

HITACHI
Inspire the Next

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

MARCOI
2015

Vol. 58 No. 1

4934

«Column

日本の将来と科学の役割

中村 洋

4936

簡単便利で高精細！進化を遂げたバイオメディカル透過電顕解析

澤口 朗

4943

AFMとDSCで見る高分子相分離界面

張 埃赫 / 吉田 博久

4949

電子顕微鏡を用いた炭化珪素(SiC)の結晶欠陥評価

一色 俊之

4956

**HPLC - 水素化物発生 - 原子吸光光度法を用いた
Asの価数別分析 — 非鉄精錬分野における利用 —**

蝦名 賢

4962

単分散ポリマー粒子を用いた高分離能HPLC用カラムの開発

佛願 道男 / 沼尾 和幸 / 櫻井 恵太

4968

アミノ酸分析の進歩とL-8900

小澤 真一 / 宮野 博 / 伊藤 正人

«技術解説

4978

新型ショットキー FE-SEM SU5000

立花 繁明

4982

F-7000形分光蛍光光度計を用いた蛍光指紋による食品分析技術

堀込 純

4989

示差熱熱重量同時測定装置 STA7200RV

西村 晋哉

4993

ChromasterUltra Rs 6440蛍光検出器の紹介

清水 克敏 / 青田 俊道 / 和田 宏之 / 秋枝 大介 / 宝泉 雄介 / 伊藤 正人

«New Products

4997

ハイブリッドイオンミリング装置 IM4000Plus**走査型プローブ顕微鏡用ステーション AFM5000II****蛍光X線膜厚計 FT150シリーズ****Chromaster 5610質量検出器 MS Detector****シーケンシャル型高分解能ICP発光分析装置 PS3500DDII****MOCON 酸素透過率測定装置 OX-TRANシリーズ****平沼全有機炭素測定装置 TOC-2350**

日本の将来と科学の役割

Role of science for Japan's future



東京理科大学 薬学部 嘴託教授

日本分析化学会 分析士会 会長

中村 洋 (薬学博士)

1. 日本の将来に対する懸念

日本の人口は明治維新時にはわずか3,330万人であったが¹⁾、日清戦争、日露戦争、第一次世界大戦、第二次世界大戦を経て100年余で人口1億3,000万人弱に達し、GDPは世界第2位の科学技術立国に成長した。“Japan as Number One: Lessons for America”(Ezra Vogel, 1979)と題した書籍がもてはやされた頃もあったが、バブル経済の崩壊を契機として絶頂期の1990年代から日本の斜陽化が始まっている。2014年現在、人口に占める65歳以上の割合(高齢化率)は25%を超え、世界で最も高齢化率が大きな国となっている。国力の基本は人口であるが、出生率の減少から2060年には日本の総人口は9,000万人を割り込み、高齢化率が40%程度となる予想²⁾もある。

気掛かりな点は、人口だけではない。私にとっては、最近の若年層の精神性に若干の不安を覚える。一般に、街で考え事をしている人を見掛けることが極端に少なくなっているからである。例えば、電車や地下鉄に乗り込むと、着席している人もそうではない人も、その多くがスマホらしき物を手に持ち忙しく指を動かしており、いつまでも止める様子がない。残りの乗客は本、雑誌、新聞を読んでいる。それぞれ、有効な時間の使い方をしているとは思うが、これが常態化すると徐々に自らの考えを情報発信する能力が失われることにならないであろうか。

かつて「テレビは日本人を1億総白痴化する」と評された時代もあったが、スマホやメディアへの依存が今そのまま進むと、日本人が創造性を失って総受信器化する道を歩むと思えてならない。情報探索の達人ではあっても、独創的な情報の発信者とは成り得ないことが危惧されるのである。

2. 日本の将来に対する期待

私の専門であるクロマトグラフィー分野の理論によれば、分離性能の指標となる理論段数 N は充填剤の量に比例し、充填剤の粒子系が小さいほど、また充填剤の粒度分布が均一であるほど N が大きくなる。理論段数を国力、充填剤を国民と読み替えれば、国力は国民の量、すなわち人口に比例し、国民が優秀で均質であるほど国力が高いことになる。まさに、日本の将来は統じて国民の量と質に依存することになる。

人口を増加させるには出生率を上げることが不可欠であるが、これは出産年齢層の経済的な余裕に主に依存する。一方、国民の質を上げる方策は、一口でいえば科学・教育における質の充実に尽きる。翻って歴史をひととけば、アジア、アフリカが植民地化される中で、日本が諸外国の侵略から免れ得たのは、明治政府による富国強兵、殖産興業政策とあいまつた義務教育を基礎とする教育制度があったがゆえであろう。明治以降のわずか100年で、科学技術立国を志向した日本が一流国の仲間入りを果たせた原動力は、この教育制度の高さと精勤さによるところが大きい。今後の100年においても、基本的には水素化社会支援技術などの新エネルギー開発技術を軸にした科学技術に立脚した路線で、国の発展を図るのが得策と思われる。

さて、それでは日本の国力が先細りにある現状で、将来に何を期待できるであろうか。私の若者に対するネガティブな印象を先に述べたが、実は、日本の若者に期待するところは大きい。いや、日本の将来は若者に担って貰うしかない。実際、スポーツ界における若手アスリートの世界的な活躍は、日本人の希望であり癒しでもある。

科学技術分野においても、積極的な人材育成と次世代へのスムーズな技術継承が課題である。21世紀の日本は、これまでの“追いつき追い越せ”型のがむしゃらな成長ではなく、成熟した国家として環境負荷に配慮した発展が望まれる。また、今後、標榜

すべき国家像のイメージとしては、「エコ」、「健康」、「医療」などがキーワードとなるであろう。隣国中国の大都市において、大気汚染によりマスクなしでは生活できない状況は、公害問題が頻発した1970年代の日本を想起させる。宇宙船地球号をこれ以上汚染しないよう、日本が培った環境技術をこの先50年で活かして貰いたいものである。

3. 科学と行政への提言

改めて言うまでもないが、科学の究極的な役割は人類の幸福と地球の保全にある。当然のことながら、科学者は正しい倫理観をもち、この原則に沿って知的活動をしなければならない。そして、業績至上主義時代の心理的圧迫から逃避するために論文の捏造や盗用に手を染め、社会的な制裁を受けるという様なことはあってはならない。こうした問題が後を絶たないのは、そこにもっと本質的かつ潜在的な問題が存在するがゆえである。つまり、行政と科学者の中にある「未必の故意」、自らの行為によって実害が発生してもかまわないとする心理である。

四大公害訴訟（イタイイタイ病、水俣病、新潟水俣病、四日市公害）や三大薬害訴訟（サリドマイド薬害、スモン薬害、クロロキン薬害）では、企業や許認可権を有する国が敗訴している。これらの事例から得られる教訓は、行政は国民の健康や安全を守るために、学者や学協会を活用して常に最新情報を入手し、災いを未然に防止することに努めなければならないということである。また、科学者や専門家については、例えば東日本大震災、福島原発事故などの大惨事が起った後に原因や対策について解説することも必要ではあるが、もっともらしい立派な解説は、ときに「普段さぼっている学者」、「頼りない学者」、「大事なことを発言しない学者」などの反感を与えることもある。学者や専門家には、解説者としてではなく、事前の発言こそが求められ、かつ「社会に役立つ科学者」としてあるべきである。

科学者や学協会は、それぞれの専門知識や成果を社会に還元する義務があり、専門知識の死蔵は許されない。専門家、学協会は躊躇せず責任をもって発言し、適切にリスク回避のための指針を出すことが大事である。そこで、学協会を束ねる日本学術会議なり所管の文科省には、例えば各学教会が担当する分野における「リスク予測票」の提出を一定期間ごとに義務付け、その内容を国民に公開した上で、優先度が高いものから対策を考える仕組みを作ることを提案したい。

著者略歴

1971年10月東京大学薬学部教務職員。1973年10月～1986年9月東京大学薬学部助手。1974年薬学博士取得（東京大学）。1974年11月～1976年11月米国National Institutes of HealthにてVisiting Fellow。1986年10月東京大学薬学部助教授。1994年4月～2011年3月東京理科大学薬学部教授。2011年4月より東京理科大学薬学部嘱託教授。（公社）日本分析化学会2009～2012年度会長。

参考文献

- 1) 鬼頭 宏、「人口から読む日本の歴史」、講談社学術文庫(2000)
- 2) 「平成24年版高齢社会白書（全体版）」、内閣府

簡単便利で高精細！ 進化を遂げたバイオメディカル透過電顕解析

Recent Progress of Bio-medical Transmission Electron Microscopy



宮崎大学医学部 解剖学講座
超微形態科学分野 教授
同フロンティア科学実験総合センター
バイオイメージングラボ 主任
澤口 朗 (医学博士)

1. はじめに

ヒトはたいへん欲張りな生き物で、肉眼では捉えきれない小さなものは拡大して見たり、何かに覆われて中身が見えないものは、叩き割ってでも見たりする。故に、ミクロのレベルで細胞膜に包まれた微細構造を明らかにするため、バイオメディカル研究領域で応用される装置が「透過電子顕微鏡」である。本稿では日立ハイテクノロジーズ製の透過電子顕微鏡 HT7700 をもとに、最新のバイオメディカル研究をターゲットに進化を遂げた透過電顕解析を紹介しながらイメージを刷新し、話題の iPS 細胞研究も含めた透過電顕解析のシーズを探り、ニーズに応える次代への提言を記したい。

2. 高い空間分解能を誇る透過電顕解析の威力

蛍光標識も華やかな光学顕微鏡と比較して、電子顕微鏡が誇るべき最大の特長である「高い空間分解能」は、モノトーン画像という制約をものともせず、揺るぎない科学的根拠を提供し続けている。ここに簡単な実例を紹介するが、ラット心筋の光顕像(図 1A)では心筋線維に特徴的な横紋や介在板の線条(図 1矢印)が何とか見てとれるのに対し、透過電顕像では横紋を構成するアクチンとミオシンの線維構造(図 1B)や介在板の入り組んだ形態(図 1C)など、より詳細に追究することができる。

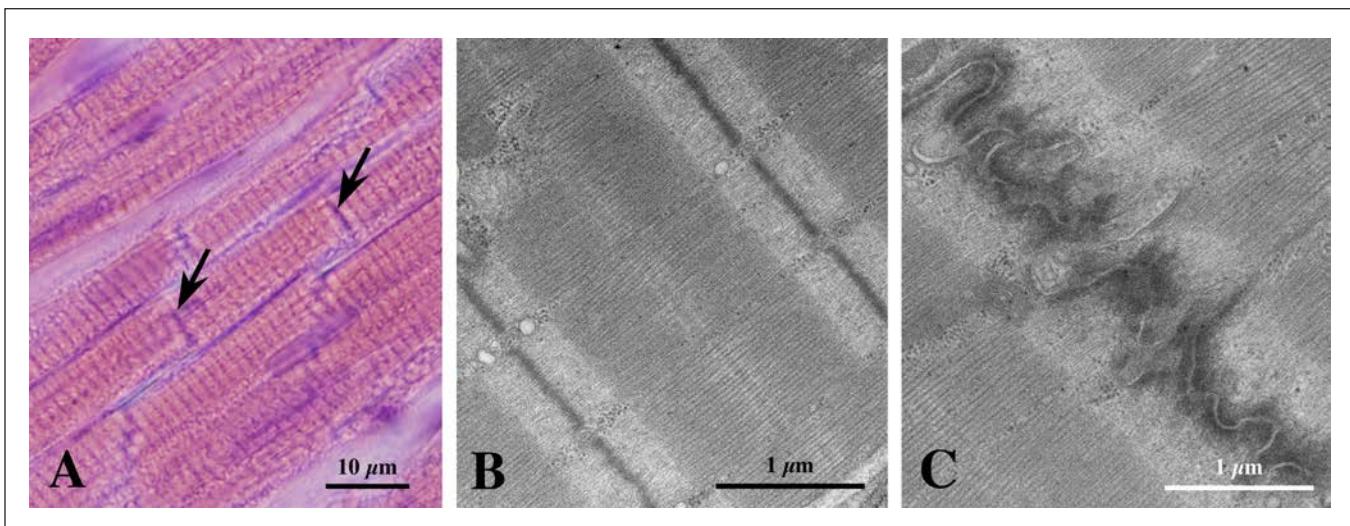


図1 電子顕微鏡が誇る高解像度を示す比較写真。ラット心筋。

(A)光顕観察像(H&E染色)。

×100油浸対物レンズを使用して撮影。心筋の特徴である横紋パターンと介在板の線条(矢印)が観察される。

(B, C)透過電顕像(ウラン+鉛染色)。

アクチンとミオシンが綺麗に配列した心筋線維(B)や、ギャップ結合が局在して心拍に重要な機能を果たす介在板(C)の微細構造が明瞭に観察される。

3. 進化を遂げた透過電顕観察と撮影

3-1 仲間と一緒に明るい部屋で簡単操作

かつての透過電顕は電子ビームで捉えた細胞形態を蛍光板に映すため、部屋を暗くして観察する必要があった。通常、透過電顕が置かれる部屋は陽が当たらない奥まった所が選ばれ、鏡筒に開いた観察窓の先にある蛍光板を大勢で覗き見ることは許されず、ひとり暗い部屋に閉じこもって観察するものだった・・・。これはもう過去の話。最新の透過電顕は蛍光板をスクリーンカメラで捉え、モニタ画面に映し出す結果、暗い部屋で蛍光板を覗き見る必要がなくなり、明るい部屋で仲間と一緒に観察することが可能になった(図2)。透過電顕は廊下に面したガラス張りの部屋に設置され、人々が電顕観察の様子を伺いながら行き交う時代を迎えたのである。

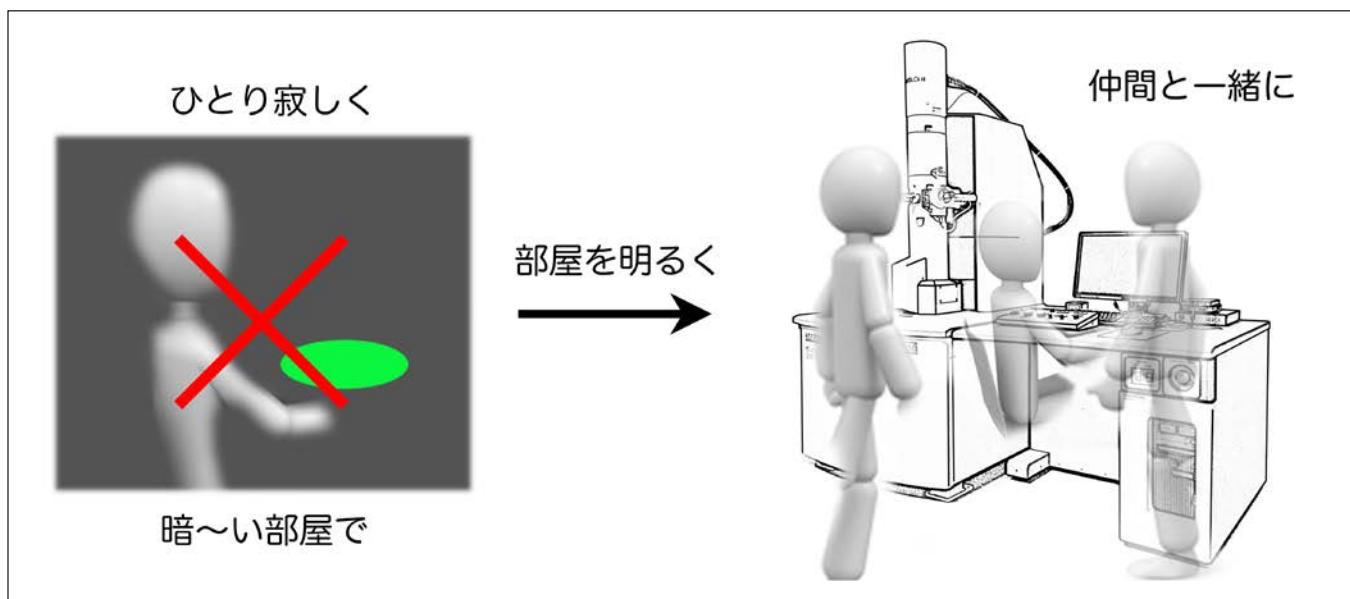


図2 電顕観察は従来の「暗室でひとり」から『明るい部屋で仲間と一緒に』へ

3-2 オートフォーカスのデジカメ感覚で撮影可能に

初心者に限らず、フォーカス合わせには苦労を強いられ、撮った写真を現像してみたら膜構造が不明瞭で撮り直しとなることも少なくなかった。これが昔話になるほど、最新の透過電顕は僅か数秒で自動的にフォーカスを合わせるオートフォーカス機能を標準搭載し、まさにデジカメ感覚で電顕画像を撮影できるようになった。さらに、撮影された画像の良否を直ちに確認できるようになり、観察効率は格段に向上した。

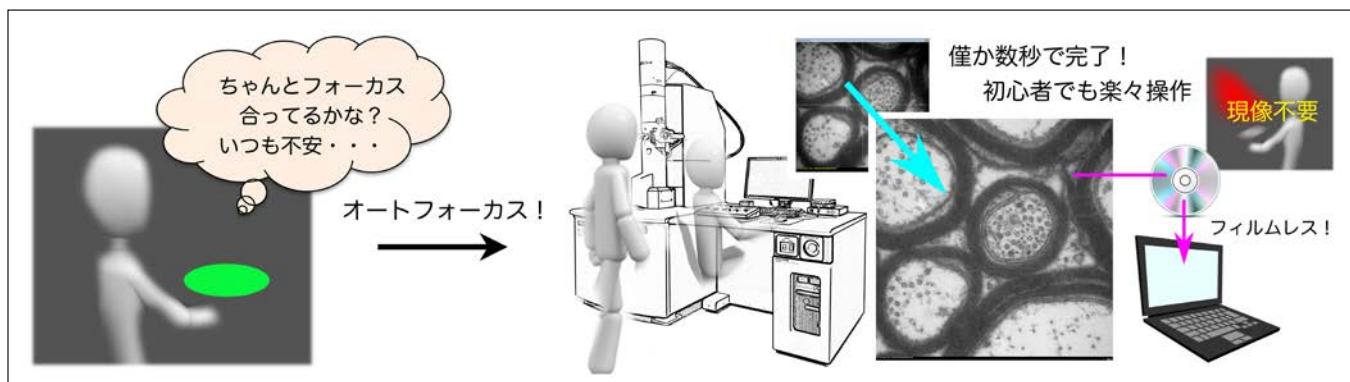


図3 電顕写真撮影はオートフォーカス、フィルムレス。ファイルをCDに記録してPCへ。

3-3 デジタル画像で現像不要、画像データ管理もスマートに

デジタル画像のフィルムレス化によって、暗室のセーフティーライトの下で目を凝らして現像する必要はなくなった。さらに、画像記録装置には便利なキャプション機能が備わっており、実験データやコメントなど自由に記録することができる。データベース管理機能を活用すれば、撮影された大量の画像を仕分けし、検索をかけて呼び出す作業も容易である。

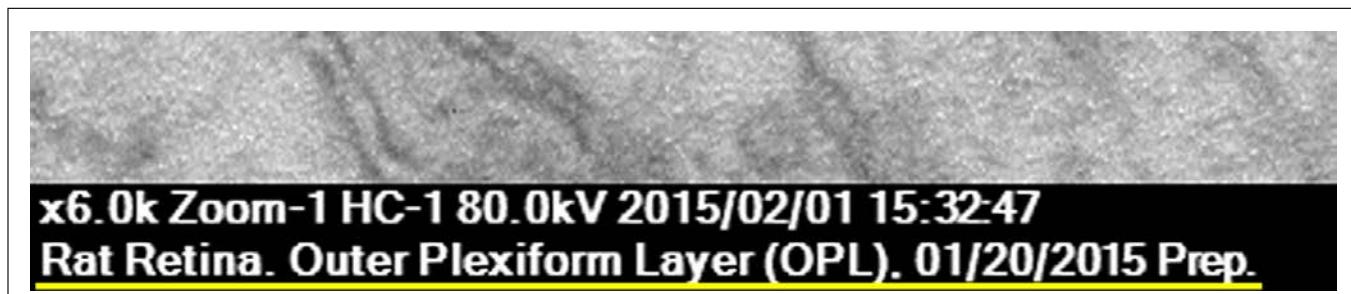


図4 撮影した電顕画像の記録や整理に便利なキャプション機能。撮影画像ファイル下欄(黄色下線部)に、自由なコメントを記入できる。

3-4 高性能CCDカメラで面倒なウラン染色も省略可能に

HT7700に搭載された複合対物レンズの高コントラスト(HC: High Contrast)モードと、標準装備された高性能CCDカメラの高精細な画像撮影によって、常法とされたウラン染色を省き、鉛染色だけで十分なコントラストが得られるようになった(図5)。ウランは厳しい規制の下で入手困難となり、使用後の排液も厳重な保管を要することから、この改良は透過電顕解析の応用を促す大きなステップと評価される。

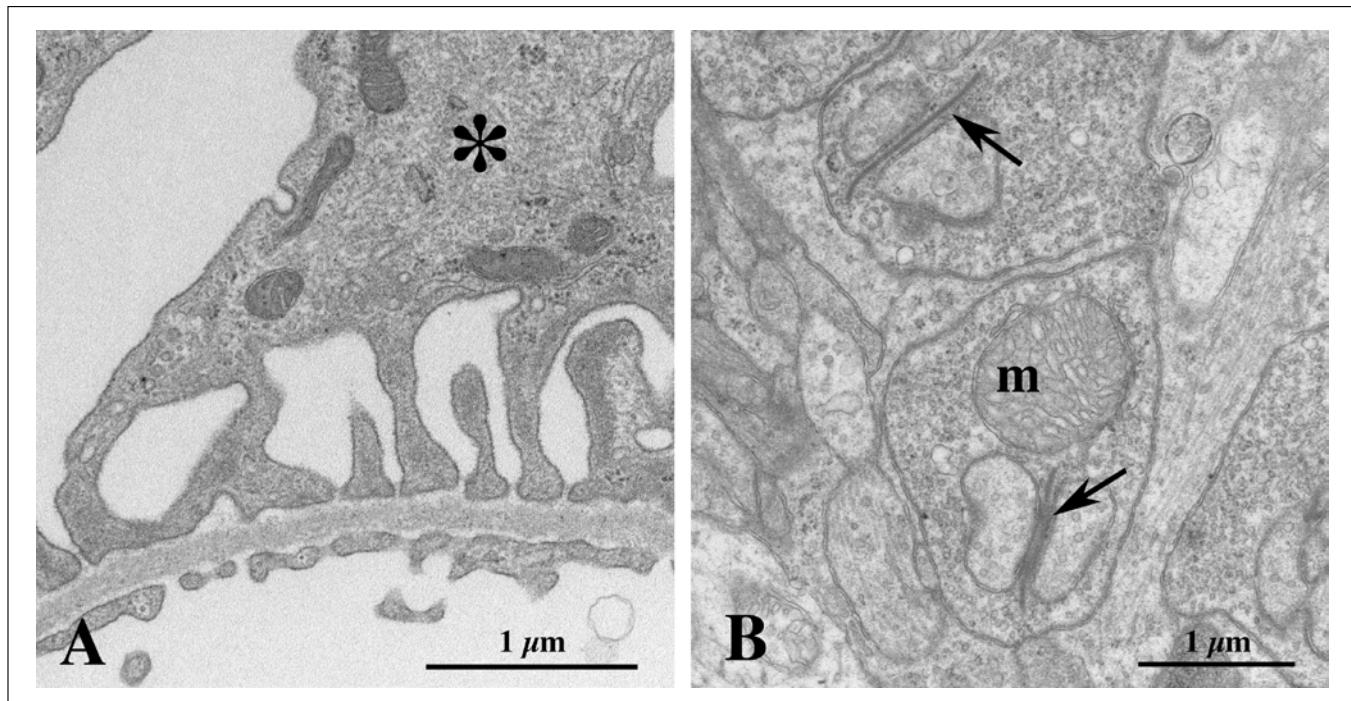


図5 高性能CCDカメラが装備され、ウラン染色を省いたレイノルド鉛染色のみで十分な観察像が得られる。

(A) ラット腎臓系球体の足細胞(*)。
(B) ラット網膜外網状層。ミトコンドリア(m)やシナプスリボン(矢印)も明瞭に観察される。

3-5 ステージメモリー機能&グリッド3個ホルダーで観察効率が大幅にアップ

限られた視野で観察を進める透過電顕解析では、木を見て歩くうちに森の中へ迷い込んでしまうかの如く、切片のどこを観察しているのか分からなくなってしまい、一度は目にした絶好の観察部位も見失ってしまうことが少なくない。しかし、これも過去の話。HT7700 をはじめとする最新の透過電顕には、記録を残しながら試料ステージを移動する「ステージメモリー機能」が装備され、観察部位を見失うことはなくなった(図6)。さらに、試料ステージが移動した軌跡を表示する「マイクロトレース機能」を利用すれば、観察が済んだ部分と未観察の部分を一目で確認することができる。



図6 ステージメモリー機能でベストショットを逃さず撮影。

透過電顕解析では、電子ビームを得るために真空状態が保たれた鏡筒内へ試料を出し入れする必要があるが、オプションとして用意されたグリッド3個ホルダーを利用すれば、切片を載せたグリッドを3個まとめて挿入でき、ステージメモリー機能と併せて観察効率が大幅にアップしている。

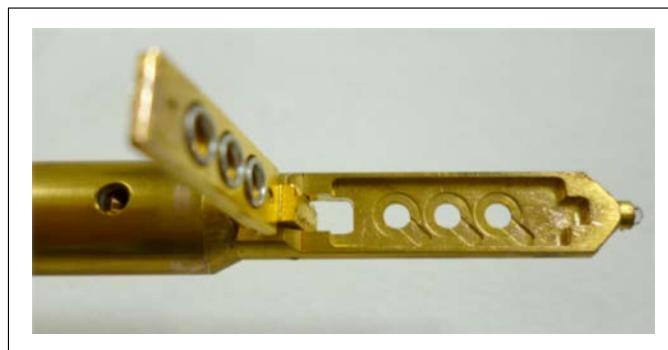


図7 便利なワンタッチ3個ホルダーを使用すると、一度に3枚のグリッドを挿入できるため、グリッドを入れ替える煩わしさが軽減され、観察効率が大幅にアップする。

3-6 電顕画像配信&テレビ会議システムで共同研究を強力にサポート

最新の情報技術を活かした電顕画像配信システムでは、スクリーンカメラや高性能CCDカメラで捉えた電顕画像をインターネットで特定の配信先へ送り、これにテレビ会議システムを併用することで、遠隔地の共同研究チームと電顕画像をリアルタイムに共有しながら意見を交換することが可能になった。この電顕画像配信システムでは情報セキュリティも厳重に管理され、透過電顕解析は「ひとり寂しく暗い部屋で観察する」時代を終え、『仲間と一緒に明るい部屋で、遠くの仲間も交えて観察する』時代を迎えている。

