 mL h<sup>-1</sup>, ambient temperature.

### 3.2 Effect of sampling volume

HF-LPME is a process dependent on equilibrium rather than exhaustive extraction. So extraction efficiency is normally controlled by the distribution coefficient of the analyte between the aqueous phase and organic acceptor phase. The adsorption capacity of organic phase was also an important parameter for 10 µL organic acceptor phase. Sample solution containing 25 mg L<sup>-1</sup> of ES, 5.0 mg L<sup>-1</sup> of the other four UV filters was extracted. The different sample volumes in the range of 0.5–2.0 mL were performed. As shown in **Fig. 4**, the extraction efficiency increases with sample volume increasing and reaches the maximum up to 1 mL volume. When the sample volume higher than 1 mL, the extraction efficiency was not further increased. This is due to that the extracted amount of UV filters was increased with the sampled volume increasing until the extraction reached balance. On the other hand, acceptor phase slightly percolated through the micropores of hollow fiber during the sample continuous injection, which may lead to a little decrease of extraction efficiency. The adsorption capacities of 10 µL toluene were reached to 4.0 µg of BZ4, 4.5 µg of BZ3, 4.7 µg of ODP and OMC, and 23 µg of ES, respectively.



**Figure 4** Effect of extraction sample volume on the HF-LPME method. Extraction conditions: sample containing 25 mg L<sup>-1</sup> of ES, 5.0 mg L<sup>-1</sup> of other four target analytes, extracted by toluene at 3.0 mL h<sup>-1</sup>, ambient temperature.

### 3.3 Effect of flow rate

Generally speaking, the extraction efficiency could be enhanced with the increasing extraction time before the equilibrium reached. The extraction time could be controlled by the injection flow rate

of the sample in this study. Therefore, the flow rate of the sample solution played a significant effect on the extraction of the dynamic HF-LPME. The flow rate in the range of 0.5–7.0 mL h<sup>-1</sup> was considered and the result showed that the extraction of five UV filters have no significant fluctuation at the range of low rate (<2.0 mL h<sup>-1</sup>). However, the extraction was curtailed when the flow rate was higher than 2.0 mL h<sup>-1</sup>. This result might be due to the fact that the extraction equilibrium could not be reached balance under the very high flow rate condition. Finally, the flow rate of 2.0 mL h<sup>-1</sup> was chosen for subsequent experiments.

### 3.4 Effect of salt concentration

The addition of salt to aqueous sample decreases the solubility of analytes in the sample [34] and increases their partition into the organic solvent through changing solvent environment. In this study, the effect of ionic strength on the extraction was evaluated by addition of different concentration of NaCl (0–20 %, w/v) solutions to the sample. The best extraction efficiencies were achieved without addition of the NaCl and the extraction efficiencies of five UV filters decreased dramatically as more NaCl was added. The results indicated that the addition of NaCl had a significant negative effect for extraction. The extraction efficiency of BZ4 decreased slightly with the ionic strength increase compared with other four UV filters. At concentration up to 20 %, BZ3 can not be extracted. This phenomenon could be assumed that apart from the “salting-out”, the physical properties of the organic membrane were changed with the presence of salt, which reduced the diffusion rates of the analytes into the acceptor phase. The viscosity of the sample was also changed at high concentration of salt, which affected the diffusion rate. Thus, the best conditions for the HF-LPME were performed without the addition of NaCl.

### 3.5 Effect of pH of sample

The extraction efficiency and selectivity of the HF-LPME can be optimized by the pH values of the sample solution. The effect of sample pH values on the extractability of the target analytes by HF-LPME was investigated from 1.0 to 8.0. The result indicates that the extraction efficiencies of BZ3, BZ4 and ODP were decreased significantly flowing with pH values increase. The pH values had positive effects on the extraction efficiency of OMC and ES. This

phenomenon was in accordance to the pK<sub>a</sub> and could be explained by the molecular properties of the five UV filters. According to the chemical structure of five UV filters (**Table 1**), most of them have the hydrophilic groups and the UV filters were protonated at high pH values, which make their partition much more into the aqueous phase and reduce their transportation into the organic solvent. Thus, UV filters display a high affinity for organic solvent in low pH values and good extraction efficiency was achieved in acidic pH environment. The chemical structure of OMC indicates that only hydrophobic groups existed can not protonated and the molecules of OMC and ES could hydrolyze easily in acidic pH environment, leading to low response. Then it was observed that the better extraction efficiency for five UV filters were accomplished at pH value of 2 after taking all factors into consideration. Therefore, pH value of 2 was maintained throughout all the work.

### 3.6 Method evaluation

As shown before, the best extraction efficiency was obtained under the following condition: 0.6 mL of sample solution at no salt addition in acidic environment, acceptor phase of toluene, sample injection flow rate at 2 mL h<sup>-1</sup>. Under the optimized conditions, limits of detection (LODs), linearity and relative standard deviations (RSDs) were investigated. The calibration curves were constructed by plotting the mean peak areas against respective concentration (mg L<sup>-1</sup>) as listed in the **Table 2**. Good correlation coefficients (R<sup>2</sup>) with excellent linearity for target analytes were higher than 0.9960.

**Table 2** Analytical characteristics of the method

| UV filters | Time (min) | Range (mg L <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> | LOD (ng L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> | RSD (%) <sup>b</sup> | F <sup>c</sup> |
|------------|------------|-----------------------------|----------------|----------------------------------------|----------------------|----------------|
| BZ4        | 2.31±0.01  | 0.5-500                     | 0.9978         | 1.00                                   | 4.5                  | 24             |
| BZ3        | 10.67±0.04 | 0.5-500                     | 0.9960         | 20.00                                  | 5.1                  | 34             |
| ODP        | 14.99±0.01 | 0.5-500                     | 0.9960         | 15.00                                  | 5.2                  | 57             |
| OMC        | 17.73±0.03 | 0.5-500                     | 0.9970         | 10.00                                  | 4.8                  | 55             |
| ES         | 20.92±0.02 | 2.5-2500                    | 0.9965         | 100.00                                 | 5.0                  | 53             |

<sup>a</sup> S/N=3; <sup>b</sup> N=3; <sup>c</sup> F=Enrichment factor

The LODs (S/N=3) of the five UV filters were found in the range from 1 to 100 µg L<sup>-1</sup>. A blank sample was carried out every time to confirm that no carryover occurred when determining LODs. The RSDs (n=3) for the five UV filters were lower than 5.2 %. All the results were calculated and summarized in **Table 2**. Compared to the traditional SPE



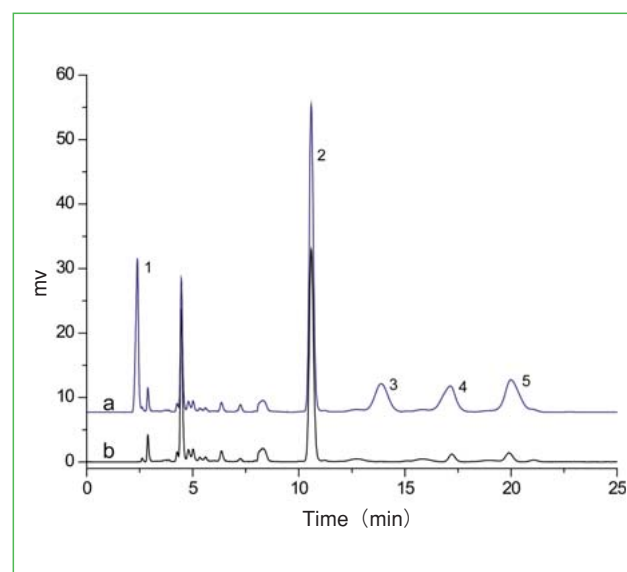
method, the proposed method exhibited better selectivity with comparative sensitivity and recovery. The reason was that the undesirable large molecules can not cross through the micropores of the hollow fiber. To investigate the extraction recovery, the method of standard additions was applied to all sunscreen cosmetic by spiking with 5 mg L<sup>-1</sup> ES and 1 mg L<sup>-1</sup> of other analytes, respectively. The relative recoveries of the five UV filters ranged between 80 % and 102 %.

### 3.7 Extraction of UV filters in cosmetic products

In order to test the applicability of the HF-LPME method to real sample, the proposed procedure was applied to analysis the cosmetics purchased from local super market. After the pretreatment of original cosmetic samples, all the cosmetic products were extracted under the optimum HF-LPME conditions and the existent amount of the UV filters in the cosmetics were determined and listed in **Table 3**. The OMC was contained in all the test cosmetic products. BZ3 and ES were presented in most of the test cosmetic products. Whereas, ODP was not found in some analyzed samples. The determined results were in the accordance to the service condition of the UV filters. Hence, HF-LPME method enables the precise determination of UV filters in cosmetic products. **Fig. 5** shows a chromatogram of a cream sample with and without spiking of 5 mg L<sup>-1</sup> ES and 1 mg L<sup>-1</sup> of the other four filters after HF-LPME extraction.

### 4. Conclusions

In the present study, a simple and effective dynamic HP-LPME method was introduced for determination of UV filters in cosmetic samples combined with HPLC analysis. High extraction efficiency was obtained by continuous injection of sample into the extractor to accelerate the extraction. This dynamic HF-LPME method with the advantages of rapid speed, low cost, and convenient operation were successfully applied to the investigation of UV filters in cosmetic products.



**Figure 5** Extraction of a blank cream and a cream spiked with 5.0 mg L<sup>-1</sup> ES and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of other four target analytes by dynamic HF-LPME with HPLC-UV. (a) Cream sample analyzed by HF-LPME-HPLC-UV. (b) Spiked cream sample analyzed by HF-LPME-HPLC-UV. (1) BZ4, (2) BZ3, (3) ODP, (4) OMC, (5) ES.

**Table 3** Five UV filters found in real cosmetic samples after applying the proposed HF-LPME method

| Cosmetic products       | UV filters in cosmetics (g 100g <sup>-1</sup> ) |      |      |      |      |
|-------------------------|-------------------------------------------------|------|------|------|------|
|                         | BZ4                                             | BZ3  | ODP  | OMC  | ES   |
| Cream <sup>1</sup>      | N.D. <sup>a</sup>                               | 2.02 | N.D  | 2.36 | 4.35 |
| Cream <sup>2</sup>      | 2.56                                            | N.D  | 4.32 | 3.28 | N.D  |
| Cream <sup>3</sup>      | 2.79                                            | N.D  | N.D  | 1.58 | 3.12 |
| Cream <sup>4</sup>      | 0.60                                            | N.D  | N.D  | 4.42 | 2.03 |
| Cream <sup>5</sup>      | 0.54                                            | N.D  | N.D  | 4.20 | N.D  |
| Lotion <sup>1</sup>     | N.D                                             | 2.35 | N.D  | 2.46 | 2.82 |
| Lotion <sup>2</sup>     | N.D                                             | 3.42 | N.D  | 2.42 | N.D  |
| Lotion <sup>3</sup>     | 1.42                                            | 2.96 | N.D  | 3.62 | 4.18 |
| Lotion <sup>4</sup>     | 2.32                                            | 4.51 | N.D  | 3.88 | 4.06 |
| Lipstick <sup>1</sup>   | N.D                                             | N.D  | 0.8  | 4.38 | N.D  |
| Lipstick <sup>2</sup>   | 1.48                                            | N.D  | N.D  | 4.39 | N.D  |
| Foundation <sup>1</sup> | N.D                                             | 4.12 | N.D  | N.D  | 3.23 |
| Foundation <sup>2</sup> | 2.82                                            | 4.34 | N.D  | 4.04 | N.D  |
| Home made <sup>1</sup>  | 2.43                                            | 3.36 | 4.03 | 4.16 | 7.08 |
| Home made <sup>2</sup>  | 1.30                                            | 1.68 | 1.26 | 1.54 | 5.70 |

<sup>a</sup> N.D. not detected

### 5. Acknowledgements

This work was supported by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20110002110052).

### References

- [1] van der Rhee H J, de Vries E, Coebergh J W W., *Eur J Cancer*, 2006, 42: 2222-2232
- [2] Armstrong B K, Kricker A., *J Photoch Photobio B*, 2001, 63: 8-18
- [3] Serpone N, Dondi D, Albini A. *Inorg Chim Acta*, 2007, 360: 794-802

- [4] Chatelain E, Gabard B. *Photochem Photobiol*, 2001, 74: 401-406
- [5] Sayre R M, Dowdy J C, Gerwig A J, Shields W J, Lloyd R. V. *Photochem Photobiol*, 2005, 81 (2): 452-456
- [6] Imanaka N, Masui T, Hirai H, Adachi G. *Chem Mater*, 2003, 15: 2289-2291
- [7] Norval M, Cullen A P, de Gruijl F R, Longstreth J, Takizawa Y, Lucas R M, Noonan F P, van der Leun J C. *Photoch Photobio Sci*, 2007, 6: 232-251
- [8] Diaz-Cruz M S, Barcelo D. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2009, 28(6): 708-717
- [9] Diaz-Cruz M S, Llorca M, Barcelo D. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2008, 27 (10): 873-887
- [10] Giokas D L, Salvador A, Chisvert A. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2007, 26: 360-374
- [11] European Directive 76/768/EEC and its successive amendments, basic act 31976L0768
- [12] Japanese, SCI, Japanese Standard of Cosmetic Ingredients, Yakuji Nippo Ltd., Tokyo, 1985
- [13] FDA, Department of Health and Human Services, 21CFR Parts 310, 325, 700 and 740, RIN 0910-AA01, Sunscreen Drug Products for over-the-counter Human Use Final Monograph, Federal Register, Rules and Regulations, 1999
- [14] Salvador A, Chisvert A. *Anal Chim Acta*, 2005, 537: 1-14
- [15] Salvador A, Chisvert A. *Anal Chim Acta*, 2005, 537: 15-24
- [16] Tarazona I, Chisvert A, Leon Z, Salvador A. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 4771-4778
- [17] Rodil R, Schrader S, Moeder M. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 4887-4894
- [18] Oliveira H M, Segundo M A, Lima J L F C, Miro M, Cerda V. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 3575-3582
- [19] Giokas D L, Sakkas V A, Albanis T A. *J Chromatogr A*, 2004, 1026: 289-293
- [20] Negreira N, Rodriguez I, Ramil M, Rubi E, Cela R. *Anal Chim Acta*, 2009, 654: 162-170
- [21] Giokas D L, Sakkas V A, Albanis T A. *J Chromatogr A*, 2005, 1077: 19-27
- [22] Scalia, S. *J Chromatogr A*, 2000, 870: 199-205
- [23] Shih Y, Cheng F C. *J Chromatogr A*, 2000, 876: 243-246
- [24] Vidal L, Chisvert A, Canals A, Salvador A. *Talanta*, 2010, 81: 549-555
- [25] Gaspar L R, Goncalves P M B. *Talanta*, 2010, 82: 1490-1494
- [26] Schakel D J, Kalsbeek D, Boer K. *J Chromatogr A*, 2004, 1049: 127-130
- [27] Smyrniotakis C G, Archontaki H A. *J Chromatogr A*, 2004, 1031: 319-324
- [28] Moeder M, Schrader S, Winkler U, Rodil R. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 2925-2932
- [29] Negreira N, Rodriguez I, Rubi E, Cela R. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 5895-5902
- [30] Rodil R, Moeder M. *J Chromatogr A*, 2008, 1179: 81-88

- [31] Rastogi S C, Jensen G H. *J Chromatogr A*, 1998, 828: 311-316
- [32] Negreira N, Rodriguez I, Ramil M, Rubi E, Cela R. *Anal Chim Acta*, 2009, 638: 36-44
- [33] Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2010, 29(1): 1-14
- [34] Hylton K, Mitra S. *J Chromatogr A*, 2007, 1152: 199-214
- [35] Zhang J, Su T, Lee H K. *J Chromatogr A*, 2006, 1121: 10-15
- [36] Ouyang G, Pawliszyn J. *Anal Chem*, 2006, 78: 5783-5788

## 質量分析によるラット脳ドーパミンの高感度定量

Quantitative analysis of the rat brain dopamine using mass spectrometry.

成田 和巳\*

### 1. はじめに

質量分析装置(MS)は質量荷電比を測定することにより分子量を求める装置である。近年、分析方法の多様化とデータ解析ソフトの向上により、活躍する場面が急速に広がりつつある。たとえばタンパク質などの大きな分子にも適応可能なイオン化法が開発され液体クロマトグラフ(LC)と連結してLC/MSとして使用することにより、生体試料を対象とした物質定量へと可能性が広がった。

医学、生物学の分野で物質定量を行う際の代表格として、RIA法、ELISA法がある。目的物質に対する特異的な抗体が必要だが、感度は非常に良く必要な機器類は汎用機器として出回っていて、新たに特殊な機器を必要としない利点がある。

質量分析器は機械的に物質の質量を測定するので、抗体のような目的物質に対応した特異的な物質は必要ないのでその適応範囲は広く分析可能な物質も多くなる。また測定した結果が、試料に含まれる様々な物質の質量と存在量を反映した質量スペクトルとして得られ、一度の分析で多種の物質を同時に測定する網羅的分析が可能になる。RIAやELISAと比べても測定感度は肩を並べるほどに向上してきているが、機器が高価格なためそれほど普及していないというのが現状だ。それでも低価格を実現させた高性能な機器が商品化されてきているので、近い将来には医学、生物学における物質定量法の主要な選択肢の一つとなるだろう。

質量分析器の性能を生かして高感度分析を行おうとすると様々な問題点に直面する。とりわけ大きな問題となるのが、質量分析では試料中の様々な物質が質量スペクトルとして出力されるので、結果はピーク数が非常に多くかなり複雑なスペクトルとなることだ。とくに微量分析を試みる場合、目的物質由来のピークを識別するのが困難になる。このたび科学技術振興機構(JST)育成研究<sup>(\*)1)</sup>にてその問題を解決できるような質量分析用の新規標識試薬を開発し、そしてドーパミンの高感度分析に成功したのでこの場をお借りして紹介する。

### 2. 日立ハイテック 液体クロマトグラフ質量分析計

ここで用いたLC/MSは日立ハイテックノロジーズ製

NanoFrontier eLD (nano-LC/MS)で、LC部はnl/minという非常に微量の流速をコントロールすることができる。そしてカラムにはモノリス製の内径50 μmという従来のマイクロLCに使用されるカラムと比べ1/100の極細カラムを使用している。質量分析部にはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を採用しているので、nano-LCの極小流速による濃縮効果により、質量分析の感度を格段に上げることができる。



成田 和巳

### 3. 質量分析用の新規標識試薬

標識試薬としてアミン反応性をもつピリリウムを基本骨格とした新規物質(PyII)<sup>(\*)2)</sup>を開発した。ピリリウムはアミノ基と反応し共有結合を形成する。生体内の物質にはタンパク質やペプチド、カテコールアミンなどのアミン類といったアミノ基を有するものが多いので、ピリリウムはそれらの標識試薬として有望だ。そこでピリリウムのアミノ基に対する反応性を保ちつつ炭化水素の側鎖を付加することにより、分子内の炭素原子数を13個に増やした新規物質PyIIを開発した。そしてPyIIに安定同位体<sup>13</sup>Cを組み込み同位体標識試薬を作製した。

ここで質量分析器と同位体標識試薬を組み合わせ使用することの有用性につて、ピリリウムを例に簡単に説明する。図1にピリリウム環の構造を示す。ピリリウム分子には炭素原子が5個含まれている。炭素原子は<sup>12</sup>Cだが、天然には安定同位体として<sup>13</sup>Cが約1%存在する。そして物質を合成する際に原料として<sup>13</sup>Cを用い、任意の個数の<sup>13</sup>Cを目的物に組み込むことができる。例

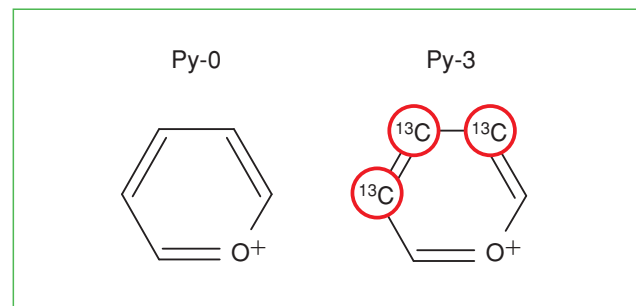


図1 ピリリウムの基本構造(左)と安定同位体の挿入例(右)

として安定同位体<sup>13</sup>Cを3個組み込んだものを右側に示す。これら二つの物質には分子量差3が生じる。左側の<sup>13</sup>Cの組み込まれた個数が0個のピリリウム(Py)をPy-0、右側の<sup>13</sup>Cが3個組み込まれたものをPy-3と表記することにする。図2ではこれを用いるサンプル(図中の星形の物質)をPy-0で、別のサンプルをPy-3と反応させ、標識後に混合して同時にLC/MS分析する。Py-0で標識された化合物もPy-3で標識された化合物も化学特性は等しいので、LCによるカラム溶出時間は等しくなる。つまりUVや蛍光、吸光度などの検出方法ではこの二つの化合物を区別することはできない。しかしMS分析を行えば二つの物質には質量差3があるので、二つの異なるピークとして識別することができる。

新規同位体標識試薬の作製ではPyIIに組み込む<sup>13</sup>Cの個数のバリエーションとして0, 2, 4, 6, 8, 10, 12個、すなわちPyII-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12の質量差2の7種類を作製した。これにより1回のMS測定で最大7個のサンプルを同時に測定することが可能となる。

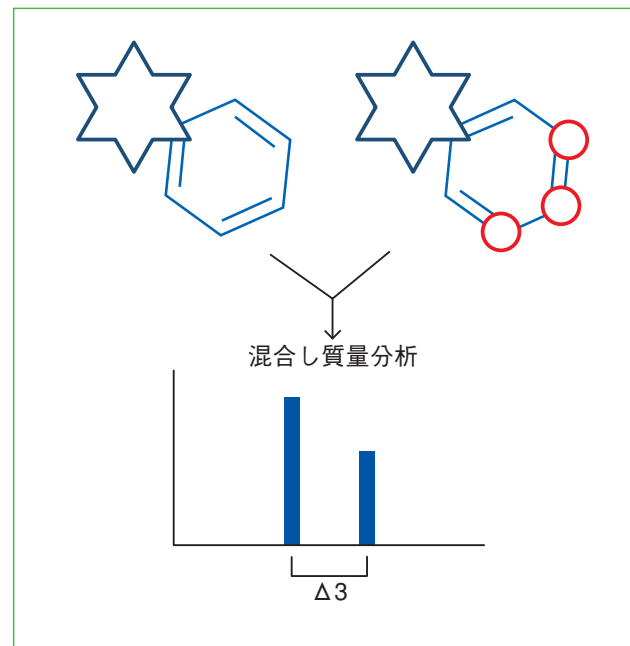


図2 質量分析による同位体標識化合物の識別。☆で示した物質をピリリウムで標識し質量分析を行い質量差により識別する。

### 4. PyII標識による物質測定<sup>\*3)</sup>

種々のアミノ酸、アミン、カテコールアミンについてPyIIによる標識とnano-LC/MSによる検出が可能か検討した。2 nmol (1 mM, 2 μl)のL-アラニン、L-グルタミン酸、グリシン、GABA、オルニチン、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、L-Dopaもしくは20 nmol (10 mM, 2 μl)のヒスタミンをPyII試薬で標識した。PyII試薬はPyII-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12それぞれを等量混合した計100 mMの溶液を準備し、標識反応には1 μl (100 nmol)使用した。標識反応後0.05 M HClで希釈し、1 pmol (ヒスタミンは10 pmol)相