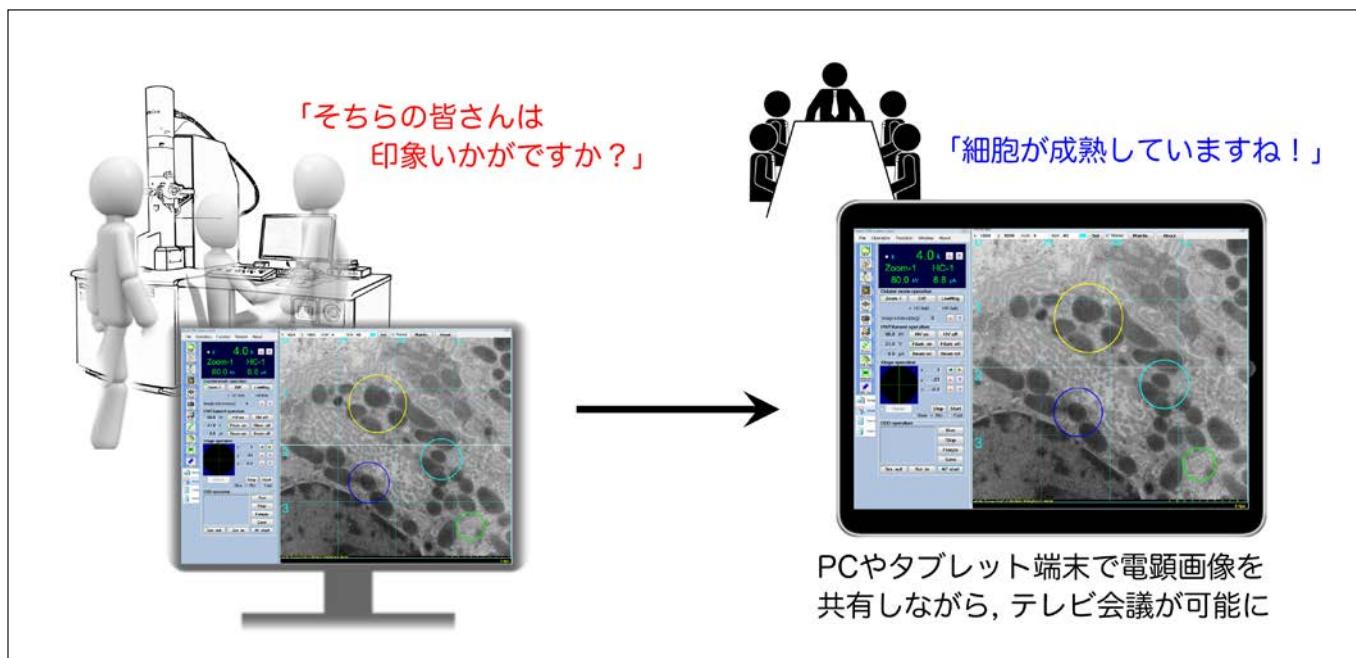


図8 テレビ会議システムの併用で、遠隔地の共同研究チームと画像を共有しながら協議できる時代に。

4. 簡便迅速かつ確実！飛躍的に向上した透過電顕試料作製

透過電顕解析では「試料作製が複雑で、日数も要する」といったマイナスイメージが先行し、敬遠されるケースも少なくないが、様々な工夫が編み出された今日では、簡便迅速かつ確実な試料作製法が確立されている^{1,2,3)}。朝一番に採取した試料を、夕方には透過電顕で観察できるため(図9)、以前は非現実的と一蹴された「ルーチンに透過電顕でスクリーニングをかけ、選抜されたサンプルを分子生物学的解析に回す」ワークフローも現実に動き始めている。

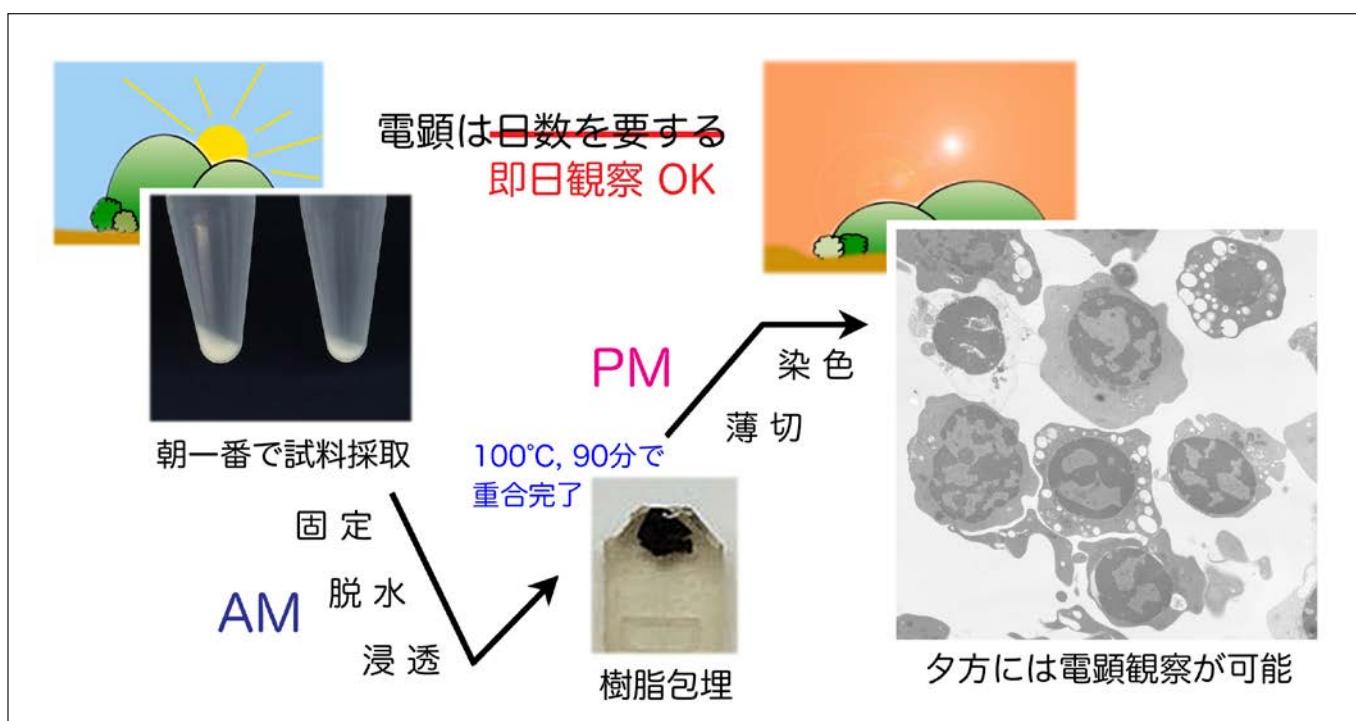


図9 朝一番で採取した試料を夕方には透過電顕で観察が可能

また、超薄切片にお目当ての細胞が見当たらず、数撃って当たるまで超薄切と観察を繰り返した経験をお持ちではないだろうか？これも過去の話。最近は光顕で最適な準超薄切片を選び出し、樹脂に再包埋して超薄切片を切り出した後、透過電顕で観察する方法が確立され^{2,3)}、光顕で狙いをつけた細胞を狙い通りに透過電顕で捉えることも容易である（図 10）。

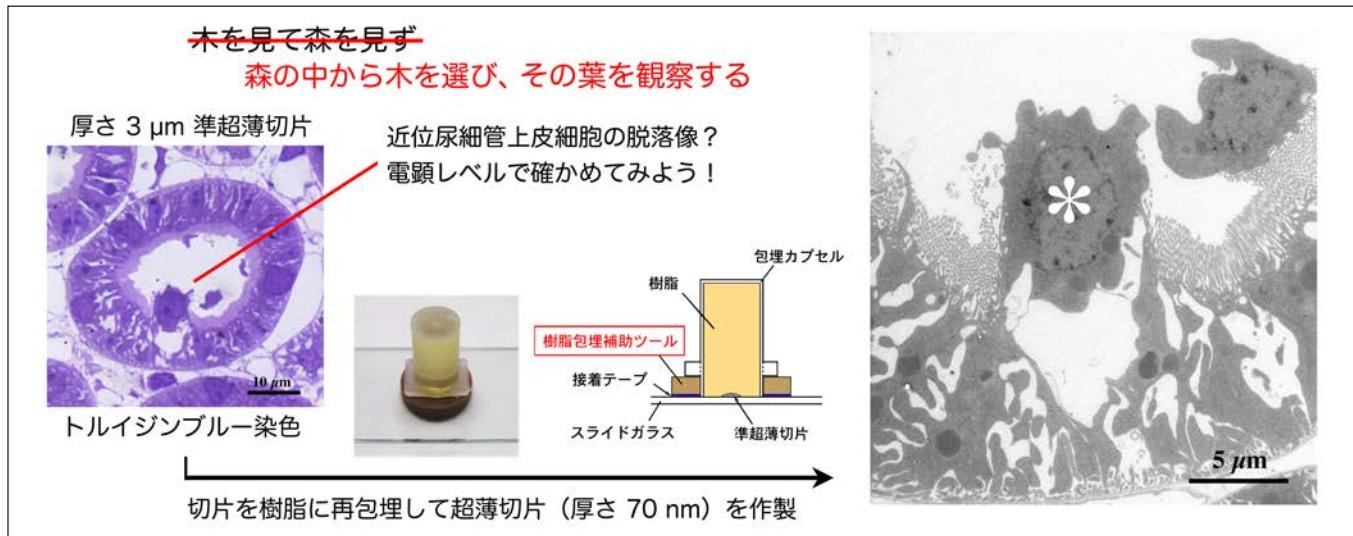


図10 光顕で狙いをつけた細胞をピンポイントの狙い通り透過電顕解析へ

5. バイオメディカル透過電顕解析の次代に向けた提言～結語に代えて～

光学顕微鏡の解像限界を遙かに凌ぐ透過電顕解析がバイオメディカル研究に果たした貢献は計り得ない。ところが分子生物学的研究手法が90年代に隆盛を極めると、電子顕微鏡を主体とする研究は「時代遅れで古典的。稲が刈り取られた田んぼで落ち穂拾いするようなもの」とまで揶揄された。忘れもしない・・・。ブラックジャックに憧れを抱いた小生が、メスを電子顕微鏡に代えて解剖学研究の道を選んだ際に、分子生物学者を自称する先輩から贈られた言葉である。

あれから四半世紀。ポストゲノムシークエンス時代を迎え、新たな潮流が生じてきた。マウスに代表される各種遺伝子のノックアウト動物やトランスジェニック動物が世に現れ、細胞や組織の微細構造に如何なる変化が生じているか、比較検討が必要になってきた。さらにはiPS細胞の開発により、あらゆる細胞へ分化する能力をもつiPS細胞から作製された細胞や組織の微細構造を検証する巨大なニーズが創出された。

具体的な検証例を挙げると、文部科学省から公表された「iPS細胞研究ロードマップ」に示されたiPS細胞由来血小板産生の基礎研究が進み、臨床応用に向けた量産化の段階を迎えている。この基礎技術確立を報告した論文⁴⁾で、透過電顕解析が大きな貢献を果たしているが、透過電顕解析をする理由は図11をご覧いただければ一目瞭然であり、赤血球や好中球と比較して血小板が極めて小さく、光顕では僅かな点にしか映らない。一方、透過電顕解析では血小板内部の開放小管系や分泌顆粒が明瞭に映し出される（図11B, C）。血小板の直径は僅か1~2 μm しかなく、内部構造の詳細な観察には透過電顕解析が不可欠である。

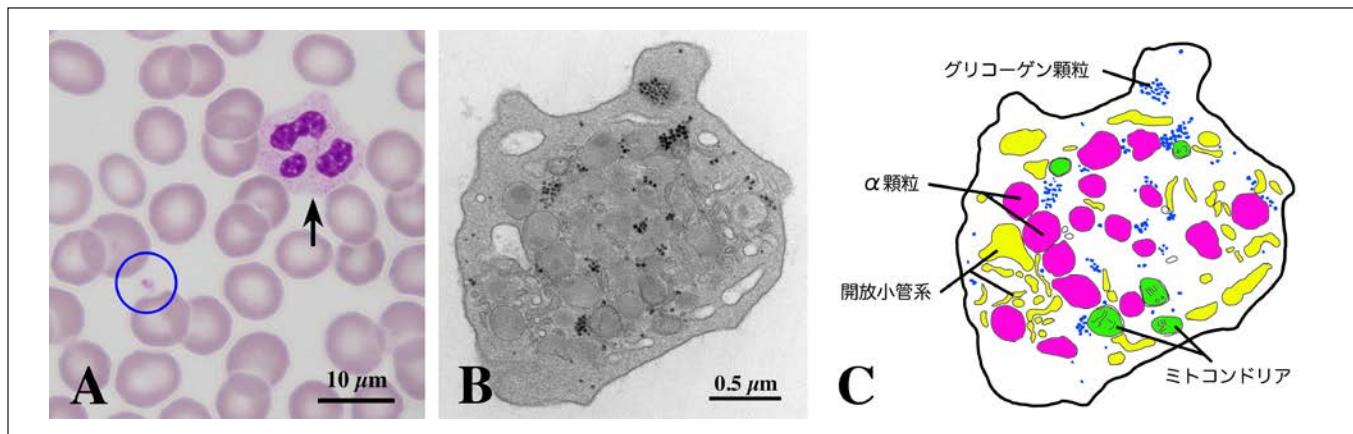


図11 ヒト血小板。

(A)末梢血塗末標本の光顕像(ギムザ染色)。血小板(青丸で囲まれた小片)と好中球(矢印)。周囲の円形細胞は赤血球。

(B)透過電顕像(鉛染色のみで観察)。

(C)内部構造の模式図。

現在、オールジャパンで研究体制を整備しながら、iPS細胞を応用した様々な細胞や組織、臓器の作製をもとに、再生医療や創薬の臨床応用に向けた検討が進められている。「稻が刈り取られた田んぼで落ち穂拾い」は改められ、『新たに干拓された水田で、新種の稻（iPS細胞）がたわわに実った穂（iPS細胞から分化誘導された細胞）を垂らし、刈り取り（電顕解析）を迎えるときがやってくる』のである。この場面では、細胞表面を観察する走査電顕より、細胞内部を捉える透過電顕が果たす役割が大きい。その透過電顕解析は、試料作製から観察、撮影に至るまで、簡単便利で高精細な解析手段として進化を遂げている。電子顕微鏡が最新のバイオメディカル研究をアップグレードし、また新たな研究領域が開拓されることを期待して本稿を結びたい。

参考文献

- 1) K. L. McDonald: Rapid embedding methods into epoxy and LR White resins for morphological and immunological analysis of cryofixed biological specimens, *Microsc. Microanal.*, 20 (1), 152-63 (2014)
- 2) A. Sawaguchi, F. Aoyama, S. Ide, T. Suganuma: Capsule-supporting ring: a new device for resin embedding of glass-mounted specimens, *Microsc.*, 234 (2), 113-117 (2009)
- 3) 高橋伸育, 豊嶋典世, 澤口 朗 :「樹脂包埋補助ツールを用いたピンポイント電顕試料作製法」顕微鏡, 48 (2), 113-117 (2013)
- 4) S. Nakamura, N. Takayama, S. Hirata, H. Seo, H. Endo, K. Ochi, K.I. Fujita, T. Koike, K.I. Harimoto, T. Dohda, A. Watanabe, K. Okita, N. Takahashi, A. Sawaguchi, S. Yamanaka, H. Nakauchi, S. Nishimura, K. Eto: Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, 14 (4), 535-548 (2014)

AFMとDSCで見る高分子相分離界面

Characterization of Interface Between Phase Separated Structure in Polymer Blends
by AFM and DSC



首都大学東京 大学院
都市環境科学研究科
博士後期課程3年

張 傑赫



首都大学東京 大学院
都市環境科学研究科
教授

吉田博久

1. はじめに

一般的な高分子製品は単独の高分子で構成されるよりも、複数の高分子を用いたブレンドとして利用されることが多い。高分子ブレンドでは、高分子鎖が長いため用いられた複数の高分子は互いに相溶することはほとんど無く相分離する。相分離の大きさは高分子間の相互作用の強さによって、ミクロ相分離（相分離した相の大きさが μm 以下の大きさ）からマクロ相分離まで様々である。したがって、高分子ブレンドでは相分離した異なる高分子相の間に界面が存在する。界面の厚みや高分子組成勾配は高分子間の相互作用の大きさによって異なり、界面の状態は材料として用いる場合の力学強度などの物理的性質にも影響する。本稿では、主に高分子ブレンドの相分離界面のキャラクタリゼーションを原子間力顕微鏡（AFM）と示差走査熱量測定（DSC）を用いて行った例を紹介する。

2. 高分子ブレンドの相分離

窒素と酸素の混合は、混合することによるエントロピーの獲得（エントロピー効果）によって起こるのに対し、水とアルコールの混合はエントロピーとエンタルピーのバランスが重要になる。例えばメタノール (CH_3OH) からオクタノール ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OH}$) までの1級アルコールを水と混合すると、ブタノール ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$) 以上のアルコールでは相分離が室温で観察される。水とアルコールは水酸基間で形成する水素結合によって混合するが、疎水性のアルキル基は水素結合ネットワークの欠陥となり、アルキル基同士が会合する。アルキル基が長くなると疎水性相互作用によって水のネットワークが乱れ、アルコールと混合にくくなり相分離が起こる。2層に相分離した上層はわずかに水が混合したアルコール相で、下層は少量のアルコールが混合した水相である。水 / オクタノール混合系では明瞭な2層間の界面が観察されるのに対し、水 / ブタノール系の界面は明瞭ではない。これは界面での水とアルコールの組成勾配が異なるためで、両者に混合状態を反映した組成勾配となる。水 / アルコール混合溶液を良く振って静置すると、小さい液滴が発生し液滴同士が会合して相分離が進行する様子を見ることができる。相分離は水 / オクタノール系では早く進行するが、水 / ブタノール系ではゆっくり進行する。

高分子同士の混合では、高分子鎖が長いためエントロピー効果は発揮されず、混合するかどうかはエンタルピー効果のみで決まる。すなわち、混合する高分子間に水 / アルコール系での水素結合のように強い引力的相互作用が働く系は混合するが、その様な組み合わせは稀でほとんどの高分子ブレンドは反発しあって（斥力的相互作用）相分離する。引力的相互作用が働く高分子ブレンドでは下限臨界共溶温度（LCST）型の相図（図1a）で、斥力的相互作用が働く系では上限臨界共溶温度（UCST）型の相図（図1b）で混合状態が決まる。相図中に実線で示したラインが共存曲線でその内側の条件で相分離が起こる。すなわち、引力的相互作用が働くブレンド系では温度が低い場合は混合し、温度が高くなつて高分子の分子運動が活発になり引力的相互作用よりも大きくなると相分離が生じる。実際のブレンド系では、これらの相図に混合系のガラス転移温度変化がどのように関わるかによって、相構造が影響を受ける。ガラス転移温度以下の温度では高分子鎖の並進運動が凍結されるため、ガラス転移温度以上の相構造が凍結されるためである。

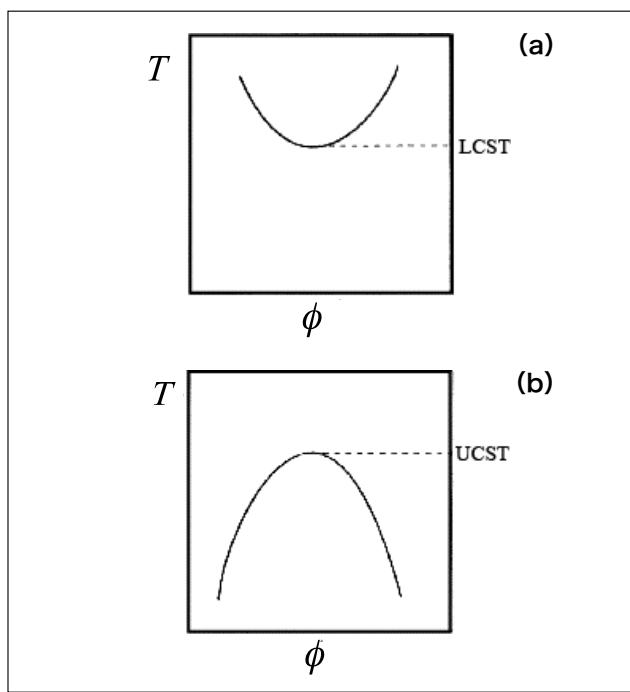


図1 下限臨界共溶温度型相図(a)と上限臨界共溶温度型相図(b)

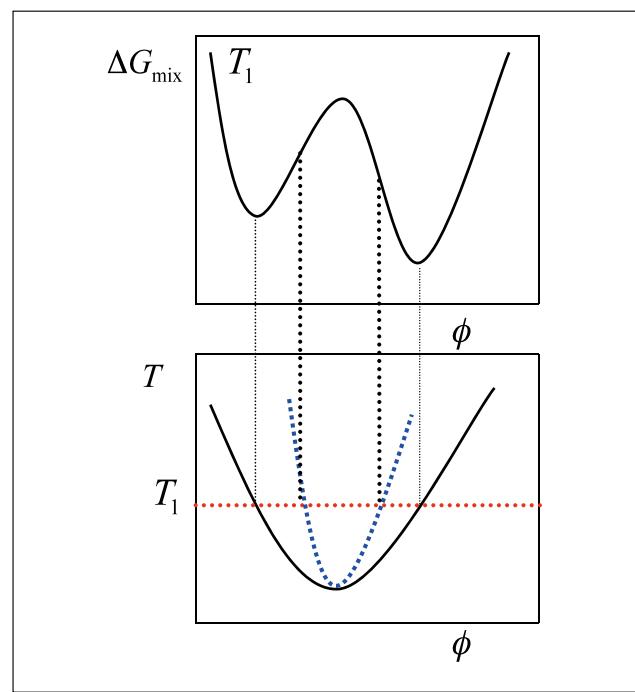


図2 下限臨界共溶温度型相図(下)と温度T₁における混合ギブスエネルギーの組成変化(上)

図2に下限臨界共溶温度型の相図と温度T₁における混合ギブスエネルギー変化(ΔG_{mix})の組成変化を示す。共存曲線は、熱力学的には等温等圧状態で混合ギブスエネルギー変化の組成(ϕ)変化が極小($\partial \Delta G_{\text{mix}} / \partial \phi = 0$)となる組成の集合である。共存曲線の内側に存在するスピノーダル曲線は、 ΔG_{mix} の組成変化の勾配が最大($\partial^2 \Delta G_{\text{mix}} / \partial \phi^2 = 0$)となる組成の集合で、この曲線の内側の組成で相分離した相は不安定で、共存組成まではやく組成変化が進行する。この相分離過程をスピノーダル分解と呼び、不定形な相分離モルフォロジーが特徴である。一方、スピノーダル曲線と共存曲線の間の条件で相分離が起こると、相分離の核が共存曲線の組成で生成する。時間と共に相分離した核が成長し、この相分離過程を核生成・成長と呼び球状の相構造が特徴である。

3. 高分子ブレンド相分離構造のAFM位相像による解析

ポリイソプレン(IR)とポリブタジエン(BR)はゴム素材として様々な工業製品として利用されている。IRとBRのブレンドは非相溶系で相分離するが、高分子濃度が4%の場合はトルエンに溶解するとブレンド組成に関わらず均一溶液になる。IR/BRトルエン溶液からシリコンウェハー上にスピンドルコートした薄膜のAFM位相像を図3に示す。白い部分はIR相、濃い部分がBR相で、いずれの相も不定形でスピノーダル分解によって相分離が進行する。溶解度パラメーターは、トルエン(18.21 MPa^{1/2})、IR(16.57 MPa^{1/2})、BR(17.59 MPa^{1/2})である。溶解度パラメーターの差が少ないほど混合するので、トルエンに対する溶解度はBRの方が高くなる。実際の溶解度測定でもIRよりもBRの方がトルエンに対して良好に溶解する。そのため、IRとBRの組成が等しい0.5では溶解性の低いIRが先に相分離して析出しドメインを形成し、溶解性の高いBRがマトリックスとなる。

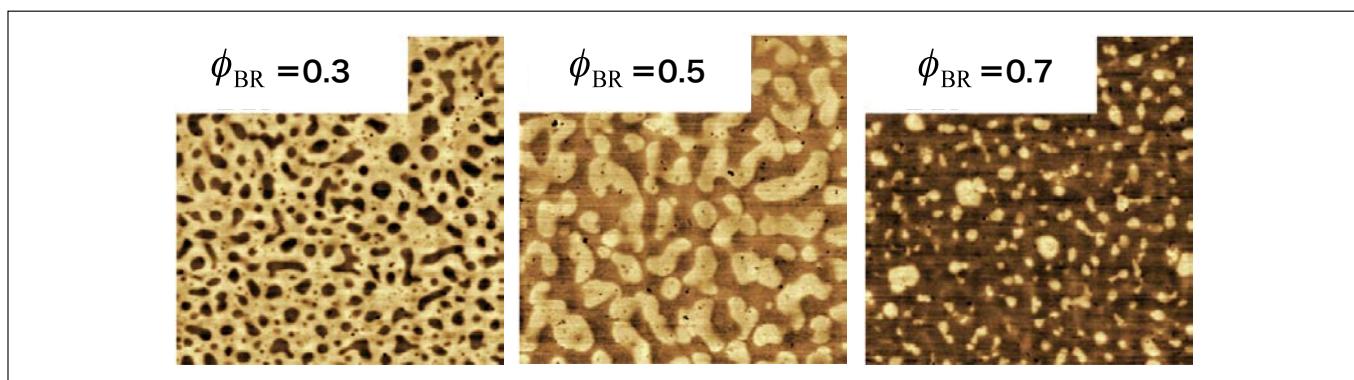


図3 IR/BRトルエン溶液からスピンドルコートで作成した薄膜のAFM位相像。数字はBR組成を示す。各画像の大きさは10 μm × 10 μm。

すなわち、高分子ブレンド溶液からスピニコートや溶媒キャストによって相分離する場合、溶媒との溶解性の差が相分離構造を決めることがある。同じ組み合わせの非相溶系ブレンドであっても、混合する溶媒によって相分離構造が異なることがある。図4に、ステレンブタジエンゴム(SBR)とアクリロニトリルゴム(NBR)の溶媒の異なるブレンド溶液から作成した薄膜の相分離構造のAFM位相像を示す。上がトルエン溶液から、下がTHF溶液から作成した薄膜である。白い相はSBRリッチ相、黒い相はNBRリッチ相である。SBRとNBRの組成が等しい0.5では、トルエン溶液から作成した場合は球状ドメインがNBRリッチ相であるのに対し、THF溶液から作成した場合は球状ドメインがSBRリッチ相とドメインとマトリックスが反対になる。これは溶媒とNBR、SBRの三体間相互作用の差が原因である。溶媒の溶解度パラメーターはトルエンが $18.2 \text{ MPa}^{1/2}$ 、THFが $18.6 \text{ MPa}^{1/2}$ であるのに対し、NBRは $19.9 \text{ MPa}^{1/2}$ 、SBRは $17 \text{ MPa}^{1/2}$ である。トルエン溶液ではSBRがより溶解するのに対して、THF溶液ではNBRがSBRよりもよく溶解する。そのため、トルエン溶液から薄膜を作成するとNBRが先に析出して球状ドメインを形成し、よく溶解しているSBRがマトリックスとなる。THF溶液では溶解状態が反対になるので、作成した薄膜ではSBRがドメインとNBRがマトリックスとなる。