当をnano-LC/MSにて測定した。

測定条件はLC部では分離カラムにはモノリスODSのMonoCap for FastFlow (ジーエルサイエンス)、トラップカラムにはODSのMonolith Trap (ジーエルサイエンス)を使用した。移動相にはA)ギ酸/水/アセトニトリル=0.1/98/2(%)とB)ギ酸/水/アセトニトリル=0.1/2/98(%)を、A/B=98/2(0 min)→2/98(50 min)のグラジェント条件で200 nl/minの流速で送液した。MS部ではイオン化法はエレクトロスプレーイオン化の正イオンモードを、MS測定の際のスキャン範囲はm/z 100-500とした。

今回検討した10種類の物質L-アラニン、L-グルタミン酸、グリシン、GABA、ヒスタミン、オルニチン、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、L-Dopaのうちグルタミン酸(1 pmol相当)、ノルアドレナリン(1 pmol相当)、ヒスタミン(10 pmol相当)の分析結果を図3、4、5に示す。上図にはm/z 322.2(グルタミン酸)、344.2(ノルアドレナリン)、286.2(ヒスタミン)で抽出したクロマトを、下図にはクロマト中の▼で示したピークでの質量スペクトルを示す。グルタミン酸、ノルアドレナリン、ヒスタミンとPyII-0が反応してできる標識化合物の分子量理論値はそれぞれ322.2, 344.2, 286.2になる。そしてそれぞれの質量スペクトルには理論値と一致したm/zから始まる分子量差2の7本の質量ピークが観察された。グラフには示していないが同様に測定した他の7種の物質でいずれも理論値と一致した質量ピークが検出された。なおヒスタミンの標識化合物は今回のクロマト条件では分離が悪く、ブロードなピークになった。

### 5. ラット脳ドーパミンの微量測定

#### 5.1 標準曲線の作製

標準ドーパミン1,250 fmol, 625 fmol, 313 fmol, 156 fmol, 0 fmol, そして内部標準として500 fmolの3, 4-dihydroxybenzylamine (DHBA)を用いた。DHBA 500 fmolを含む標準ドーパミン溶液に5%過塩素酸を加え総量を10 μlとした。2 Mリン酸カリウム緩衝液、pH 12を20 μl加えpH 9に保った。過塩素酸カリウムの沈殿を除去した後に、PyII試薬7種のうちいずれか100 mMを1 μl加え、50 ℃で15分間保温しPyII標識反応を行った。

次に、官能基にフェニルホウ酸(PBA)を持つカラム(MonoSpin PBA, GLサイエンス)により試料中のドーパミン-PyII化合物の精製を行った。試料をPBAに結合させ100 mMリン酸カリウム緩衝液pH 8.0で洗浄してから、0.5%トリフルオロ酢酸含有30%アセトニトリル溶液で溶出した。溶出液を減圧遠心濃縮機により濃縮し、孔径0.22 μmのフィルター(DURAPORE PVDF 0.22 μm, MILLIPORE)で濾過し、nano-LC/MSシステムにより分析した。nano-LC/MSは上記と同様の分析条件を用いた。得られた結果をDHBAにより標準

\* 福井大学 医学部 医学科 助教 獣医学博士



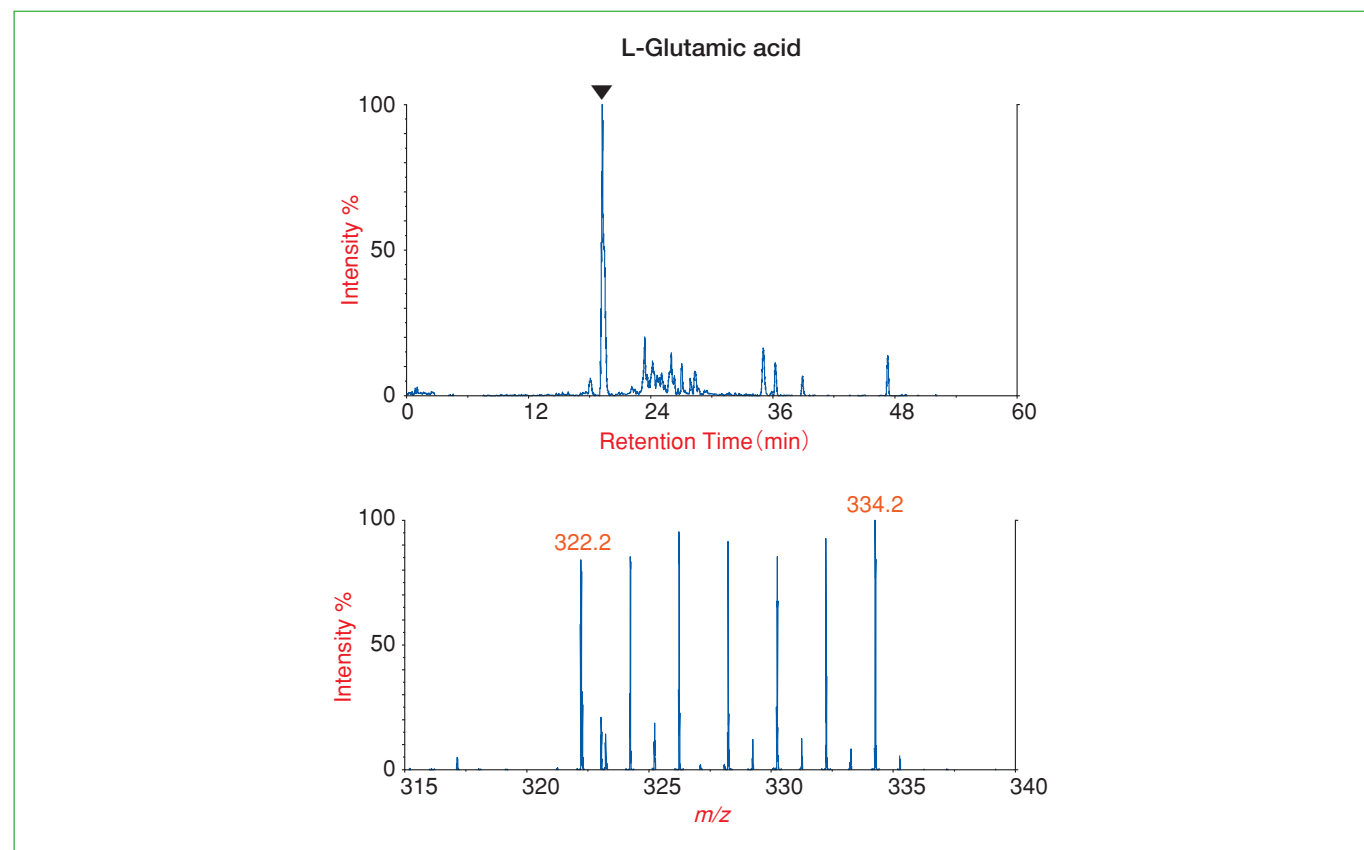


図3 nano-LC/MSで測定したPyIIで標識したグルタミン酸のスペクトル。(上) m/z 322.2で抽出したクロマト図。(下) クロマト中の▼で示したピークでの質量スペクトル図。縦軸はイオン強度を、横軸は上図ではLCの溶出時間を、下図ではm/zを示す。下図では質量の異なる7種の標識体ピークのうち、最小のものと最大のもののm/zを図中に示す。

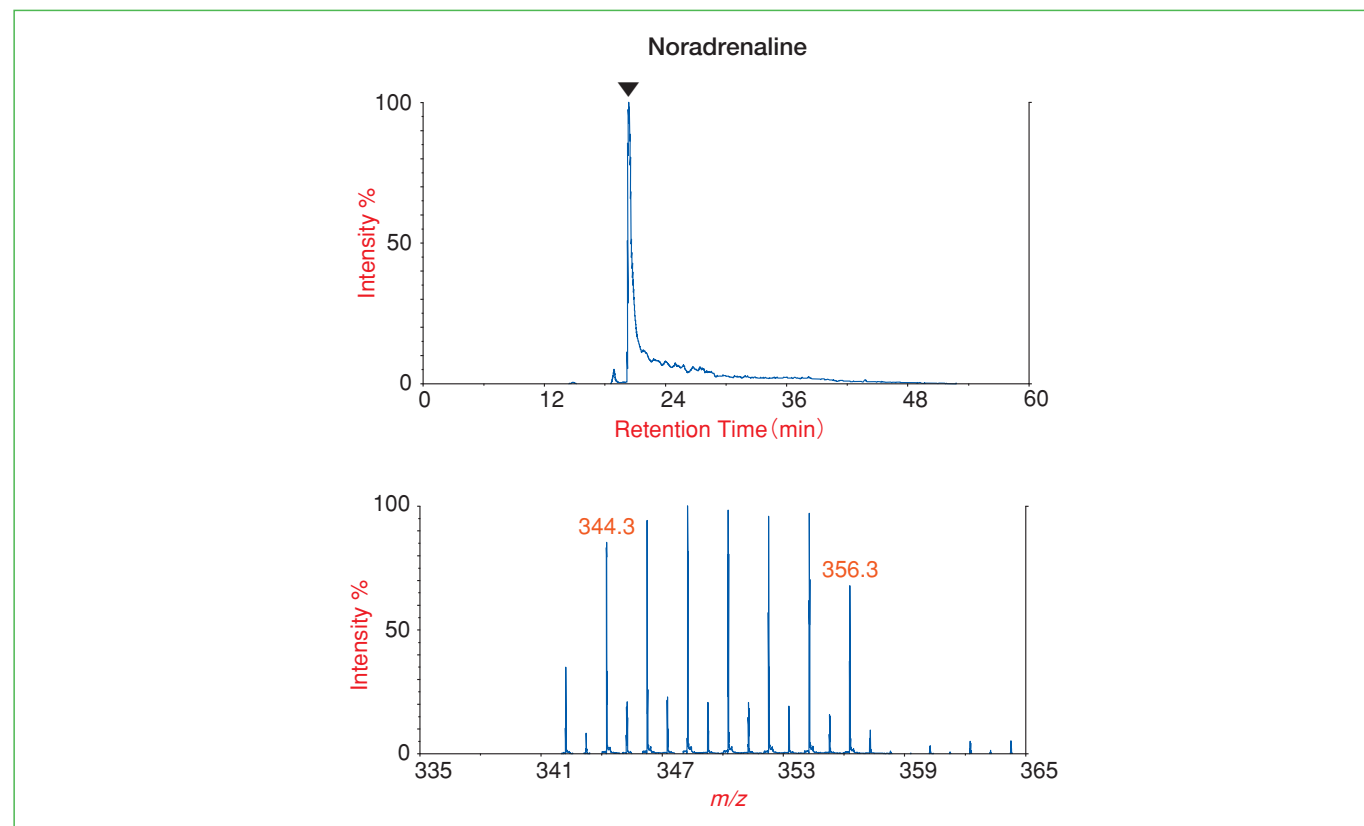


図4 nano-LC/MSで測定したPyIIで標識したノルアドレナリンのスペクトル。(上) m/z 344.2で抽出したクロマト図。(下) クロマト中の▼で示したピークでの質量スペクトル図。

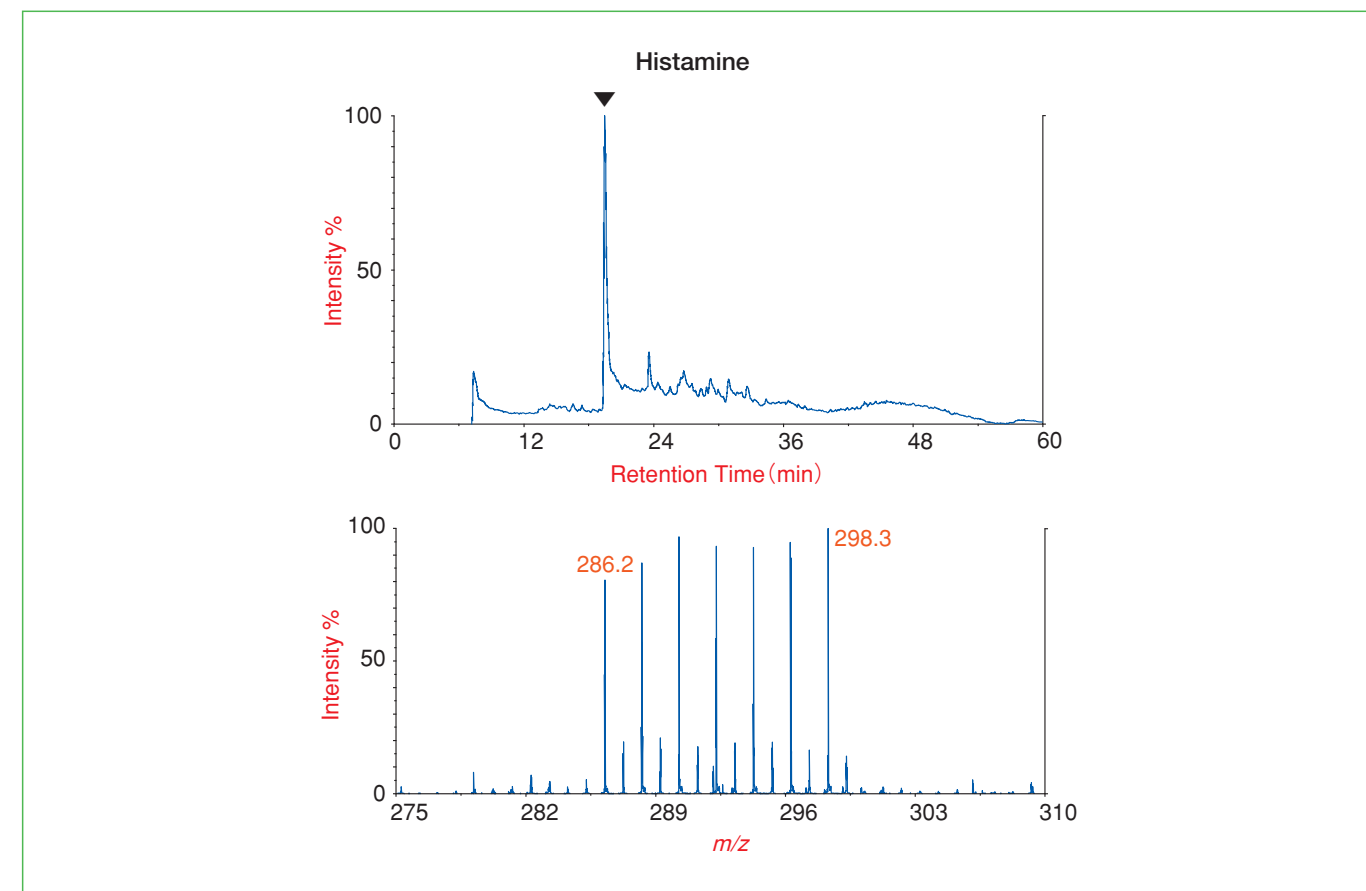


図5 nano-LC/MSで測定したPyIIで標識したヒスタミンのスペクトル。(上) m/z 286.2で抽出したクロマト図。(下) クロマト中の▼で示したピークでの質量スペクトル図。

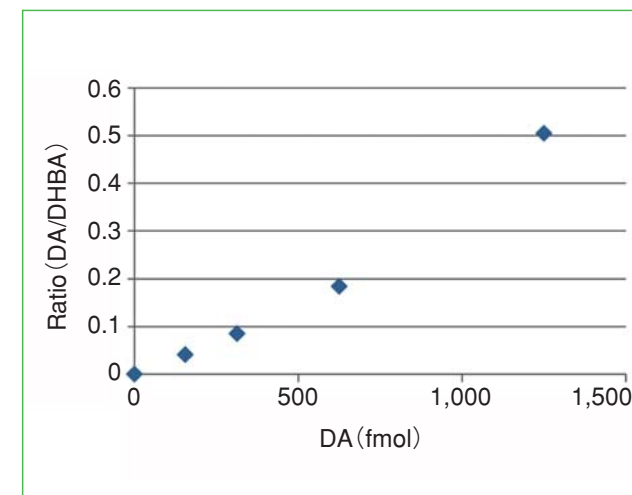


図6 ドーパミン標準曲線。縦軸は各サンプルに等量ずつ加えたDHBAにより標準化した値を示す。

化し作図すると直線関係が得られたことから(図6), DHBAを内部標準としてPyII標識によりドーパミンが定量できることが判明した。

## 5.2 ラット脳微小切片の作製

ラット頭部にマイクロウェーブの照射を行い(マイクロウェーブアプリケーション, 室町機械)固定を行った。凍結マイクロームにより線条体を含む部位の30 μm厚の

脳組織切片を作成し、レーザーマイクロダイセクション(ASLMD, ライカ)により、一辺1 mm四方、厚さ30 μmの脳組織を得た。採取された各切片の体積は30 nlに相当する(図7)。続いて5%過塩素酸10 μlと内部標準物質としてDHBAを各試料あたり500 fmol (500 nM DHBA含有0.05 M塩酸溶液を1 μl)添加し、除タンパクを行った。その後、上述の方法に従いPyII標識反応を行い、PBAによる精製と減圧濃縮、フィルター濾過した後に、nano-LC/MSによる分析を行った。またPyIIによる標識反応ではinter-assay標準として625 fmolのドーパミンを用いた。

図8にPyIIで標識されたドーパミンの質量スペクトルの実際例を示す。ドーパミンとPyII-0が反応して出来る標識化合物の分子量理論値は328.2になる。そして質量スペクトルにはm/z 328.2から始まる分子量差2の7本の質量ピーク(図中の赤丸)が観察された。図中でm/z 328.2のピークはinter-assay標準として用いた625 fmolドーパミン由来のピークを、m/z 330.2, 332.2, 334.2, 336.2, 338.2, 340.2のピークは30 nlのラット脳組織中ドーパミンを反映したピークを示す。得られた質量分析スペクトルの結果と図6の標準曲線に基づいて、脳各部位のドーパミンの量を算出したものを図9に示した。図中の着色した四角は図7の組織写真に対応した30 nl相当の脳組織片の部位を示す。ドーパミン含量は

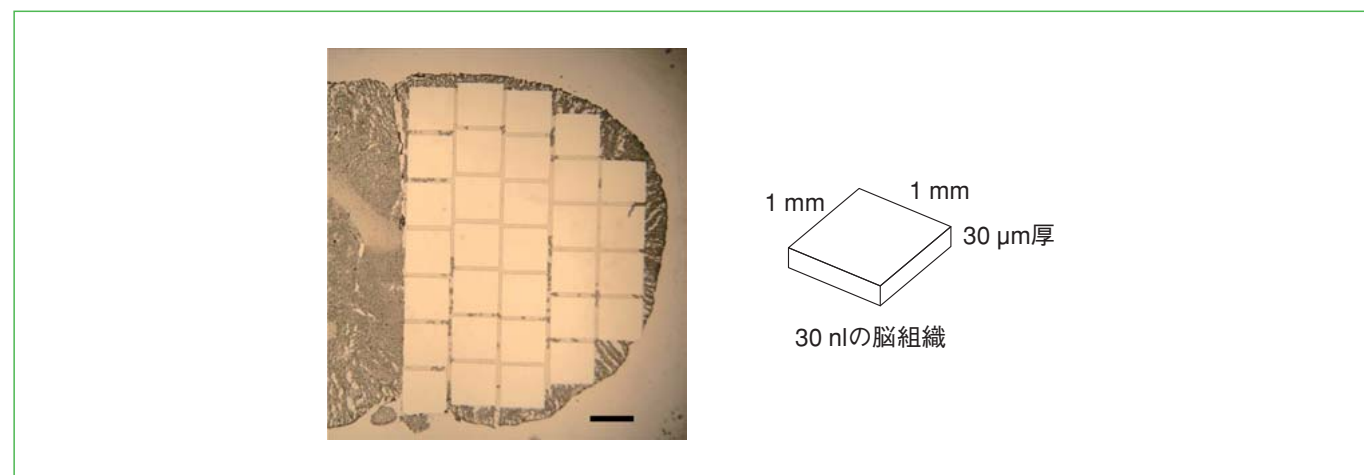


図7 レーザーマイクロダイセクションにより切り出された後のラット脳切片。黒線は1 mmを示す。右は切り出した微小切片の大きさを模式的に示す。

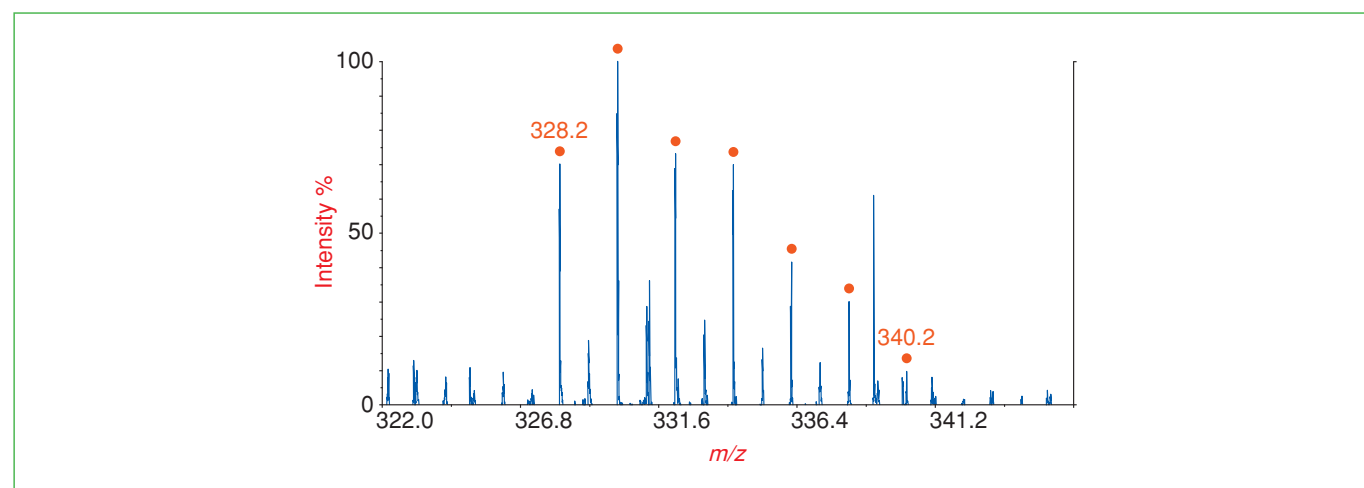


図8 PyIIで標識したドーパミンの質量スペクトル図。赤丸で示したピークが7種類の異なる質量のPyII試薬により標識されたドーパミンのピークを示す。

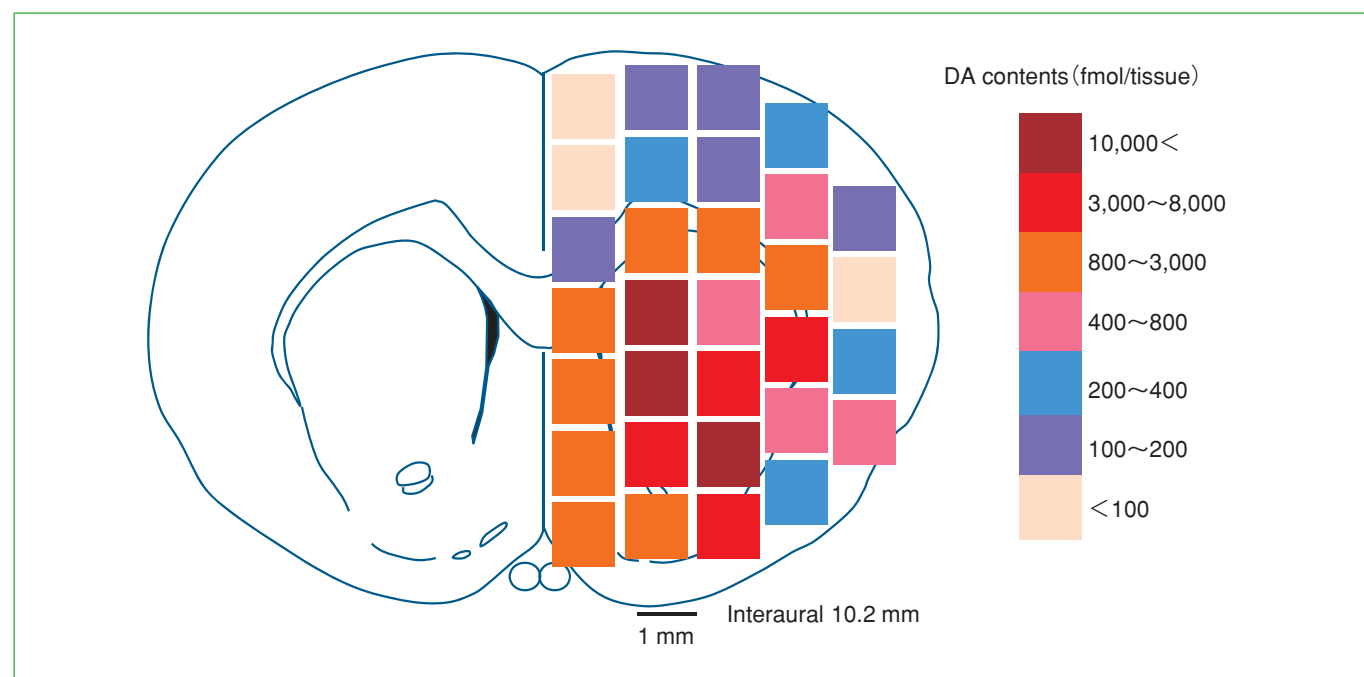


図9 線条体レベルでのラット脳前額断面図。着色した□は微小切片当たりのドーパミン含量を示す。

大脳皮質で少なく、線条体で多いという結果が得られた。

従来、ラット脳のドーパミン含量を測定する方法としては、マイクロウェーブ固定した脳から肉眼でナイフ等を用い目的部位のブロックを切り出し、酸抽出後にHPLC-電気化学検出器で検出する方法がしばしば用いられる。その方法で測定したラット線条体ドーパミン含量は約50 nmol/gの値を示す。この数値を図9で示した30 nl組織当たりに換算すると1,500 fmol/30 nlとなる。本実験の結果では線条体内部でドーパミン含量に大きな部位差が観察されたが、全体的には従来の方法に近い結果が得られている。