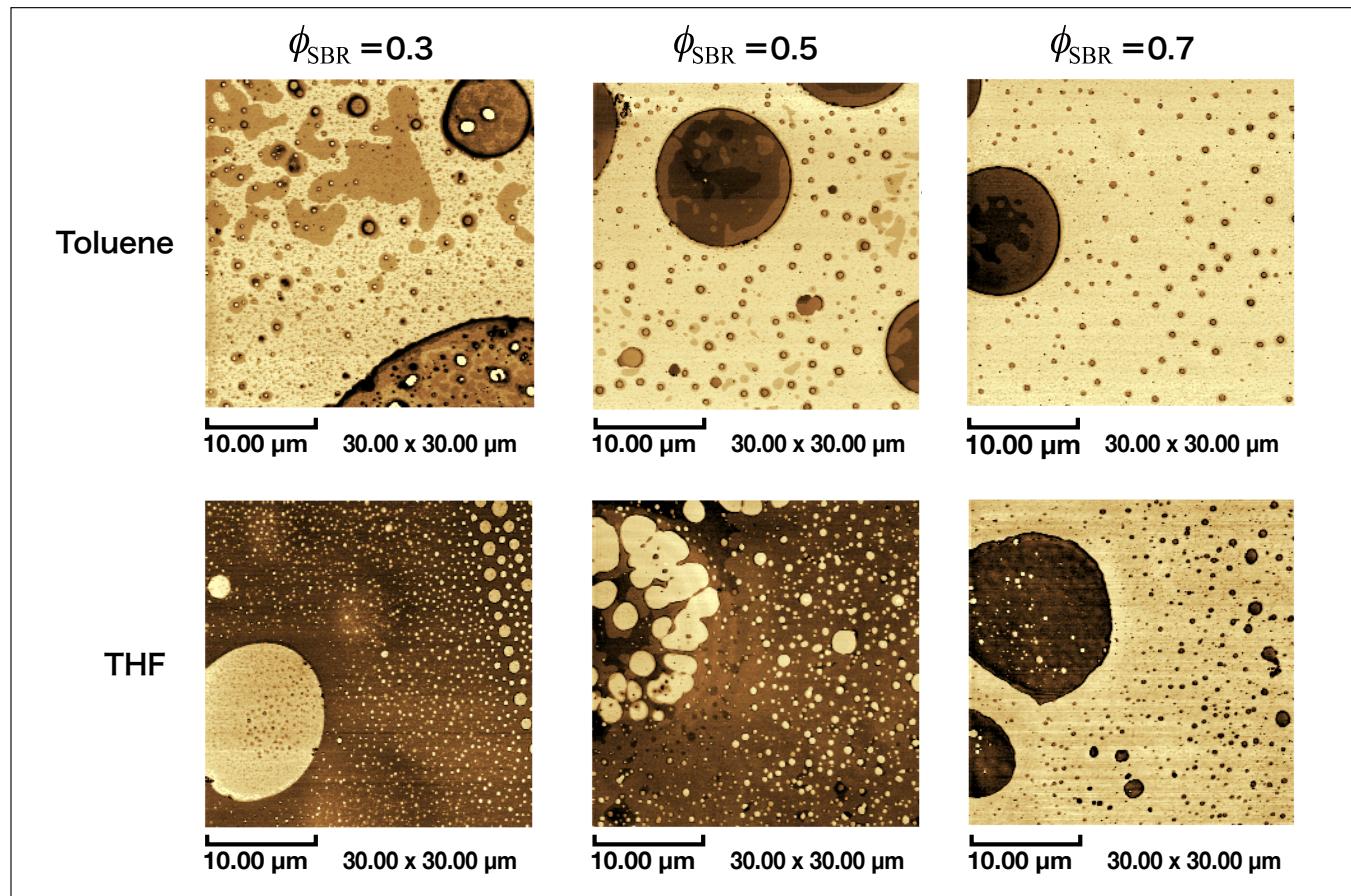


図4 SBR/NBRブレンド薄膜のAFM位相像。上はトルエン溶液から下はTHF溶液からスピニコートで作成した。数字はSBR組成を示す。各画像の大きさは $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ 。

4. 位相像のヒストグラム解析による相分離構造と混合状態の評価

位相像データを位相差に対するヒストグラム解析を行うと、ドメインとマトリックスの面積比や混合状態などを知ることができる。図5に図4の位相像をヒストグラム解析した結果を示す。位相差の大きい方がSBR相で小さい方がNBR相である。ヒストグラムのピークの数は相分離した相の数に対応しており、相分離構造はSBRリッチ相とNBRリッチ相の2相で構成されているのではなく、3~5相で構成されていることが判る。また、図中に示した ϕ^*_{SBR} はヒストグラムから求めたSBR組成で、THF溶液から作成した薄膜ではブレンド組成と良く一致したのに対し、トルエン溶液から作成した薄膜ではヒストグラム解析から求めた組成の方が大きな値になった。これはTHFとトルエン溶液中でNBRとSBRの溶解状態の差が原因である。溶液中の高分子鎖の溶解状態を評価する方法に、分子鎖の溶液中での広がりを示す回転半径(radius of gyration; R_g)がある。回転半径は動的光散乱で実測することができ、NBRとSBRの R_g はTHF中では145 nm (NBR)と51.4 nm (SBR)であったが、トルエン中では23 nm (NBR)と94.1 nm (SBR)であった。THF中ではNBRが、トルエン中ではSBRがよく溶解する。 R_g の値からトルエン中ではNBRはほとんど溶媒によって膨潤しておらず、凝集した状態で分散していることが判る。そのため溶媒が蒸発した薄膜でもNBR相の面積が小さくなり、ヒストグラムから求めたSBR組成(ϕ^*_{SBR})が実際の組成(ϕ_{SBR})よりも大きくなる。

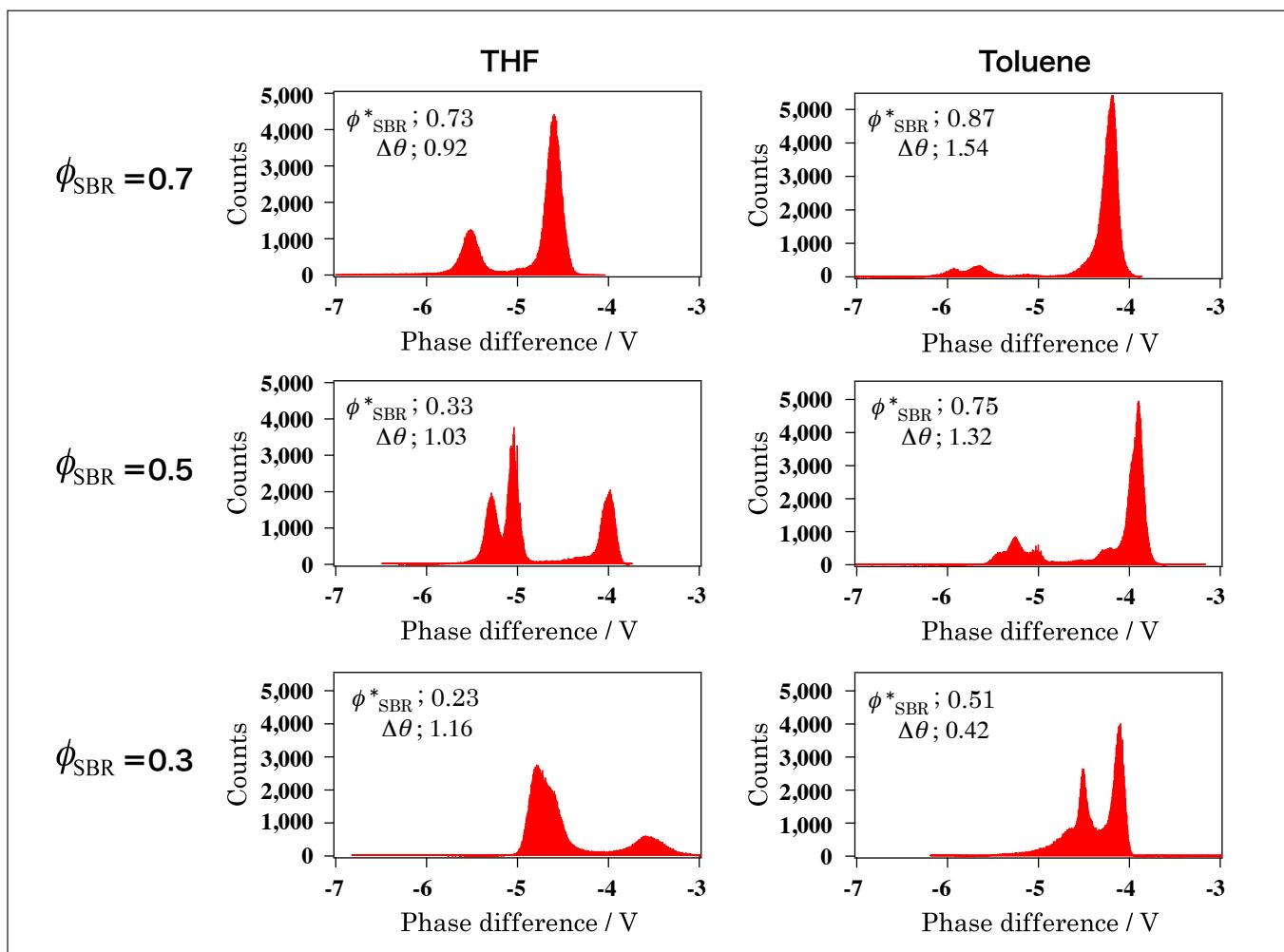


図5 SBR/NBRブレンド薄膜のAFM位相像のヒストグラム解析。右はトルエン溶液から左はTHF溶液からスピンコートで作成。数字はSBR組成を示す。

さらにトルエン溶液とTHF溶液中ではNBRとSBRの混合状態が異なることも ϕ^*_{SBR} と ϕ_{SBR} が異なる原因である。位相像の位相差(θ)の値は混合状態を反映したものではなく、測定条件によって変化する。しかし、ヒストグラムのNBRリッヂ相とSBRリッヂ相の位相差の相対差($\Delta\theta$)はNBRとSBRの混合状態を反映する。Fig. 6にNBRリッヂ相とSBRリッヂ相の相対的位相差($\Delta\theta$)の組成依存性を示す。赤丸はトルエン溶液から青丸はTHF溶液から作成した薄膜である。 $\Delta\theta$ が小さいほど両相の組成の差が小さいこと、すなわち良好に混合していることを示す。THF溶液では混合状態の組成依存はわずかであるが、トルエン溶液ではSBR組成の小さい方ほど混合状態が良いことを示唆している。

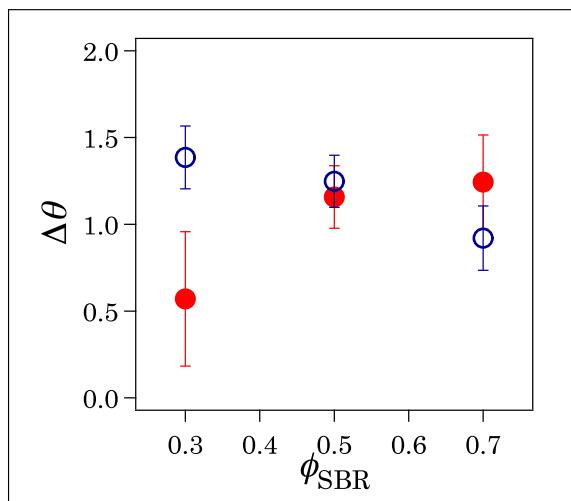


図6 SBR/NBRブレンド薄膜のAFM位相像のヒストグラム解析から求めた相対的位相差($\Delta\theta$)の組成依存性。赤丸はトルエン溶液から青丸はTHF溶液から作成した薄膜。

4-1 位相像のライン解析による相分離界面の評価

位相像の球状ドメインの直径方向にラインプロファイルを求めるとき、NBR リッチ相と SBR リッチ相の位相差の領域が明確に評価できる。両者の間が相分離界面になり、相分離界面の厚みを求めることができる。異なる場所での AFM 位相像の複数のドメインを用いて、相分離界面の厚み (l_{IF}) を評価した。サイズの異なる球状ドメイン (3 μm 以下と 10 μm 以上) で評価した相分離界面厚みの組成依存性を図 7 に示す。界面厚みが厚いほど NBR と SBR の混合性は良い。トルエン溶液から得た薄膜の方が相分離界面厚みは厚く、特に 10 μm 以上のドメインでは SBR 組成が小さいほど混合状態が良いことが明確になった。これはヒストグラム解析から示唆された混合状態と良い一致を示した。

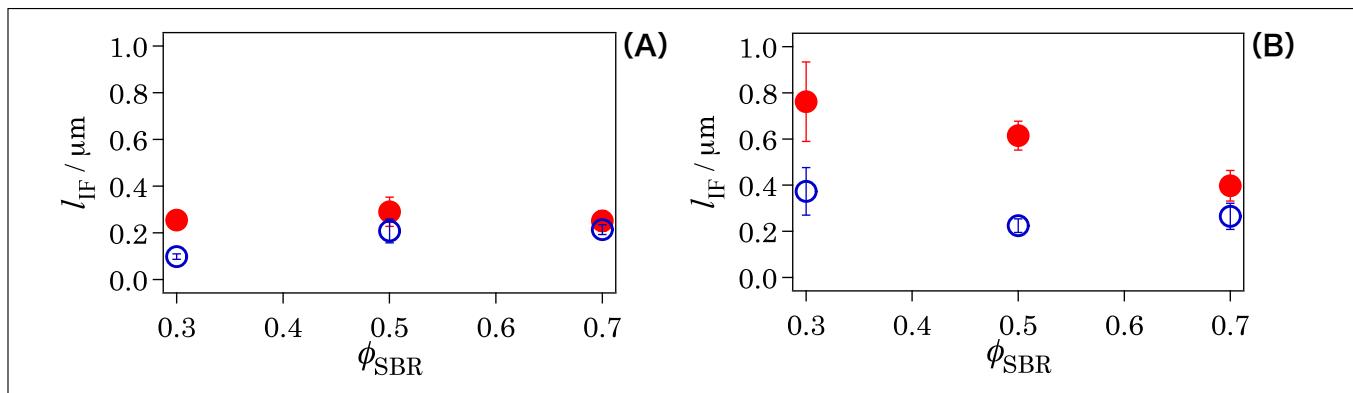


図7 SBR/NBRブレンド薄膜のAFM位相像のラインプロファイルから求めた相分離界面厚み (l_{IF}) の組成依存性。赤丸はトルエン溶液から青丸はTHF溶液から作成した薄膜。(A)は3 μm 以下のドメイン,(B)は10 μm 以上のドメイン。

4-2 DSCによる相分離界面の評価

AFM 位相像のヒストグラム解析とラインプロファイル解析の異なる評価から、NBR/SBR 薄膜の混合状態を考えることができた。しかし AFM の観察領域は 10 ~ 30 μm 程度のミクロな領域で、場所を変えて測定してもマクロな評価と対応しているか?という疑問が残る。熱分析はマクロな特性評価を行う代表的な手法である。NBR/SBR ブレンドや IR/BR ブレンドではガラス転移における熱容量差 (ΔC_p) から相分離界面の重量分率を評価することが可能である。たとえば、NBR/SBR ブレンドでは相分離した NBR 相と SBR 相のガラス転移が二つ観察される。SBR と NBR 単体のガラス転移温度と熱容量差は、216 K ($T_g^*_{\text{SBR}}$) , 0.41 J/g ($\Delta C_p^*_{\text{SBR}}$) と 238.8 K ($T_g^*_{\text{NBR}}$) , 0.49 J/g ($\Delta C_p^*_{\text{NBR}}$) である。異なる組成の NBR/SBR ブレンドの実測値 (ΔC_p_{NBR} , ΔC_p_{SBR}) を用いて、相分離界面の NBR と SBR の分率 ($\phi_{IF}^{* \text{NBR}}$, $\phi_{IF}^{* \text{SBR}}$) を次式で求めることができる。

$$\begin{aligned} & \phi^{* \text{NBR}} + \phi_{IF}^{* \text{NBR}} + \phi^{* \text{SBR}} + \phi_{IF}^{* \text{SBR}} \\ = & (1 - \phi_{\text{SBR}}) \left\{ \frac{\Delta C_p_{\text{NBR}}}{(1 - \phi_{\text{SBR}})\Delta C_p^*_{\text{NBR}}} + \left[1 - \frac{\Delta C_p_{\text{NBR}}}{(1 - \phi_{\text{SBR}})\Delta C_p^*_{\text{NBR}}} \right] \right\} \\ & + \phi_{\text{SBR}} \left\{ \frac{\Delta C_p_{\text{SBR}}}{\phi_{\text{SBR}}\Delta C_p^*_{\text{SBR}}} + \left[1 - \frac{\Delta C_p_{\text{SBR}}}{\phi_{\text{SBR}}\Delta C_p^*_{\text{SBR}}} \right] \right\} \\ = & 1 \end{aligned}$$

ここで、 ϕ_{NBR}^* と ϕ_{SBR}^* は相分離した NBR リッチ相と SBR リッチ相の分率である。

DSC 測定で得られた相分離界面の分率と AFM で評価した相分離界面厚みの組成と溶媒の影響を図 8 に示した。SBR 組成が 0.5 の場合を除いて、相分離界面分率と界面厚みは良い一致を示した。トルエン溶液から作成した薄膜の方が THF 溶液から作成した薄膜よりも相分離界面分率が大きく、界面厚みが厚く、NBR と SBR の混合が良いことを示す。相分離界面厚みはドメイン周辺の二次元的な広がりを評価しているのに対し、相分離界面分率は三次元的な評価である。SBR 組成が 0.5 ではトルエンと THF ではドメインとマトリックスが反転することが、ミクロな分析とマクロな分析の差となったと考えられる。

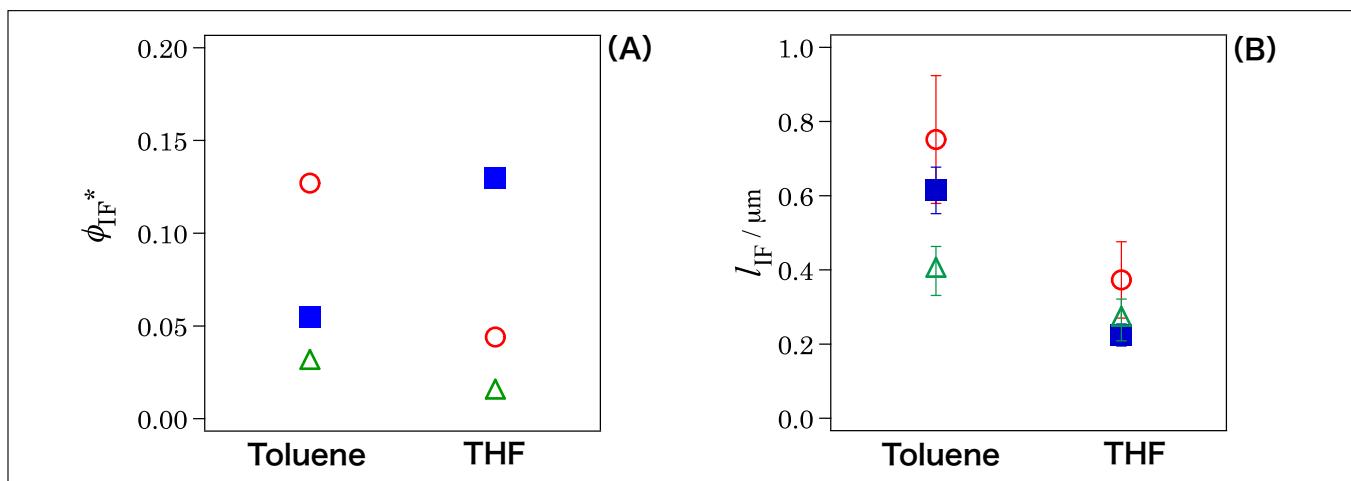


図8 SBR/NBRブレンド薄膜のDSC測定から求めた相分離界面分率(A)とAFM位相像から求めた相分離界面厚み(B)の組成依存性。
赤丸は $\phi_{SBR} = 0.3$ 、青丸は0.5、三角は0.7である。

5. まとめとして

高分子ブレンドの相分離界面のキャラクタリゼーションを AFM と DSC で行った例を示した。ミクロな観察の AFM から得られた界面情報はブレンドした高分子同士の混合状態を示し、DSC 測定のガラス転移から得たマクロな特性である相分離界面の重量分率の評価と良い一致を示す。ここで紹介した NBR/SBR 系の界面評価は論文に詳細が述べられている¹⁾。相構造の AFM による解析は溶媒キャスト法以外に工業的な手法で作成されたブレンド系の断面観察から行われている²⁾。

参考文献

- 1) Junhyeok Jang, Masayuki Kawazoe, Hirohisa Yoshida, "Characterization of Phase Separated Structure and Interface in SBR/NBR blend by AFM and DSC", *Netsu Sokutei*, W39, 33-39 (2012)
- 2) Yoshihisa Inoue, Masayuki Iwasa, Hirohisa Yoshida, "Variable Temperature AFM Observation of Phase Separation in NR/BR Blend", *Netsu Sokutei*, 39, 41-46 (2012)

電子顕微鏡を用いた炭化珪素(SiC)の結晶欠陥評価

Crystal defect evaluation of silicon carbide (SiC) using an electron microscope



京都工芸繊維大学
大学院 工芸科学研究科
数理・自然部門
准教授

一色 俊之

1. はじめに

電力は、動力源、熱源、光源としてのみならずコンピューターや携帯電話といった情報通信機器など広く利用され、われわれの生活に欠かせないものになっている。低炭素化社会の実現に向けて電力の高効率な利用が強く求められ、パワーデバイスを応用した電力マネージメントが期待されている。パワーデバイスは、電力変換や電力制御に用いられるキーコンポーネントで、従来はシリコン(Si)を使ったデバイスが用いられてきた。近年、Siパワーデバイスの限界を越えるものと注目されているのが、炭化珪素(SiC)を用いたデバイスである¹⁾。SiCはSiと炭素(C)の原子が一対一の割合で結合した化合物半導体であり、原子間の結合力が強くバンドギャップが大きいという特徴を持つ。SiCデバイスは、Siよりも高い絶縁破壊耐性を持ち、高効率のパワーデバイスを実現することができる。SiCデバイスの実用化の課題のひとつにSiCウエハの品質の問題があげられる。SiC結晶では、結晶成長中に局所的に構造の規則性が崩れ、積層欠陥や転位といった結晶欠陥が発生しやすい。これらの結晶欠陥の中にはデバイス動作に影響を与えるものがあることが知られている。SiCデバイスの歩留まりや信頼性の向上のためには、結晶欠陥のどこに、どんな種類の結晶欠陥があるかを理解することが重要である。われわれのグループでは電子顕微鏡を応用したSiC結晶欠陥の解析方法について検討を行っている。本稿では、高分解能走査電子顕微鏡(SEM)を用いてウエハの表面に現れている結晶欠陥を見つける方法²⁾と、結晶欠陥を含む部分を集束イオンビーム加工観察装置(FIB)を用いて加工し、走査透過電子顕微鏡(STEM)を用いて結晶欠陥の種類を詳細に調べる方法^{3,4)}について紹介する。

2. SEMを用いたSiCウエハ表面の高分解能評価

SiCデバイスは、図1に示すように、基底面をオフ角と呼ばれる角度だけ傾けエピタキシャル(エピ)成長して作製される。エピ結晶表面には基底面が積み重なったテラス、テラスの端部にはステップが形成される。このステップ端に原子が吸着しステップが前進して結晶成長が進む。理想的に成長が進むと、ウエハの表面には向きが一定でほぼ等間隔のステップが形成される⁵⁾。この成長メカニズムをステップフロー成長と呼んでいる。われわれは、結晶表面に結晶欠陥があると、その周辺でステップフローの乱れが生じ、ステップの形状が変化するのではないかと考え、エピ結晶表面の微細な形状を詳しく調べることにした。今回用いた試料は市販のオフ角4°のSiCエピウエハで、最小のステップの高さ1 nm、テラス幅はおよそ14 nmである。このようなステップ形状の評価には平面方向、高さ方向ともにナノメートルオーダーの高い分解能を持つ観測手段が求められる。試料表面の構造評価には走査電子顕微鏡(SEM)が広く用いられているが、ナノメートルオーダーの高さのステップ評価するためには、試料に照射する電子のエネルギーを数百エレクトロンボルト程度の低エネルギーにする必要がある⁶⁾。最近の電界放出形SEMでは、このような低い照射エネルギー条件でも分解能を損なうことなく評価が可能である。

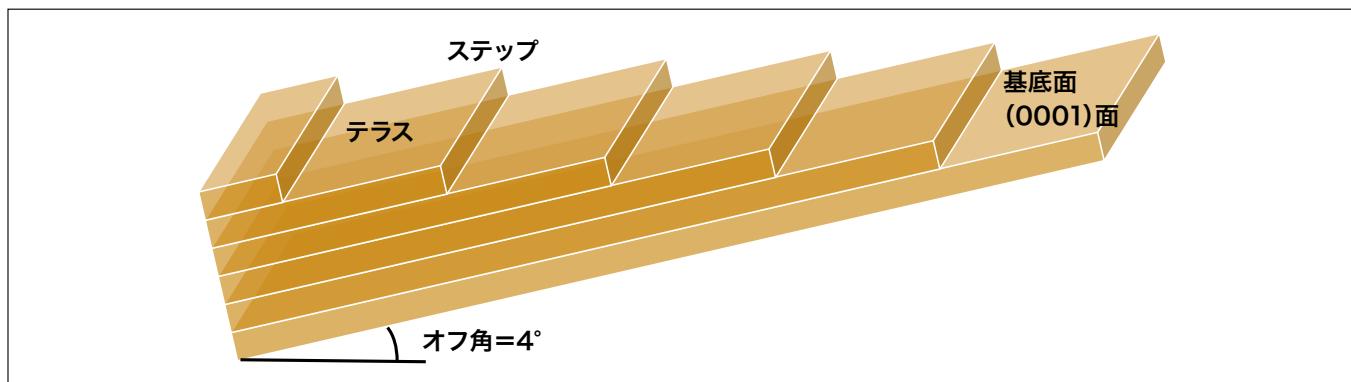


図1 SiCエピ結晶の表面構造の模式図

今回の検討では日立ハイテクノロジーズ製 SU8220(図2)を用いて、照射エネルギー500 eVの条件での評価を試みた。また、できるだけ試料表面に近い部分から放出される電子を検出するために、放出角の低い後方散乱電子を検出する検出器を用いて評価を行った。



図2 SU8220の外観

ウエハ表面の多くの視野のSEM評価を行った結果、SiCエピウエハ表面にほぼ均等な間隔で並ぶ成長ステップが確認できた。さらに特異的なステップ形状をしている表面欠陥があることがあり、三角形のテラスを持つものと広い範囲で平行なテラスを持つものの二種類あることがわかった。図3に表面欠陥のSEM像を示す。それぞれ左から右のステップフローが進行している。これらSEM像から像の上から下に走る細かな線状の構造が数多くあり、それらがほぼ均等な間隔で並んでいることがわかる。これらは成長ステップであり、ステップ間隔は最小で10～20 nm程度である。このことからSEMで一格子に相当するステップが観察できていると考えられる。図3(a) (b)ではステップがそれぞれの画像の中央部で折れ曲がり、三角形のテラスを形成している。テラスの長さはステップに沿った方向に2 μm程度、テラスの幅は図3(a)では270 nm、(b)では80 nmである。図3(c)に、平行テラス形状の表面欠陥のSEM像を示す。こちらはテラスに沿って15 μm程度の広い領域にわたり幅100 nmのテラスが形成されている。テラスの上端はほぼ左右対称に収束しているが、下端ではステップフローの下流側のステップは直線状であるのに対し、上流側のステップが屈曲して収束している。