脳内では神経伝達物質としてアミノ酸やカテコールアミン、アミン類が重要な役割を果たしている。またある種のアミノ酸は神経活動を修飾する作用を持っている。

このような物質は脳内の部位によって濃度差が非常に大きくなっていて、脳内の局所におけるそれらの増減は神経活動の変化を表し、場合によっては何らかの疾病に直結する。従来の測定方法の感度ではラット、マウス脳の微小脳組織中の物質量を定量することは困難であった。ここで報告した方法を用いれば中枢神経疾患モデル動物の脳内の物質動態が詳細に検討できるようになり、病態解明に大きく役立つことが期待できる。

- \*1 JST育成研究「プロテオーム解析用2種、およびメタボローム解析用1種の新規マルチ同位体標識化合物の開発と製品化」研究代表者 福井大学 松川茂
- \*2 特許出願中。同位体標識ピリリウム化合物。出願番号 2012-079110
- \*3 ここで測定した10種の物質の結果は日立ハイテクノロジズの好意により提供を受けている。



# TEM-EELSによるリン酸鉄リチウムにおけるLiイオン移動機構の解明

Lithium Intercalation Mechanism Analysis in Lithium Iron Phosphate Using TEM-EELS

寺田 尚平<sup>1)</sup> 平野 辰巳<sup>2)</sup> 湯浅 豊隆<sup>2)</sup> 山田 淳夫<sup>3)</sup>

## 1. はじめに

Liイオン電池は、携帯電話やノートパソコン等の小型民生機器の電源として幅広く普及している。また、環境に対する負荷が少ない自動車(ハイブリッド車, 電気自動車)への適用にも期待が高まっている。図1にLiイオン電池の概略図を示す。Liイオン電池は、正極材, 負極材, 電解液, セパレータ等により構成されているが, その中でも正極活物質は電池性能を左右する極めて重要な要素のひとつである。現在, 民生用において正極活物質には, 主に層状岩塩型構造を有するLiCoO<sub>2</sub>が使われている。しかし, コバルトは希少金属であり高価であるため, 自動車等の大型用途へ展開する場合, コスト面で大きな障害となってしまう。また, 種々の要因で電池セル内部において短絡不良が生じた場合, LiCoO<sub>2</sub>は酸素を放出しやすいため発火の危険性があり, 安全性の観点において何らかの制御機構が必要となる。このような問題を解決するために, 近年, 高安全化と低コスト化を両立する正極材として大きな脚光を浴びているのが, オリビン型の結晶構造を有するリン酸鉄リチウム(Li<sub>x</sub>FePO<sub>4</sub>: 0 < x < 1)である。1997年にPadhiらによって発表されたリン酸鉄リチウム<sup>1)</sup>は, 資源として豊富である鉄を原料としているため, コストを安価にすることが出来ると共に, リンと酸素の結合が強固であるため, 短絡不良が生じた場合にも酸素を放出しないことが大きな特徴である。前述の通りリン酸鉄リチウムは優れた正極材であり, 将来の電極材料のニーズ, 特に大型化に向けた用途に適していると考えられる。

リン酸鉄リチウムの充放電反応はLiFePO<sub>4</sub>とFePO<sub>4</sub>の二相反応であり, 両者の結晶構造は同じ空間群である<sup>2)</sup>。FePO<sub>4</sub>も熱安定性に優れているため, 構成元素の溶出などによる容量劣化の心配がない。しかしながら, LiFePO<sub>4</sub>とFePO<sub>4</sub>の二相間でのリチウムの移動が遅いことや, 電子伝導性が低いために高速充放電が困難であるという問題点がある。図2にLiFePO<sub>4</sub>の結晶構造を示す。FeO<sub>6</sub>の八面体は,



寺田 尚平



平野 辰巳



湯浅 豊隆



山田 淳夫

頂点を共有しながら連なっており, bc面に平行な層を形成する。この八面体とPO<sub>4</sub>の四面体は頂点を共有して結合しており, これによって三次元のネットワークが形成されている。ここで, 鉄とリンとは酸素を介した結

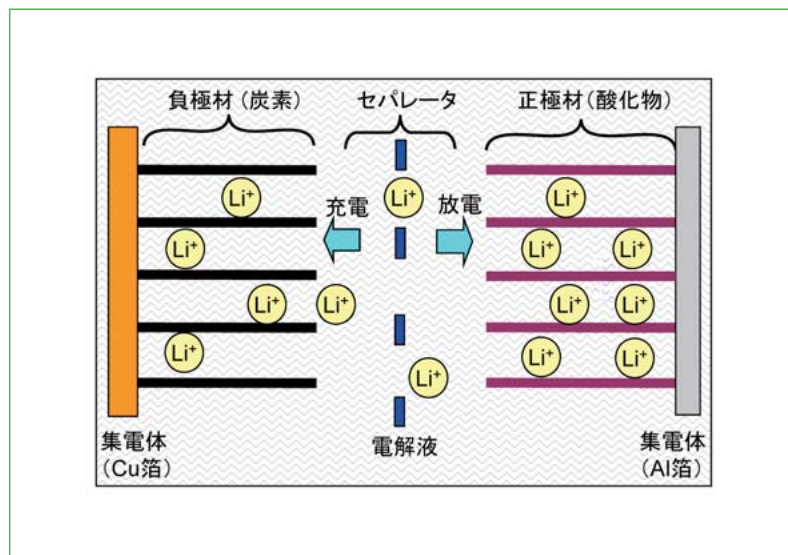


図1 Liイオン電池の概略図

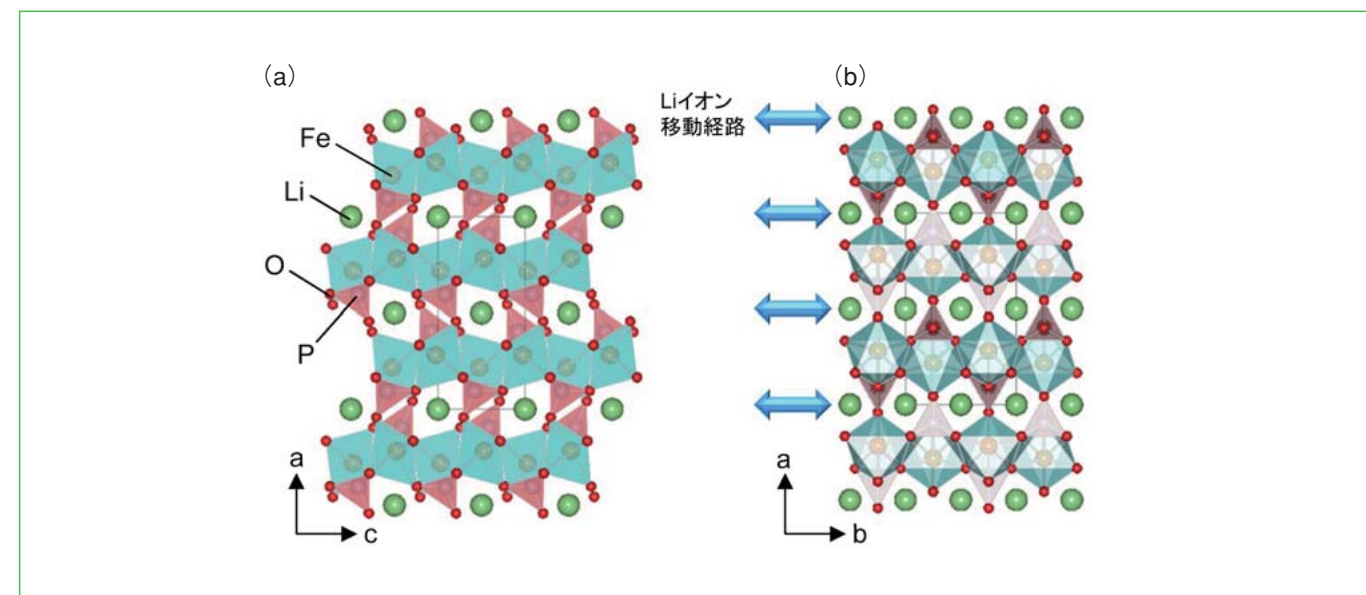


図2 LiFePO<sub>4</sub>の結晶構造 (a) b軸投影 (b) c軸投影

合を有している。リチウムは, 八面体サイトに位置し, b軸に平行な配列を形成しており, この配列に沿って一次元的にLiイオンが移動出来るものと考えられている。しかしながら, リン酸鉄リチウムの充放電反応における反応モデルは種々提唱されており, この反応メカニズムをナノメートル領域で二次元的に解明することが, 今後の電極特性向上や劣化機構解明への大きな鍵となっている。

本報告では, 透過電子顕微鏡法(Transmission Electron Microscopy:TEM)と組み合わせた電子エネルギー損失分光法(Electron Energy Loss Spectroscopy:EELS)を用いて, 化学的および電気化学的にLiイオンを挿入脱離させたリン酸鉄リチウムにおける鉄の吸収端位置の差異(ケミカルシフト)をナノメートル領域で二次元的に測定し, 吸収端位置から得られる価数の変化からLiイオンの移動機構を解析した。

## 2. 実験

### 2.1 リン酸鉄リチウムの二次元価数評価方法

本研究では, EF(Energy Filtering)-mapping法によりリン酸鉄リチウムの鉄の価数を二次元で評価することとした<sup>3)</sup>。図3にEF-mapping法による価数評価方法の概略図を示す。図3(a)に示すように, 所望の吸収端位置近傍において, エネルギー幅 $\delta E$ , 取得時間を $t$ とし, 順次エネルギー値 $E$ を変更させながら,  $n$ 枚のエネルギーフィルタ像を連続的に取得する。エネルギーフィルタ像の取得後, それぞれのエネルギーフィルタ像から, 各場所における像強度を各エネルギー値に対してプロットすると, 各場所における所望の吸収端位置近傍のコアロススペクトルを取得することが出来る(図3(b))。各場所から得られたコアロススペクトルから, 最大強度のエネルギー値を測定し, 二次元像としてプロットするこ

とにより, energy mapすなわち価数分布像を得ることが出来る(図3(c))。本研究では, エネルギーフィルタ(Gatan GIF-Tridiem)を備えた電界放出型透過電子顕微鏡(Hitachi HF-2000)を用いて, エネルギーフィルタ像を取得した。エネルギーフィルタ像の取得条件は, 加速電圧は200 kV, エネルギースリット幅は2 eV, 連続エネルギー像間のエネルギーステップ幅は0.2 eV, 一枚の取り込み時間は10秒とし, Fe-L<sub>3</sub>殻吸収端位置近傍である706 eVから712 eVのエネルギー範囲を連続的に31枚撮影した。全エネルギーフィルタ像を取得後, 各画像間の試料ドリフトを補正した。

### 2.2 評価試料の作製方法

リン酸鉄リチウムの一次粒子の評価用試料として, Li<sub>0.5</sub>FePO<sub>4</sub>の粒子を作製した<sup>4)</sup>。はじめにLiFePO<sub>4</sub>を固相法により作製し, その後, 酸化剤としてNO<sub>2</sub>BF<sub>4</sub>(Aldrich, >95%)を用い, LiFePO<sub>4</sub>を化学酸化させることによりFePO<sub>4</sub>を作製した。Li<sub>0.5</sub>FePO<sub>4</sub>は, アセトニトリル中でFePO<sub>4</sub>とLiI(High Purity Chemicals, 99.9%)と反応させ, 室温で24時間攪拌し作製した。作製した試料は, アセトニトリルで洗浄して不純物を除去した後, 真空中で乾燥した。上述の各粉末試料をマイクログリッド膜が敷かれたCuグリッド上に直接分散しTEM-EELS測定試料とした。

一方, 電気化学的手法を用いたリン酸鉄リチウムのLiイオンの挿入脱離状態を明らかにするため, リン酸鉄リチウムによる正極シートを作製し, モデル電池セルにより充放電状態を調整した。正極シート材料は, 活物質, 導電材, バインダ, 溶媒を乳鉢上で混練し, スラリー化して調整した。活物質は, 炭素被覆したリン酸鉄リチウムとし, 導電材はアセチレンブラック, バインダはポリフッ化ビニリデン, 溶媒はN-メチル-2-ピロリドン

1) ㈱日立製作所 日立研究所 材料研究センタ 電池研究部 主任研究員 博士(理学)

2) ㈱日立製作所 日立研究所 材料研究センタ 電池研究部 主任研究員

3) 東京大学大学院 工学系研究科 教授 博士(工学)



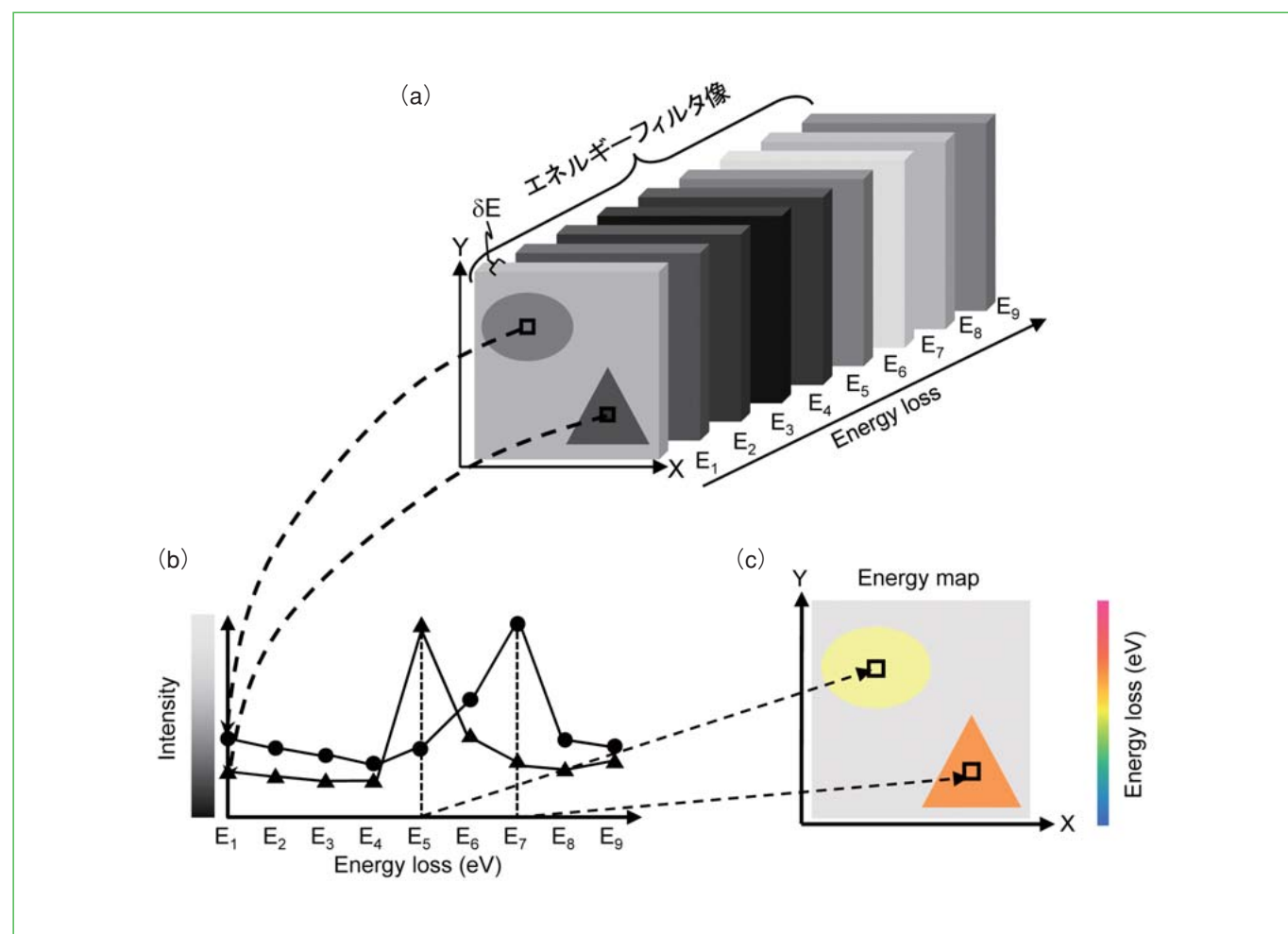


図3 EF-mapping法によるenergy mapの取得方法の概略図  
 (a) エネルギーフィルタ像の取得  
 (b) エネルギーフィルタ像より得られたコアロススペクトル  
 (c) 各場所のコアロススペクトルより得られた最大強度のエネルギー値をプロットしたenergy map

(NMP)をそれぞれ用いた。調整したスラリーは厚さ20  $\mu\text{m}$ のアルミニウム箔上に塗布し、乾燥後直径15 mmの円盤状に打ち抜いた。正極シートの充電状態は三極式モデル電池セルを用いて制御した。円盤状正極シートと、対極・参照極のリチウム金属を、電解液を含浸させたセパレータを介して積層させ、SUS製端板2枚を用いて挟み込んだ後、ボルトで締め付けた。これをガラスセル中に入れ三極式モデル電池セルとした。なお、モデル電池セルはアルゴン雰囲気下で満たされたグローブボックス内で組み立てた。作製したモデル電池セルは、初期化充放電を実施した後、定電流定電圧モードにより満充電状態にした後、所定の充電状態(State of Charge: SOC)となるよう放電した。SOCが0%の場合は正極側にLiが存在する完全放電状態、100%の場合は負極にLiが存在する満充電状態である。本実験では、SOCは10, 50, 90%とした。SOCを制御した正極シートのTEM-EELS測定試料の作製には、集束イオンビーム装置(Hitachi FB-2100, Focused Ion Beam: FIB)を用いた。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$ 一次粒子の二次元価数評価

図4に $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$ 粒子から得られたTEM像および電子回折像(図4(a))、energy map(図4(b))を示す。電子回折像の結果から電子線の入射方位は[001]であることが分かる。また、energy mapから、鉄の価数は粒子全体で一定ではなく、Liイオンが挿入されている箇所と挿入されていない箇所が存在することが判明した。さらにa軸に沿って粒子表面に鉄の価数が2価すなわち $\text{LiFePO}_4$ の領域が、また粒子内部に3価すなわち $\text{FePO}_4$ の領域が存在していた。これらの結果から、 $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$ の作製プロセスにおけるLiイオンの挿入モデルを考察した。図5(a)に $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$ 粒子のc軸入射のenergy map(図4(b))から推察される粒子全体のリチウムの挿入モデル図を、図5(b)に $\text{LiFePO}_4/\text{FePO}_4$ 界面の原子レベルでのモデル図を示す。図5(a)に示すように、a軸方向に沿って $\text{LiFePO}_4/\text{FePO}_4/\text{LiFePO}_4$ の各相が存在していることから、 $\text{FePO}_4$ 粒子においてb軸方向からLiイオンが挿入し、また $\text{LiFePO}_4$ 相はa軸方

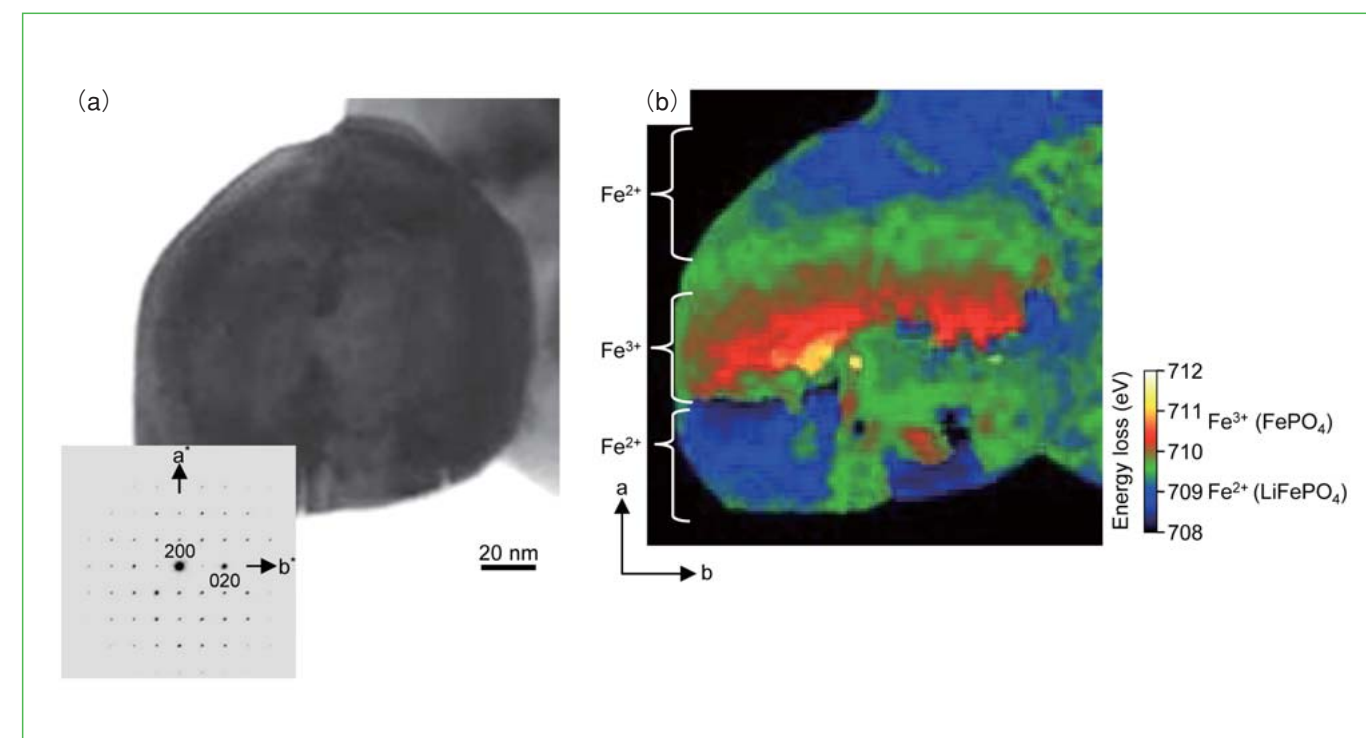


図4  $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$ 粒子より得られた (a)TEM像および電子回折像 (b)energy map

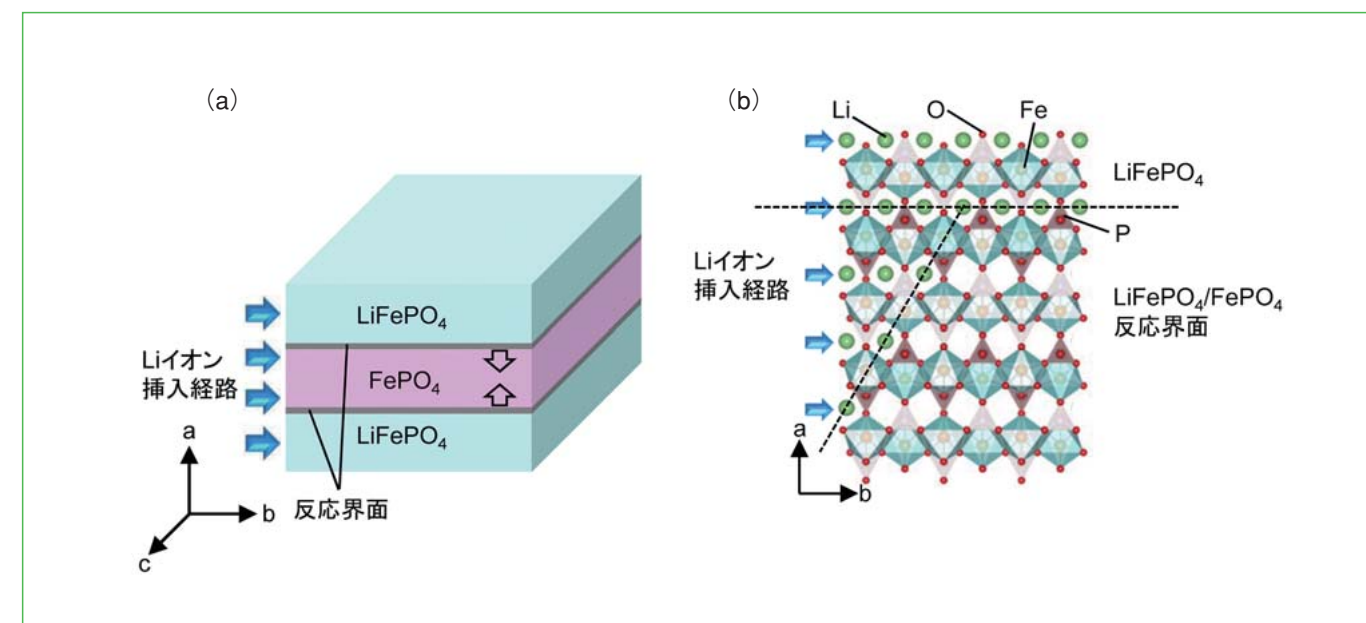


図5  $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$ 粒子のc軸入射のenergy mapから推察されるLiイオンの挿入モデル図  
 (a)粒子全体のモデル図 (b) $\text{LiFePO}_4/\text{FePO}_4$ 界面の原子レベルでのモデル図

向に沿って粒子表面から粒子内部へ形成していくと考えられる。また、energy mapから $\text{LiFePO}_4$ 相と $\text{FePO}_4$ 相間には数10 nmの界面領域が存在していると考えられる。従って図5(a)(b)に示したように $\text{LiFePO}_4$ 相と $\text{FePO}_4$ 相間には反応界面が形成され、両者の相構造を介してLiイオンが挿入されていると推察される。これまで、上述のリチウムの挿入脱離機構のモデルはX線回折、電子回折等の結果からも提唱されている<sup>5-7)</sup>。本研

究ではenergy mapより界面の反応状態の可視化に成功し、また、本結果から推察されるリチウムの挿入モデルは従来提唱されているモデルと相反しない結果であることが判明した。

#### 3.2 正極シートにおける二次元価数評価

図6にSOCを制御した各正極シートより得られたenergy mapおよびLiイオンの挿入モデルを示す。各



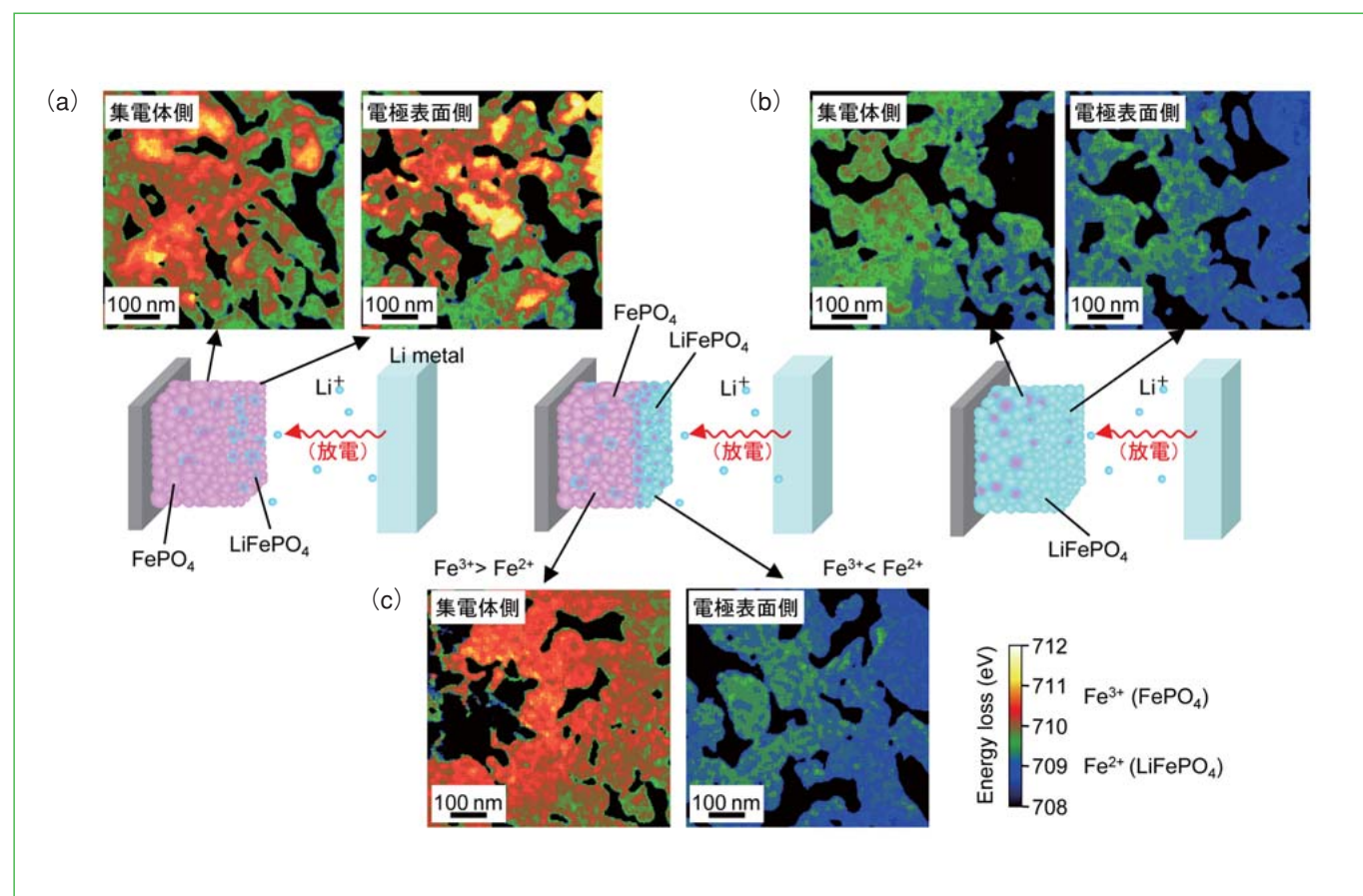


図6 正極シート断面から得られたenergy map及びLiイオン挿入モデル  
(a)90 %SOC (b)50 %SOC (c)10 %SOC

SOCにおいて、電極表面側と集電体側の測定領域の間隔は約3~4  $\mu\text{m}$ とした。90 %SOC (図6 (a))の場合、電極表面側及び集電体側において鉄の価数はほぼ3価であった。一方、10 %SOC (図6 (c))の場合は、ほぼ2価となっており、放電により正極側へLiイオンが挿入されていることがわかる。また、50 %SOC (図6 (b))の場合は、集電体側の鉄の価数は90 %SOCの価数とほぼ同等であるのに対し、集電体側は電極表面側と比較して2価の鉄が増加していることがわかった。

EF-mapping法により得られたenergy mapはナノメートル領域の局所的な箇所の価数を評価しているため、正極シート全体の価数を評価することは難しい。そこで、同じ正極シートのミリメートル領域から測定したXAFS (X-ray Absorption Fine Structure) スペクトルより求めた鉄の価数と比較した。図7にXAFSスペクトルより得られた鉄の価数を示す。XAFSスペクトルはCEY (Conversion Electron Yield) 法(表面XAFS)及び透過法(透過XAFS)で測定しており<sup>8)</sup>、前者では正極シート表面の約100 nmの領域から、後者では正極シート全体から鉄の価数が得られる。10 %SOC及び90 %SOCでは、両者で同等の価数を示していた。また、50 %SOCでは表面XAFSと透過XAFSの両方で鉄の価数の差異が顕著であり、energy mapよりナノメートル領域で測

定された鉄の価数状態とXAFSスペクトルによりミリメートル領域で測定された鉄の価数の増減の傾向に大差が無いことがわかった。

以上の結果から、正極シートへのLiイオン挿入モデルを推察した。先述の通り、本実験では正極シートのSOCは、一度100 %SOCすなわち満充電状態にしてか

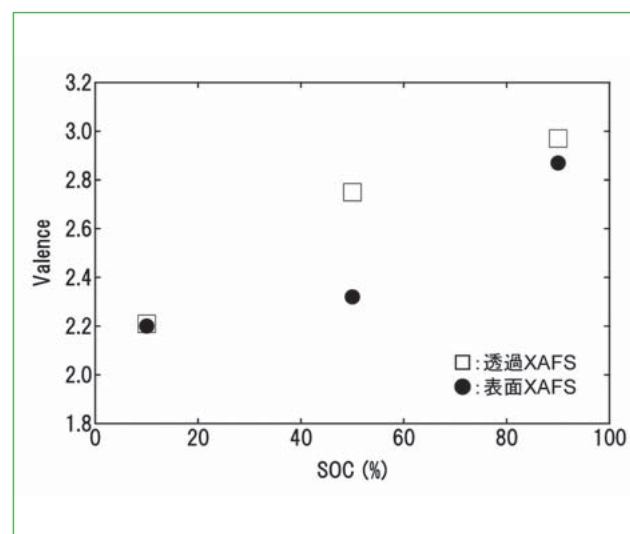


図7 XAFSにより評価した各SOCの正極シートの鉄の価数状態

ら放電状態に進める方向でSOCを制御している。そのため、90 %SOCではリチウムが正極シート内にほとんど存在しておらず、電極表面側および集電体側において $\text{FePO}_4$ 粒子が全体的に存在していると考えられる。また10 %SOCでは、正極シート全体にリチウムが存在しており、ほとんどの粒子が $\text{LiFePO}_4$ であると考えられる。一方50 %SOCの場合、energy mapおよびXAFSスペクトルの結果から、電極表面側には $\text{LiFePO}_4$ 粒子が、集電体側では $\text{FePO}_4$ 粒子が多く存在していると考えられる。リン酸鉄リチウムは $\text{LiFePO}_4$ と $\text{FePO}_4$ の二相共存反応で進行するため、 $\text{LiCoO}_2$ をはじめとする電位が連続的に変化する層状系の正極材と異なり電位が平坦である。よって、放電の所定のSOCまで調整後、電流を切断した場合、電極内部での電位勾配が生じないためにLiイオンが電極全体に移動せず、電極表面側と集電体側で鉄の価数に差異が生じたと推察される。

#### 4. おわりに

Liイオン電池の正極材におけるLiイオンの移動機構をナノメートル領域で二次元的に解析することを目的とし、透過電子顕微鏡と組み合わせた電子エネルギー分光法を利用したEF-mapping法を検討した。その結果、オリビン型の結晶構造を有するリン酸鉄リチウムにおいて、Liイオンの移動に伴う鉄の価数変化を二次元で測定可能であった。また、 $\text{FePO}_4$ 粒子に化学的にリチウムを挿入した $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$ 粒子において、c軸方向から電子線を入射し粒子全体の鉄の価数を評価した結果、

a軸に沿って $\text{LiFePO}_4$ が存在することが確認され、従来から提唱されている反応界面モデルの可視化に成功した。さらに、モデル電池セルによりSOCを調整した正極シート断面を観察した結果、50 %SOCにおいて電極表面側と集電体側で鉄の価数に差異が見られ、本結果は $\text{LiFePO}_4$ と $\text{FePO}_4$ の二相反応に起因すると結論づけた。

以上よりEF-mapping法による二次元での価数評価は、Liイオン電池の正極材におけるナノメートル領域のLiイオンの移動機構の解析に対し有効であると言える。

#### 文献

- [1] A. K. Padhi, K. S. Nanjundaswamy and J. B. Goodenough, J. Electrochem. Soc., 144 (1997) p.1188
- [2] G. Rousse, J. Rodriguez-Carvajal, S. Patoux and C. Masquelier, Chem. Mater., 15 (2003) p.4082
- [3] S. Terada, T. Hirano, N. Hashikawa and K. Asayama, Jpn. J. Appl. Phys., 48 (2009) p.011203
- [4] S. Nishimura, G. Kobayahshi, K. Ohoyama, R. Kanno, M. Yashima and A. Yamada, Nature Materials, 7 (2008) p.707
- [5] L. Laffont, C. Delacourt, P. Gibot, M. Y. Wu, P. Kooyman, C. Masquelier and J. M. Tarascon, 18 (2006) p.5520
- [6] C. Delmas, M. Maccario, L. Croguennec, F. L. Cras and F. Weill, Nature Materials, 7 (2008) p.665
- [7] G. Chen, X. Song and T. J. Richardson, Electrochemical and Solid-State Letters, 9, (2006) p.A295
- [8] 野中敬正, 放射光, Nov. (2008) p.313



# 日立UH5300形ダブルビーム紫外可視分光光度計の特長と測定例

## Introduction of HITACHI UH5300 Double Beam UV-Visible Spectrophotometer

堀込 純\* 栗田 浩二\* 和久井 隆行\*\* 玉島 孝弘\*\*\*

### 1. はじめに

紫外可視分光光度計は、白色光をプリズムや回折格子で単色光に分けて試料に照射し、透過光を検知することで物質の同定や濃度測定を行う装置である。分光光度計は、材料、環境、製薬、バイオ分野などの学術、産業界で多岐にわたる測定に用いられているが、用途や精度の違いなどから、フォトメーター、シングルビーム、ダブルビームなどのカテゴリーに分類される。中でも、ダブルビームタイプの分光光度計は、高い安定性を有することから、幅広いユーザーに支持されている。

今回開発したUH5300形ダブルビーム紫外可視分光光度計(以下、UH5300形)は、「新時代のスタンダード」をコンセプトに先進的な操作性と高い信頼性を備え、環境負荷低減を実現した分光光度計である(図1)。本稿では、UH5300形の主な特長と測定例を紹介する。



図1 UH5300形外観とiPad

### 2. UH5300形の特長

#### 2.1 タブレット端末を用いた先進的な操作性

UH5300形の特長は、定評ある高い光学性能はもちろんのこと、タブレット端末(iPad)に対応し、無線LAN

による通信やタッチパネルで直感的に操作を行うことのできる新たな操作系を開発した。操作部には、ユニバーサルデザインのパネルを用いることにより、初めてのユーザーでもアイコンから機能を連想することができるので直感的な操作が可能となる(図2)。

#### 測定メニュー

濃度測定や波長スキャン測定、時間変化測定など、多彩な測定モードが搭載されています。

#### 条件ファイル参照

保存された分析条件ファイルの読み込みが可能です。管理項目として入力された情報(分析者や検体名など)に従い、検索が可能です。

#### メンテナンス

装置の性能確認や波長校正などを行うモードです。光源の使用状況を確認することができます。

#### 基本設定

光度計の基本設定を行います。ネットワークやファイル自動保存先、グラフ表示色の設定などが可能です。

#### データファイル参照

保存されたデータファイルの読み込みやデータ分析が可能です。管理項目として入力された情報(分析者や検体名など)に従い、検索が可能です。



図2 UH5300形トップ画面

\* (株)日立ハイテクノロジーズ モノづくり統括本部 那珂地区生産本部 グローバルアプリケーションセンタ  
 \*\* (株)日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部 科学・医用システム設計開発本部 分析システム設計部  
 \*\*\* (株)日立ハイテクノロジーズ 科学システム営業本部 マーケティング部

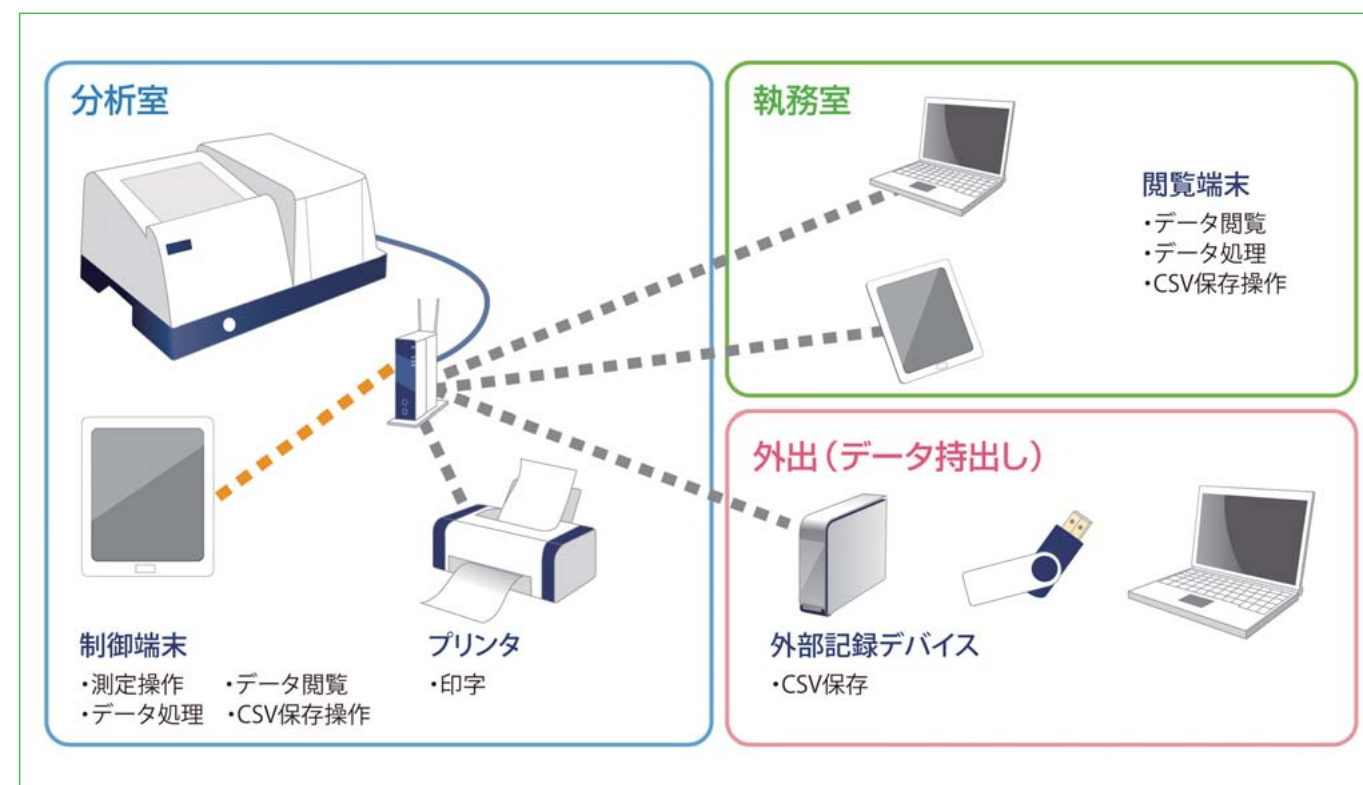


図3 新たな業務スタイル

また、無線LAN接続されることで、装置から離れた場所からの分析操作やデータの確認など、ユーザーの新しい業務スタイルを提供する。例えば、データ取得状況の確認や測定後のデータ確認も執務室から行うことができる(図3)。もちろん、従来のようなWindows PCによる制御も可能である。

#### 2.2 信頼の基本性能

従来の分光光度計は、光源に重水素放電管、ハロゲンランプが用いられてきたが、光源にキセノンフラッシュランプを採用することにより、省電力かつランプの長寿命化を図った。低消費電力のキセノンフラッシュランプの採用に加え、光源部をファンレス化することにより、従来機<sup>\*1</sup>の300 Wと比較し70 Wと75 %以上の低消費電力化を図った。さらに、従来機では、定期的なランプ交換が必要であったが、キセノンフラッシュランプは、測定の際のみにパルス発光させるため寿命が長く、定期的なランプ交換は不要である(光源保証7年間<sup>\*2</sup>)。

性能面でも、キセノンフラッシュランプ搭載機では最高レベル<sup>\*3</sup>となる分解能や安定性を達成した。欧州薬局方では、分解能の指標としてトルエン溶液(0.02 % (V/V))の指定波長のピークとバレーの吸光度の比率1.5以上が定められている。UH5300形では、図4に示す通り、ピーク波長268.7 nmの吸光度0.4518とバレー波長267 nmの吸光度0.2217の比率は、2.04とその指標を十分にクリアしている。独自に改良を加えた波長駆動方式により、6,000 nm/minの速いスキャンスピードを実