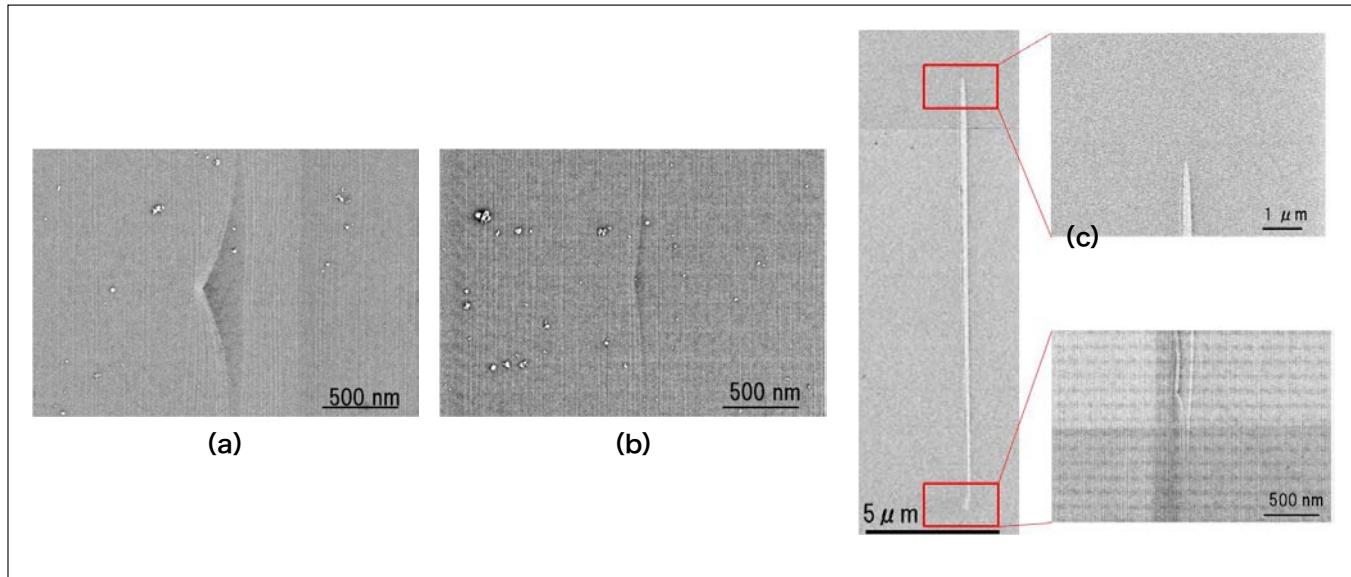


図3 SiCエピウエハ表面の表面欠陥
 (a)三角形テラスを持つ表面欠陥 テラス幅270 nm
 (b)三角形テラスを持つ表面欠陥 テラス幅90 nm
 (c)平行テラスを持つ表面欠陥

次に、これらの表面欠陥が転位に関係しているかを確認するために、SiCウエハを高温に熱した水酸化カリウム(KOH)の融液でエッチング処理を行った。溶融KOHはSiCウエハの表面に転位が現れた部分のみをエッチングしピットを形成し、転位の種類によりピット形状が異なる⁷⁾。図4にエッチング後の表面のSEM像を示す。それぞれ、図3と同一場所を評価した結果である。図4(a) (b)では図3(a) (b)のステップが折れ曲がっていたところに六角形状のエッチピットが形成されている。ピット形状から三角形状の表面欠陥は貫通転位に由来するものと考えられる。転位から離れた部分ではステップフローが正常に進行するのに対し、貫通転位部ではステップの進行が局所的に妨げられ、後からきたステップが追いついてくるために三角形状のテラスが生じたと考えられる。図4(c)に平行テラスを持つ表面欠陥部のエッチング後の形状を示す。図3(c)と同一の場所を評価したところ、テラス下端部のステップフロー上流側のステップが屈曲したところに、基底面転位由来の擬楕円状のエッチピットが二つ重なって存在することがわかった。欠陥を含む近傍の領域に他のエッチピットは存在しない。以上の結果から、ウエハ表面に現れた結晶欠陥は表面形状と密接に関連し、結晶欠陥がステップフロー成長に影響を与えていると考えている。

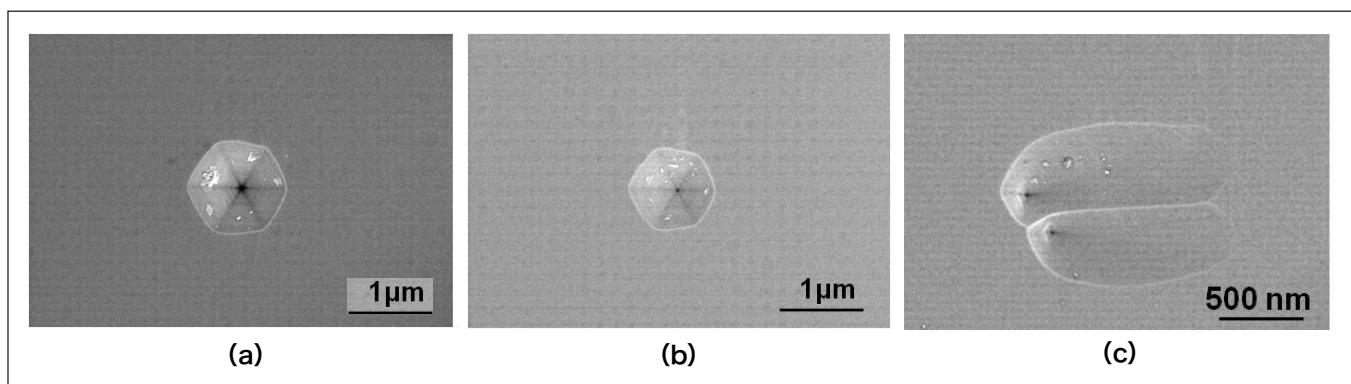


図4 表面欠陥部のKOHエッチング後の形状
 (a)三角形テラスを持つ表面欠陥 テラス幅270 nmと同一部
 (b)三角形テラスを持つ表面欠陥 テラス幅90 nmと同一部
 (c)平行テラスを持つ表面欠陥と同一部

3 STEMを用いた転位の結晶学的な解析

前章ではエッチピット形状から転位の種類を推定したが、転位の成因やデバイス特性への影響を知るために転位が結晶の中でどのように伝播しているか、転位の部分で結晶格子がどのようななずれ方をしているかを調べる必要がある。

転位の特性を調べる方法としては、転位部分の断面を透過電子顕微鏡(TEM)観察する方法が一般的である。従来のTEMを使った評価では、試料を100 nm程度の薄い厚さまで加工し観察する必要がある。転位の場所を狙って加工することが難しいだけでなく、結晶内で転位が伝播している方向がわからない状態で加工する必要があり、加工した試料内に転位を確実に保持した状態で試料作製することが困難で、評価の確実性という意味では問題があった。われわれは、通常より厚い500 nmから1 μm程度の厚さの試料を用いることを考え、TEMより厚い試料の評価が可能なSTEMによる結晶欠陥評価を試みた。STEMはTEMと電子光学系の構成が異なり、厚い試料でも比較的高コントラストの観察が可能である。今回の評価には日立ハイテクノロジーズ製200 keV STEM HD-2700(図5)を用いた。HD-2700では転位評価に欠くことができない特定の回折波を選択励起した画像(二波励起像)の取得が可能で、これにより転位の結晶学的な方位決定が可能である。



図5 HD-2700の外観

試料は日立ハイテクノロジーズ製 FIB FB2200(図6)を用いマイクロサンプリング法により作製した。



図6 FB2200の外観

この方法は、像観察を行ながらウエハの特定部位を細い針で吊り上げ試料ホルダーの上に移して加工を行うので、高い位置精度で転位を含む試料の作製が可能である。試料ホルダーはFIBとSTEMの両方に使用が可能であり、両方の装置の間を容易に行き来できるようになっている。また、試料ホルダーの先端部は試料の向きを360°任意の向きに変えられる機構になっている。

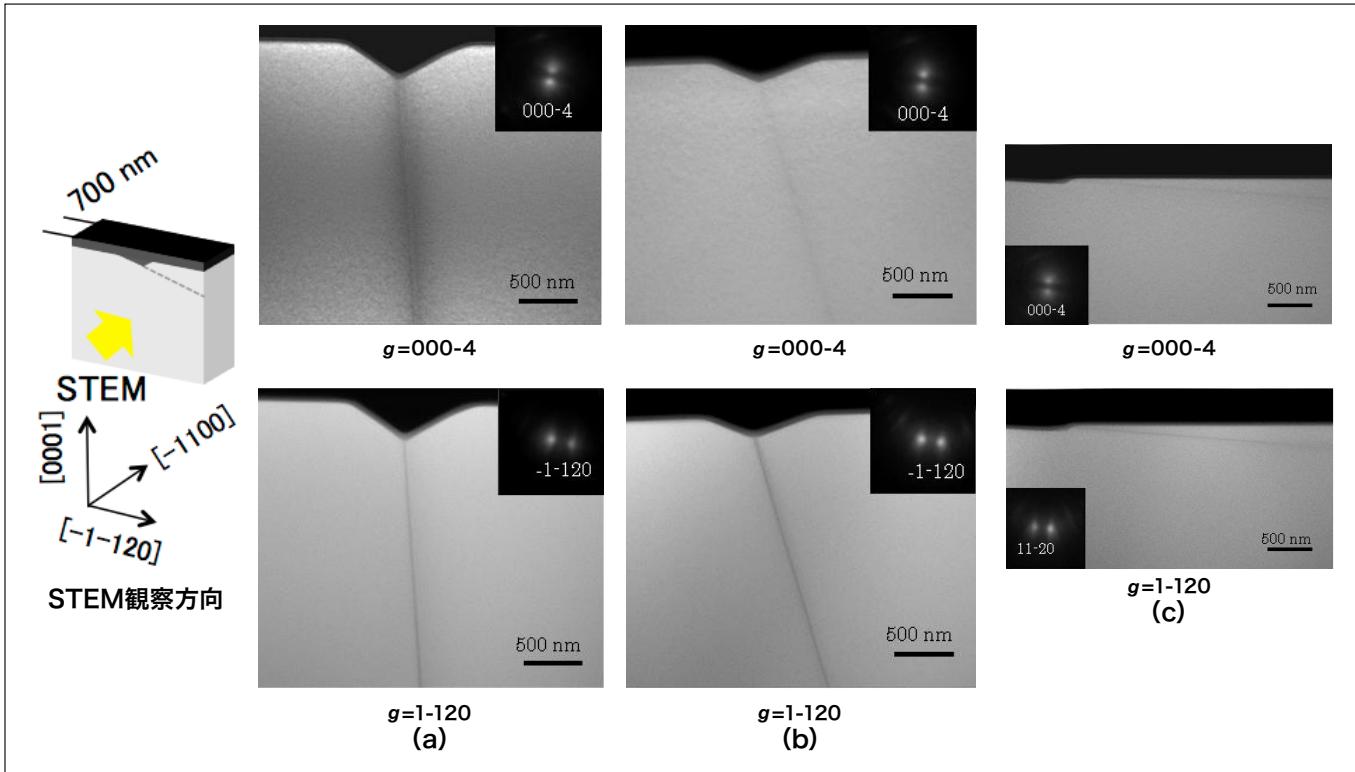


図7 エッチピットコア部の断面STEM像

- (a) 三角形テラスを持つ表面欠陥 テラス幅270 nmと同一部
- (b) 三角形テラスを持つ表面欠陥 テラス幅90 nmと同一部
- (c) 平行テラスを持つ表面欠陥と同一部

図7に前章で評価した表面欠陥部の断面STEM像を示す。観察方向は[1-100]方向であり、ステップフローの方向はSEM像とは逆に右から左である。それぞれ図4のエッチピットのコアを狙って試料を作製し、厚さは500 nmである。いずれの場所でも転位を逃すことなく明瞭に捉えることができている。図7(a) (b) 転位はウエハ表面を横切る方向に伝播する貫通転位、図7(c)はウエハ表面から4°傾いた基底面内を伝播する基底面転位であることがわかる。前章のエッチピット形状から推定した結果と一致する。それぞれの図で複数の像があるのは方位を変え励起条件を変えたもので、これらを比較することにより転位のバーガースペクトルの向きを知ることができる。バーガースペクトルは転位の性質を表す重要なパラメーターで、転位で結晶面がどの方位にずれているかを示している。図7(a)では000-4励起の場合と11-20励起の両方で転位は可視であり、バーガースペクトルは<0001>成分と<11-20>成分を持つことがわかる。一方、図7(b)の転位は000-4励起では不可視、11-20励起では可視であり、<0001>成分は持たず<11-20>成分のみを持つことがわかる。つまり図7(a)の転位は刃状転位とらせん転位の両方の成分が混ざった混合転位であり、図7(b)の転位はらせん成分のない刃状転位である。図4(a) (b)のエッチピットの形状を見る限りでは、このような違いを判別することは困難であり、転位種を詳細に特定するためにはSTEM解析が重要である。一方、図7(c)の基底面転位のバーガースペクトルは<11-20>のみである。図4(c)では二個のピットが重なって見えたが、STEM解析では一本の転位線しか見えていないという疑問が残る。

そこで、この試料を上面方向から透過して観察することを試みた。試料をホルダーごとSTEMから取り出しFIB装置に再装着し、試料の向きを回転させて試料の底部を削り取ってエピ表面からの厚さが1 μmの短冊形の試料を作製した。この試料をエピ表面側からSTEM観察を行った結果を、図8に示す。像の左側に二つのエッチピットが重なって見える。二つのピットのコアから面状の暗い部分が右方向に伸び、積層欠陥があることがわかる。図7(c)と図8を合わせて考えると、両端に部分転位をともなった基底面に沿った積層欠陥があり、部分転位がウエハ表面に現れたところに二つのエッチピットが重なって形成されたと考えられる。

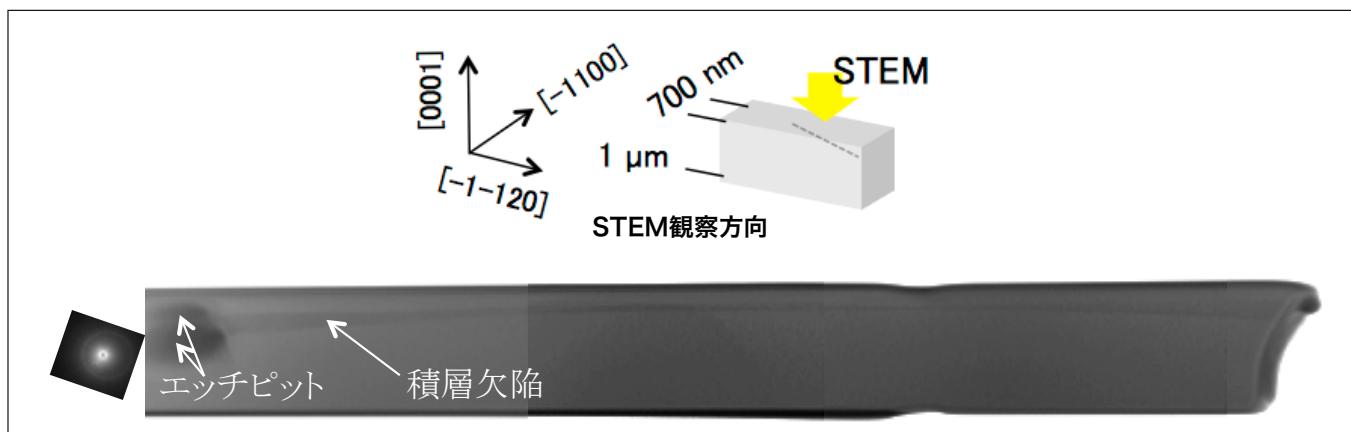


図8 図7(c)の基底面転位の平面STEM像(晶帶軸入射条件)

4 まとめ

電子顕微鏡を用いたSiCの結晶欠陥評価について説明した。高分解能SEMにより、転位がステップフロー成長に影響を与え、転位種に応じた表面形態をとることを明らかにした。さまざまなウエハで転位と表面形状の関係について解析するとともに、転位が表面形状を変化させるメカニズムを明確にする必要があると考えている。この関係が一般的に成立つとすると、高分解能SEM評価はSiCの転位評価の効率化に大きく貢献するものと期待できる。FIBマイクロサンプリングとSTEM観察の組み合わせは、転位の種類を確実に決定することができ、さらに多方向STEM解析により結晶欠陥の三次元的な構造を調べることができる。このような電子顕微鏡技術よりSiCの結晶欠陥についての理解が深まり、SiCデバイスの性能や信頼性向上に貢献できるものと期待している。

本研究に際し、電子顕微鏡を用いた評価で多大なご協力をいただいた日立ハイテクノロジーズの皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 松前弘之他編, 「半導体SiC技術と応用(第2版)」, 日刊工業新聞 (2011)
- 2) Y. Orai et al., *Proc. European Conference on Silicon Carbide & Related Materials 2014*, TU-P-35 (2014)
- 3) T. Sato et al., *Proc. European Conference on Silicon Carbide & Related Materials 2014*, Mo-P-23 (2014)
- 4) 佐藤高広他, 第62回応用物理学会春季学術講演会, 11p-P2-7 (2015)
- 5) K. Kuroda et al., *Ext. Abstr. 19th Solid State Device and Materials*, 227 (1987)
- 6) M. Fukui et al., 14th International Conference on Defects-Recognition, *Imaging and Physics in Semiconductor*, p.58 (2011)
- 7) T. Sato et al., *Materials Science Forum*, pp.358-361 (2014)

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。 <https://members.hht-net.com/sinavi/>

HPLC-水素化物発生-原子吸光光度法を用いたAsの 価数別分析—非鉄精錬分野における利用—

Speciation of Arsenic(III) and Arsenic(V) by HPLC—Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry—Application to non-ferrous metal refinery process—



JX日鉱日石金属株式会社
技術開発センター
分析グループ

蝦名 毅

1. はじめに

非鉄業界では、ひ素、アンチモン、セレンなどの価数別分析の需要が多い。銅精錬工程の工場排水などに含まれるひ素は鉄共沈による除去分離を行うが、五価のひ素(As(V))は除去し易いものの三価のひ素(As(III))は除去し難い。セレンの四価と六価では四価は鉄共沈により除去できるが六価は分離し難い。

また銅電解液中のひ素とアンチモンの存在形態(価数)と濃度比は浮遊性スライムの発生に関連があり、電気銅の品位の低下並びに物理的性質に影響するといわれている。

このため、ひ素、アンチモン、セレンの価数別分析が行われているが、セレンの鉄共沈分離-ICP測定法以外は比較的簡便な分析方法は見当たらない。従って、溶媒抽出やイオン交換カラム分離など、操作が煩雑で長時間をする分離、分析方法を採用してきた。このような理由から簡便かつ迅速な分析法が要望されてきた。

比較的簡便に分離・測定できる方法としてはHPLCを用いる分離・測定方法が報告されており、逆相分配カラムを用いる方法¹⁻⁴⁾とイオン交換カラムを用いる方法⁵⁾が多い。

ここでは、有機溶媒による洗浄が可能であり、長期間安定に使用する目的に適しているC30タイプの逆相分配カラムを使用し、非鉄製錬分野の価数別分離に適する溶離液の検討を行った。検出方法としては既に報告があり⁴⁻⁷⁾、比較的装置が安価で、感度も良好な水素化物発生(HG)-原子吸光光度法(AAS)を用いた。

2. 実験

2-1 装置

装置概要を図1に示す。

- 1) 原子吸光光度計: 日立ハイテクサイエンス製Z-2310形偏光ゼーマン原子吸光光度計に加熱石英セルを装着して測定した。
- 2) 高速液体クロマトグラフ: 日立ハイテクサイエンス製LaChrom Eliteシステムを使用した。
- 3) カラム: 和光純薬製Wakopak Navi C30-5 内径6 mm×長さ150 mmと、内径6 mm×長さ250 mmを直列に接続して使用した。
カラムの温度は30°Cとした。
- 4) 水素化チューブ: 内径2 mm、長さ6 mのPFAフッ素樹脂チューブを用いた。
- 5) チューブポンプ: GILSON製MINIPLUS 3を使用した。
- 6) キャリアガス用マスフローコントローラ: 山武製MQV9500を使用し、窒素ガスを100 mL/minで流した。

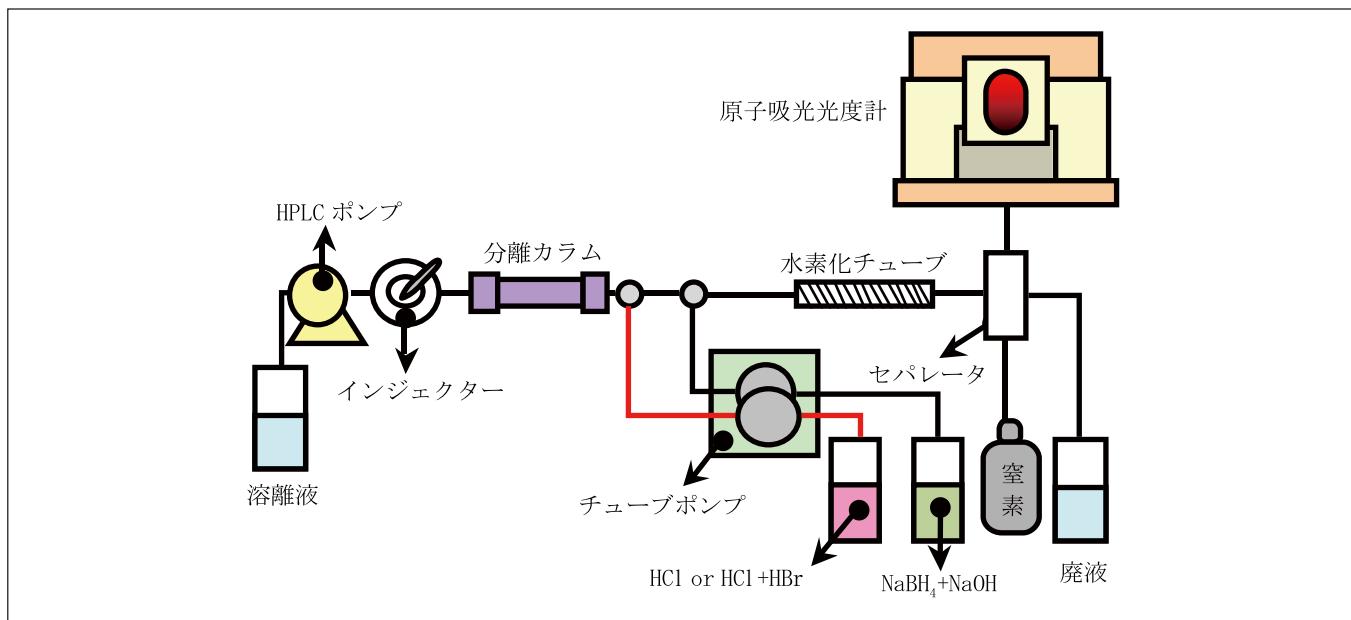


図1 装置概要

2-2 溶離液

5 mM 水酸化テトラ-n-ブチルアンモニウム、2 mM 硫酸、40 mM クエン酸となるように調製した。液流速は 1 mL/min とした。

2-3 水素化反応用の酸とテトラヒドロほう酸ナトリウム溶液

水素化物発生用の酸は、銅及びクロムが 100 mg/L 以下の試料溶液測定や測定条件検討の場合は 1.2 M 塩酸 (HCl) とした。実試料では金属イオン濃度が高い場合があるため、6 M 塩酸と 1.8 M 臭化水素酸 (HBr) の混合溶液を使用して金属による影響を軽減するようにした。

テトラヒドロほう酸ナトリウム溶液は、1.5 (w/v) % テトラヒドロほう酸ナトリウムと 0.4 (w/v) % 水酸化ナトリウムの混合溶液とした。

2-4 As標準液

1) As (III) 標準溶液の調製

市販の 1,000 mg/L ひ素標準液を 10 mL 採取し、40 g/L L-アスコルビン酸と 200 g/L ヨウ化カリウム混合溶液 10 mL と濃塩酸 8 mL を混合し、100 mL にメスアップする。以下、同様の操作で 10 mg/L と 1 mg/L の溶液を調製する。

2) As (V) 標準溶液の調製

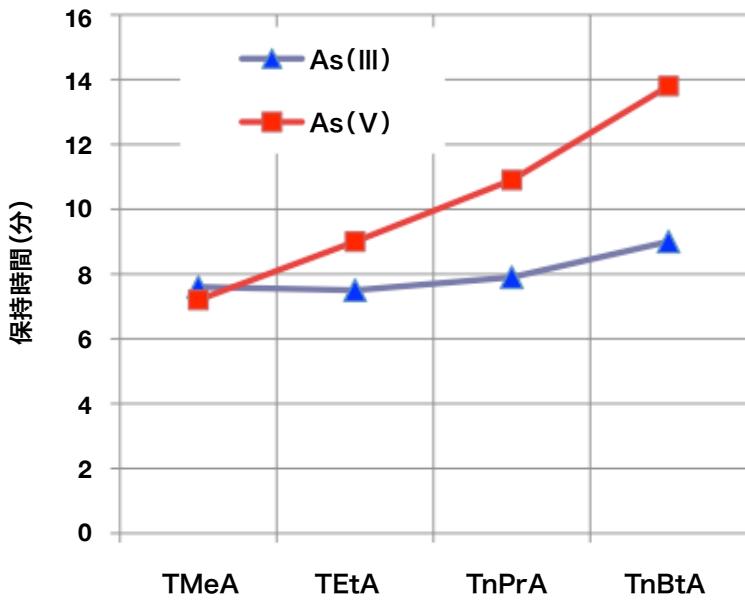
市販の 1,000 mg/L ひ素標準液を 10 mL 採取し、次亜塩素酸ナトリウム溶液 5 mL、濃硝酸 5 mL を加え 100 mL にメスアップして 100 mg/L とする。この 10 mL を採取し、濃硝酸 2 mL を添加して 100 mL にメスアップし、10 mg/L の溶液を調製する。同様の操作で 1 mg/L の液を調製する。

3. 溶離液組成の検討

組成の検討は各成分について行ない、最適な条件を決定した。ここでは、第四級アンモニウムイオンの選択と最終的に得られたクロマトグラムを示す。

3-1 第四級アンモニウムイオンの選択

第四級アンモニウムイオンの炭素数の違いによる As (V) の保持時間の変化を調べた。結果を図 2 に示す。テトラメチルアンモニウム (TMeA) では As (V) が先に溶出しているが、テトラエチルアンモニウム (TEtA) になると逆転し As (V) が後に溶出するようになる。テトラ-n-プロピルアンモニウム (TnPrA)、テトラ-n-ブチルアンモニウム (TnBtA) になると、さらに保持時間の差が大きくなる。X. Chris Le and Mingsheng Ma も報告^⑥しているように、TnBtA が As (III) と As (V) の分離に有効であることが確認できたため、TnBtA を使用することにした。



- ・TMeA : テトラメチルアンモニウム, TEtA : テトラエチルアンモニウム,
TnPrA : テトラ-n-プロピルアンモニウム, TnBtA : テトラ-n-ブチルアンモニウム
- ・溶離液 : クエン酸 ; 30 mM, 第四級アンモニウムイオン ; 10 mM, pH調整無

図2 第四級アンモニウムイオンの種類による保持時間への影響

3-2 As(III)とAs(V)のクロマトグラム

標準的な HPLC-HG-AAS 測定における As(III) と As(V) のクロマトグラムを図 3 に示す。ひ素濃度は 2.8 mg/L である。As(III) よりも As(V) の方が保持時間が長いにもかかわらず、ピーク幅が若干狭くピーク高さが高くなっている。保持時間の差は約 4 分間あり、As(III) と As(V) が十分分離できていることが分かる。

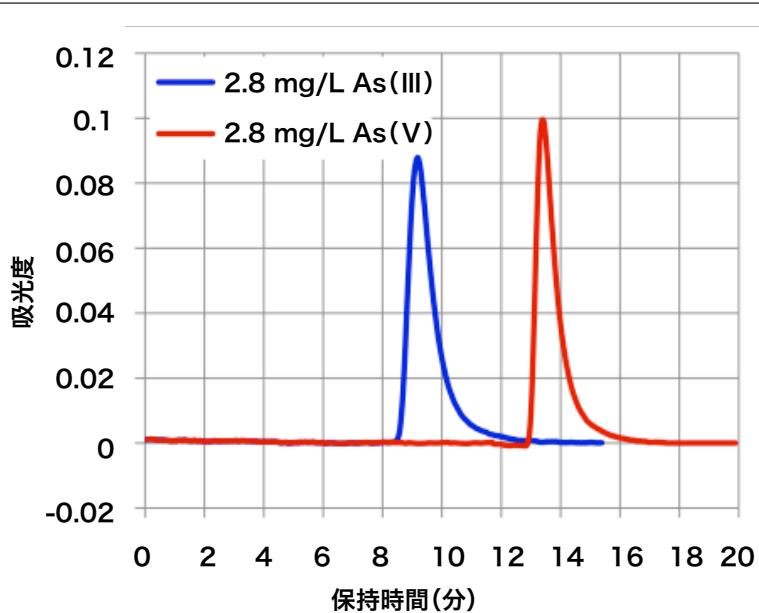


図3 As(III)とAs(V)のクロマトグラム

4. As(V)の水素化物発生効率改善

ひ素の水素化物発生(HG)では、通常As(V)はAs(III)の40~60%程度の効率であると言われている。このため、HG-AAS法などを利用してひ素の全量を測定する場合は、As(V)を予備還元によりAs(III)にする必要がある⁹⁾。

しかし、HPLCによるひ素の価数別分離水素化物発生法では、As(V)を予備還元することはできない。このため、As(V)の水素化物発生効率の検討を進めたところ、水素化チューブ長さ、クエン酸濃度の条件を変えることで水素化物発生効率を向上できることが分かった。

As(V)の水素化物発生効率の条件検討で、HPLCの検出器に原子吸光光度計を用いる場合は、ピークの形状をほぼ同一にしないとAs(III)とAs(V)のピーク面積を直接比較をすることが困難となることが考えられた。

そこで、カラムの代わりに抵抗管を使用し、フローインジェクション法(FIA法)にすることでピーク形状を揃え、比較を行った。また、TnBtAが存在すると樹脂チューブだけの配管であってもAs(V)が若干保持されてピーク形状が変わる。このため、FIA法の搬送液にはTnBtAを添加せずに条件検討を行った。

4-1 水素化チューブ長さの影響

水素化チューブの内径を2mmとし、長さ2mにしたところAs(V)は90%近い水素化物発生効率が得られた。さらにチューブを延長したところ、3m~6mで97%となった。この結果から、余裕を見て6mとした。

4-2 クエン酸、酒石酸の効果

FIA法の搬送液のクエン酸濃度の影響を調べたところ、濃度を高めるに従ってAs(V)の水素化物発生効率が向上することが分かった。また、酒石酸も同様の効果があった。図4にAs(III)のピーク面積平均値を100%としたときのAs(III)とAs(V)のピーク面積比率を示す。

クエン酸、酒石酸濃度が高くなるに従ってAs(V)の感度が向上することが分かる。しかし、40mMを超えるとHPLCで分離した時のAs(V)のテーリングが大きくなつた。そこで、クエン酸、酒石酸濃度は40mMとした。

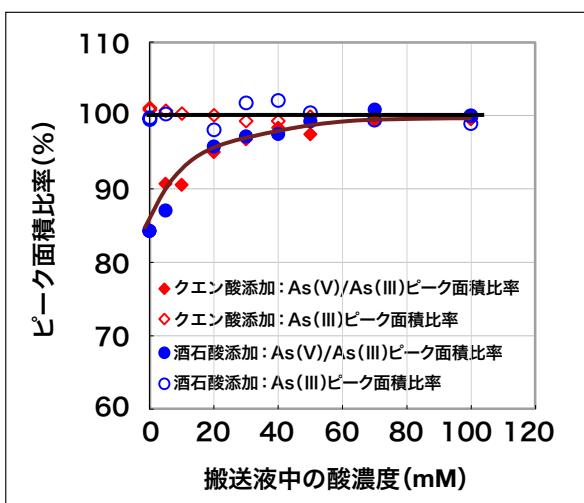


図4 酸濃度の影響

5. 金属イオンによる妨害の検討

水素化物発生によるひ素の分析では、銅(Cu)、ニッケル(Ni)などの金属イオンが共存すると大きな妨害となることが知られている⁸⁻⁹⁾。このため、金属イオンが共存することによる影響を調べた。

予め、As(III)とAs(V)のHPLC分離条件でCu、Ni、鉄(Fe)、コバルト(Co)、クロム(Cr)との分離を調べたところ、これらの金属イオンはAs(III)の前に出現し、ひ素と分離できていることが確認できた。

試料溶液中のCu(II)イオン濃度を5g/Lとしたときの注入回数とピーク面積比率を図5に示す。水素化物発生用の酸を6M HCl+1.8M HBrとしたときの1回目のピーク面積を100%としている。図から分かるように、水素化物発生用の酸が1.2M HClの場合は、ひ素の水素化物のピーク面積が1回目から大きく低下しており、回数が増えるに従ってさらに低下している。6M HClの場合も酸による抑制効果は見られるが、やはり回数が増えるに従ってピーク面積が低下する。水素化物発生用の酸が6M HCl+1.8M HBrの場合は、3回目までは感度の大きな低下がなかった。

このように、Cuとひ素が分離できているにも拘わらず、妨害を受ける。また、妨害が蓄積的であることも分かる。水素化物発生効率が低下している場合、テトラヒドロほう酸ナトリウムが混合された後のチューブは析出物によって黒くなっている。これがテトラヒドロほう酸ナトリウムを優先的に分解することによりひ素の水素化物発生効率が低下するものと推測される。

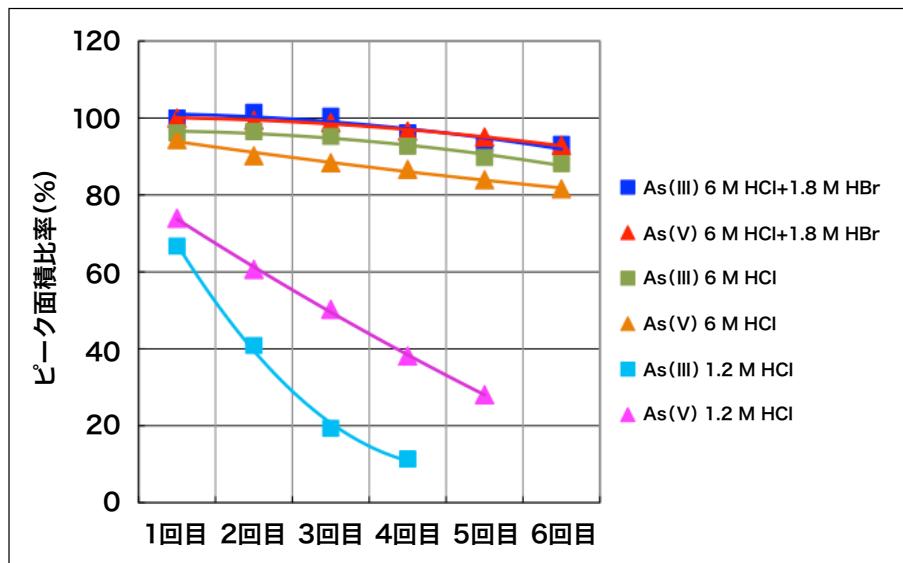


図5 高濃度の銅を含む試料の注入回数と感度の低下の状況

また、Cu, Ni, Fe, Co, Crが試料中に共存する場合、5回測定した回収率の平均が97%～103%以内に納まるような許容濃度範囲を調べた。水素化物発生用の酸として6M HCl+1.8M HBrを用いれば、3g/LまでのCu(II), Ni(III), Fe(II), Fe(III)及びCo(II)と、As(III)に対する3g/LまでのCr(III)は許容範囲内であった。As(V)に対しては1g/LまでのCr(III)が許容範囲内であった。

6. 実試料の測定

As(V)の水素化物発生効率改善前の検量線と、水素化物発生効率改善後の検量線の例を図6に示す。クエン酸の濃度を高めたことと、水素化物発生用のチューブを改善することでAs(V)の感度が大幅に高まり、As(III)とほぼ同じレベルまで改善されていることが分かる。

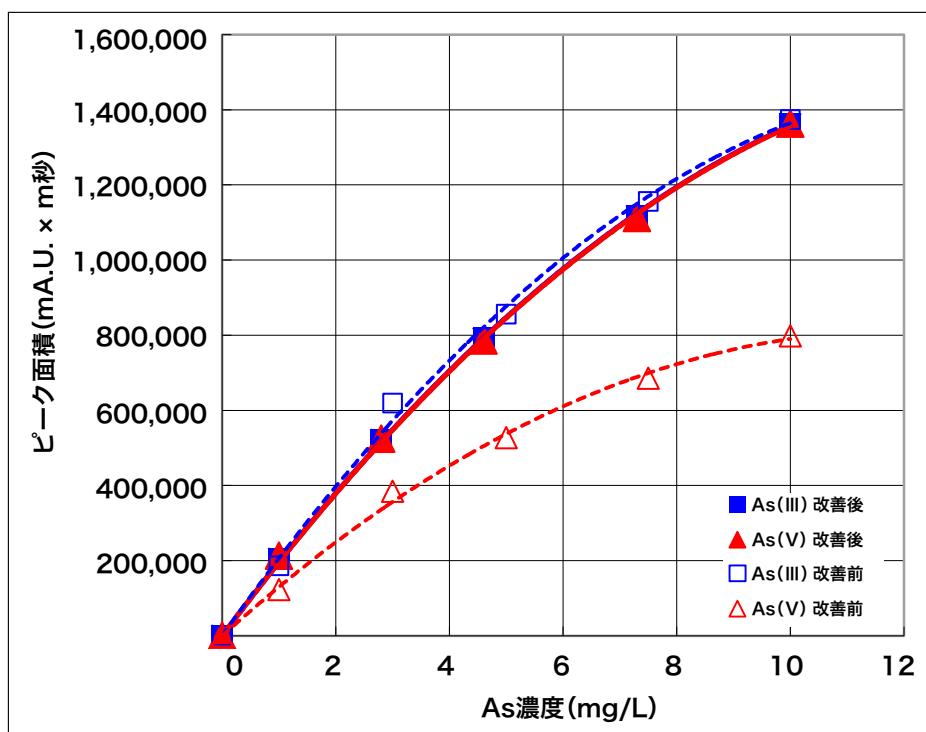


図6 As(V)水素化効率改善前後の検量線例

本報告条件での結果を含め、今まで測定してきた約100点の試料の測定結果についてHPLC-HG-AAS法とICP測定法を比較した。試料溶液を希釈してHPLCに注入するとき、Cuは0～0.55g/L、硫酸は0～0.1M、Feは0～0.27g/Lの範囲であった。

結果を図7に示すが、HPLC-HG-AAS法によるAs(III)とAs(V)の測定値の合計とICP測定による全ひ素の測定結果はよく一致していた。また、As(V)のみが存在する試料についても同様に比較したが、やはりよく一致していた。このことから、本測定法は十分に実用性があると思われる。

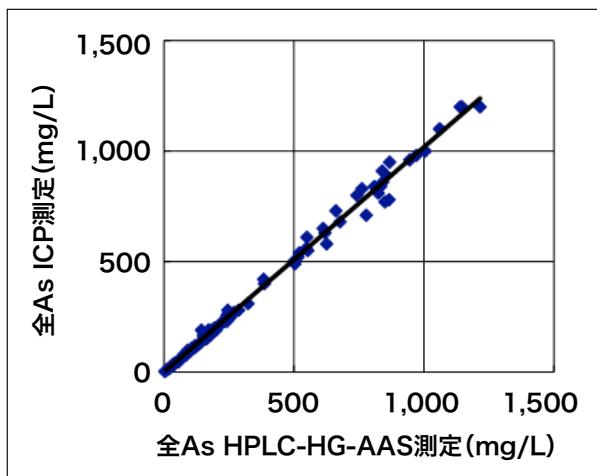


図7 HPLC-HG-AAS法によるAs(III)とAs(V)濃度の測定値合計と、
ICP法による全As濃度測定結果比較

7. まとめ

HPLC-HG-AASによる、As(III)とAs(V)の価数別分析で、溶離液組成と水素化物発生用いる酸の濃度を検討することで、非鉄製錬分野のように高濃度の硫酸、銅及び有機分解物を含む試料でも、長期間に渡り安定に測定できる方法を開発できた。

また、HPLC溶離液にオキシカルボン酸を添加し、かつ水素化チューブと水素化ホウ素ナトリウム濃度を最適化することで、As(V)の感度が、As(III)に較べて40～60%程度であったものを98～100%程度に改善できる方法を開発した。

以上の成果により、As(V)の定量性を改善した分析法とすることができた。

参考文献

- 1) Narukawa, T., Kuroiwa, T., Yarita, T. and Chiba, K., *Appl. Organometal. Chem.*, 20, 565-572 (2006)
- 2) Yukitoki Morita, Teppei Kobayashi, Takayoshi Kuroiwa and Tomohiro Narukawa, *Talanta*, 73, 81-86 (2007)
- 3) 神和夫, 小林智, 武内伸治, 辰巳健一, 三浦勝巳, 成田隆広, 道衛研所報, 62, 35-41 (2012)
- 4) Xiao-Chun, William R. Cullen and Kenneth J. Reimer, *Talanta*, 40, 495-502 (1994)
- 5) Bruce A. Manning and Dean A. Martens, *Environmental Science & Technology*, 31, 171-177 (1997)
- 6) X. Chris Le and Mingsheng Ma, *Anal. Chem.*, 70, 1926-1933 (1998)
- 7) Zhilong Gong, Xiufen Lu, Mingsheng Ma, Corinna Watt, X. Chris Le, *Talanta*, 58, 77-96 (2002)
- 8) JIS K 0102:2013 61.ひ素(As)
- 9) 楠崎久武「水素化物発生:原子分光法による水素化物発生元素の定量<総説 マイレビュー>」CACS FORUM Vol.15, 9-19 (1995)

謝 辞

本報告は、(株)日立ハイテクサイエンスの白崎俊浩氏、坂元秀之氏とJX日鉱日石金属(株)の樋村寛氏、上村憲一氏のご助力により得られた成果である。ここに関係の方々に深謝する。

単分散ポリマー粒子を用いた高分離能HPLC用カラムの開発

Development of High-Resolution HPLC Columns packed with monodisperse polymer particles



日立化成テクノサービス株式会社
共同執筆者
ファインケミカル部門
沼尾和幸^{*1}, 櫻井恵太^{*1}
機能材料開発グループ

佛願 道男

1. はじめに

粒径 3 ~ 20 μm のポリマー粒子は分析用途に広く適用されており、筆者らは、ポリマー粒子合成技術を基に大気捕集管、固相抽出材、HPLC 用カラム等の環境分析ツールを開発している。大気捕集管では大気中のホルムアルデヒド、NOx、VOC 等の用途に加え、ポリマー粒子多孔化技術、低バックグラウンド技術を活かし個人暴露、作業環境用の捕集管を開発検討中である。固相抽出材では疎水吸着、イオン交換、キレート等の機能を付与したポリマー粒子を用いた固相抽出材を開発した。これらは水質、医薬品等の濃縮、分析に広く用いられている。HPLC 用カラムは 1980 年頃から開発を開始し、有機溶媒系分析用・分取用 SEC カラム、糖・有機酸用カラム、水系 SEC 用カラム、逆相分配用カラム、イオンクロマトグラフィー用カラム等ポリマー系カラムを順次製品化している。

これらの製品では懸濁重合でポリマー粒子を合成し、篩や風力による分級で粒度分布を揃えていた。しかし近年、製品の特性向上のため、粒子の小粒径化、粒度分布のシャープ化が求められ、分級なしで粒度分布が揃うシード重合法による单分散粒子¹⁾が注目されている。そこで、シード重合法による单分散粒子（以下、单分散粒子と称す）のカラム適用検討を行い、カラムの高性能化を図ったので、その内容を報告する。

2. 单分散粒子

シード重合法による单分散粒子の合成方法概要を図 1 に示す。ソープフリー乳化重合²⁾により 0.4 ~ 1 μm の種粒子を作製し、そこに、モノマーや細孔調節剤を吸収させ、10 ~ 500 倍に膨潤後、熱重合で粒子形状を保った状態で重合させる³⁾。この单分散粒子と懸濁重合後、及びその分級後の粒子の粒度分布比較例を図 2 に、单分散粒子の SEM 写真を図 3 に示す。

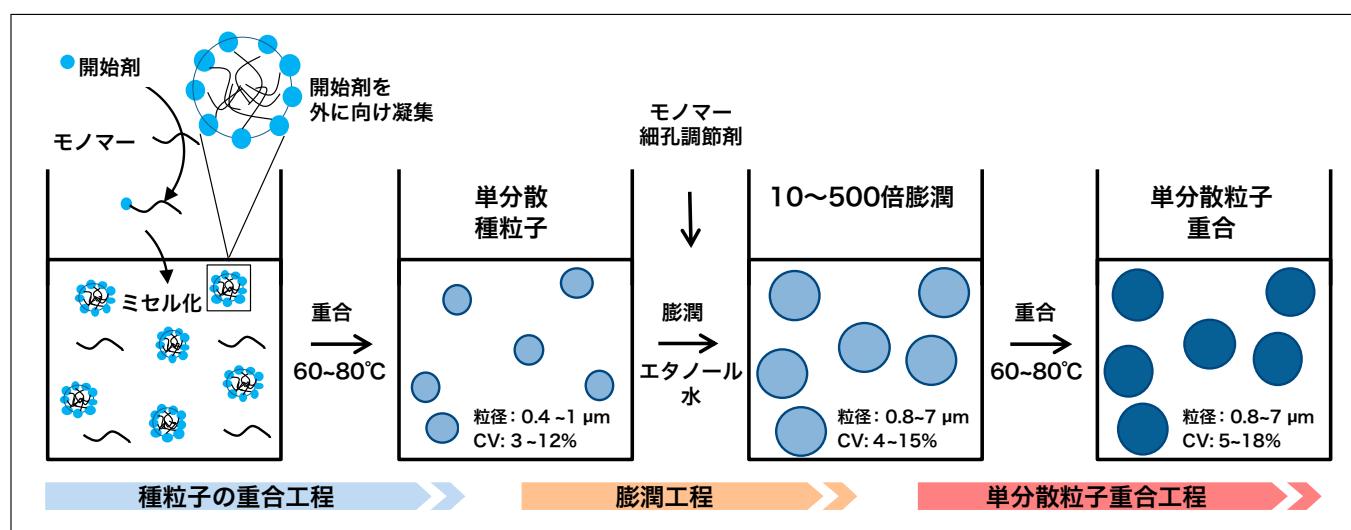


図1 单分散粒子の合成法(シード重合法)

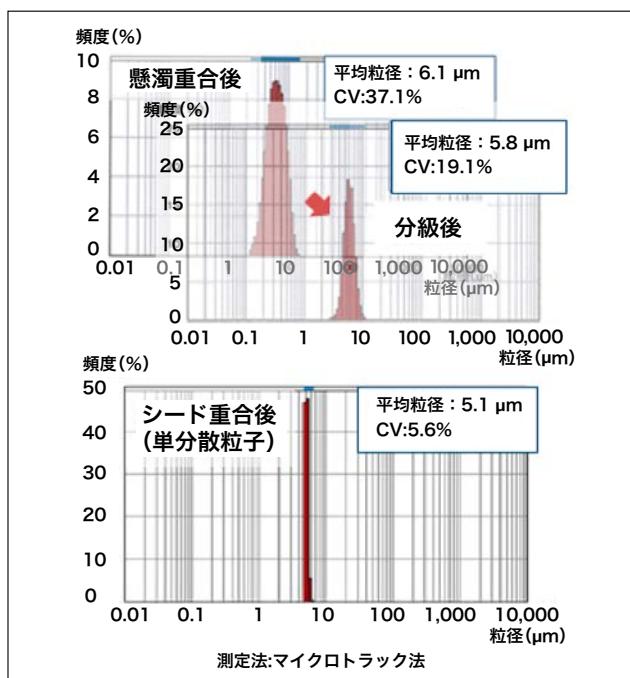


図2 懸濁重合粒子と単分散粒子との粒度分布比較例

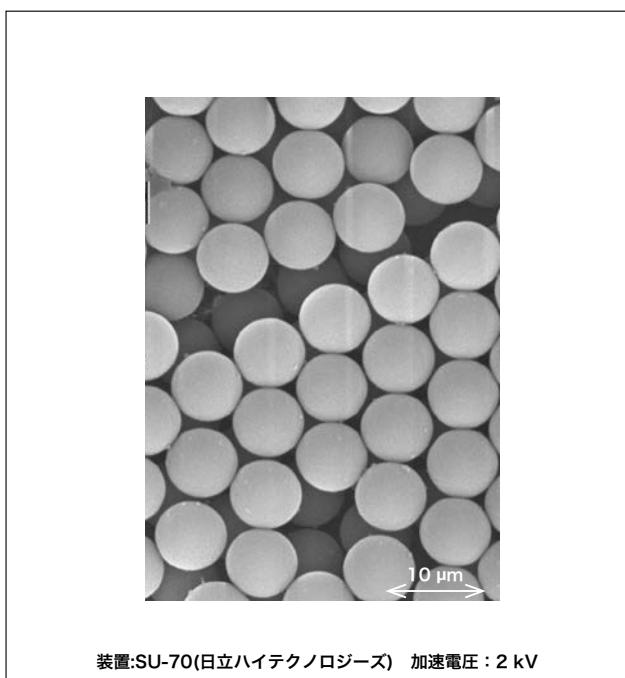


図3 単分散粒子のSEM像
装置:SU-70(日立ハイテクノロジーズ) 加速電圧:2 kV

図2、図3より、単分散粒子の粒度分布のシャープさの指標 CV (標準偏差 / 平均粒径 × 100) は、懸濁重合による粒子及びその分級粒子に比べて小さいことが分かる。

懸濁重合法に比べ、シード重合法で粒度分布がシャープな単分散粒子を得られることを確認したので、親水性アクリル系とステレン系の単分散粒子を合成し、それぞれ、蛋白質分析用 SEC カラム、有機化合物分取用 SEC カラムへの適用を検討した。

3. 分析用SECカラム

3-1 粒子特性

蛋白質の SEC 分析用に親水性アクリルモノマーを用い、シード重合法で単分散粒子を合成した。単分散粒子は理論段数向上のため、平均粒径は 3.5 μm と懸濁重合粒子の 9.5 μm に比べ小さく、また、カラム圧低減を考慮し架橋性モノマー比を高く設計した。この単分散粒子 (W540-SM) と、懸濁重合後に分級 (8 μm~12 μm) した粒子 (現行 SEC カラム Gelpack W540S 用) の特性を表1に、粒度分布を図4に示す。CV は 5.8% と懸濁重合分級粒子より小さな値を示し、また、架橋性モノマー比増加による膨潤度低減が確認できた。

表1 アクリル系粒子の特性

| 粒子 | 架橋性 モノマー比 *** | 平均粒径 **** (μm) | CV (%) | 膨潤度 ***** |
|----------|---------------------|----------------------|-----------|--------------|
| W540-SM* | 1.7 | 3.5 | 5.8 | 1.2 |
| W540S** | 1.0 | 9.5 | 23.7 | 1.3 |

* シード重合法の単分散粒子

** 懸濁重合法の粒子

*** W540Sの架橋性モノマー量を1.0としたときの値

**** マイクロトラック法により測定

***** アセトンの膨潤体積を測定 膨潤度=膨潤体積/乾燥体積

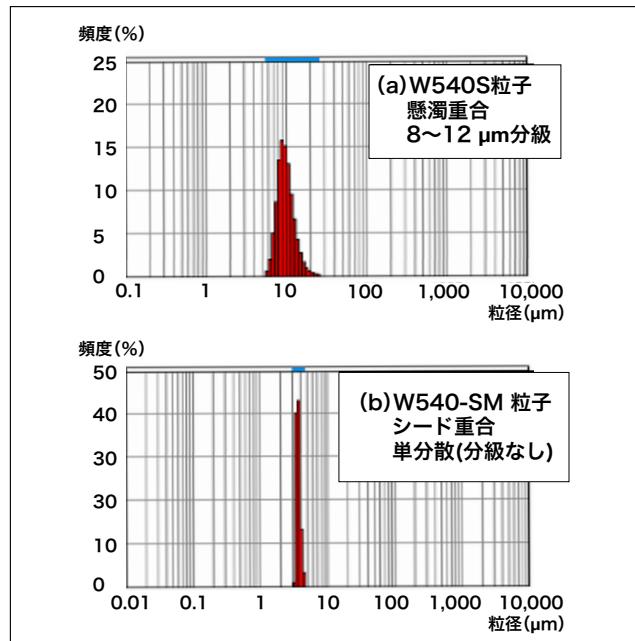


図4 懸濁重合粒子と単分散粒子との粒度分布

3-2 カラム特性

上記の単分散粒子を分級することなく $\phi 4.6\times150\text{ mm}$ のステンレス製カラムに充填し、カラム(W540-SM)を作製後、その特性を装置1(HPLC)と装置2(UHPLC)を用いて評価した。表2に理論段数とカラム圧を、図5にクロマトグラムを示す。現行Gelpack W540Sのカラムサイズは $\phi 7.8\times300\text{ mm}$ とカラムサイズが違うためカラム理論段高さ(H)を性能指標として表2に併記した。現行カラムGelpack W540Sでは装置1、2とも理論段高さ $23\text{ }\mu\text{m}$ (理論段数13,000)と変化がなかった。一方、W540-SMでは装置1では理論段高さ $21\text{ }\mu\text{m}$ (理論段数7,100)と現行品と大きく変わらなかつたが、装置2で測定すると理論段高さが $9\text{ }\mu\text{m}$ (理論段数16,000)と大幅に向上了り、理論値に近くなつた。装置1は、装置2に比べ、セルサイズと流路径が小さいため、装置内での拡散が少なく⁵⁾、小粒子単分散カラムW540-SM本来の特性が発現したものと考える。したがつて、今後、 $3.5\text{ }\mu\text{m}$ 程度の単分散粒子を用いる分析用カラム開発に当たつては評価装置との適合性が重要と思われる。