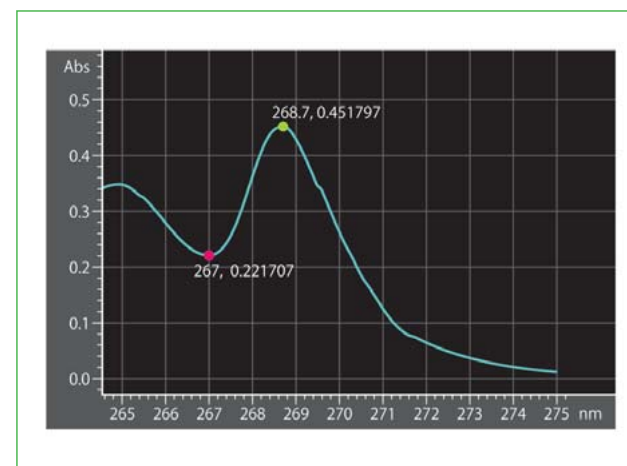


図4 ヘキサン中のトルエンの吸収スペクトル

現しつつ、クラス最高レベル<sup>\*3</sup>の±0.3 nmの波長正確さを実現した。これらの高い基本性能が精度の高い分析データの取得に貢献する。

\* 1 日立ダブルビーム分光光度計U-2900形  
 \* 2 ランプの7年保証には会員制サイト「S.Inavi(エスアイナビ)」または同封の製品登録書の郵送によるご使用製品登録が必要。ランプの保証は製品納品日より7年もしくは規定のランプ点灯回数のいずれか早い方。  
 \* 3 日立ハイテクノロジーズ調査 日本国内販売機種2012年8月現在



### 2.3 自動6セルターレットによる高スループット化

自動6セルターレットを標準装備し、測定スループットを向上した。6セルターレットは、従来機U-5100でも搭載されていたが、UH5300形では制御端末であるiPadからセルの移動が可能となり、利便性が増した。さらに試料室ふたの開閉により測定をスタートする<sup>\*4</sup>ことができる新機能インテリジェントスタートにより、試料セルの入替え後のスタート操作が省略され、6セルターレットとの併用で多検体測定時の測定時間の短縮が図れる(図5)。

\*4 特許出願中(特願2012-181302)

## 3. 測定例

### 3.1 6価クロムの定量(ジフェニルカルバジド-吸光光度法)

2006年7月に施行されたRoHS指令は、電子・電気



図5 インテリジェントスタートの流れ

機器を対象に特定有害物質の使用を制限する欧州連合の指令で、6価クロム、鉛、水銀など6物質が規制の対象となっている。現在、アメリカ、中国など各国でこのRoHS指令をモデルにした有害物質規制が始まっており、対象物質の測定の必要性が高まっている。この中でクロムは化学形態による使用制限が設けられ、6価クロムを選択的に検出することが必要である。ここでは、UH5300形にて6価クロムの測定を共立理化学研究所製の試薬セットを用いて行った。図6に波長スキャンモードによる吸収スペクトルの測定結果を示す。濃度測定モードにて吸収極大波長542 nmの検量線を作製した。検量線は、0~0.8 mg/Lの範囲にて相関係数R=0.999の良好な直線関係を得た(図7)。

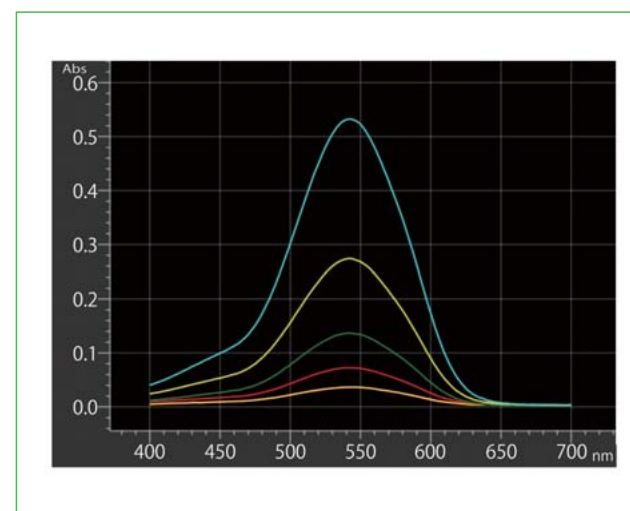


図6 波長スキャンモードによる吸収スペクトル

### 3.2 サケ精巢DNAの定量(紫外吸光法)

DNAは、260 nmに極大吸収を有し、この波長の吸光度からDNA濃度を算出できるため、分光光度計を用いて検体から抽出したDNAの定量分析が行われる。また、DNAの純度測定を行うことで、精製などの前処理状態の確認ができる。図8に各濃度に調製したサケ精巢DNAの吸収スペクトルを示す。図9は、核酸測定モードにて得られたサケ精巢DNAの測定結果である。核酸測定モードは、条件設定から結果表示まで一連の流れで測定可能な機能である。核酸測定モードでは、DNA濃度算出の他に、DNAの純度を求めることができる。今回測定したサケ精巢DNAは、260 nm付近に吸収極大を有する良好なスペクトルが得られた。数 $\mu\text{g/mL}$ ~数10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲の定量値にて、純度100付近の良好な結果が得られた。なお、微量サンプルに対しては、オプションの微量セルを用いることで1.5 $\mu\text{L}$ の試料量で測定可能である。

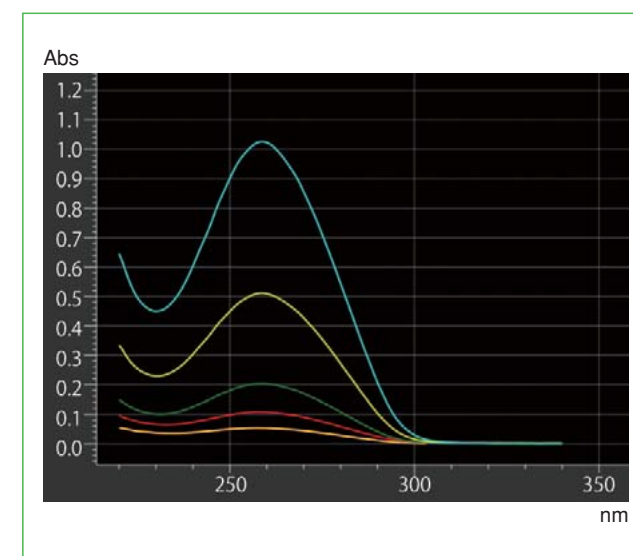


図8 波長スキャンモードによる吸収スペクトル

| セル位置 | サンプル名      | WL1 (260.0) | WL2 (280.0) | BKG     | 吸光度比  | 核酸濃度 (μg/mL) | 純度    |     |
|------|------------|-------------|-------------|---------|-------|--------------|-------|-----|
| A    | BLK        |             |             |         |       |              |       |     |
| ✓    | 1 サケ精巢DNA1 | 0.05365     | 0.02821     | 0.00106 | 1.937 | 2.630        | 107.6 | 再測定 |
| ✓    | 2 サケ精巢DNA2 | 0.10791     | 0.05842     | 0.00319 | 1.896 | 5.236        | 105.3 | 再測定 |
| ✓    | 3 サケ精巢DNA3 | 0.20335     | 0.10793     | 0.00064 | 1.889 | 10.14        | 105.0 | 再測定 |
| ✓    | 4 サケ精巢DNA4 | 0.51108     | 0.27201     | 0.00215 | 1.886 | 25.45        | 104.8 | 再測定 |
| ✓    | 5 サケ精巢DNA5 | 1.02661     | 0.54562     | 0.00224 | 1.885 | 51.22        | 104.7 | 再測定 |

図9 核酸測定結果

## 4. まとめ

以上、UH5300形分光光度計の特長と試料の測定例を紹介した。UH5300形は、高い基本性能と信頼性、先進的な操作性を備えるとともに、環境負荷低減を実現した分光光度計である。「新時代のスタンダード」をめざし、幅広い分野での利用に寄与していく。

\* iPadおよびSafariは米国Apple Inc.の米国およびその他の国における登録商標または商標です。

\* Microsoft, Windowsは米国Microsoft Corporationの米国およびその他の国における登録商標または商標です。



図7 6価クロムの検量線と濃度測定結果

# 日立偏光ゼーマン原子吸光光度計ZA3000シリーズ ツインインジェクションテクノロジーのご紹介

Introduction of “Twin Injection Technology” for ZA3000 Series  
Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer

坂元 秀之\* 米谷 明\* 山本 和子\*\* 三浦 和代\*\* 戸辺 早人\*\*\* 西村 崇\*\*\*

## 1. はじめに

日立偏光ゼーマン原子吸光光度計ZA3000シリーズは環境、食品、材料など様々な分野で利用されている元素分析装置であり、主成分元素から微量元素まで多くの測定ニーズがある。特に微量元素の分析では、各種公定法の改訂などにより、更に高精度・高感度な分析が要求されてきている。原子吸光光度計は大きく分けてフレームを用いた分析法と電気加熱炉を用いた分析法があり、微量元素を分析する場合は主に電気加熱炉による分析法が用いられる。ZA3000シリーズは電気加熱炉による分析において、専用キュベットを用いた「ツインインジェクションテクノロジー」を新たに搭載した。これにより更に高精度な分析を可能にした。本稿では、ツインインジェクションテクノロジーについて分析例を示し紹介する。

## 2. ツインインジェクションテクノロジー

電気加熱炉分析では、一般にキュベット内に注入する試料量を増加させることにより感度の向上を図って



図2 パイロチューブD HR

いる。しかし試料の注入量の増大に伴ってキュベットの乾燥時間を長く設定する必要があった。「ツインインジェクションテクノロジー」はこれを改善し、分析のスループットを向上することが可能となった。本機能は図1に示すZA3000形およびZA3700形で使用することができる。図2に二ヶ所の試料注入口を設けたツインインジェクション専用キュベット「パイロチューブD HR」を示す。図3に従来のキュベットとツインインジェクションテクノロジーの試料注入方法を示す。従来のキュベットは試料を一ヶ所にサンプリングするため、熱源であるキュベットと試料の接触面積が狭くなり、大容量試料を注入し



ZA3000形原子吸光光度計

ZA3700形原子吸光光度計

図1 ZA3000形およびZA3700形の装置外観

\* (株)日立ハイテクノロジーズ モノづくり統括本部 那珂地区生産本部 グローバルアプリケーションセンタ  
\*\* (株)日立ハイテックコントロールシステムズ ナノテクノロジー設計本部 分析機器設計部 アプリケーショングループ  
\*\*\* (株)日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部 科学・医用システム設計開発本部 分析システム設計部

## ツインインジェクションテクノロジー



(1) サンプルの1/2の量を片側の注入口に導入

(2) 残り1/2の量をもう一つの注入口に導入

## 従来のキュベット



(1) サンプルの全量を一つの注入口に導入

(2) サンプルは大きな塊になる

図3 各種キュベットの試料注入方法

表1 アンチモンの分析条件

| 装置条件      |                                                 |
|-----------|-------------------------------------------------|
| 項 目       | 条 件                                             |
| BKG補正     | 偏光ゼーマン補正法                                       |
| 測定波長      | 217.6 nm                                        |
| スリット幅     | 0.4 nm                                          |
| キュベット種類   | パイロチューブD HR                                     |
| 試料注入量     | 35 $\mu$ L $\times$ 2 (70 $\mu$ L)              |
| マトリックス修飾剤 | 1,000 mg/L Pd-Mg<br>(5 $\mu$ L $\times$ 2, 後添加) |

て測定を行う場合、乾燥時間を長くとる必要があった。ツインインジェクションテクノロジーでは、試料を二ヶ所に分けてサンプリングすることから、キュベットと試料の接触面積が従来のキュベットに比べ広くなるため、効率よく乾燥することができ、乾燥時間を短縮することができる。したがって、試料注入量を増加させる測定においても、従来の分析時間と同様に分析が可能である。

## 3. 河川水中のアンチモン分析

ツインインジェクションテクノロジーを用いて、厚生労働省が定める水質基準の指針値(0.002 mg/L)の1/10である0.0002 mg/L (=0.2  $\mu$ g/L)レベルのアンチモンを分析した例を示す。表1にアンチモンの分析条件を示す。試料は70  $\mu$ Lを35  $\mu$ Lずつ二ヶ所に分けて注入した。ま

温度プログラム

| 測定段階 | 開始温度(℃) | 終了温度(℃) | 時間(秒) | ガス流量(mL/分)     |
|------|---------|---------|-------|----------------|
| 乾燥_1 | 50      | 110     | 40    | 200 mL/分(ノーマル) |
| 乾燥_2 | 110     | 300     | 20    | 200 mL/分(ノーマル) |
| 灰化   | 800     | 800     | 20    | 200 mL/分(ノーマル) |
| 原子化  | 2,300   | 2,300   | 2     | 0 mL/分(ノーマル)   |
| クリーン | 2,800   | 2,800   | 4     | 200 mL/分(ノーマル) |
| 冷却   | 0       | 0       | 10    | 200 mL/分(ノーマル) |



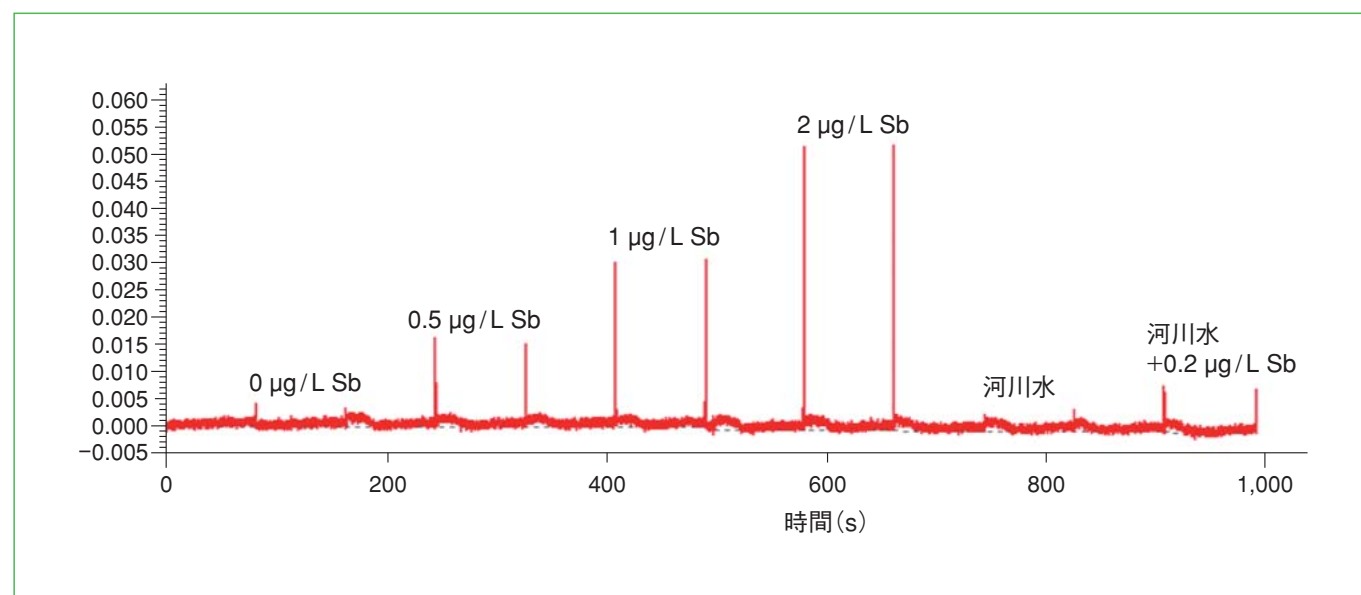


図4 河川水中のアンチモン分析の測定プロファイル

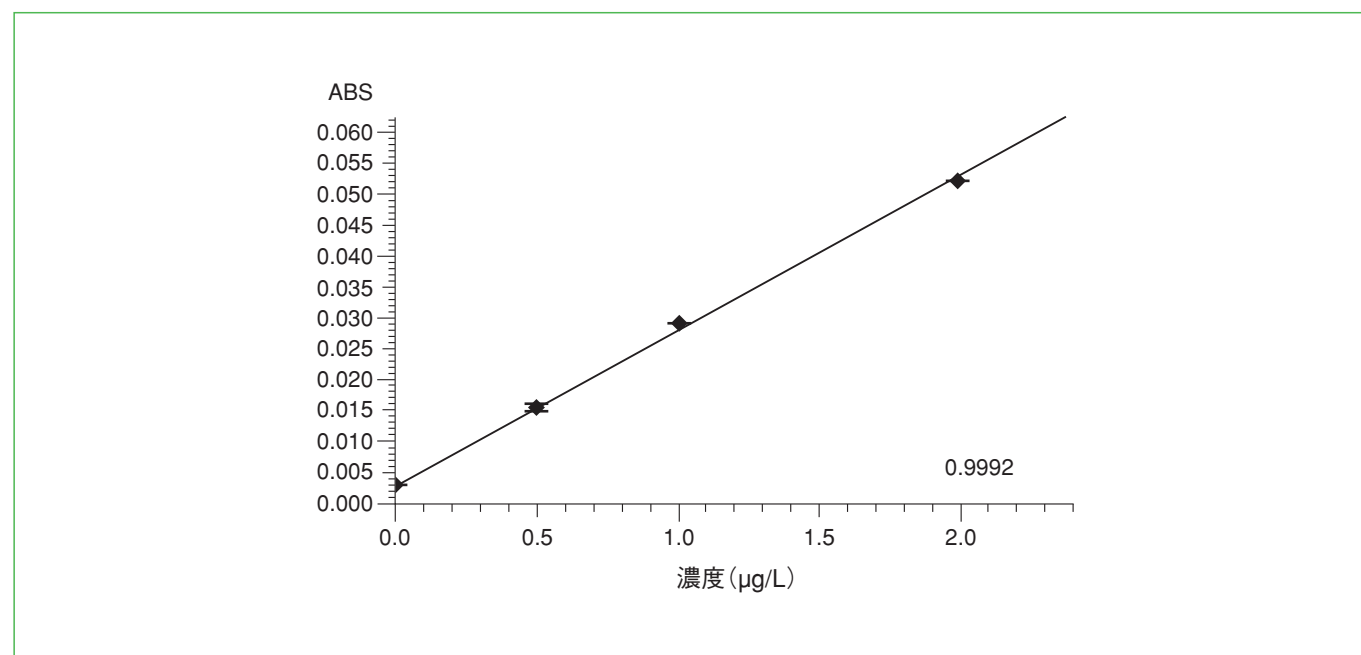


図5 アンチモンの検量線

た、マトリックス修飾剤として1,000 mg/Lパラジウム-マグネシウム溶液を試料導入後、5 µLずつ二ヶ所に分けて注入した。従来のキューベットを用いて0.2 µg/Lレベルのアンチモンを分析する場合は、試料注入、乾燥を繰り返し、導入する試料量を増やす加熱濃縮を行う必要がある。この方法の場合、乾燥過程を繰り返し実施するため、測定時間が長くなる。ツインインジェクションテクノロジーでは一度の乾燥過程で大容量の試料を短時間で乾燥できることから、ここで示した測定において従来のキューベットを用いて分析した場合と比べて約30 %の分析時間短縮を実現した。図4に測定プロファイル

を示す。測定方法には検量線法を用い、河川水試料中のアンチモンを分析した。分析の信頼性を確認するため、濃度が0.2 µg/Lとなるように同じ河川水試料にアンチモンを添加し、添加回収試験を行った。図5に作成したアンチモンの検量線を示す。相関関係は0.9992と良好であった。この検量線を用いて河川水試料を分析した結果を表2に示す。河川水試料ではアンチモンは不検出(検出下限値は0.06 µg/L)であったが、0.2 µg/Lを添加した試料では測定値は0.20 ± 0.001 µg/Lとなり、回収率も100 %と良好であった。

表2 河川水中のアンチモン分析結果

| 試料名          | 測定値(µg/L)  | 回収率(%) |
|--------------|------------|--------|
| 河川水          | ND         | —      |
| 河川水+0.2 µg/L | 0.20±0.001 | 100    |

#### 4. まとめ

原子吸光度法の電機加熱炉分析において「ツインインジェクションテクノロジー」を用いた河川水試料中のアンチモンの分析を紹介した。従来は、測定試料の導入量を増やすことで、試料の乾燥にかかる時間が長く

なっていたが、ツインインジェクションテクノロジーを用いることにより、これを改善することができた。試料の大容量注入による分析時間の増大を抑制し、感度向上を簡便にすることができた。

法規制の改正などから、今後も微量元素の分析ニーズは高くなると考えられ、ツインインジェクションテクノロジーは、原子吸光度計の新しい機能として期待される。

#### 参考文献

- 1) 新製品紹介 日立偏光ゼーマン原子吸光度計ZA3000シリーズ SI NEWS September 2012 Vol.55 No.2

# IM4000形イオンミリング装置のオプション機能紹介

## Introduction of the IM4000 optional device

高須 久幸\* 許斐 麻美\*\* 上野 敦史\* 武藤 宏史\* 岩谷 徹\*\*\*

### 1. はじめに

イオンミリング装置IM4000形(以下、IM4000と略記)を2010年末に発売した。

イオンミリングは、走査電子顕微鏡(以下SEMと略記)の試料作製装置として、材料分野やデバイス分野など、多方面で広く活用されている。IM4000は、イオンミリング法として知られる断面ミリングと平面ミリング<sup>[1]</sup>の二つの機能を持つハイブリッドイオンミリング装置として多様なニーズに対応できること、高ミリングレートイオンガン(当社従来製品E-3500形比3倍)を装備して短時間でイオンミリング処理できることを特徴としている<sup>[18]</sup>。

今回、高分子材料などに代表されるイオンビーム照射による熱で変形を示すような材料や、Liイオン電池材料等の大気との接触を嫌う材料への断面イオンミリング適用を目的に、試料冷却ユニットおよび雰囲気遮断試料ホルダをIM4000のオプションとして発売したので紹介する。

### 2. IM4000の概要と特徴

試料の内部構造をSEMで観察・分析するためには、目的とする内部構造を表面に露出させる必要がある。従来は、切断や機械研磨を用いて試料が作製されていたが、これらの方法は物理的な圧力による変形やキズの発生を避けることができない。この解決手段として、数kVに加速させた収束させないアルゴンイオンビームを試料に照射し、スパッタリング現象により無応力で試料表面の原子を弾き飛ばし、試料表面を平滑化するイオンミリング法が広く適用されている<sup>[1, 5, 7, 9, 10, 11等]</sup>。

平面ミリングと断面ミリングの加工模式図を図1に示す。

平面ミリング法には、フラットミリング<sup>®</sup>とレリーフミリングがある。

フラットミリング<sup>®</sup>法は、低角度(図1(a)中の $\theta$ を80°前後に設定する)で試料にイオンビームを照射させる方法で、結晶方位や組成によるミリングレート依存の影響



図2 オプション機能付きIM4000の外観(試料冷却ユニット、雰囲気遮断ユニット装備)

表1 オプション機能の主な仕様

| 項 目     | 内 容               |                     |
|---------|-------------------|---------------------|
|         | 雰囲気遮断ホルダ          | 試料冷却ユニット            |
| 最大試料サイズ | 5(W)×5(D)×2(H) mm | 20(W)×12(D)×7(H) mm |
| 反転角度    | ±15°              | ±15°, ±30°, ±40°    |
| 冷却温度    | —                 | 室温-30℃以下*           |
| その他     | 試料室上面にキャップ着脱機構装備  | コントローラ別置き           |

※液体窒素投入30分後のマスク温度

を少なくでき、広範囲の平坦なミリング加工が可能となる方法で、結晶状態の観察を目的に用いられる。これに対して、レリーフミリング法は、高角度(図1(a)中の $\theta$ を30°前後に設定する)で試料にイオンビームを照射させ、イオンビームの中心と試料の回転中心を偏心させる(図1(a)中のdを0～約5mmに設定)ことにより、結晶方位や組成によるスパッタリングレート差を利用して、試料断面に凹凸をつけ構造を浮き彫りにする加工法で、結晶粒界の観察、多層膜断面の層判別を目的に用いる<sup>[1, 6, 9, 12, 14, 15]</sup>。