表2 分析用SECカラムの特性

| カラム | カラム サイズ (mm) | 流速 (mL/min) | 装置1**測定値 | | | 装置2**測定値 | | | 理論値 ⁴⁾ | |
|---------|---------------------|----------------|-----------------|---|--------------------|-----------|-------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------------|
| | | | 理論段数 N*** | 理論段 高さ H**** (μm) | カラム圧 P (MPa) | 理論段数 N | 理論段 高さ H (μm) | カラム圧 P (MPa) | 理論段数 N | 理論段 高さ H (μm) |
| | | | 線速度 (mm/sec) | | | | | | | |
| W540-SM | $\phi 4.6\times150$ | 0.35 (0.35) | 7,100 | 21 | 2.8 | 16,000 | 9 | 3.5 | 21,000 | 7 |
| W540S | $\phi 7.8\times300$ | 1.00 (0.35) | 13,000 | 23 | 2.2 | 13,000 | 23 | 2.4 | 17,000 | 18 |

* 装置1:HPLC LaChrom Elite(日立ハイテクサイエンス), UV検出器(セル容量:13 μL), 配管径:0.3 mm

** 装置2:UHPLC ChromasterUltra Rs(日立ハイテクサイエンス), DAD(ダイオードアレイ)検出器(セル容量:2.2 μL), 配管径:0.1 mm

*** N=5.54x(保持時間/半値幅)

**** H(μm)=カラム長さ(μm)/N

測定条件:溶離液:1/15リン酸ナトリウム(pH7)+0.2 M NaCl, 試料:1%アラニン, 注入量:5 μL

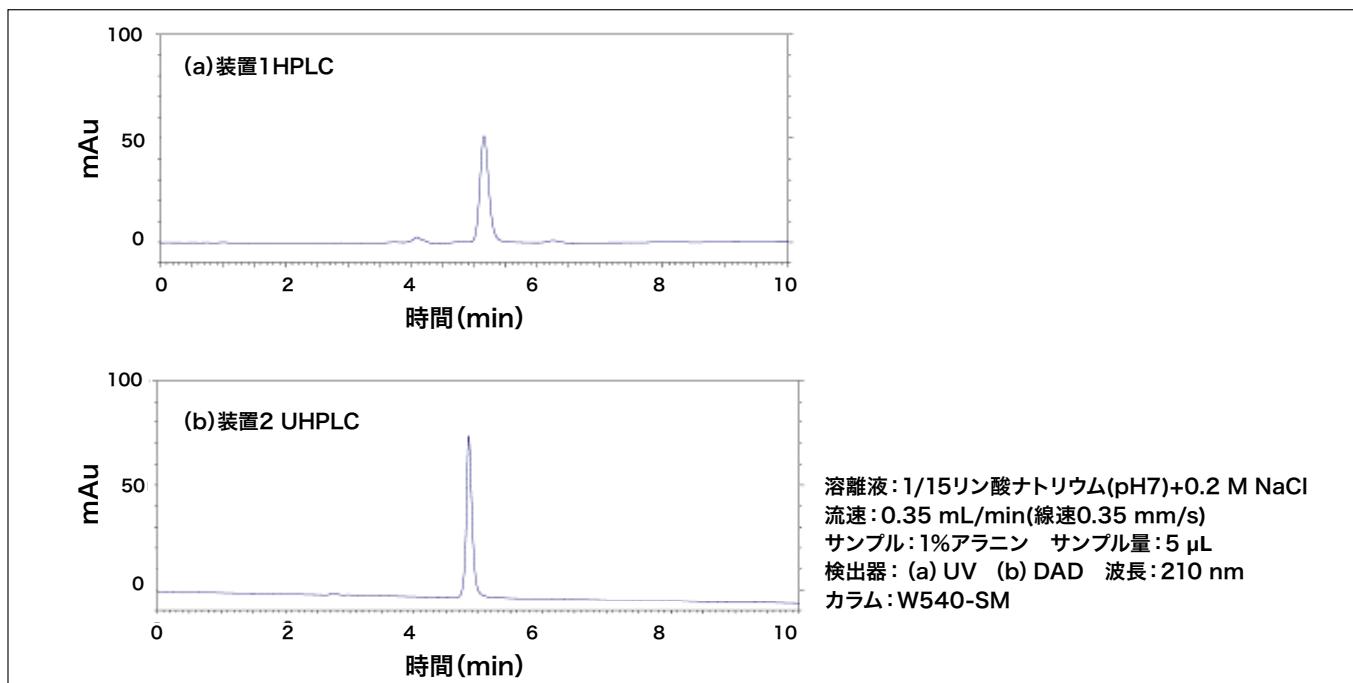


図5 装置によるクロマトグラム比較

4. 分取用SECカラム

4-1 粒子特性

有機化合物の SEC 分取用にスチレン系モノマーを用い、シード重合法で排除限界違いの単分散粒子2種を合成した (P212MD, P213MD)。単分散粒子は理論段数向上のため平均粒径は 8 μm と懸濁重合粒子の 14 μm に比べ小さく、また、カラム圧低減を考慮し架橋性モノマー比を高く設計した。これらの単分散粒子と、10 ~ 20 μm に分級した現行 SEC カラム (分取用 Gelpack P212, P213) 用懸濁重合粒子の特性を表 3 に、P212L, P212MD の粒度分布を図 6 に示す。その CV は 7.2 ~ 7.6 と懸濁重合分級粒子の 18.6 ~ 25.0 より小さな値を示し、また、架橋性モノマー比増加による膨潤度低減が確認できた。

表3 スチレン系粒子の特性

| 粒子 | 架橋性モノマー比*** | 平均粒径****(μm) | CV(%) | 膨潤度***** |
|---------|-------------|---------------------------|-------|----------|
| P212MD* | 3.8 | 8.0 | 7.2 | 1.3 |
| P213MD* | 3.8 | 8.2 | 7.6 | 1.2 |
| P212L** | 1.0 | 14.6 | 18.6 | 2.1 |
| P213L** | 1.3 | 13.6 | 25.0 | 2.1 |

*シード重合法により合成した単分散粒子

**懸濁重合法により合成した粒子

*** P212Lの架橋性モノマー量を1.0としたときの値

****コールターカウンタ法で測定

*****メスシリングダで膨潤体積を測定 膨潤度=膨潤体積/乾燥体積

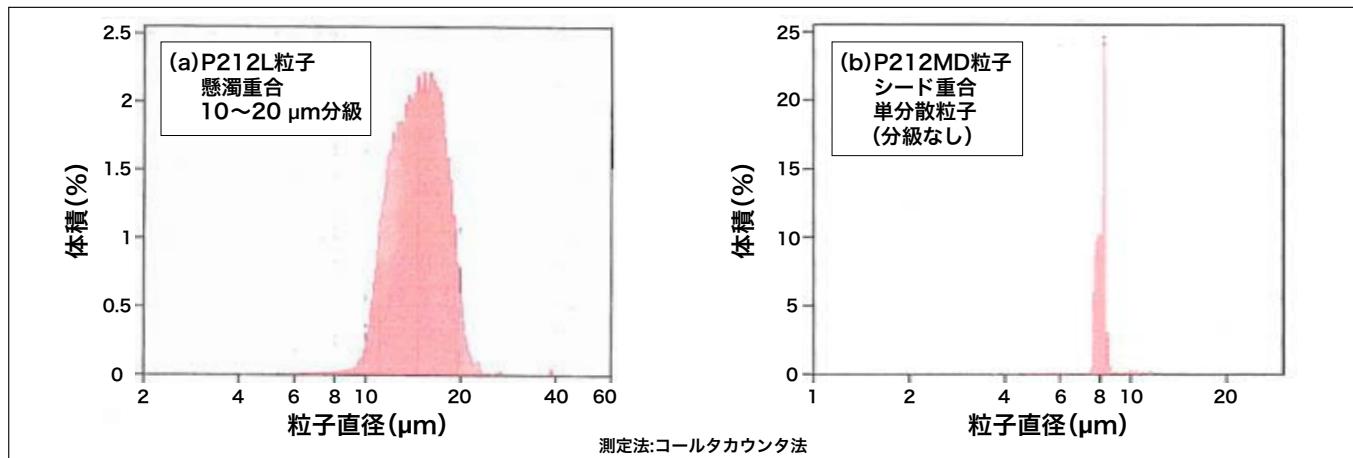


図6 懸濁重合粒子と単分散粒子との粒度分布比較例

4-2 カラム特性

これらの単分散粒子及び懸濁重合粒子をそれぞれ ϕ 20×600 mm のステンレス製カラムに充填し、カラム (P212MD, P213MD, P212L, P213L) を作製後、その特性を評価した。表 4 に理論段数及びカラム圧を示す。

表4 分取用SECカラムの特性

| カラム | 理論段数N | 測定値* | | 理論値** |
|--------|--------|------------|------------|--------|
| | | ピーク対称度 fas | カラム圧P(MPa) | |
| P212MD | 40,000 | 1.1 | 2.1 | 38,000 |
| P213MD | 41,000 | 1.1 | 2.1 | 37,000 |
| P212L | 17,000 | 1.0 | 2.4 | 21,000 |
| P213L | 24,000 | 1.0 | 1.7 | 22,000 |

* 試料0.1%ベンゼン500 μL , 溶離液:クロロホルム
流速:7.5 mL/min, 装置:LC-9101 (日本分析工業)

**N=カラム長さ/粒子径×2

単分散粒子を用いた P212MD, P213MD の理論段数はそれぞれ 40,000 段, 41,000 段となり、現行の 2.3 倍程度の高理論段数が得られた。粒度分布がシャープなため、粒径から計算した理論値とほぼ一致している。また、架橋性モノマー比を高くしたため、小粒径化しても圧力は従来カラムと同等であった。P212MD, P213MD について較正曲線を作成し、排除限界分子量は P212MD が 5,000、P213MD が 20,000 であることを確認した(図 7)。

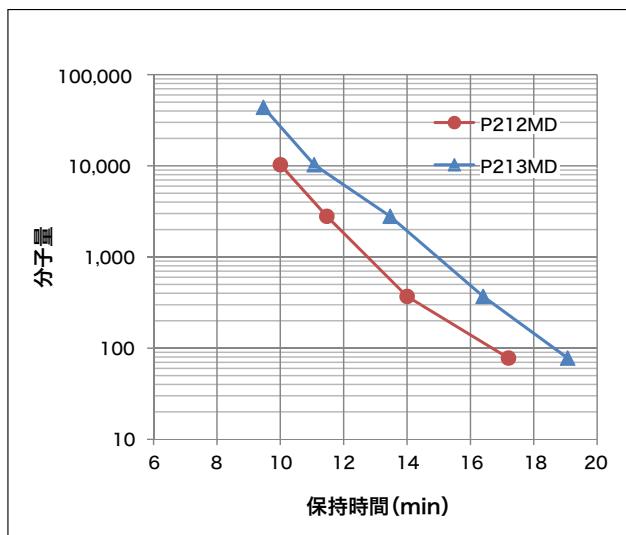


図7 較正曲線

次に単分散粒子カラムについて流速と理論段数との関係を調べた。その結果とクロマトグラムを図 8, 図 9 に示す。P212MD, P213MD とも通常の流速の 2 倍の 15 mL/min で通液しても理論段数は 30,000 段を超えていた。架橋性モノマー比を高くしたため、高流速条件で分析時間が半減でき、単分散かつ小粒径のため、高分離が可能になったと考えられる。

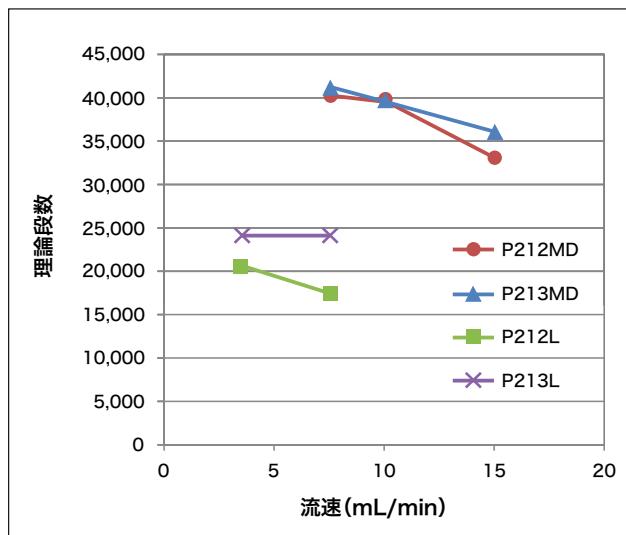


図8 流速と理論段数との関係

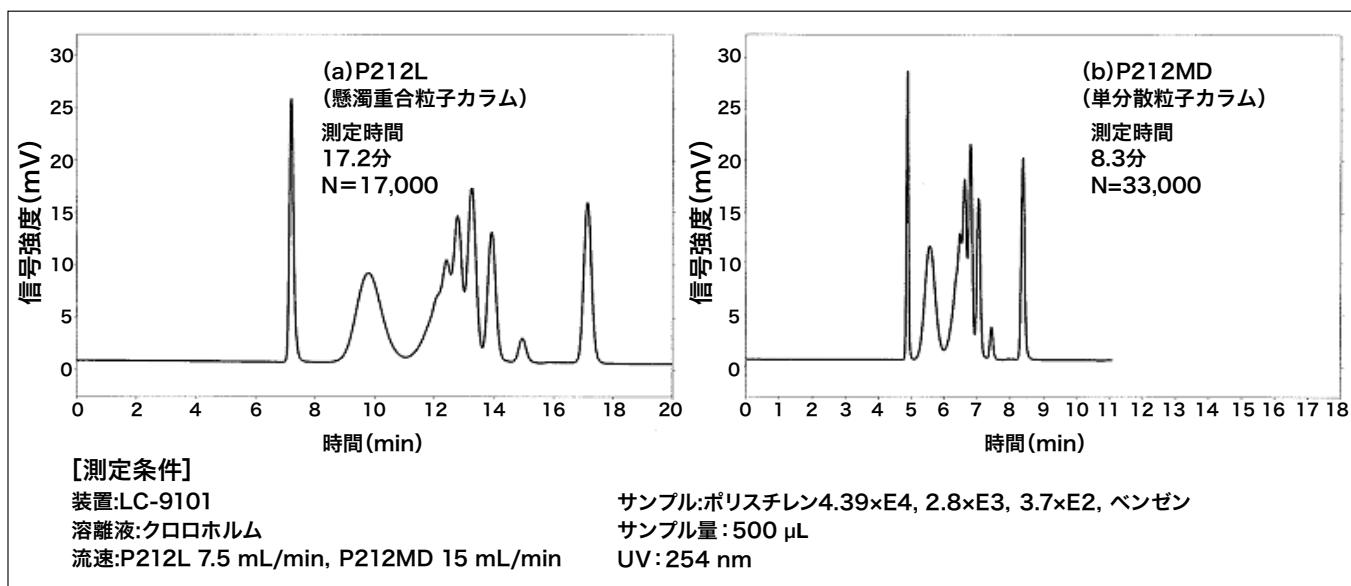


図9 懸濁重合粒子と単分散粒子カラムとのクロマトグラムの比較

5. おわりに

- 単分散ポリマー粒子のHPLCカラム適用を検討した。
- ・親水性アクリル系単分散粒子を ϕ 4.6×150 mm のカラムに充填した蛋白質分析用SECカラムは、UHPLC測定で理論段高さが9 μm(現行カラム23 μm)となった。
 - ・スチレン系単分散粒子を ϕ 20×600 mm のカラムに充填した有機化合物分取用SECカラムは理論段数40,000段(現行カラム20,000段)で、流速を15 mL/minと現行カラム条件の倍にしても理論段数は33,000段以上を示した。

以上のように、単分散粒子をHPLCカラムに適用することにより、分離能やスループット等のカラム特性の大幅な向上が期待できる。

6. 今後の予定

蛋白質分析用SECカラムは分離特性と装置との適合性検討、有機化合物分取用SECカラムは排除限界 10^5 相当品の作製検討を行い、早期の上市をめざしている。

参考文献

- 1) S. T. Camli, E. Unsal, S. Senel, A. Tuncel, *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 3685-3696 (2004)
- 2) 今野 幹男, 「ソープフリー乳化重合による単分散ポリマー粒子の合成」, 日本ゴム協会誌, 79, 61-66 (2006)
- 3) Kazuhiro Shibuya, Daisuke Nagao, Haruyuki Ishii, Mikio Konno, *Polymer*, 55, 535-539 (2014)
- 4) A. Fallon他, 「高速液体クロマトグラフィ」, 東京化学同人, 9-22 (1989)
- 5) Masahito Ito, Kosaku Toyosaki, Katsutoshi Shimizu, *Chromatography*, 28, 101-104 (2007)

共同執筆者

*1沼尾和幸 櫻井恵太
日立化成テクノサービス株式会社 ファインケミカル部門機能材料開発グループ

アミノ酸分析の進歩とL-8900

Advances in amino acid analysis & Amino Acid Analyzer L-8900



味の素株式会社
イノベーション研究所

小澤 真一



味の素株式会社
イノベーション研究所

宮野 博

共同執筆者
伊藤 正人^{*1}

1. はじめに

私たちの身体の約 60% が水分であるが、残りの半分、全体の約 20% はタンパク質などのアミノ酸で構成されている。体重 50 kg の人であれば、約 10 kg がタンパク質であり、筋肉や消化管、内臓、血中のヘモグロビン、髪や皮膚のコラーゲンなど、カラダの重要な組織を形成している¹⁾。タンパク質は、「三大栄養素」の中でも、身体の中で一番多く「生命活動を行う上で必要不可欠な根源的栄養素」である。たんぱく質を構成しているのは 20 種類のアミノ酸であるが、体内にはそれ以外にも数多くのアミノ酸が存在し、代謝、免疫、消化、中枢機能、発達、生体防御、運動機能等、あらゆる生体活動に重要な役割を担っていることが知られている。さらに自然界には約 500 種類ものアミノ酸が発見されている。

本稿では、アミノ酸研究に不可欠な分析法である分離分析技術のうち、HPLC の横綱といるべき L-8900 形アミノ酸分析計を中心に、アミノ酸分析の歴史、現状を概説し、さらに今後求められる分析計のあり方について提言していきたいと考える。

2. アミノ酸分析の歴史²⁾

アミノ酸分析は、古くは乳酸菌を用いる微生物定量法でおこなわれていたが、時代とともにクロマトグラフィーによる分離定性・定量分析が主流となっている。

イギリスの生化学者マーチンとシンジは、アミノ酸分析を目的として、1941 年に分配クロマトグラフィー³⁾、1944 年にペーパークロマトグラフィー⁴⁾を開発し、アミノ酸やペプチドの複雑な混合物の分離をおこなうことに成功した。1955 年にサンガーは、この分配・ペーパークロマトグラフィーを駆使して、インシュリンの全アミノ酸配列決定に成功した。

アメリカの生化学者スタインとムーアは 1948 年頃からでんぶん粒子やイオン交換樹脂を利用したクロマトグラフィーによるアミノ酸分析の研究に取り組み、1958 年にスパックマンとともに、アミノ酸自動分析計を開発した⁵⁾。この原理は、現在汎用されているアミノ酸分析計（後述）とほとんど変わらず、タンパク質を構成するアミノ酸の一斉分析法として、試料量、分析操作などが、従来法にくらべ、格段にすぐれていた。この分析法は、のちにリボヌクレアーゼ分子のアミノ酸配列の決定に大いに威力を発揮した。

マーチンとシンジは 1952 年に、スタインとムーアは 1972 年にそれぞれノーベル化学賞を受賞^{6,7)}している。これは、アミノ酸分析の進化が、科学史に大きな足跡を残した証拠の一つといえよう。

ちなみに、日本でいち早くアミノ酸分析計を導入したのは、味の素株式会社（以下、味の素）である。1959 年には、世界で最初に製造されたベックマン製のアミノ酸自動分析計の第二号機を購入している。ちなみに一号機はメルク株式会社であり、発明したムーアやスタインが所属するロックフェラー研究所には、三号機が納入されている。本装置が残っていないのは誠に残念である。

さて、味の素は、1963 年に、株式会社日立製作所が販売した KLA-2 形を導入している。

回顧録⁸⁾を読むと、当時の分析計は、内径 0.9 cm、長さ 15 cm の塩基性アミノ酸分析用のショートカラムと長さ 150 cm の中酸性アミノ酸分析用のロングカラムの 2 塔式で、緩衝液の流速は 30 mL/ 時間で、塩基性アミノ酸の分析を午前中に行い、午後に中酸性アミノ酸の分析を行うようになっていたとある。つまり、タンパク質加水分解の 17 種類のアミノ酸分析に 1 日を要していた。

3. アミノ酸分析に不可欠な誘導体化技術

さて、アミノ酸には特徴的な紫外あるいは可視の吸収域、また蛍光性もないものがほとんどであるため、通常はアミノ基を選択的に修飾して可視や蛍光性物質に変化させる、すなわち、誘導体化をして検出している⁹⁾。

誘導体化には、試料中の分析対象物のカラムへの注入に先立って誘導体化し、反応生成物を分離・検出するプレカラム誘導体化法と、試料中の分析対象物をあらかじめカラムで分離した後に、その溶出液をオンラインで誘導体化して検出するポストカラム誘導体化法がある。表にプレカラム誘導体化法とポストカラム誘導体化法の特徴を対比させた。それぞれの方法に専用の試薬もあれば、両方法に適用可能なものもある¹⁰⁾。

表 プレカラム誘導体化法とポストカラム誘導体化法の特徴の比較¹⁰⁾

| プレカラム誘導体化法 | ポストカラム誘導体化法 |
|--|--|
| 一般のHPLC装置で可能 | 装置が複雑化する |
| 自動化には特別な装置が必要 | 自動化が容易 |
| 誘導体化反応に要する時間は長くても可能だが、 その場合の分析時間は長くなる | ある程度早い反応が必要で、 全体として分析時間は短縮される |
| 反応条件設定に、 カラムでの溶離条件をそれほど考慮しなくてよい | 溶離条件が反応条件に大きく影響する |
| 反応が定量的である | 反応が中途の状態でも検出可能 |
| 反応生成物が単一である | 反応生成物が複雑でも分析可能 |
| 反応生成物が比較的安定である | 反応生成物が多少不安定でも分析可能 |
| 試薬プランク(過剰試薬や試薬分解物)が検出されてもよいが、 目的物と明確に分離が可能であること →検出器の種類に応じて試薬を選ぶことができる | 試薬プランクが検出器に応答しないものを選ぶか、 応答する場合は極力小さくする必要がある →使用できる誘導体化試薬が制限される |
| 試薬の消費量が少ない | 試薬の消費量が多い |
| 試薬溶液による試料の希釈はほとんど無視可能 | 試薬溶液による希釈やピーク拡散が生じる |
| 高感度化が可能 | 定量性・再現性に優れる |
| 誘導体化の反応効率が 試料マトリックスの影響を受ける | 反応前に試料成分がカラムにより分離されるので誘導体化試薬との反応時に試料マトリックスの影響を受けない |
| 逆相HPLCが適用できる | 逆相HPLCが適用できない |

文献10 Q55表1を一部改変

本稿の中心となる L-8900 形アミノ酸分析計、すなわちスタンヒムーの開発した原理は、ニンヒドリンを分析試薬として用いるポストカラム誘導体化法であり、反応後に生成する分析対象物の分解物と試薬とが反応した生成物を検出に利用している¹⁷⁾(図1)。

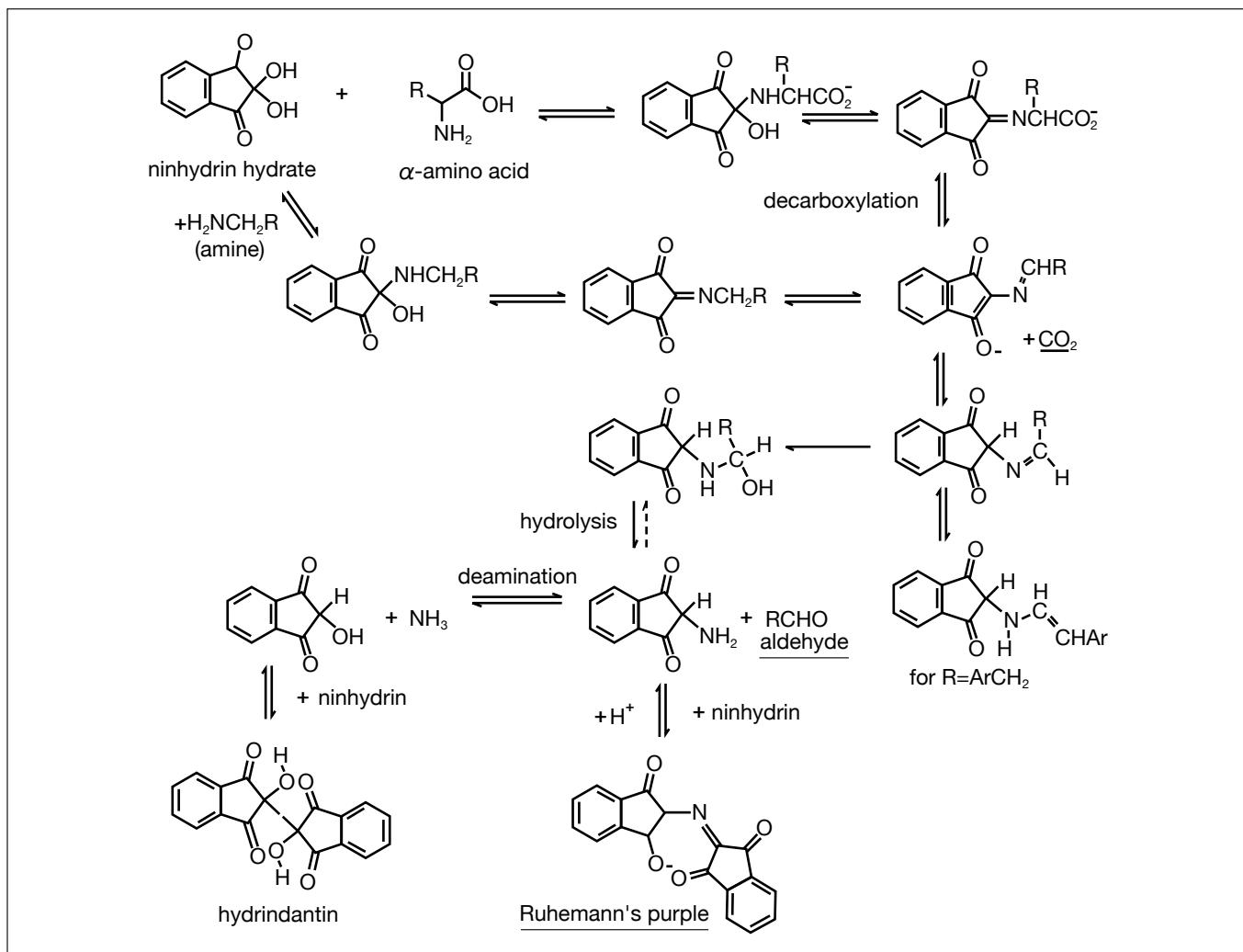


図1 ニンヒドリンの構造と発色機構

プレカラム誘導体化アミノ酸分析では、主として、アミノ酸のアミノ基を誘導体化する。

誘導体に蛍光性をもたせる前処理がおこなわれる場合が多いが、その目的は、

- ・アミノ化合物(アミノ酸)のみが蛍光性を有することになるため、選択的にアミノ酸を検出できるようになる。
- ・蛍光検出により、感度を格段に向上させることができる。
- ・誘導体は、多くの場合、疎水性が高まるので、逆相 HPLC での分離が容易となり、最新の装置・カラムの進歩とあいまって、アミノ酸相互の分離能を工夫・向上させることができることが可能となること。

などがあげられる。

試薬には、オルトフタルアルデヒド(OPA, $\lambda_{\text{ex}}.245 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}}.395 \text{ nm}$), 6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシニルイミド(AQC, $\lambda_{\text{ex}}.245 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}}.395 \text{ nm}$), 4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン(NBD-F, $\lambda_{\text{ex}}.470 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}}.530 \text{ nm}$) 9-フルオレニルメチルクロロフォルメート(FMOC, $\lambda_{\text{ex}}.340 \text{ or } 350 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}}.450 \text{ nm}$), フルオレセイン-4-シアネート(FITC, $\lambda_{\text{ex}}.390 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}}.520 \text{ nm}$) (図2)など、いずれも市販されているものが有名であるが、それ以外にも多くのものが発明されており、総説^{11,12)}も豊富である。ただし、試薬によっては OPA のように一級アミンにしか反応しないものがあるので、注意が必要である。

最近では、LC/MS や LC/MS/MS の進歩とあいまって、アミノ酸分析に適した LC/MS あるいは LC/MS/MS 用プレカラム誘導体化試薬が開発されている。

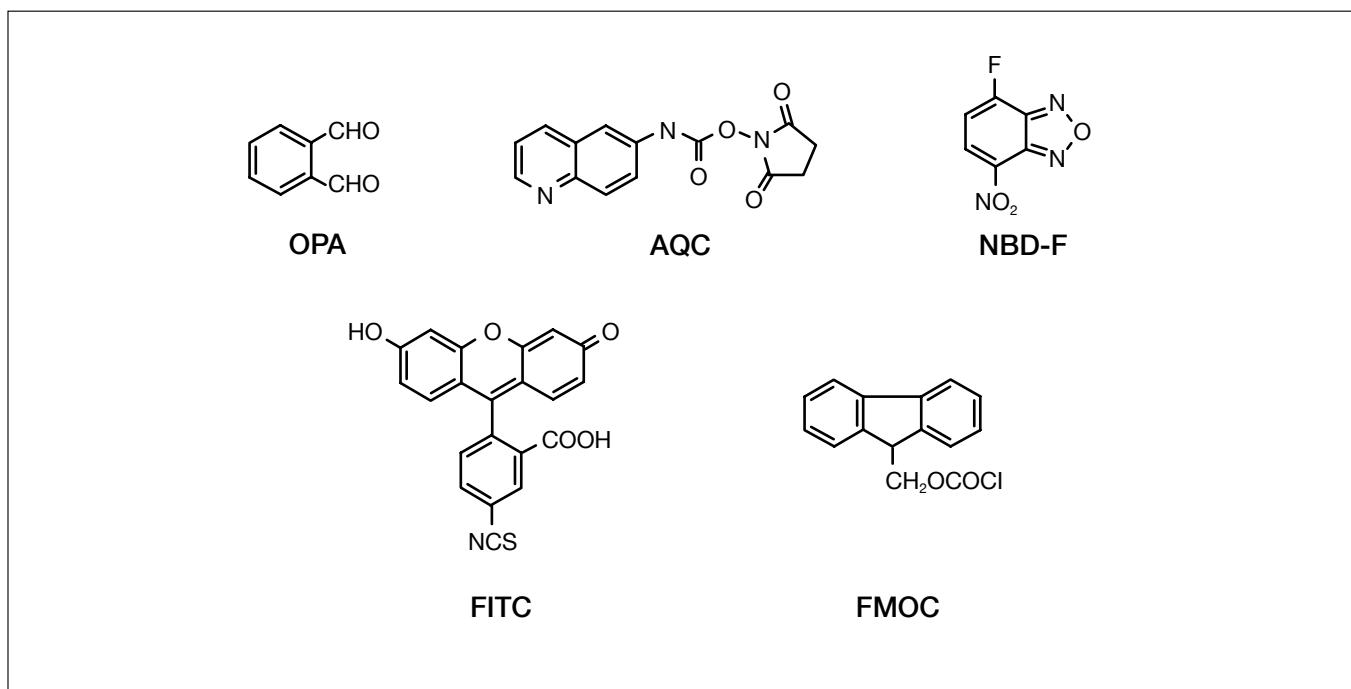


図2 代表的なプレカラム誘導体化試薬の構造

蛍光誘導体化試薬では、アミノ酸に蛍光性を付与させるための構造が必要であったが、質量分析用試薬では、イオン化効率を高める部分構造をもたせる場合が多い（図3）。特に、MS/MSでは、S/Nが格段に向かう。また、MS/MSの特性を活かし、誘導体の開裂に規則性を与える、それを利用するさまざまな分析法の開発や、超高速測定の可能性についての報告もあるが、詳細については文献を参照願いたい^{13,14,15)}。

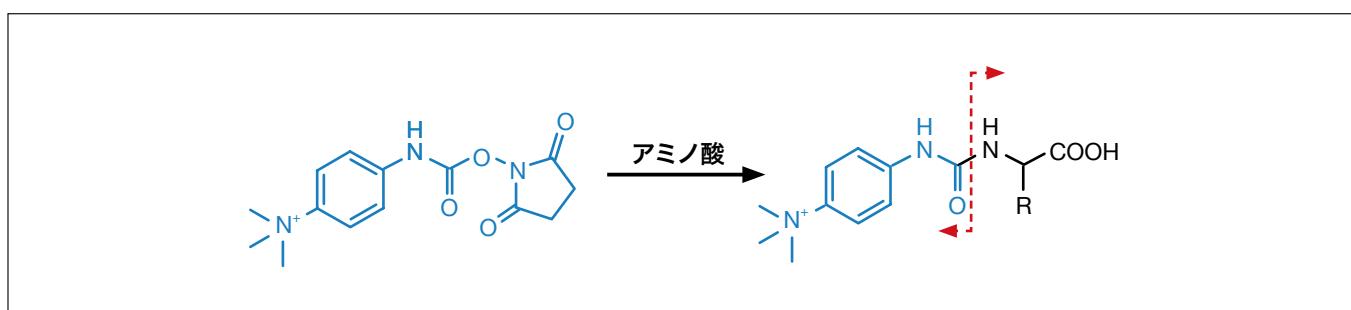


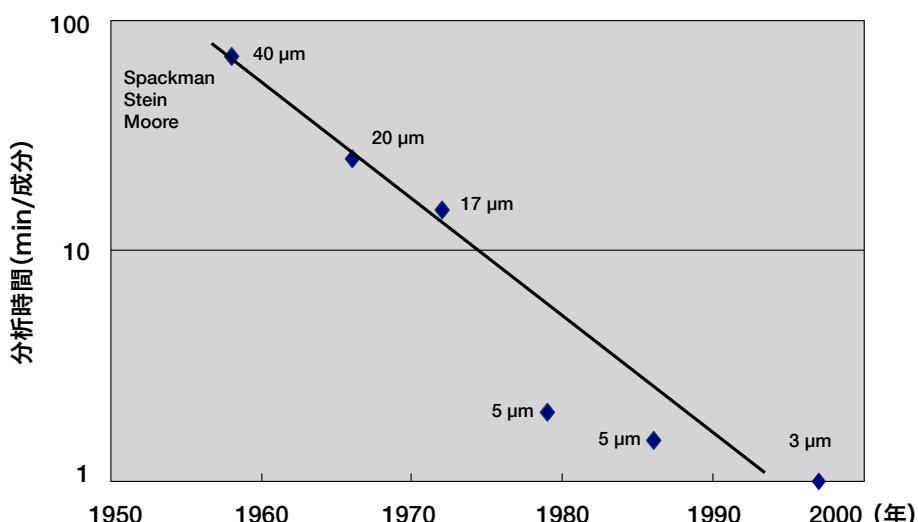
図3 LC/MS/MS用プレカラム誘導体化試薬TAHSの構造、誘導体とMS/MSでの開裂部位

4. ユーザーフレンドリーなアミノ酸分析装置をめざしたL-8900

1960年代の日立KLA-2形以降、ニンヒドリンを試薬とするポストカラム誘導体化法によるアナライザはさまざまな開発が行われたが、835形からボール弁を使ったポンプや一塔式のステンレスカラム、試料注入からデータ処理までコンピュータ制御されるようになった（図4）。



「アミノ酸分析の全自動化」KLA-2形



「粒径3 μm イオン交換樹脂を用いる高速アミノ酸分析計の開発」

図4 日立アミノ酸分析計の歴史

2005年株式会社日立ハイテクノロジーズ(以下、日立ハイテク)と味の素は共同で高速アミノ酸分析計「L-8900形」を開発し、発売を開始した。これはL-8800の後継機であり、精度や測定できるアミノ酸数に変化はないが、開発コンセプトおよび製品仕様を主に味の素がユーザーの視点で提案し、それを日立ハイテクが実現したものである。つまり、非常に性能と完成度の高い装置となったアミノ酸分析計であったが、オペレーターの立場からすると、必ずしも使い勝手がよくなく、複雑で扱いにくい装置という半面もあり、それらをできるだけ改善していった。

具体的には、これまでのアライザーは分析装置としては高いパフォーマンスがあったが、習得までに時間がかかる、ミスによるトラブルが多い、オペレーターの束縛時間が長い、といった操作性の問題があった。そこで、2004年当時としては先端的なタッチパネルや音声ガイドの導入、窒素バルブ、ドレンバルブの自動化等により、簡単なプロセスで分析がスタートできるような仕組み、溶離液を「枯らす」ことがないようにするための重量センサーの導入などを味の素が提案し、日立ハイテクができるかぎり実現した。

また、操作性があがることで、アミノ酸分析のニーズが高まり、測定数も増加することを予想し、これまでの生体分析1サイクル150分からツインカラムを採用して、1サイクル最短75分の測定法を開発した。カラムには内径5.4mm、長さ25mmのものを直列に2本接続するツインカラム方式を採用了。イオン交換樹脂は耐圧に限界があるため、2本化することによりカラムそれぞれの耐圧力(実際は圧力差)まで流量を引き上げることができる。流量0.56mL/minを送液し、カラム温度は28~70°Cの範囲を時間プログラムにより可変設定した。

5. L-8900装置の特徴

L-8900 形高速アミノ酸分析計は、粒径 3 μm の強酸性陽イオン交換樹脂（スルホン酸基により修飾されたポリスチレンジビニルベンゼン）を充填したカラムを用いるポストカラム誘導体化高速液体クロマトグラフ装置である。移動相として、タンパク質加水分解物分析法の 20 成分アミノ酸にはクエン酸ナトリウム系の緩衝液を、生体液分析法の 40 成分アミノ酸にはクエン酸リチウム系緩衝液を用いる。緩衝液は市販ボトルをそのまま設置できる。いずれの分析方法も数多くの成分を溶出するために、数種類の緩衝液によるステップワイズ溶離法を主に利用する。

各移動相は、窒素ガスにより加圧された試薬ボトルから電磁弁を経由し、移動相用ポンプ 1 により送液される。ポンプ 1 は再生液を含め 6 液が送液できる。クロマトグラム上のベースラインノイズを抑えるためにワンストローク 10 μL の微量ポンプを採用し、脈流（圧力変動）を低減した。ポンプ・プランジャーの吸引工程に同期させ各電磁弁の開閉切り替え時間をコントロールすることにより、各移動相を設定比率に混合することができる。

オートサンプラーは、1.5 mL バイアルを最大 200 検体までセットすることができ、サンプルを一定の周期で 20 μL を吸引し分離カラムに注入する。試料容量が少ない場合には 200 μL 微量バイアルも使用できる。また、分析種にグルタミンなどを含み冷蔵保存が必要な場合、200 本用冷却ラックも用意されている（図5）。



図5 L-8900の写真

試料は前述の通り主たる分離モードが陽イオン交換作用のカラムによりアミノ酸成分に分離される(図6)。

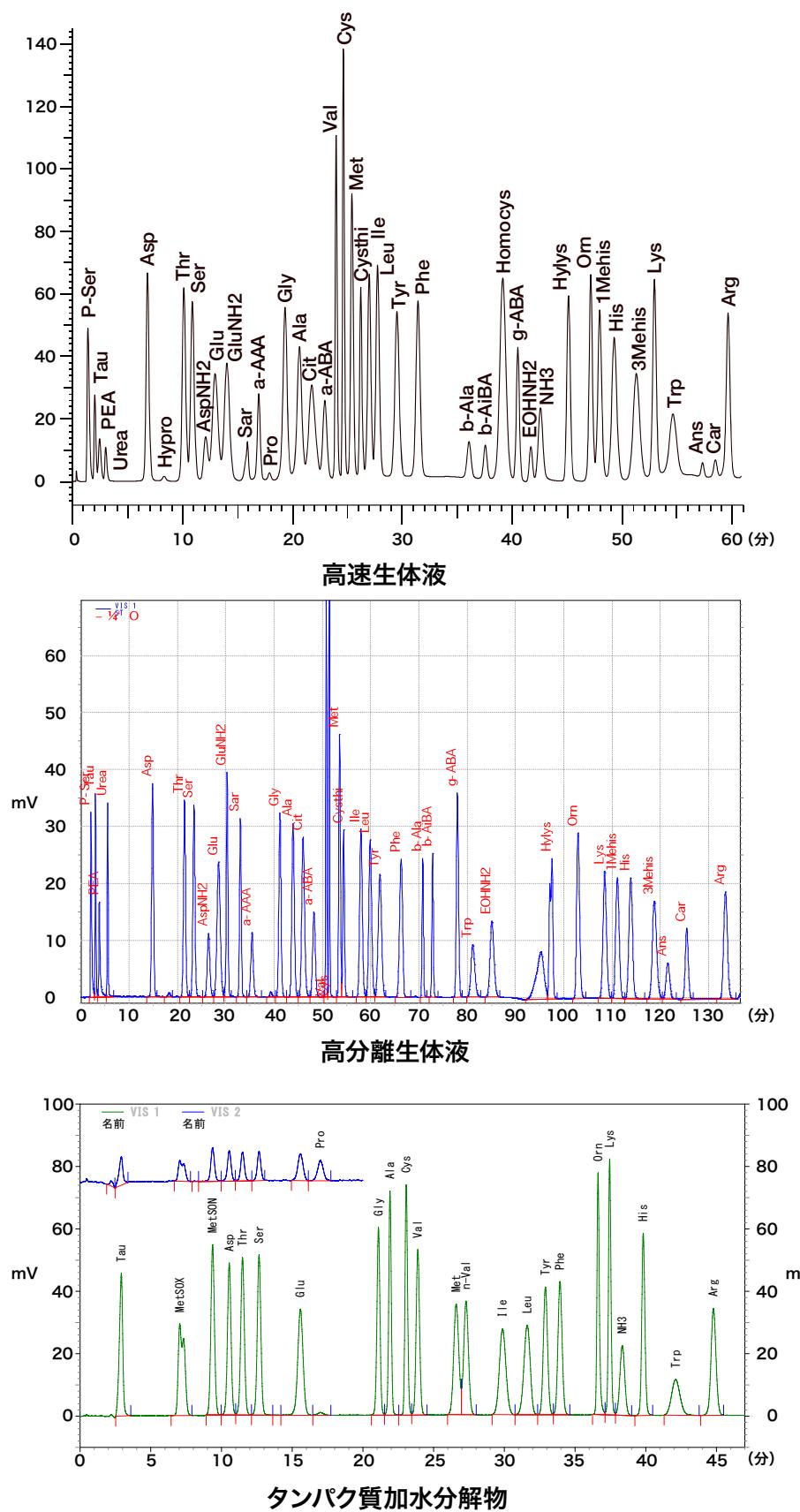


図6 L-8900の代表的なクロマトグラム

分離用カラムには分析法により充填剤やサイズの異なるパックドカラムを選択することができる。通常、流量 0.4 mL/min で送液し、約 10 MPa の圧力をかけ高速高分離に分析することができる。カラム恒温装置はペルチエ素子を用いて分離カラムを一定の温度に保つ。さらにタイムプログラムを用いて 20 ~ 85°C の範囲で高速な加熱冷却制御も可能である。

ニンヒドリン反応液は2つの試薬を市販ボトルのまま設置し、反応直前に混合する。カラムから溶出されたアミノ酸各成分は、反応液用ポンプ 2 により送られる反応試薬と混合され、反応装置で 135°C に加熱される。混合液が流れている間のピーク拡散を極力抑えるために、フッ素系樹脂チューブの代わりにイナートビーズを充填する反応カラムを反応の場として採用した。

アミノ酸は、反応生成物（ルーエマンパープル）の吸光度極大である可視光 570 nm で検出され、クロマトグラムのピークとして測定・定量される。イミノ酸であるプロリンとハイドロキシプロリンは、可視光域に吸光度極大がないため 440 nm で検出する。検出レファレンスには 700 nm の可視光を使用し、ハロゲンランプの光源ゆらぎなどを補償している。

基本的な自動化機能としては、ニンヒドリン反応試薬を酸化から防止する窒素 (N_2) ガスバブリングが選択できる。ボトル中の反応試薬残量多ければ、バブリング時間を長くする自動調節方法を採用している。また、3種類のアラームセンサ（窒素ガス圧力値、液漏れ、検出器のランプエネルギー）の搭載によりエラーを未然に防止することができる。

L-8900 形フルスペック版では、いくつかのハードウェアを付加することによりさらなる自動化機能を発展させた。ポンプページ用に高圧切り替えバルブを搭載した。ポンプの停止時間に応じてページ時間の長さを自動的に調節することができる。さらに、試薬量を重量計測するセンサーを設置し、移動相・反応液の試薬残量および廃液タンク内の廃液量をリアルタイムで監視することができる。この試薬残量管理機能により、入力設定された注入検体数に基づき、分析するために必要な試薬量を計算する。この機能により分析をスタートする時に試薬量が足りるのか事前に確認することができる（図7）。



図7 L-8900の操作画面

6. L-8900へのさらなる挑戦：ナビゲーションシステムの構築

操作性が格段に向上した L-8900 であったが、実際は理想とするユーザーフレンドリーな装置開発の夢は道半ばとなった感がある。

弊社は国内外で数十台のアミノ酸分析計を有し、さまざまな場面でさまざまオペレーターが装置を使用している。その人たちのために、私たちは、必要とする情報をすぐに得ることが出来るオペレーター向けのナビゲーションシステムを社内のネットワークを利用して独自に作成した。一例をあげると以下のとおりとなる。

- ・試料情報を入力することで、前処理や分析条件を検索できる。
- ・重なりやすいアミノ酸の情報を知ることが出来る。
- ・トラブルの解決手順のフローシート化。
- ・消耗品リストや交換方法の説明動画。
- ・FAQ

このように書くと、味の素のノウハウをシステム化したように思われるかもしれないが、実はこれらのほとんどは既存のデータを整理したものにすぎない。つまり、逆の見方をすれば、ユーザーが望む利用可能なデータや情報が探せばたくさんあるということになる。

いくつか種明かしをしよう。

「試料情報を入力すると前処理や分析条件を検索できる」では、日立ハイテクの「S.I.navi（エスアイナビ）」のデータを利用している。以前の S.I.navi では、キーワード検索ができず、目次タイトルからがんばって条件を探すしかなかった（現在はフリーワード検索機能が追加されている）。それを改良して、たとえば「トマト」と入力すると、それに適した前処理条件、分析条件、たとえば、どういうカラムでどのようなプログラムで分析した事例があるか、という情報を得られるようにした。

「重なりやすいアミノ酸の情報」には、弊社独自のデータ蓄積もあったが、弊社で保存してあったベックマンのアプリケーションシートを利用し、条件ごとに整理した。

「トラブルの解決手順」についても、日立ハイテクにはトラブルシューティングの系統樹が資料としてあるが、ユーザーにはわかりにくい部分もあった。私たちは、よく起る7つのトラブルについて、簡単なイエス・ノーのフローシートを作成した。一例として図7に「ピークが小さくなった」についてのフローシートを示す。

メンテナンスについては、流路系、ポンプ、オートサンプラー、光度計の4つに分類して、交換方法を動画化、また部品番号が画面に表示されるような工夫をおこなった。

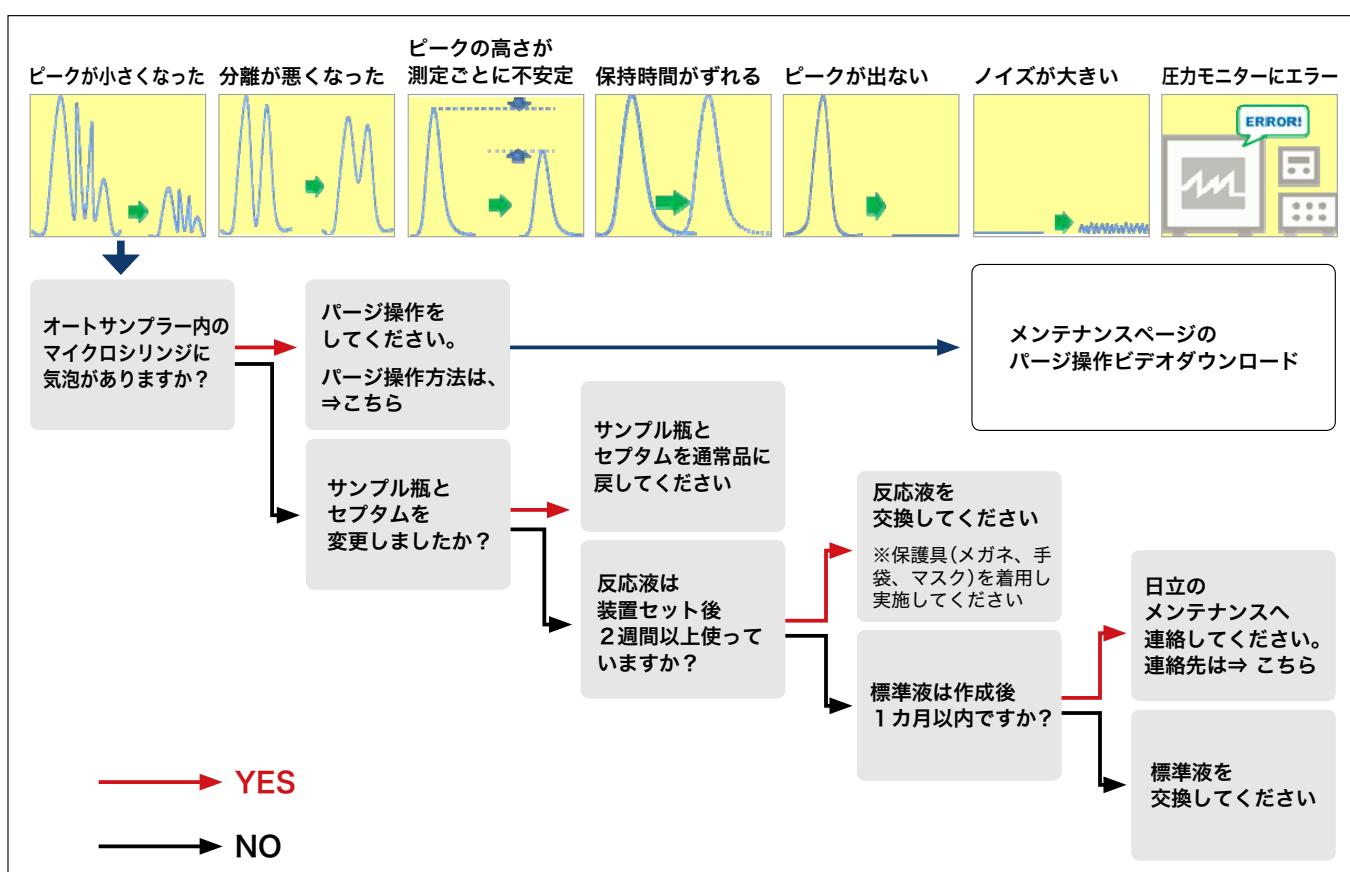


図7 ホームメイドナビゲーションシステム中のトラブル解決フローシート「ピークが小さくなかった」に関するトラブル対応チャート

7. おわりにかえて アナライザーにさらに望むこと

アミノ酸分析計 L-8900 は、ポストカラム誘導体化 HPLC 分析の横綱として君臨し、正確さ、精度において他の追随をゆるさないが、ユーザー視点にたったとき、メーカーサイドにさらにいくつかの要望があるので列挙しておきたい。

①世界一の精度と耐久性とが両立する装置

アナライザーも技術の進歩とともにパーツが高性能化している。アミノ酸分析計はすでに十分な正確さと精度を有する分析装置である。むしろ耐久性を重視すべきと考える。

②アプリケーションにリンクしたデータ処理条件の確立

現在提供されているアプリケーションはカラムと分離プログラムのみである。ベースラインなどの処理プログラムもセットで用意されているとユーザーは非常に助かる。

③データの再処理がやりやすい装置

日々の測定においては溶出時間がわずかに変動する。この変動に伴い、ベースラインを引き直したり、ピーク同定用の時間幅を見直したりする。また、周辺ピークの溶出時間もズレていれば、それも修正する必要もある。このようなさまざまな場合に、どのような手順で再計算処理を実施するかの手ほどき（経験の少ないオペレーターでも理解できるヘルプ機能）、できれば自動補正機能があるとユーザーは大変助かると考える。

④アミノ酸分析専用装置として、お助けナビ、トラブル対処法等を搭載した総合システム

いずれは味の素のナビゲーションシステムとの一体化が望ましい。

⑤優秀な技術者によるサービス体制の構築（サービス体制）

国内メーカーだからこそ、サービス体制構築は強みとなる。アナライザーの調整は匠の技なのかもしれない。その育成と充実は必須である。

味の素にかぎらず、ユーザーにはさまざまな用途があり、出口をもち、アイデアがある。メーカーには計り知れない奥深い技術と知見がある。その両者が意見を闘わせながら「高めあい」、「優れた」装置をさらには開発していくことが大切である。L-8900 は、まさにその一つの結果であるが、「優れた」の定義は、ユーザーによってそれぞれ異なる。

2011 年に、新アミノ酸分析研究会¹⁶⁾が発足し、年に1回、学術講演会をおこなっている。毎年、100 名近くの方が集まる。分析対象をアミノ酸、ペプチド、タンパク質、アミノ酸関連物質とし、メーカーとユーザーから、さまざまな発表がある。メーカー、ユーザーが膝をつき合わせて議論するよい場である。そういう場などをを利用して、よりよい装置からよりよいアウトプットをだしていきたいと考えている。