断面ミリング法は、図1(b)に示すように試料とイオンガンの間に遮蔽板を配置して、遮蔽板を介して試料にイオンビームを照射する。このとき、試料を遮蔽板の端面から数十 $\mu$ m程度突出させてセットすることで、遮

蔽材端面から突出した部分が遮蔽板の端面に沿ってイオンミリングされ、平坦な断面を作製する加工法である<sup>[1, 13, 16]</sup>。

試料冷却ユニットと雰囲気遮断試料ホルダは断面ミリング用のオプションであり、試料を冷却した状態での断面ミリング、および大気非暴露での加工が可能となる。

### 2.1 装置の構成と仕様

試料冷却ユニットおよび雰囲気遮断ユニットを装備したIM4000形の外観を図2に、主な仕様を表1に示す。

試料室に試料冷却のための液体窒素デューアを装備し、試料室上側に雰囲気遮断ユニットのキャップ着脱機構を装備している。

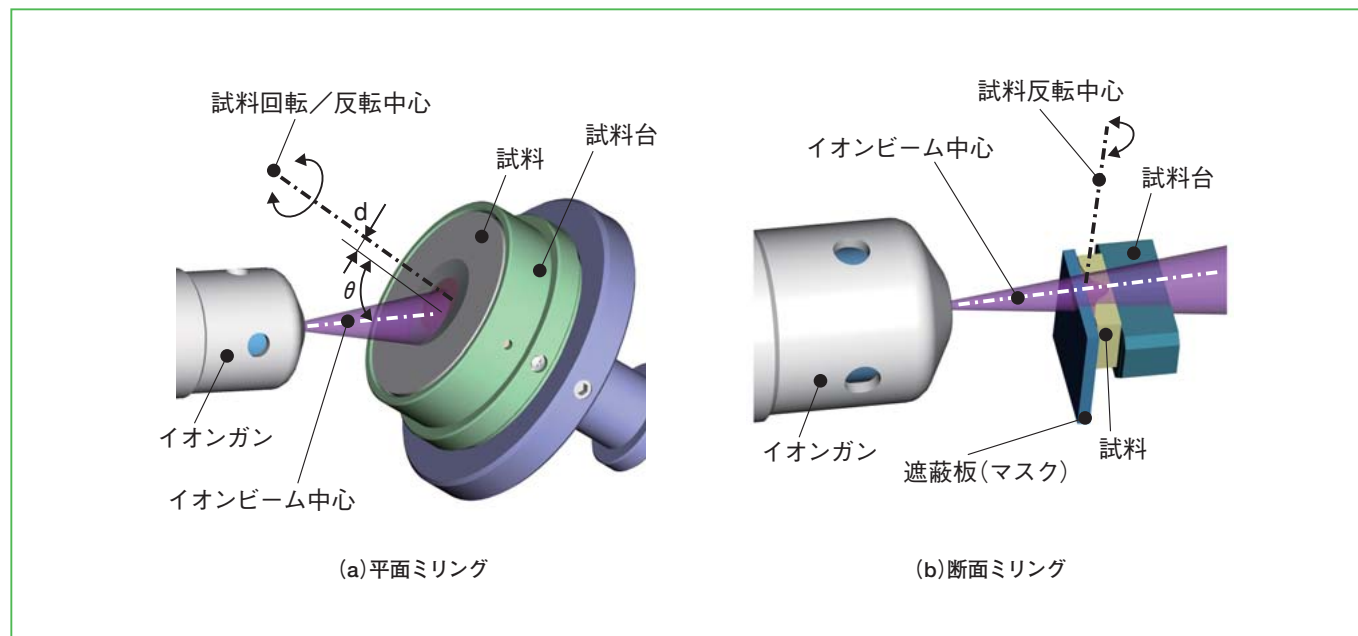


図1 平面ミリングと断面ミリングの加工模式図

\* (株)日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部 科学・医用システム設計開発本部 先端解析システム設計部  
 \*\* (株)日立ハイテクノロジーズ モノづくり統括本部 那珂地区生産本部 グローバルアプリケーションセンター  
 \*\*\* (株)日立ハイテクノロジーズ モノづくり統括本部 那珂地区生産本部 機械設計部



### 3. 試料冷却ユニット

IM4000形イオンミリング装置の試料冷却ユニットは、試料室外に設置した液体窒素デュアに充填した液体窒素からの試料間接冷却方式である。

試料を冷却しないイオンミリング処理では、イオンビーム照射による熱ダメージを受けやすい低融点材料(鉛入り半田、偏光板、セパレータ)に対して冷却ミリングを適用した結果を示す。

#### 3.1 鉛入り半田の適用例

試料を冷却しないイオンミリング処理では図3(a)に示すように試料の温度上昇に起因する熔融によって空隙が形成され、Pb-Snの界面も確認できない。これに

対し、試料冷却ユニットを用いた冷却イオンミリングでは図3(b)に示すようにPb-Snの界面が明瞭に確認でき、空隙も確認できないことから、試料冷却により試料の変形を抑制した効果と考えられる。

#### 3.2 偏光板の適用例

鉛入り半田と同様に、偏光板を冷却有無でイオンミリング処理した結果を示す。図4(a)に示すように冷却無しのイオンミリングでは、粘着層にスジ、穴が発生しているのに対し、試料冷却ユニットを用いたイオンミリング加工では、図4(b)に示すように粘着層のスジ、穴の発生無く平滑に加工できており、層間を粘着層がつながり様子が観察できる。

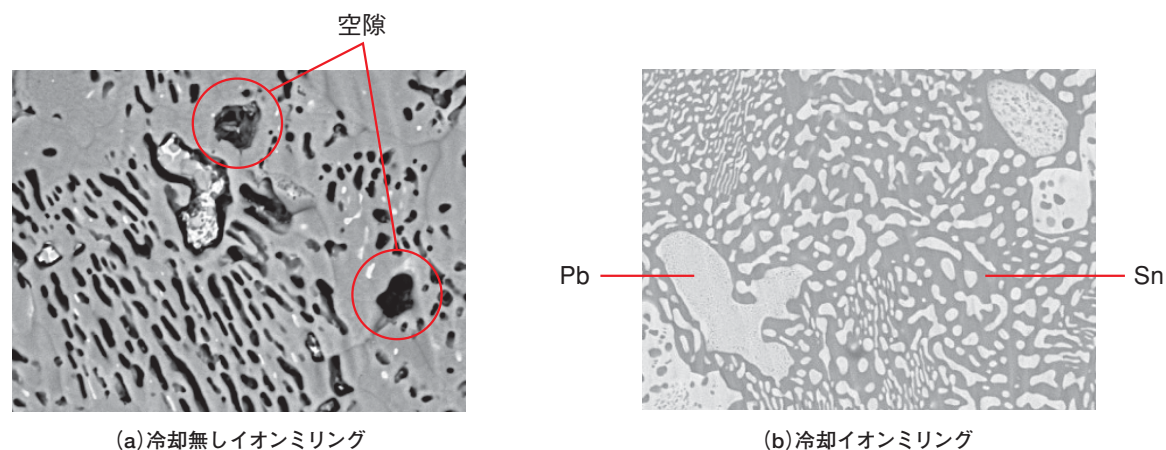


図3 鉛入り半田への適用例

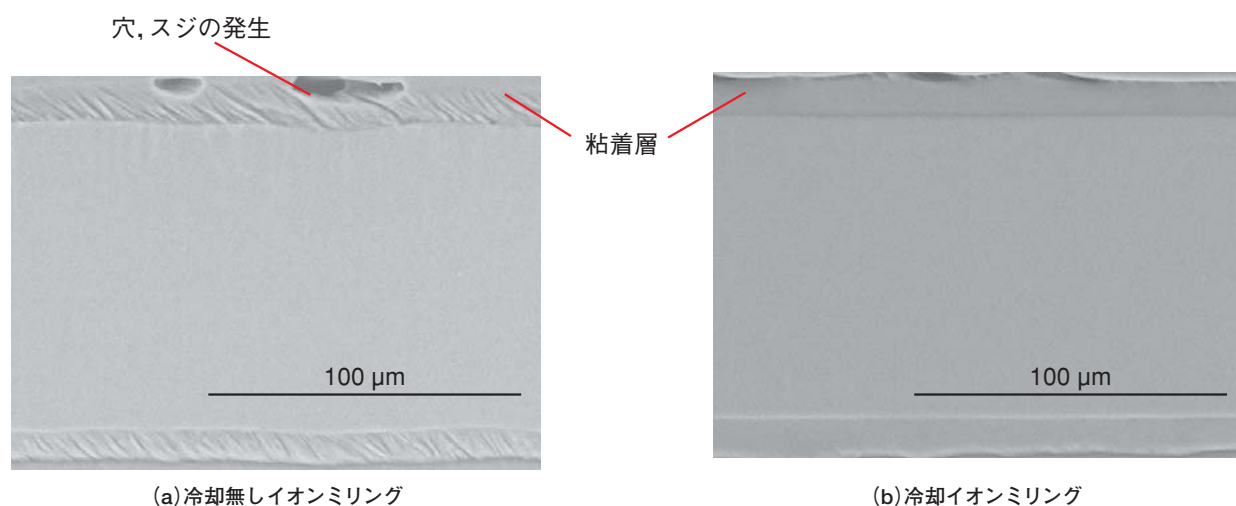


図4 偏光板への適用例

### 3.3 Liイオン電池用セパレータの適用例

冷却なしのイオンミリング処理では、図5(a)に示すように微細なフィラメント構造が熱の影響によって切れているのが確認できるのに対し、冷却イオンミリングでは、図5(b)に示すように最表面の微細なフィラメントが切れずに残存しており、微細高分子繊維で構成されるセパレータの構造が明瞭に観察されており冷却イオンミリングの効果が確認できる。

#### 4. 雰囲気遮断試料ホルダ

当社旧製品のE-3500形イオンミリング装置は、大気に非接触で試料を保持する手段を持たなかったため、大気中の酸素や水分と反応して形状が大きく変化してしまうLiイオン電池材等へ適用できなかった。

IM4000の雰囲気遮断試料ホルダは、Liイオン電池負極材の断面ミリングを主用途として、大気に暴露するこ

となく試料を保持できる断面試料ホルダとして開発したものである。雰囲気遮断イオンミリングの主な操作手順を図6に示す。

酸素濃度や露点温度を制御したグローブボックス内でLiイオン電池負極材をトリミングした後に雰囲気遮断試料台にセットし、キャップで密閉後にグローブボックス外に取りだしIM4000に設置する。イオンミリング処理前後の試料は、真空排気した試料室内でキャップ着脱により密閉できる構造で、雰囲気遮断試料交換対応のSEM<sup>[9,17]</sup>と試料ホルダを共用できる形状としており、イオンミリング処理後の試料はグローブボックスを介さずSEM観察可能である。

この雰囲気遮断試料ホルダを使用して、充電後のLiイオン電池負極材に適用し、大気に暴露させずに断面構造をSEMで観察した例を示す。



図5 Liイオン電池セパレータへの適用例

試料ご提供(偏光板、セパレータ)：  
旭化成ケミカルズ株式会社 基盤技術開発部 主幹研究員 乙部 博英様



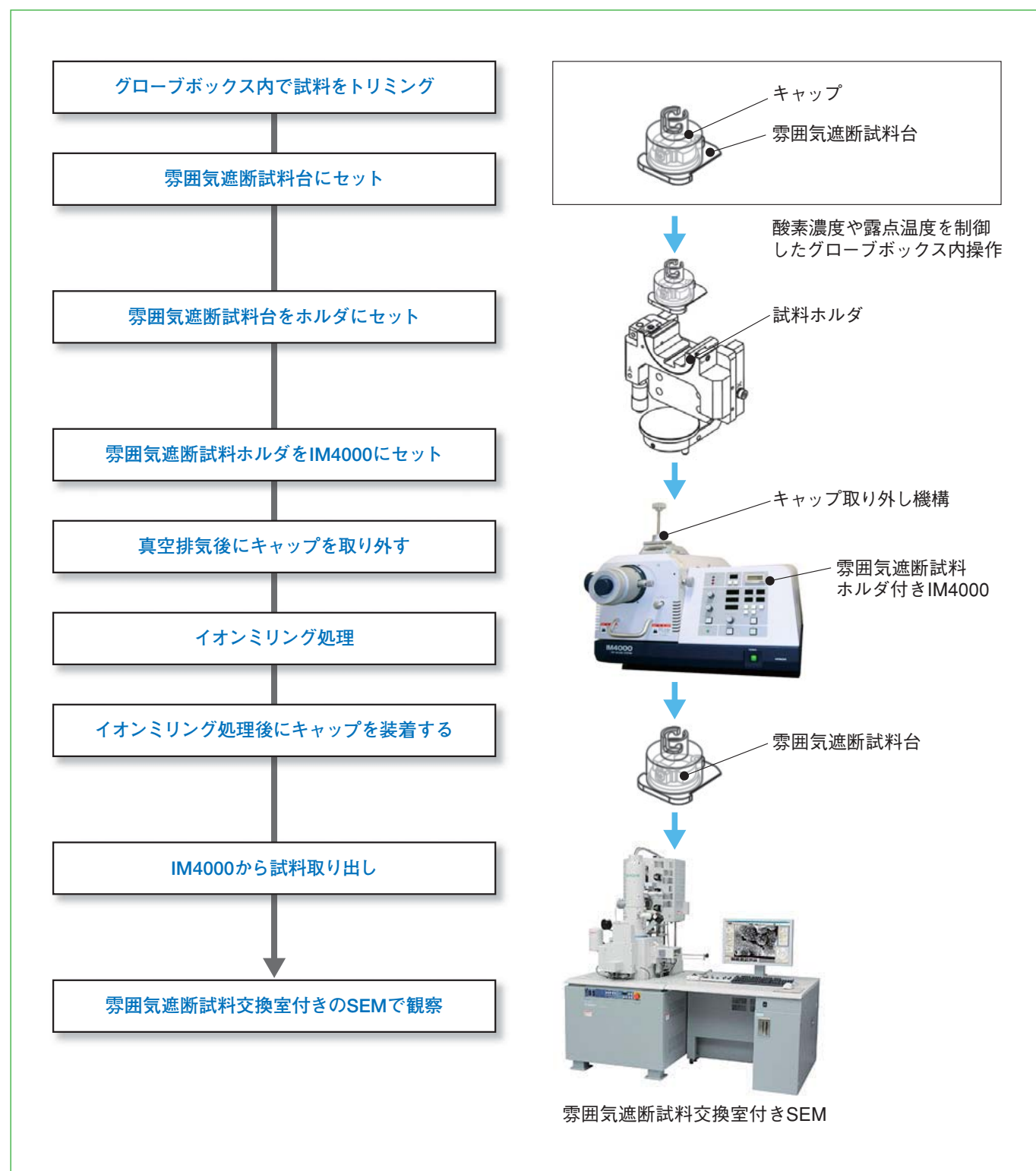


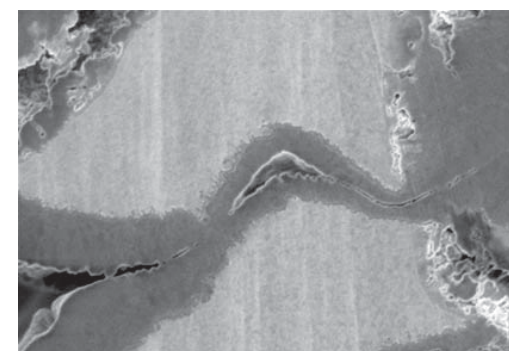
図6 雰囲気遮断イオンミリングの操作手順

#### 4.1 充電したLiイオン電池負極材の雰囲気遮断ミリングの適用例

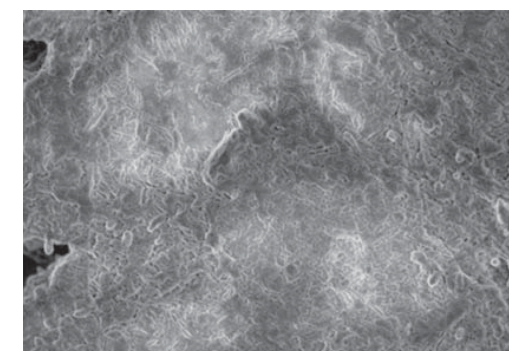
雰囲気遮断ホルダを用いてイオンミリング処理したLi電池負極材のSEM観察像は図7(a)に示すようにLiイオン電池の負極構造の断面が平滑に加工できており、構造が明瞭に観察できている。このサンプルをSEM観察後に約10分間大気に暴露したところ、図7(b)に示すSEM像のように、大気中の水分や酸素に接触したことにより、負極材の断面構造が確認できない程著しい形状の変化(膨張)が起こっており雰囲気遮断ホルダの有効性が確認できる。

#### 4.2 充電したLiイオン電池負極材の冷却雰囲気遮断ミリングの適用例

IM4000では、試料冷却ユニットを用いた雰囲気遮断ミリングホルダの冷却が可能である。この冷却・雰囲気遮断ミリングをLiイオン電池負極材へ適用した例を示す。冷却・雰囲気遮断ミリングによるSEM像は、図8(a)に示すように粒状構造の外周に微小突起形状が確認できる。この微小突起形状は、図7(a)に示す冷却しない雰囲気遮断イオンミリング処理結果では確認できないことから、試料冷却によりイオンビーム照射による熱での消失を抑制した効果と考えられる。SEM観察後に大気暴露して観察すると、図8(b)に示すように冷却無しの雰囲気遮断ミリングと同様に試料表面への析出物や膨張が確認でき、試料冷却ユニットとの併用でも雰囲気遮断ホルダの効果を確認できる。

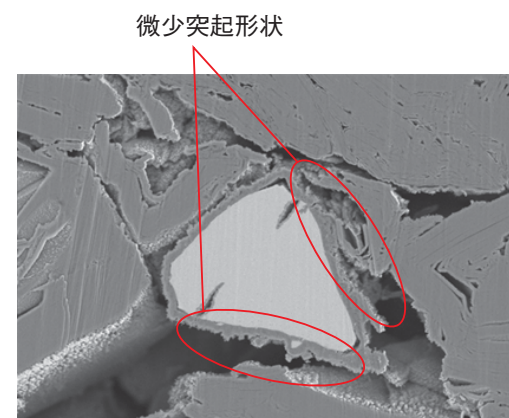


(a) 雰囲気遮断イオンミリング

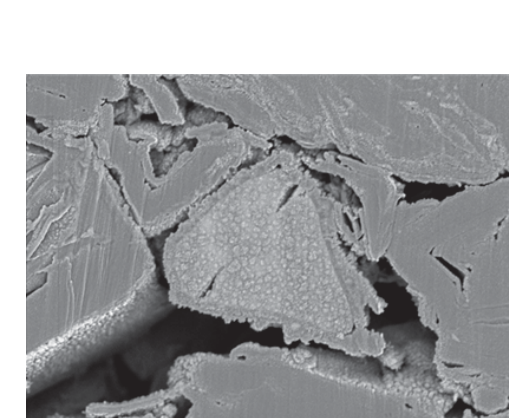


(b) 雰囲気遮断イオンミリング後大気暴露

図7 Liイオン電池負極材の適用例



(a) 試料冷却・雰囲気遮断イオンミリング



(b) 試料冷却・雰囲気遮断イオンミリング後大気暴露

図8 Liイオン電池負極材の冷却・雰囲気遮断イオンミリングの適用例



## ■ まとめ

IM4000形イオンミリング装置のオプションとして、雰囲気遮断試料ホルダ、試料冷却ユニットを開発し、各々のイオンミリング処理例を紹介した。

今後もSEM観察に適した前処理ツールとして、さらなる市場ニーズに適した加工機能を製品化してゆく予定である。

## ■ 謝辞

試料冷却ユニットの開発にあたり、旭化成ケミカルズ(株)基盤技術開発部 主幹研究員 乙部博英様には試料のご提供と冷却ミリング評価について技術のご指導を頂き心より感謝申し上げます。

また、雰囲気遮断試料ホルダのLiイオン電池材料の評価に際しましては、国内の技術者の方々から評価試料のご提供と貴重なアドバイスを頂いており紙面を借りてお礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] 新・走査電子顕微鏡 日本顕微鏡学会関東支部編 共立出版(2011年)
- [2] 上野敦史, 他: Liイオン電池負極材へのイオンミリングの適用 日本顕微鏡学会第68回学術講演会発表要旨集221(2012)
- [3] 岩谷 徹, 他: 新型イオンミリング装置での試料冷却の試み 日本顕微鏡学会第67回学術講演会発表要旨集261(2011)
- [4] 武藤宏史, 他: 高レートイオンミリング装置の開発 日本顕微鏡学会第66回学術講演会予稿集207(2010)

- [5] 鈴木猛夫, 他: イオンミリングによるSEM試料作成, 日本電子顕微鏡学会第48回学術講演会予稿集 246(1992)
- [6] 許斐麻美, 他: フラットミリング法を用いたSEM解析のための広域試料作成, 日本顕微鏡学会第66回学術講演会発表要旨集 205(2010)
- [7] 伊藤寛征: イオンミリングによる多様な試料前処理例, 日本顕微鏡学会第61回学術講演会講演概要集 P.97(2005)
- [8] 細谷幸太郎: 雰囲気遮断試料交換による酸化防止観察手法, 日本顕微鏡学会第66回学術講演会発表要旨集 P.197(2010)
- [9] 山田満彦他: イオンミリングによるSEM試料作製: SCANTECH'92予稿集, p.15(1992)
- [10] 野中裕貴他: E-3200形日立フラットミリング装置: HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS, Vol.34 (No.4), p.24(1991)
- [11] 平坂雅男, 朝倉健太郎: FIB・イオンミリング技法Q&A: アグネ承風社(2002)

## 日立ハイテクノロジーズ刊 TECHNICAL DATA

- [12] (SEM No.131) イオンミリングによるSEM試料断面作製
- [13] (SEM No.133) E-3500形イオンミリング装置の特長と電子部品材料への応用
- [14] (SEM No.136) IM-3000形フラットミリング装置の特長と応用
- [15] (SEM No.139) Arイオンミリングによる電子部品の実装部解析
- [16] (SEM No.142) 高レートイオンガン付きE-3500形イオンミリング装置とその応用
- [17] (SEM No.147) FE-SEM SU8000によるLiイオン電池材料の観察
- [18] (SEM No.149) IM4000形イオンミリング装置の特長と応用

# SU3500用新型低真空検出器(UVD)の特長と応用

## Introduction of New Ultra Variable-pressure Detector (UVD) for SU3500 VP-SEM

西村 雅子<sup>1</sup> 海老根 裕太<sup>1</sup> 片根 純一<sup>1</sup> 塩野 正道<sup>2</sup> 坂上 万里<sup>2</sup> 振木 昌成<sup>2</sup>

## 1. はじめに

低真空走査電子顕微鏡は、非導電性試料を無蒸着で観察できることから、幅広い分野で利用されている。低真空観察における画像の形成法としては、①1～100 Pa程度の圧力下で反射電子を検出する方法と、②40～2000 Pa程度の圧力下で試料周囲の残留ガスにより二次電子を増幅して検出する方法に大別される<sup>1)</sup>。一方、最近では、デジタル信号処理によって、異種信号の同時表示および取得が可能となり、高加速電圧観察においては、50～80 Paの圧力下で、組成コントラストを反映した反射電子像と試料表面の凹凸形状を反映した二次電子ガス増幅像を同時に表示して観察することができる。しかし、加速電圧5 kV以下の低加速電圧

観察においては、試料室圧力が像形成に大きく影響し、最適試料室圧力が反射電子像では30 Pa以下、二次電子ガス増幅像では50～70 Paと異なるため、両画像を同時にS/N(信号とノイズの比)良く観察することは困難となる。

そこで今回、加速電圧5 kV以下の低加速電圧においても、反射電子像と二次電子ガス増幅像を同時にS/N良く観察することを可能にするため、30 Pa以下でも二次電子ガス増幅信号を検出できる新型低真空検出器(Ultra Variable-pressure Detector: UVD)を開発した。本稿では、UVDの概要とその応用例について紹介する。

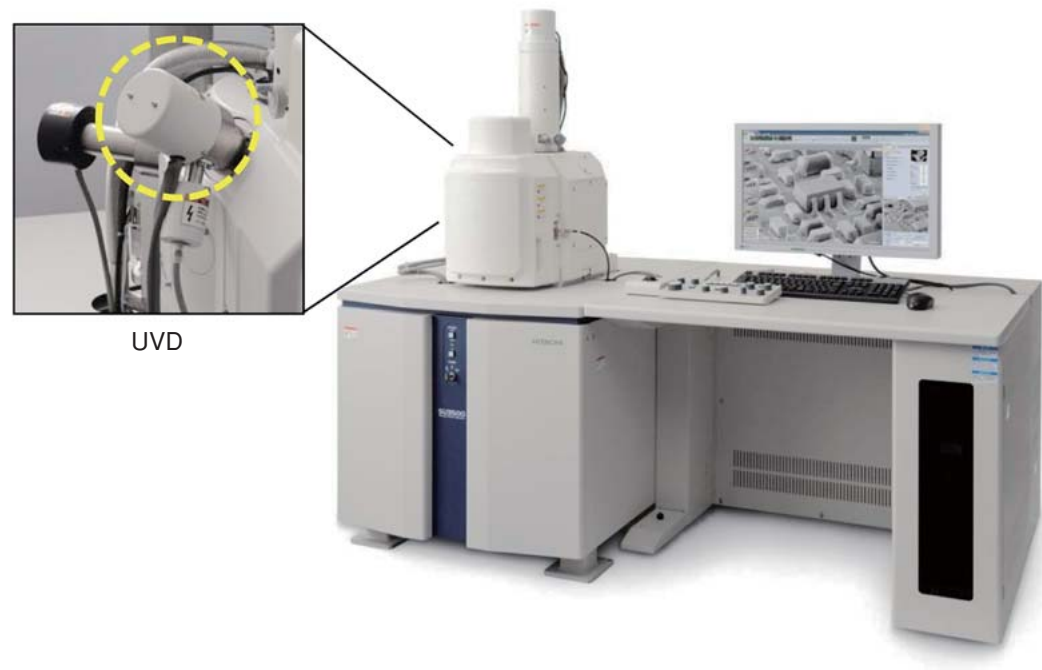


図1 UVDを装着したSU3500の外観

1 株式会社日立ハイテクノロジーズ 先端解析システム設計部  
2 株式会社日立ハイテクノロジーズ グローバルアプリケーションセンタ



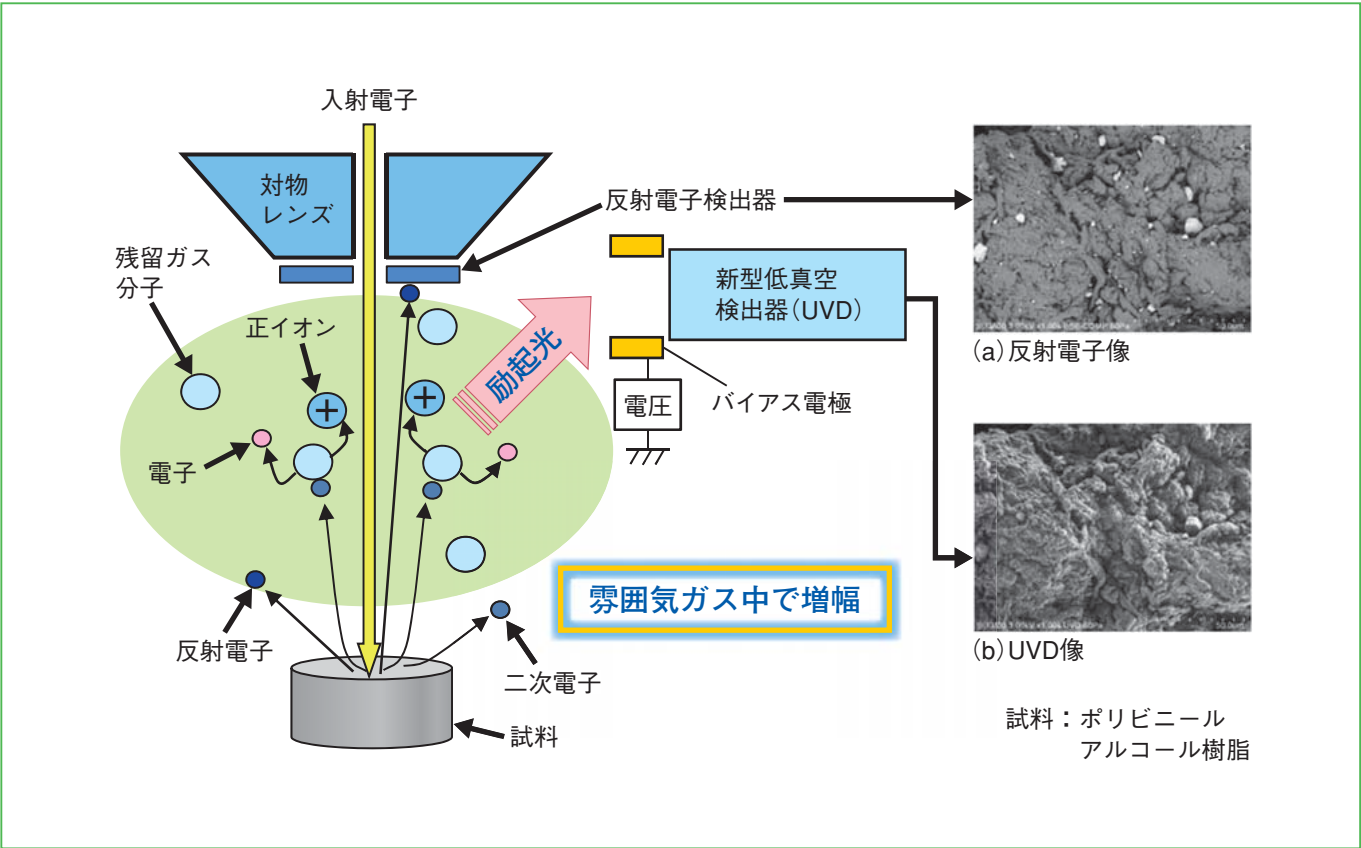
2. UVDの概要

図1にUVDを装着した低真空走査電子顕微鏡SU3500の外観、図2にUVDの信号検出法を示す。

入射電子を試料に照射すると、低真空雰囲気であっても試料表面から二次電子は発生する。しかし、二次電子はその保有エネルギーが小さいため、ガス分子と衝突してエネルギーを失いやすく、また低真空下では二次電子を検出器に向けて加速するための高電圧も印加できないという理由から、高真空観察で用いられる二次電子検出器で検出することはできない。

そこで低真空観察では、二次電子ガス増幅信号を捉えるための専用の低真空検出器を装着している。検出器近傍に配置したバイアス電極に数百Vの電圧を印加して、電極と試料表面の間に電界を形成すると、試料

表面で発生した二次電子は加速されて残留ガス分子と衝突し、残留ガス分子は正イオンと電子に電離する。従来の低真空検出器では正イオンを検出して像形成を行っていたが、UVDではその際に生じる励起光を検出して像形成を行う。二次電子および発生した電子は再度バイアス電極によって形成される電界により加速されて、電離が繰り返されるため、正イオンと電子が指数関数的に増幅し、それに伴って励起光も放出される。電離によって生じた励起光は二次電子情報を有しているため、低真空観察においても、高真空二次電子像と酷似した試料表面の凹凸形状を反映した画像を得ることができる。



3. UVDの評価

加速電圧5 kVにおいて、試料室圧力を20 Pa～50 Paに可変し、同一照射電流で、反射電子像、従来型の低真空検出器像、UVD像を取得した結果を図3に示す。反射電子像では試料室圧力が低くなるにつれてS/Nの良い画像が得られるが、従来型低真空検出器像で

は40 Pa以下でS/Nの著しい低下が認められる。一方、UVD像では、反射電子像と同様、試料室圧力が低くなるにつれて画像のS/Nが良くなり、反射電子像と同時観察が可能な30 Pa以下においても画像を得ることができた。また、従来型低真空検出器像と同様、試料表面の凹凸形状を反映した画像であった。

|       | 反射電子像 | 従来型低真空検出器像 | UVD像 |
|-------|-------|------------|------|
| 20 Pa |       |            |      |
| 30 Pa |       |            |      |
| 40 Pa |       |            |      |
| 50 Pa |       |            |      |

図3 同一照射電流での試料室圧力における画像比較  
(試料：塗工紙，加速電圧：5 kV，照射電流： $2.6 \times 10^{-11}$  A，観察倍率：500倍)



## 4. 応用例

### 4.1 電子部品破面の観察

電子部品破面の同一視野を、試料室圧力20 Pa、加速電圧3 kVで、反射電子像とUVD像を同時に取得した結果を図4に示す。反射電子像(図4(a))では組成コントラスト、UVD像(図4(b))では破面の凹凸形状、さらに両信号を合わせたミキシング像(図4(c))で

は、組成コントラストと凹凸形状を同時に観察することができる。

### 4.2 樹脂／無機粒子複合材料の観察

樹脂／無機粒子複合材料の同一視野を、試料室圧力30 Pa、加速電圧15 kVと3 kVで、反射電子像とUVD像を同時に取得した結果を図5に示す。加速電圧

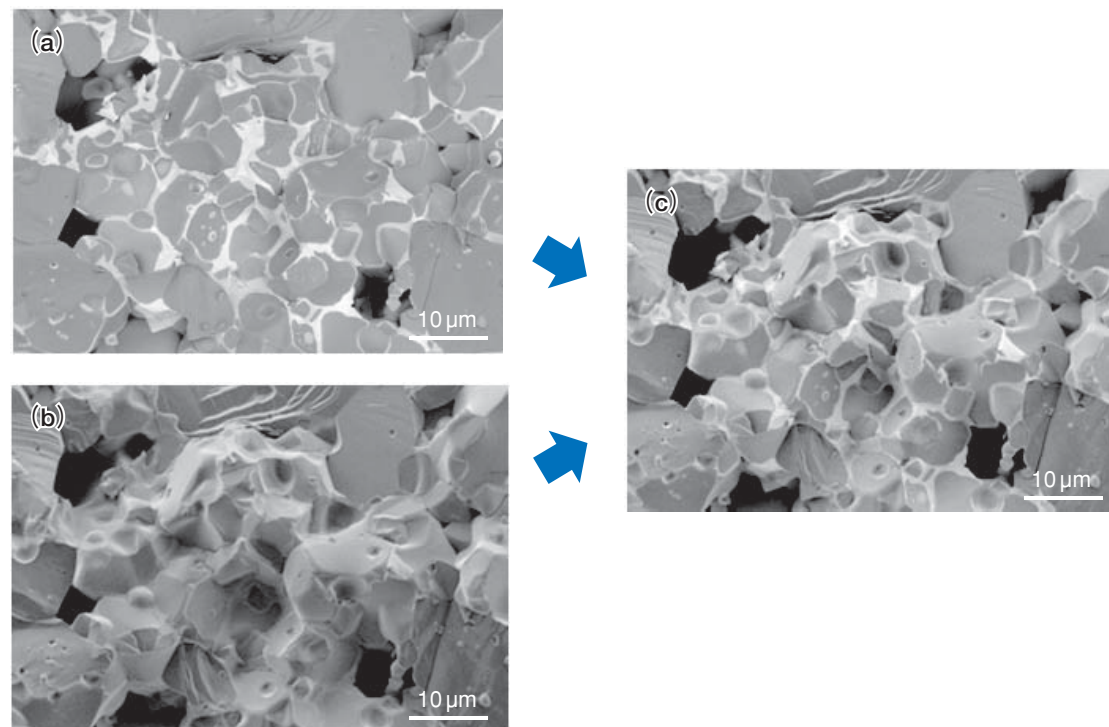


図4 電子部品破面の異種信号同時観察  
(a)反射電子像、(b)UVD像、(c)反射電子像＋UVD像  
試料室圧力：20 Pa、加速電圧：3 kV、観察倍率：3,000倍

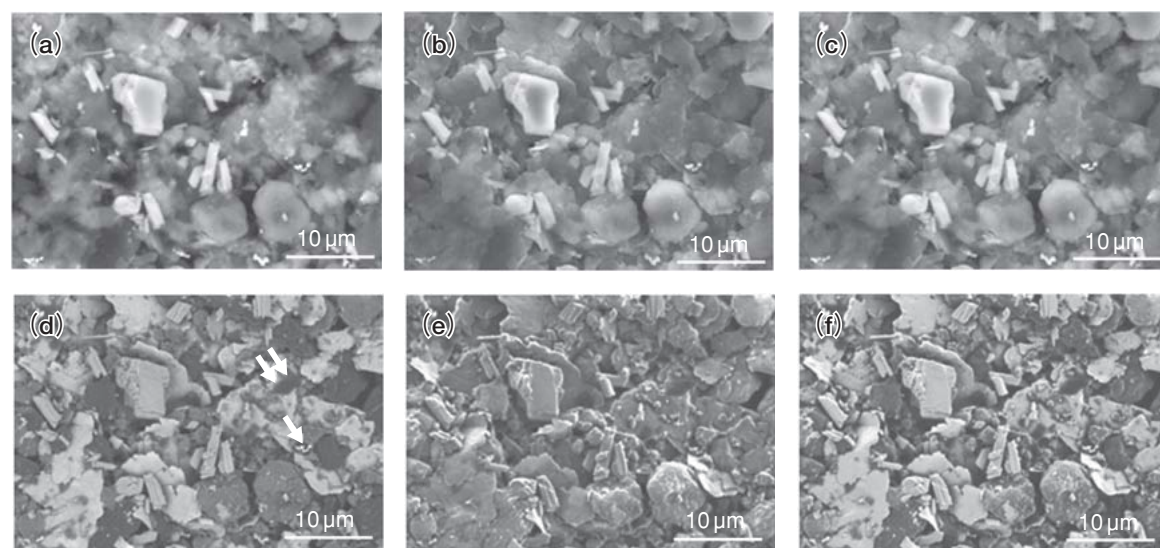


図5 樹脂／無機粒子複合材料の異種信号同時観察  
(a)加速電圧15 kV／反射電子像、(b)加速電圧15 kV／UVD像、(c)加速電圧15 kV／反射電子像＋UVD像、  
(d)加速電圧3 kV／反射電子像、(e)加速電圧3 kV／UVD像、(f)加速電圧3 kV／反射電子像＋UVD像  
試料室圧力：30 Pa、観察倍率：3,000倍

15 kVでは、反射電子像(図5(a))、UVD像(図5(b))ともに、入射電子が試料の内部深くまで侵入し、内部情報が混入して表面情報が少なくなるため、試料表面の微細構造を把握することは困難である。一方、加速電圧3 kVでは、反射電子像(図5(d))で組成が異なる粒子が複合的に存在していることが確認でき、UVD像(図5(e))では試料表面の僅かな凹凸形状や粒子間の立体構造が明らかとなった。ミキシング像(図5(f))では、両信号の情報を同時に観察することができる。

## 5. まとめ

新型低真空検出器(UVD)を開発し、反射電子像観察に最適な試料室圧力30 Pa以下で、S/Nの良い凹凸形状を反映した画像取得が可能となった。加速電圧5 kV以下での反射電子像とUVD像の同時観察は、今後、様々な試料の評価や解析において活用が期待できる。

### 参考文献

- 1) 日本顕微鏡学会関東支部 編，新・走査電子顕微鏡，共立出版株式会社(2011)

## 学会発表 ミニファイル

### 1. 日本藻類学会第36回大会(2012/7/14~15 北海道)

塩野 正道(日立ハイテクノロジーズ)：イオン液体を用いたヒカリモ浮遊相の走査電子顕微鏡観察

### 2. Microscopy & Microanalysis 2012(2012/7/30~8/2 米国)

佐藤 高広(日立ハイテクノロジーズ)他：Reduce electron damage in atomic resolved SEM observation using aberration corrected electron microscope.

砂押 毅志(日立ハイテクノロジーズ)他：A Study of crystal lattice fringe observation using the 30 kV STEM.

鈴木 裕也(日立ハイテクノロジーズ)他：Application of selected diffraction with STEM to some materials.

### 3. 第28回分析電子顕微鏡討論会(2012/9/4~5 千葉県)

森川 晃成(日立ハイテクノロジーズ)他：雰囲気遮断FIB/STEMシステムを用いたネオジム磁石の微細構造解析

土屋 美樹(日立ハイテクノロジーズ)他：含水液体試料のクライオFIB加工とSEM観察

### 4. 英国王立化学会(RSC)東京国際コンファレンス2012(2012/9/6~7 千葉県)

白井 学(日立ハイテクノロジーズ)他：Cryo transfer observation of vitreous ice-embedded liposomes using 120 kV TEM.

坂上 万里(日立ハイテクノロジーズ)他：Applications of Hitachi tabletop microscope TM3000.

### 5. 2012年秋季第73回応用物理学会(2012/9/11~14 愛媛県)

生頼 義久(日立ハイテクノロジーズ)他：30 kV STEMによるMOS界面の高コントラスト観察の検討

### 6. 日本植物学会第76回大会(2012/9/15~17 兵庫県)

許斐 麻美(日立ハイテクノロジーズ)他：加圧凍結技法を用いた分裂酵母の超微構造学的解析

### 7. EMC2012(2012/9/16~21 英国)

砂押 毅志(日立ハイテクノロジーズ)他：30 kV STEM imaging with lattice resolution using a high resolution cold FE-SEM

今野 充(日立ハイテクノロジーズ)他：Reduce the electron damage in atomic resolved SEM observation using aberration corrected electron microscope.

渡邊 俊哉(日立ハイテクノロジーズ)他：Observation of the fine structures of green energy materials by a high resolution FE-SEM.

### 8. 第44回日本臨床分子形態学会(2012/9/28~29 高知県)

中澤 英子(日立ハイテクノロジーズ)他：日立透過電子顕微鏡HT7700形の機能と応用

### 9. 第32回LSIテストングシンポジウム(2012/11/7~9 大阪府)

生頼 義久(日立ハイテクノロジーズ)他：30 kV STEMを用いたMOS界面の高コントラスト観察の検討

福井 宗利(日立ハイテクノロジーズ)他：LSIパターン断面のイオン液体を用いたSEM観察法の検討

### 10. 日本顕微鏡学会第56回シンポジウム(2012/11/19~20 北海道)

中澤 英子(日立ハイテクノロジーズ)他：イオン液体の電子顕微鏡応用

上村 理(日立製作所)他：低加速電子回折顕微鏡

#### ◆トピックス

塩野 正道(日立ハイテクノロジーズ)：イオン液体を用いたヒカリモ浮遊相の走査電子顕微鏡観察  
日本藻類学会第36回大会(2012/7/14~15 北海道)

【要旨】ヒカリモは各地の洞窟内の湧水などに生息する淡水性単細胞藻類で、不等毛植物門、黄金色藻綱に属する。ヒカリモには2本の鞭毛を用いて水中を泳ぐ遊泳相と、柄を形成して水面に浮かぶ浮遊相があり、浮遊相は洞窟内で光を反射して黄金色に輝くことが知られている。浮遊相は通常の化学

固定法で形態を保持できないため、これまで走査電子顕微鏡(SEM)による観察は行われていない。そこで我々は、真空中で液体状態であるイオン液体を用いてヒカリモの浮遊相の観察を試みた。イオン液体(1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム テトラフルオロボレート)の希釈濃度2.5 %及び5 %を用いることに

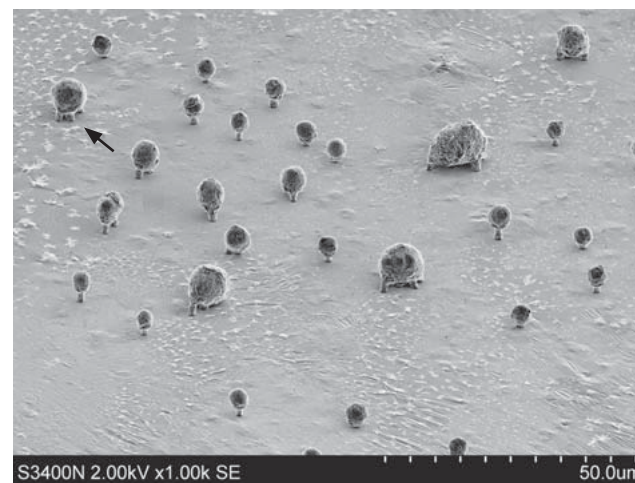


図1 イオン液体上に浮遊するヒカリモ  
試料傾斜：60度，加速電圧：2 kV，信号：二次電子  
観察倍率：1,000倍，装置：S-3400N

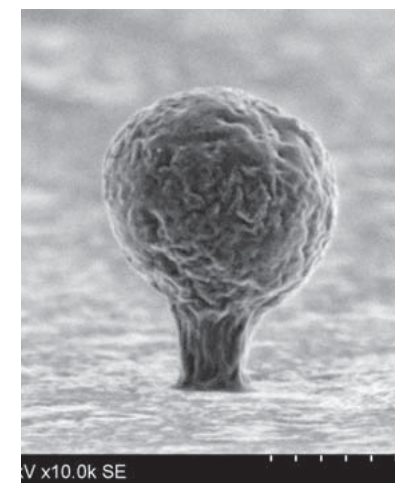


図2 5 %希釈イオン液体で処理したヒカリモ  
試料傾斜：90度，加速電圧：2 kV，  
信号：二次電子  
観察倍率：10,000倍，装置：S-3400N



より、イオン液体表面に浮遊した状態のヒカリモをSEM観察することができた。また、試料を傾斜して観察した結果、一本の柄を有する細胞や複数の柄

を有する細胞が観察された(図1, 矢印)。図2は試料を90度傾斜して真横から観察した結果で、細胞体が柄で保持されている様子が捉えられている。

生頼 義久(日立ハイテクノロジーズ)他: 30 kV STEMによるMOS界面の高コントラスト観察の検討  
2012年秋季第73回応用物理学会(2012/9/11~14 愛媛県)

【要旨】半導体デバイスの微細化によりTEM/STEM解析のための試料は、デバイス寸法と同程度あるいはそれ以下に薄膜化する必要があるが、薄膜化により像コントラストが低下し、Si/SiO<sub>2</sub>界面やNANDフラッシュメモリのONO膜などの観察が困難となる。我々は冷陰極電界放出型電子銃を搭載したインレンズSEM日立SU9000にて加速電圧30 kVでのSTEM(Scanning transmission electron microscope: 走査透過像観察装置)を用いてSi(111) d=0.314 nm格子像を取得した(Fig. 1(a))。そのFFT像からSi(111)に相当する回折スポットが得られている。さらに格子像の高コントラスト化のため球面収差(Cs)低

減による像質の向上を検討した。Fig. 1(b)はCs低減後の30 kV BF-STEMを用いて得られたSi(111) d=0.314 nmの格子像とそのFFT像で、Csが半減し、Si(111)格子像のコントラストが改善している。また、そのFFT像にはSi(200) d=0.272 nmの回折スポットが確認され、分解能の向上が明らかとなった。Fig. 2はその条件を用いて撮影したデバイス薄膜試料(膜厚30 nm) MOS界面の高分解能観察結果である。酸化膜のラフネスを高コントラストで観察できると同時にSi(111)の格子像が明瞭に観察されている。これらの結果から格子間隔を用いた倍率校正による高精度の測長が期待できる。

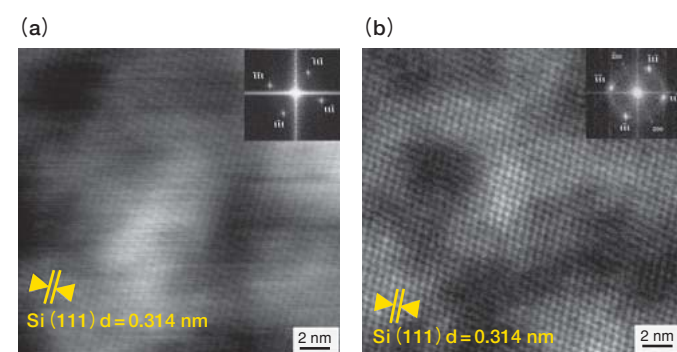


Fig. 1 BF-STEM image of the single-crystal silicon  
(a) Before Cs reduction, (b) After Cs reduction  
Specimen: Single-crystal Si<011>,  
Acceleration voltage: 30 kV

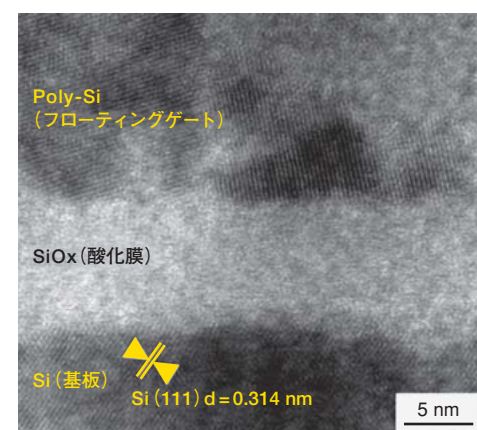


Fig. 2 BF-STEM image around the gate oxide  
Specimen: 3X nm NAND flash memory  
Specimen thickness: 30 nm,  
Acceleration voltage: 30 kV

## 1. 第25回バイオメディカル分析科学シンポジウム(2012/8/8~10 東京)

中川 裕章(日立ハイテクノロジーズ)他: 反応クロマトを用いた糖ペプチドの選択的分析

井上 陽子(日立ハイテクノロジーズ)他: バイオ医薬品等製造におけるアミノ酸モニタリング

井上 陽子(日立ハイテクノロジーズ)他: Amino acid analysis of peptide based on the regulation method

## 2. 日環協・関東支部環境セミナー(2012/7/12~13 群馬)

白崎 俊浩(日立ハイテクノロジーズ)他: 日立原子吸光光度計の新機能の紹介

## 3. 第25回イオン交換セミナー(2012/7/13 東京)

中川 裕章(日立ハイテクノロジーズ): 分析分野への挑戦~アミノ酸分析への展開

## 4. 英国王立化学会(RSC)東京国際コンファレンス2012(2012/9/6~7 東京)

宝泉 雄介(日立ハイテクノロジーズ)他: Analyses of Biopharmaceuticals using Amino Acid Analyzer

【Summary】Quantitative analysis of amino acids is required in several fields, including biomedical research, bio-engineering, amino acid metabolism and food science. Moore and Stein developed the first automated amino acid analyzer (AAA), combining cation-exchange chromatographic separation of amino acids with postcolumn ninhydrin detection<sup>[1]</sup>. This method is excellent in stability and repeatability. Recently, the production of biopharmaceuticals, such as immunoglobulins

and erythropoietin, has increased greatly. As the majority of these biopharmaceuticals are proteins produced by the cell culture, the control of cell culture conditions and confirmation of amino acid components of product, is very important. In this presentation, we will present several AAA applications, amino acid monitoring of Cell culture medium, Amino acid components analysis of monoclonal antibody often used as a model sample for biopharmaceutical

片山 裕美子(日立ハイテクノロジーズ)他: Food Safety and Environmental Safety for Human Health (Introduction for Hitachi ZA3000 series Polarized Zeeman ASS)

## 5. 第73回応用物理学会学術講演会(2012/9/11~14 愛媛)

市川 慈(日立ハイテクノロジーズ)他: 液体電極プラズマを用いた原子発光における発光分布の元素種依存性

## 6. (一社)日本環境測定分析協会『環境と測定技術』Vol.39/ No.8

三浦 和代(日立ハイテックコントロールシステムズ)他: 原子吸光法による環境試料中セシウムの分析

テクニカルデータ発行ミニファイル (バックナンバー紹介)

日立ハイテックが製品別に発行しているアプリケーションデータシート“TECHNICAL DATA”のご紹介です。

ここでご紹介するアプリケーションデータの詳細をご希望の場合は会のアドレスよりお申込み頂き、S.I.navi(会員制サイト)にご入会頂ければ直接インターネットで参照することが出来ます。

<http://www.hitachi-hitec.com/sinavi/>

|       |                                                                                                                                                                                                                              |     |          |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------|
| 題目    | ZA3000形、ZA3700形搭載ツインインジェクションテクノロジーのご紹介<br>Introduction of Twin-Injection Technology on Model ZA3000 and ZA3700                                                                                                               |     |          |
| 機種    | ZA3000形偏光ゼーマン原子吸光度計<br>ZA3000, ZA3700 Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer                                                                                                                                   |     |          |
| シートNo | AA No.128                                                                                                                                                                                                                    | 発行日 | 2012年12月 |
| 要約    | 日立原子吸光度計ZA3000シリーズに搭載された電気加熱炉法における新技術「ツインインジェクションテクノロジー」を紹介します。ツインインジェクションテクノロジーは試料を炉内へ二ヶ所に分けて注入することが可能です。試料と電気加熱炉(キューベット)の接触面積を増やすことで乾燥時間を延長させることなく、試料注入量を増加させ高感度に測定することができます。ここではツインインジェクションテクノロジーを用いた河川水中の微量Sbの分析例を紹介します。 |     |          |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |          |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------|
| 題目    | HT7700用 走査透過像観察装置(STEM)の材料分野への応用(1)<br>Some applications of STEM instrument on an HT7700 to materials                                                                                                                                                                                      |     |          |
| 機種    | HT7700形透過電子顕微鏡<br>Model HT7700 Transmission Electron Microscope                                                                                                                                                                                                                            |     |          |
| シートNo | TEM No.140                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 発行日 | 2012年10月 |
| 要約    | 120 kV汎用型TEM HT7700の走査透過像観察装置(以下、STEM)では明視野(BF)STEM像および暗視野(DF)STEM像を取得することができます。STEM像はTEM像と比較して色収差の影響を受けにくいため厚い試料の観察に有効です。また、BF-STEM像では回折コントラストを含め明視野TEM像と同様なコントラストを、DF-STEM像では原子番号効果を活用した組成コントラストを得ることができます。このようにHT7700ではTEM機能に加え、多種の信号検出により多角的な観察が可能です。<br>本稿では、STEM像観察の材料分野への応用例を紹介します。 |     |          |

|       |                                                                                                                       |     |          |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------|
| 題目    | SU9000形走査電子顕微鏡の特長と応用<br>SU9000 : Its characteristics and application data                                             |     |          |
| 機種    | SU9000形日立超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡<br>Ultra-high Resolution Scanning Electron Microscope SU9000                               |     |          |
| シートNo | SEM No.148                                                                                                            | 発行日 | 2012年10月 |
| 要約    | SU9000形走査電子顕微鏡(以下、SU9000)は、新開発の電子銃とインレンズ方式の対物レンズを搭載することで、装置起動直後から高いビーム電流で超高分解能観察が可能となりました。今回は、SU9000の主な特長と応用例をご紹介します。 |     |          |

7. 日本分析化学会第61年会(2012/9/19～21 石川)

米谷 明(日立ハイテクノロジーズ)他：電気加熱原子吸光法における高粘性試料測定時のキューベット選択方法  
坂元 秀之(日立ハイテクノロジーズ)他：HPLC－水素化物発生－原子吸光光度法による電解液中の無機ヒ素の形態分析  
堀込 純(日立ハイテクノロジーズ)他：分光蛍光光度計による溶液試料の高濃度領域における蛍光特性評価方法の検討 ～第3報～  
小原 賢信(日立製作所)他：液体電極プラズマを用いた原子発光分布の元素間相違とその計測応用  
蛭田 多美(日立ハイテックコントロールシステムズ)他：作業環境測定におけるN,N-ジメチルヒドラジン分析法の検討

三浦 和代(日立ハイテックコントロールシステムズ)他：ジルコニウム担持ポリアミノポリカルボン酸キレート樹脂固相カラムを用いるヒ素の固相抽出

【要旨】ポリアミノポリカルボン酸(PAPC)型キレート樹脂は、鉛やカドミウムなどの多くの元素を、広いpH領域かつ高い効率で捕捉できる固相抽出剤である。しかし、ヒ素は捕捉可能なpH領域が狭く、捕捉効率が低いことが課題であった。PAPC型キレート樹脂にジルコニウムを担持させた樹脂(Zr-PAPC樹脂)でヒ素を捕捉する手法について検討を行い、本手法を環境試料の分析に適用した。

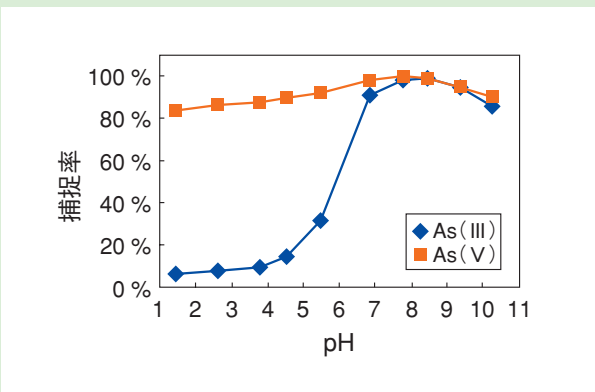


図1 試料溶液のpHと捕捉率の関係  
As濃度：0.1 mg/L  
試料負荷量：50 mL

8. 平成24年度・第20回日環協・環境セミナー全国大会 in Hokkaido(2012/9/20～21 北海道)

山本 和子(日立ハイテックコントロールシステムズ)他：電気加熱原子吸光法によるヒ素の高感度分析

9. 新アミノ酸分析研究会第2回学術講演会(2012/10/26 東京)

井上 陽子(日立ハイテクノロジーズ)他：バイオ医薬品製造管理へのニンヒドリンーポストカラムアミノ酸分析法の適用

10. 第23回クロマトグラフィー科学会議(2012/11/14～16 岐阜)

中川 裕章(日立ハイテクノロジーズ)他：赤ワイン等食品中の有機酸分析における固相抽出とポストカラム法の効果

11. Recent advance in analytical techniques for steelmaking industry(2012/11/19 東京)

坂元 秀之(日立ハイテクノロジーズ)他：Introduction of Model ZA3000 Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer  
－Analysis of Antimony in Steel Samples－

12. 第9回茨城地区分析技術交流会(2012/11/22 茨城)

小原 賢信(日立製作所)：液体電極プラズマによる元素発光分析法の開発  
蛭田 多美(日立ハイテックコントロールシステムズ)他：作業環境測定におけるN,N-ジメチルヒドラジン分析法の検討  
山本 和子(日立ハイテックコントロールシステムズ)他：電気加熱原子吸光法によるヒ素の高感度分析 ～大容量注入法と固相抽出法～



|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |          |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------|
| 題目    | IM4000形イオンミリング装置の特長と応用<br>General features and some applications of IM4000 Ion Milling System                                                                                                                                                                                                                                 |     |          |
| 機種    | IM4000形イオンミリング装置<br>Ion Milling System IM4000                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |          |
| シートNo | SEM No.149                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 発行日 | 2012年10月 |
| 要約    | イオンを試料に照射して試料表面の原子を弾き飛ばす、いわゆるスパッタリング現象を利用して試料を削るイオンミリング法は、ミリメートルオーダーの清浄な観察面を作製できる走査電子顕微鏡(SEM)用試料作製法として、材料分野やデバイス分野など、多方面で利用されています。このSEM用試料に広く適用されているイオンミリング法には、平面ミリング(フラットミリング®)法と断面ミリング法の2つがあります。IM4000形イオンミリング装置は、これらの2つのイオンミリング機能を装備したハイブリッドタイプのイオンミリング装置です。ここでは、はじめに2種類のイオンミリング方法について述べ、次に本装置の特長と主な仕様およびイオンミリング加工例を紹介します。 |     |          |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |          |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------|
| 題目    | NB5000およびHD-2700による磁性材料の微細構造解析<br>Structural characterization of magnetic material by NB5000 and HD-2700                                                                                                                                                                    |     |          |
| 機種    | 日立集束イオン／電子ビーム加工観察装置 nanoDUE' T® NB5000<br>球面収差補正機能付日立走査透過電子顕微鏡HD-2700<br>NB5000 Focused Ion & Electron Beam System<br>HD-2700 spherical aberration corrected Scanning Transmission Electron Microscope(STEM)                                                                |     |          |
| シートNo | FIB No.21                                                                                                                                                                                                                                                                   | 発行日 | 2012年10月 |
| 要約    | ハイブリッド自動車のモータなどに使用されているネオジム磁石材料の高機能化には、結晶粒子界面などの微細構造解析が重要となり、電子顕微鏡の活用が期待されています。<br>本稿では、集束イオンビーム加工観察装置(FIB：Focused Ion Beam)と走査電子顕微鏡(SEM：Scanning Electron Microscope)の複合装置NB5000と、走査透過電子顕微鏡(STEM：Scanning Transmission ElectronMicroscope) HD-2700を用いたネオジム磁石の微細造解析例を紹介します。 |     |          |

新製品紹介

NEW PRODUCTS

日立高速液体クロマトグラフ Chromaster5000シリーズ反応LCシステム

日立高速液体クロマトグラフChromaster5000シリーズの応用分野拡大のため、有機酸、アミノ酸および糖分析を目的とした反応LCシステムを開発しました。目的成分をカラムで分離後、反応試薬により誘導体化させて検出するポストカラム法を採用し、高感度分析が可能です。また、目的成分の選択性に優れており、夾雑物質の影響を受けにくく、高精度な分析が実現できます。

【主な特長】

- (1)各反応LCシステム構築のための配管／流路部品、配線およびシステム専用取扱説明書を含む各種分析キット、性能確認用据付試薬の提供が可能です。
- (2)新開発の5510 反応ユニットとの組み合わせにより、クロマトデータステーション(CDS) \*1からのフルコントロールが可能です。また、アミノ酸(NIN法)で使用する反応試薬(ニンヒドリン)の酸化防止を目的とした、N2ガス制御ユニットの内蔵が可能です。
- (3)5510 反応ユニットの温度制御範囲は、50～150 ℃、反応コイルとしてフッ素系樹脂チューブを最大20 mまで設置可能とし、さまざまなアプリケーションにも対応可能です。

\* 1：Empower3, ChromasterシステムマネージャVer1.1以降で対応



Chromaster5000シリーズ反応LCシステムの外観

## 新製品紹介

## NEW PRODUCTS

## 日立120 kV TEM HT7700型の標準デジタルカメラ高精細化

日立120 kV TEM HT7700型の標準デジタルカメラを従来の4メガ画素から8メガ画素に変更いたしました。基本性能やオートフォーカスなどの機能は従来と同様です。デジタル画像を自動撮影してつなぐオートマルチフレーム機能も従来通り4枚×4枚の画像を撮影し、オートパノラミックイメージ機能で位置を合わせてつなぐことが可能なため、広視野でさらに高精細な画像を

取り扱えるようになりました。つないだ画像は標準搭載している画像閲覧ソフトウェアのビューワー機能で全体像と任意の領域を1,000%～10%に拡大・縮小して確認することが可能です。病理組織や細胞全体など広い視野を高コントラストで観察する用途において、高精細なデジタルカメラを搭載したHT7700型がさらにお役に立てる製品になりました。



HT7700型透過電子顕微鏡の外観

## 新製品紹介

## NEW PRODUCTS

## ZONEサンプルクリーナー

UVオゾン洗浄法により電子顕微鏡観察時のコンタミネーションを低減するためのサンプルクリーナーを発売しました。

電子顕微鏡試料の前処理時や保管中には、試料の表面にハイドロカーボンが付着します。

電子顕微鏡観察時のコンタミネーションは、このハイドロカーボンに起因して試料表面に形成され高分解能観察や分析の妨げの原因となります。

Zoneサンプルクリーナーは、低真空に制御した試料室内にUV光を照射して生成されるオゾンと活性酸素により試料表面に付着したハイドロカーボンを除去し、コンタミネーションを低減できます。

## 【主な特長】

- ・洗浄液を使用しない環境負荷の少ないドライクリーニング法
- ・クリーニング後のサンプルを真空保管可能な“Vacuum Storage”モードを装備
- ・オイルフリーのダイアフラムポンプを採用

## ZONESEM

- ・日立SEM用に設計されたサンプルトレー
- ・最大60 mm角の表面クリーニングが可能

## ZONETEM

- ・日立TEM, STEM, FIB用, 日立インレンズSEM用のサイドエントリホルダに対応
- ・最大3本のサイドエントリホルダを同時装着可能



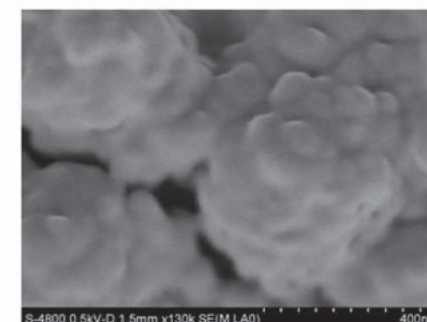
ZONESEM



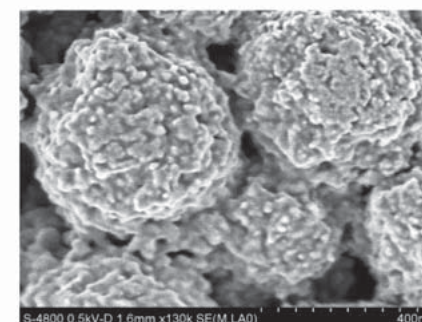
ZONETEM

## 【応用例】

試料：メソポーラス酸化チタン



ZONEクリーニング前



ZONEクリーニング後



## お客さまの分析をサポートする日立ハイテク会員制サイト「S.I.navi (エスアイナビ)」

「S.I.navi」は、日立ハイテク取り扱い分析機器に関する会員制サイトです。  
お客様の知りたいこと、日々の業務に役立つ情報を  
「S.I.navi」がサポートします。

### このような方にお勧めです！

- 分析機器をお使いの方
- 分析機器のご購入を検討される方
- 分析でお困りの方

## S.I.naviの主な内容

### 製品情報

以下のようなコンテンツが閲覧可能です。

- ・製品の特長や仕様
- ・カタログ (PDF)
- ・価格表

### ご使用製品登録者限定情報

- ・取扱説明書 (PDF)
- ・メンテナンス/トラブル解決情報

### アプリケーションデータ

- 「約4,500件」のデータを掲載。
- 2つの検索方法から、ご活用ください。
- ・フリーワード検索
- ・一覧からプルダウンでの絞り込み

### 展示会・セミナー

申し込みはボタン1クリックで完了  
します。

更新情報は、  
メールマガジン (2回/月)  
でもご案内しています。



### 注目！

### もっと知りたい！活用したい！

弊社主要製品をさらにご活用いただく  
ための情報を集めました。

### テクニカルサポート情報

- ・技術解説  
製品の原理や使い方のコツ
- ・バージョンアップ情報  
装置で使用しているソフトのアップグレード  
に関するご紹介

### New!

### 部品/消耗品

消耗品、定期交換部品の情報です。  
サイト内で注文も可能です。  
\*サイト内でのご注文には、会員登録以外に  
別途契約が必要です。  
\*販売中止製品の部品の閲覧には、ご使用  
製品のご登録が必要です。

日立電子顕微鏡 (SEM/TEM) をご登録いただくと、ユーザー様限定「Semevolution (セメボリューション)」のコンテンツ閲覧が可能になります！

### S.I.naviのご入会

ご入会は無料です。お申し込みは、下記にて承っております。

エスアイナビ

検索

<https://members.hht-net.com/sinavi/>

プライバシーポリシー: お客様の個人情報の取り扱いについては、下記でご説明しております。  
<https://members.hht-net.com/public/privacy.html>

## 株式会社日立ハイテクノロジーズ

本社 (サポートセンタ) 東京 (03) 3504-7211 中部支店 名古屋 (052) 219-1881  
北海道支店 札幌 (011) 707-3200 関西支店 大阪 (06) 4807-2511  
東北支店 仙台 (022) 264-2211 九州支店 福岡 (092) 778-3000

分析機器に関する各種お問い合わせは…  
お客様サポートセンタ 電話 (03) 3504-7211  
受付時間 9:00~11:50 12:35~17:30  
(土・日・祝日および弊社休日を除く)

### 〈編集後記〉

日本漢字能力検定協会の公募により、毎年恒例の今年の漢字に「金」が選ばれました。昨年は大震災の復興へ向け、多くの人々が支援したことで「絆」が選ばれています。今年の漢字を見ながら2012年度を振り返ると、932年振りに日本の広範囲で観測された金環日食を思い出します。朝の出勤前に家族で空を見上げ、幻想的な天体ショーを満喫された方々も多かったことでしょう。また、8月にはロンドンオリンピックが開催され、日本は過去最高のメダルを獲得しました。特に、個人競技である競泳でも、メダル獲得に向けチーム日本が団結し戦っている姿は、とても感動的でした。

一方、科学分野では、京都大学の山中伸弥教授がiPS細胞でノーベル賞を受賞されました。12月10日の授賞式の晩さん会後の記者会見では、「ノーベル賞は私にとって過去形になる。これからの研究が大切なので、

一生懸命やっていきたい」と、今後のiPS細胞の実用化に向けさらに研究が続けられる決意を語られ、チャレンジ精神の高さに敬服するばかりです。

科学技術の進歩は目覚ましいですが、その研究段階では解析・分析のデータが必要不可欠です。本誌では、今後も先端分野に向けた新しい解析・分析技術を掲載する所存ですので、本誌に関するご意見、ご要望など忌憚の無いご意見を頂ければ幸いです。  
(多持 記)

### ■インターネットホームページ

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

■本ニュースに関するお問い合わせは、右記または、  
株式会社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。

### ○株式会社日立ハイテクノロジーズ 事業管理部

〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14  
電話 (03) 3504-5833 FAX (03) 3504-7756

### ○株式会社日立ハイテクノロジーズ

那珂事業所グローバルアプリケーションセンタ  
〒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, 2013 VOL. 56 No. 1

発行日 2013年3月21日  
編集人 多持隆一郎  
発行人 榎 義人  
発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ  
〒105-8717  
東京都港区西新橋1-24-14  
電話 (03) 3504-5833 (ダイヤルイン)  
印刷 日立インターメディックス株式会社