参考文献

- 1) 味の素株式会社ホームページ <http://www.ajinomoto.co.jp/index.html>
- 2) 宮野博、「アミノ酸の歴史、アミノ酸科学の最前線-基礎研究を活かした応用戦略-」監修、鳥居邦夫、門脇基二、シーエムシー出版(2014)
- 3) A. J. P. Martin and R. L. M. Synge, *Biochem. J.*, 35, 1358 (1941)
- 4) R. Consden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, 38, 224 (1944)
- 5) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958)
- 6) Nobel Foundation, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/
- 7) Nobel Foundation, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1972/
- 8) 石渡昭男、クロマトグラフィー, 12, 16 (1991)
- 9) 中村洋監訳、分離分析のための誘導体化ハンドブック、1、丸善 (1996)
- 10) 「液クロ虎の巻—誰にも聞けなかったHPLC Q&A 単行本—」中村洋(監修)、液体クロマトグラフィー研究懇談会(編集)、筑波出版会(2001)
- 11) S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, 15, 295 (2001)
- 12) T. Fukushima, N. Usui, T. Santa, K. Imai, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 1655 (2003)
- 13) K. Shimbo, A. Yahashi, K. Hirayama, M. Nakazawa, H. Miyano, *Anal. Chem.*, 81, 5172 (2009)
- 14) 宮野博、吉田寛郎、細胞工学, 26, 485 (2007)
- 15) K. Shimbo, S. Kubo, Y. Harada, T. Oonuki, T. Yokokura, H. Yoshida, M. Amao, M. Nakamura, N. Kageyama, J. Yamazaki, S. Ozawa, K. Hirayama, T. Ando, J. Miura, H. Miyano, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 1483 (2009)
- 16) 新アミノ酸分析研究会ホームページ <http://jsa3.s2.weblife.me/index.html>
- 17) M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 385 (2004)

共同執筆者

*1伊藤正人 株式会社日立ハイテクサイエンス光学技術部

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。<https://members.hht-net.com/sinavi/>

新型ショットキー FE-SEM SU5000

New Schottky FE-SEM, SU5000

立花繁明^{*1}

I. はじめに

走査電子顕微鏡(SEM)は様々な分野で観察・分析に使用されている。中でも電界放出形電子銃を備えたタイプ(以下FE-SEM)は熱電子放出形電子銃タイプに比較して高分解能が得られることで、近年の観察対象物の微細化によりユーザーの裾野が広がっている。また、試料から発生するさまざまな信号の検出技術が進歩し、FE-SEMは形状観察にとどまらない表面解析ツールとして認識されつつある。しかしそれと同時に、目的の情報を得るためにユーザーに要求される知識と操作技術も高くなっており、必ずしも性能・機能に応じた有効な運用がすべてのユーザーレベルにおいてなされているとは限らない。

性能を引き出せないケースとしては、光軸調整や非点補正などのオペレーションが不十分な場合と、取得したい情報に対して加速電圧などのSEM条件が適切でない場合などが考えられる。

つまり装置側で上記二つの問題を解決できていればユーザーはいつもベスト条件で観察に専念できることになる。

日立ハイテクノロジーズでは従来のSEMの使用法に加えて、上記の二つの問題を解決するための新たなユーザーインターフェースを開発した。このユーザーインターフェースは「新しいユーザビリティ」へユーザーを導くことを目的とし、ウィザード形式での操作ガイドを備えていることから"EM Wizard"と名づけられている。このEM Wizardを搭載したFE-SEMが、2014年8月に発売開始したショットキーFE-SEM SU5000である(図1)。



図1 SU5000 装置外観

2. 新インターフェース：EM Wizard

EM Wizardにおいて、ユーザーは加速電圧やWD、検出器などの装置パラメータを設定するのではなく、「表面情報強調」や「材料分布強調」などの強調したい試料情報（観察目的）を目的画面で選択する（*2）。画面内では各観察目的に対して試料がどう見えるかの仮想像と、取得される像情報（分解能、表面情報、組成）のバランスがレーダーチャートで表示される。ユーザーはこれらの情報からSEM像の特性を視覚的に理解して目的を選択できる（図2）。

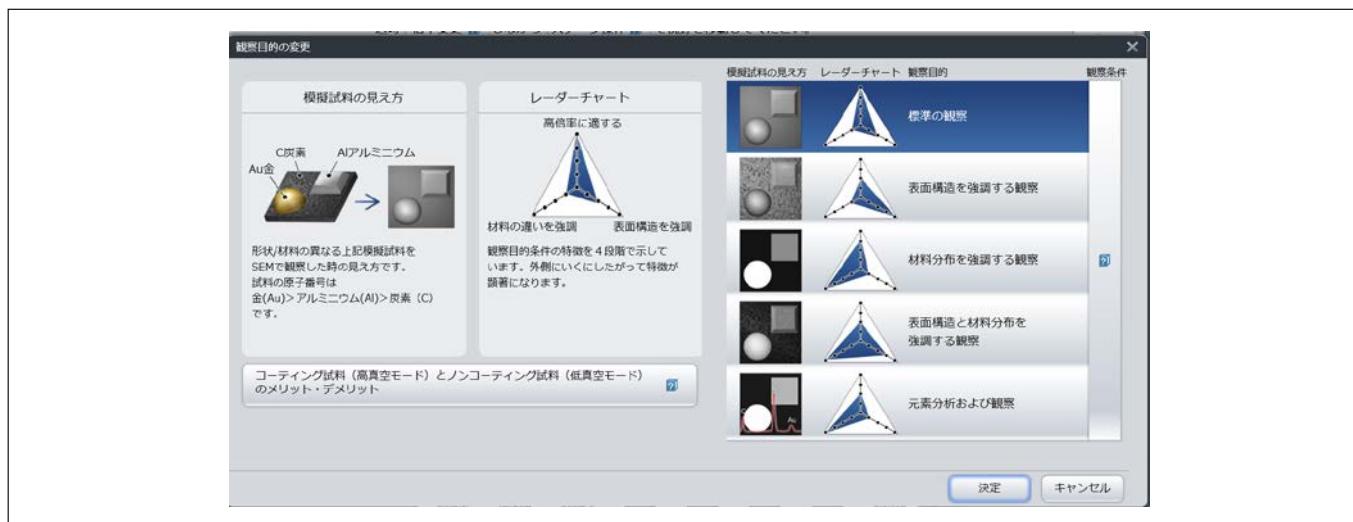


図2 EM Wizard、目的選択画面。

“観察目的”が選択されると、関連する装置パラメータ（加速電圧やWD、検出器など）と適正な値に調整された光軸条件、非点補正が自動的に設定される。ユーザーはフォーカスと輝度／コントラストの調整のみで分解能を維持した目的の像を簡単に取得できる。

この機能の実現には、アプリケーションの蓄積に加え、測長SEMで開発された高精度自動化技術が背景にある。測長SEMにおいては高い測長再現性が要求されるため、光軸調整などは高度に自動化されているが、EM Wizardではこの自動化技術を適用して高精度な調整状態を常に維持できるようにした。光軸、非点補正值はレンズ状態の経時的な変化のため、一度装置に記憶させてもその状態を長期的に維持することは不可能である。EM Wizardはレンズ状態の経時的な変化に応じて最適条件を自動的に回復させるAuto Calibration機能を備えており（*3）、再調整に熟練を要することはない。これにより、ユーザーはフォーカスのあった像を簡便に得られると共に、高い再現性とスループットでデータを取得することができる。

図3はAuto Calibration実行後、光軸調整を行わずに倍率20万倍で触媒を観察した事例である。煩雑な調整を省いた操作で数nmの金属微粒子が識別できている。

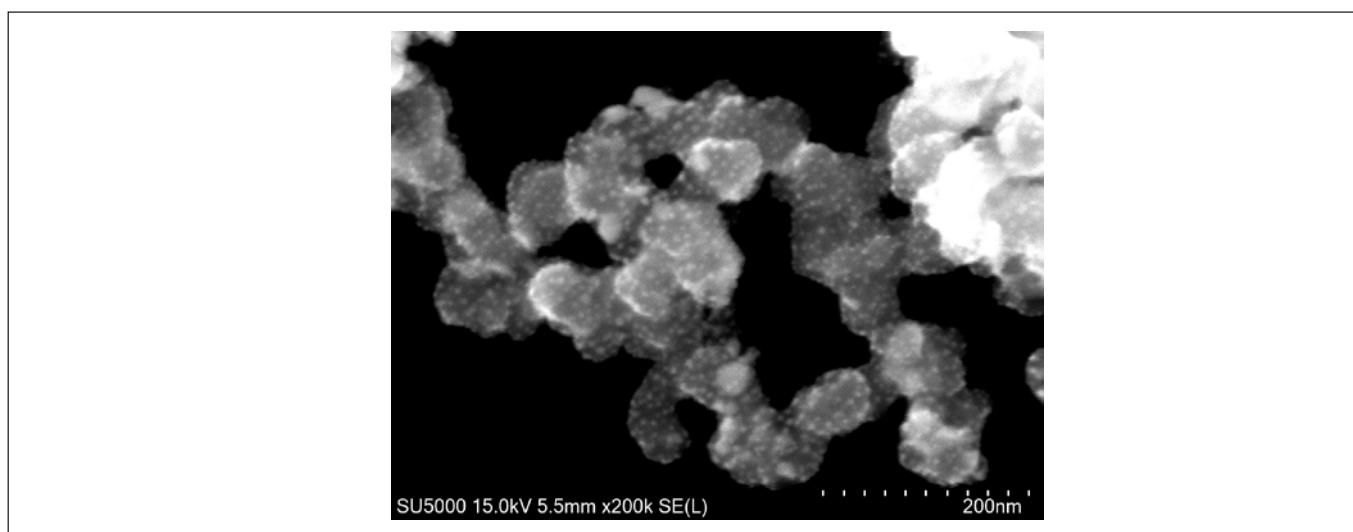


図3 触媒の観察事例。倍率：20万倍

3. 低エネルギー観察

SU5000 は上記に見られる自動化によるユーザーアシストの他にも、現在要求されているさまざまな測定に対応する光学系 / 検出系を備えている。

エミッターはショットキータイプを採用し、1 kV で 2.0 nm の空間分解能 (*4) と大照射電流 (200 nA) を両立している。

図 4 はリチウムイオン電池の正極材を 0.3 kV の照射電圧で観察した事例である。

正極材は活物質、導電材、バインダーなどからなるが、材料評価の上では各材料の局在が観察できることが重要である。しかしバインダー材料が電子線照射に弱いこともあり、必要なだけ低いエネルギーでの観察が要求される。

図 4 の左は鏡筒内に装着された二次電子検出器による像で、右は鏡筒直下に配置した反射電子検出器による像である。二次電子像ではバインダーの部分が暗いコントラストで表れており、また反射電子像では各材料の立体的な分布が把握できる像が得られている。複数の信号で形状と組成分布を評価した事例である。

二次電子像でよりコントラストが明瞭になる理由は入射電子が極低エネルギーの時の、各材料の二次電子発生効率や材料ごとの帶電の違いに起因すると推測している。

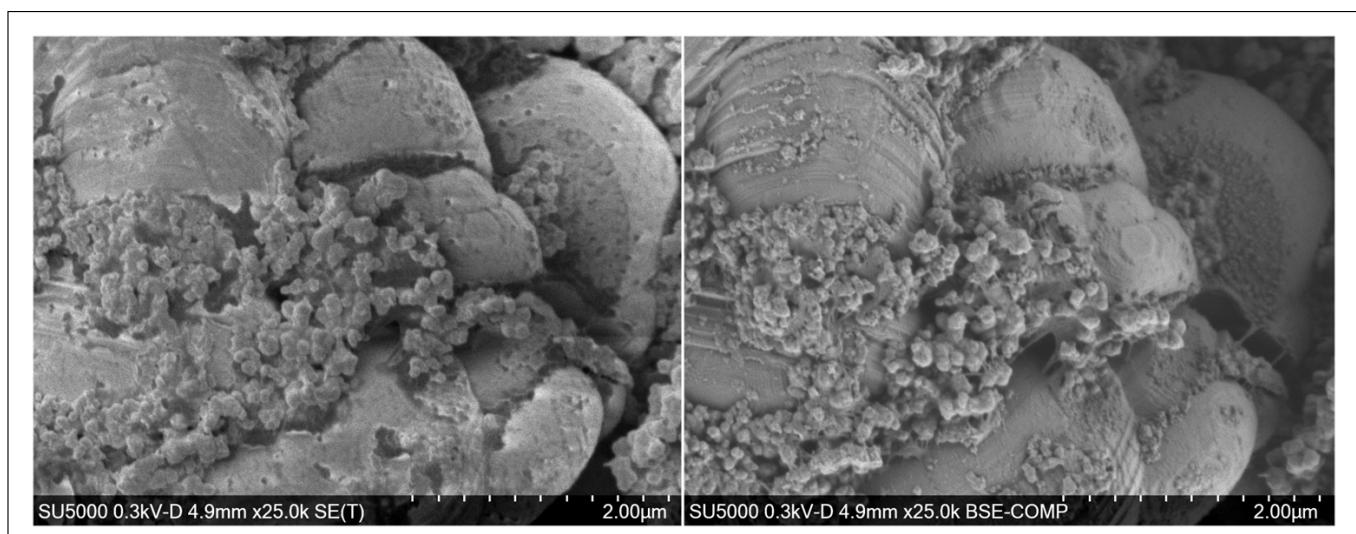


図4 リチウムイオン電池正極材の観察事例。左：二次電子像、右：反射電子像。倍率25,000倍

4. おわりに

FE-SEM のユーザー層増大に伴い、ユーザーのレベルに関わらず「高分解能」と「適切なコントラスト」を「再現性高く」提供できる、EM Wizard のようなインターフェースは重要性を増していくはずである。

ハード / ソフト共に、ユーザーレベルおよび使用目的の拡張性を念頭において開発された SU5000 は、材料評価やバイオメディカルなど多くの分野での活用が期待される。

(*2) 特許第5416319号

(*3) 特許第5464534号

(*4) リターディングモード（オプション）適用時

参考文献

佐藤貢, 「SEM高性能化の歩み」, 高分子, 9月号 (2014)

著者所属

*立花繁明
(株)日立ハイテクノロジーズ マーケティング部

会員制サイト“S.I.navi”では、S.I.NEWSのバックナンバーを含む全内容をご覧いただけます。<https://members.hht-net.com/sinavi/>

F-7000形分光蛍光光度計を用いた 蛍光指紋による食品分析技術

Introduction of food distinction technology by
fluorescence fingerprint measurement with F-7000

堀込 純^{*1}

1. はじめに

蛍光指紋を用いた食品分析は、試料特有の自家蛍光パターン（蛍光指紋）を取得し、得られた膨大な蛍光強度の数値データを多変量解析することで、試料の種別や産地の判別¹⁾、試料の混合割合の算出²⁾、カビ毒などの危害物質の検知³⁻⁶⁾、機能性成分の定量などへの応用が期待されている。試料の蛍光指紋は、分光蛍光光度計の3次元蛍光スペクトル測定モードにて、励起波長と蛍光波長、蛍光強度の3事象を等高線図や鳥瞰図などでプロットすることで得る。蛍光は励起波長よりも長波長側に観測されること、同一成分であれば励起波長を変えても蛍光波長は変わらないことから、等高線図に描かれる蛍光強度の分布は指紋状に見て取れる。従来は着目する成分の励起波長・蛍光波長からなる単一のピーク波長を用いて成分の判別や定量を行っていたが、試料が有する多成分の蛍光情報を網羅的に解析することで、分析の高精度化が期待される。

2. F-7000形分光蛍光光度計と自動フィルタ付属装置について

F-7000形分光蛍光光度計は、クラス最高レベルのスキャンスピード(60,000 nm/min)と高速スキャンに対応したレスポンス処理の自動設定、迅速な励起波長切り替えなど3次元蛍光スペクトル測定の高スループット化技術が組み込まれている。この3次元蛍光スペクトル測定において、ゴーストピークとして出現する高次光の影響を簡便・迅速に取り除くことが課題であった。図1に示す自動フィルタ付属装置は、測定条件に合わせて自動でフィルタが挿入され、分光器特有の高次光(2次光、3次光など)の不要光の影響をなくすことができる(図2)。



図1 F-7000形と自動フィルタ付属装置の外観

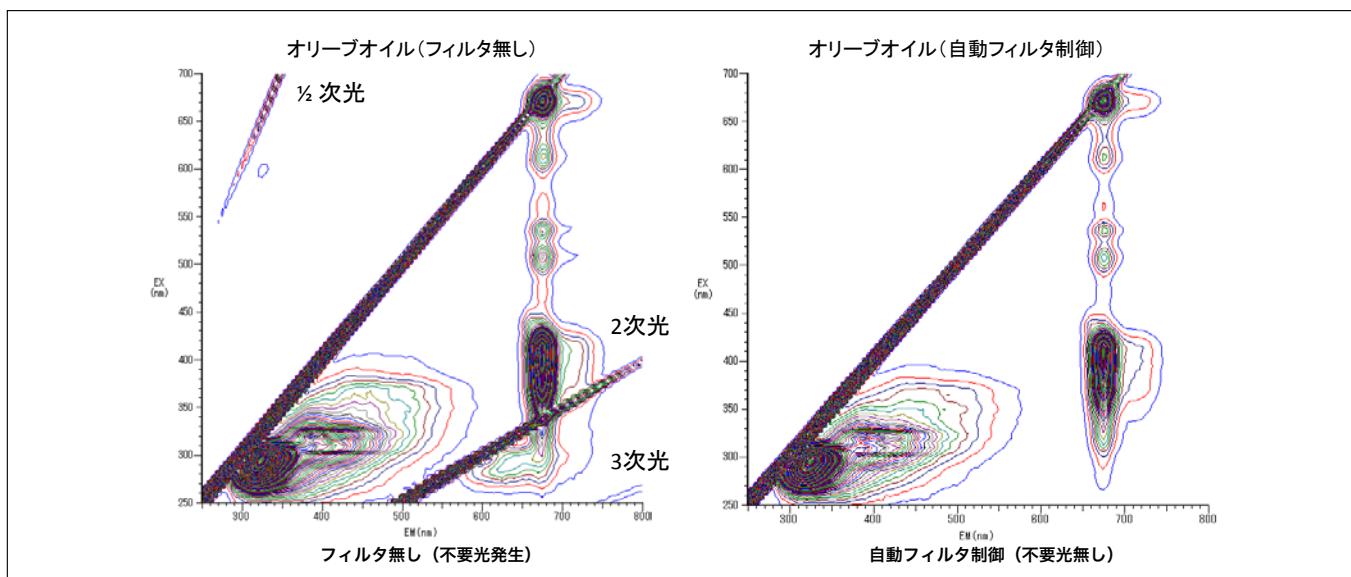


図2 3次元蛍光スペクトルの一例(オリーブオイル)

3. 蛍光指紋分析の3つの特徴

ここで、蛍光指紋分析の3つの大きな特徴を示す。

3-1 膨大な情報量にて判別分析が可能

一般的に励起波長と蛍光波長は紫外域から可視域の波長範囲(200 nm ~ 800 nm程度)で測定する。得られる蛍光強度は、数万点となるが、この膨大な数値データを多変量解析し判別分析に用いる。

3-2 分析の簡便性

一般的に食品や農作物を機器分析する際には、さまざまな工程を伴う前処理を行う。蛍光指紋分析は極力試料そのものが有する自家蛍光を測定する。そのため、粉碎、溶解、ろ過など必要最低限の前処理で測定することが可能である。果実の切片や生肉などの試料を直接分析することも多々ある。煩雑な前処理が不要なことも魅力の一つである。また、試料は溶液状態、固体状態(板状・粉末状等)にて分析可能である。

3-3 分析コストの低減

一般的な分析機器に比べて装置の導入コストやランニングコストが安価である。例えばカビ毒の分析例が藤田ら³⁻⁶⁾によって報告されているが、蛍光指紋による分析法は、高額な質量分析法などの前段階の試料選別(スクリーニング分析)に用いることで分析コストの低減が期待される。

4. 蛍光指紋を用いた食品分野への応用事例

4-1 でんぶんの原材料ごとの判別例

トウモロコシ、馬鈴薯、小麦を原料とするでんぶんを用意し、蛍光指紋の測定結果からでんぶんの種別判別を試みた。試料は粉末セルに0.7 cc程度を封入し、試料表面の蛍光を測光することができる固体試料ホルダに設置した(図3)。得られた蛍光指紋を図4に示す。それぞれの試料にて、いくつかのピークが確認された。蛍光波長300 nm付近に観測されたピークはタンパク質を構成するアミノ酸に由来するピークと推測される。出現するピーク波長は試料間で大きな差は確認されなかったが、ピーク強度の違いが確認された。そこで、ピークやバレーに相当する代表的な波長の蛍光強度を抽出し、主成分分析を行った。結果を図5に示す。縦軸は主成分1、横軸は主成分2である。それぞれの原料ごとにプロットが大別されていることが分かる。例えば、混合品が入るとプロット位置が純品と異なることが見て取れる。これはトウモロコシ由来と馬鈴薯由来の混合品と推定される。主成分分析を用いることで、未知試料の原材料の把握、品質管理、不良品解析への応用が期待される。

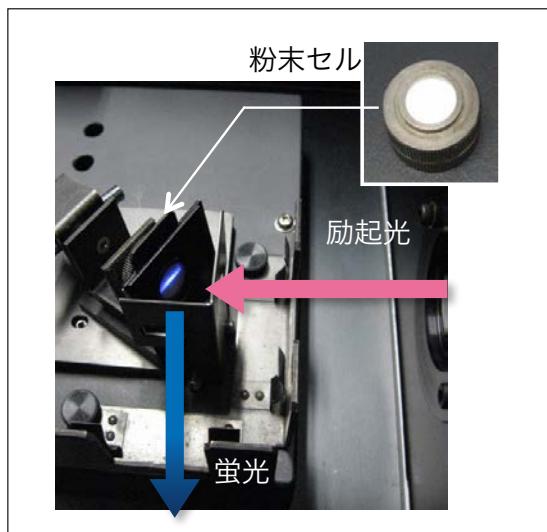


図3 サンプル設置

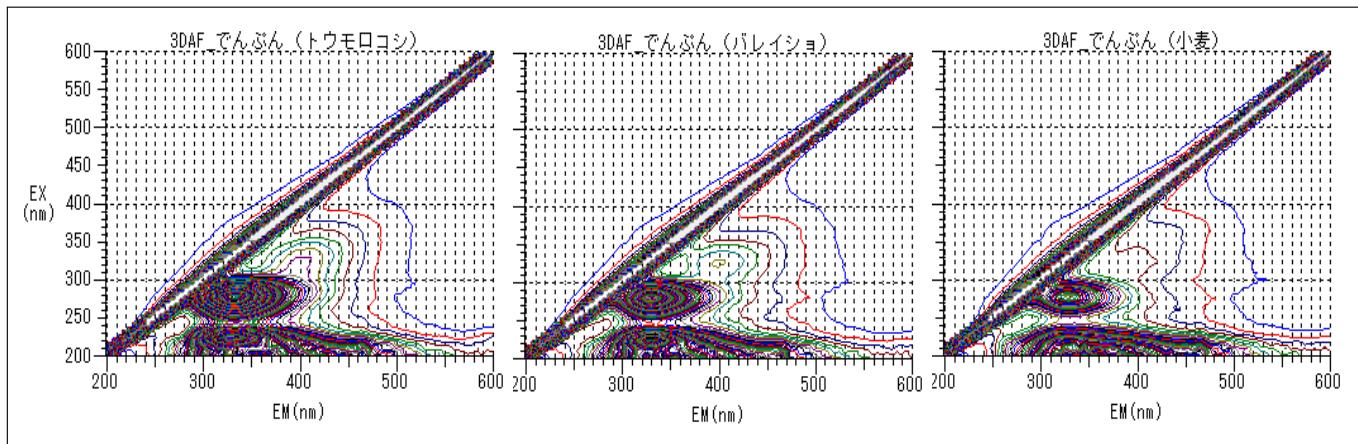


図4 各原材料ごとのでんぶんの蛍光指紋

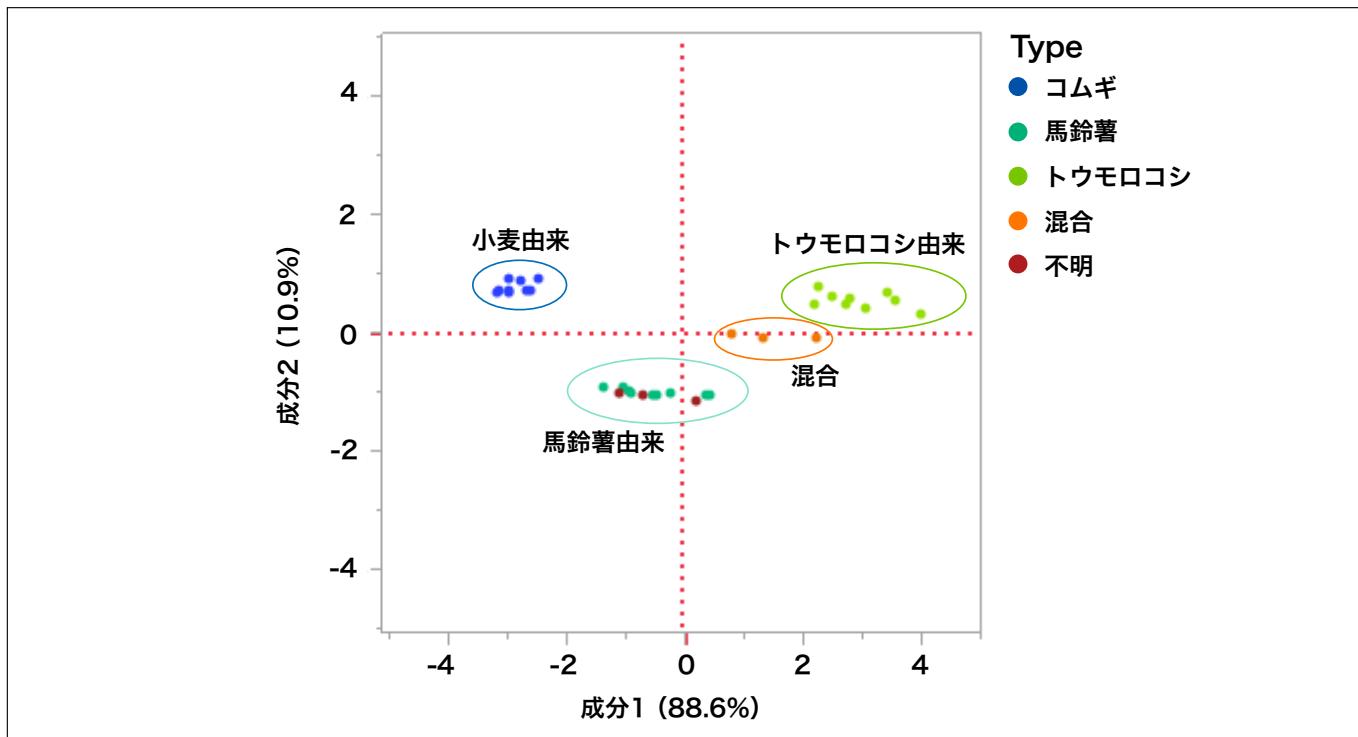


図5 主成分分析結果

4-2 ウコン粉末の混合比率算出例

春ウコン粉と秋ウコン粉の蛍光指紋を測定し、春ウコン粉に特異的な蛍光波長を用いて、春ウコン粉と秋ウコン粉の混合比の推定を行った。図6-aに春ウコン粉0%，秋ウコン100%，図6-bに春ウコン粉100%，秋ウコン0%の蛍光指紋を示す。また、模擬試料として春ウコンにて25%，50%，75%となるように配合したものを用意した。それぞれの蛍光指紋の測定結果を図6-c～図6-eに示す。励起波長340 nm、蛍光波長440 nmに春ウコン粉に特有の蛍光ピークが確認された。春ウコン0%をSTD1とし、春ウコン100%をSTD2として、この波長における蛍光強度を用い検量線を作成し、春ウコンと秋ウコンの混合粉の蛍光強度から混合比を算出した（図7）。

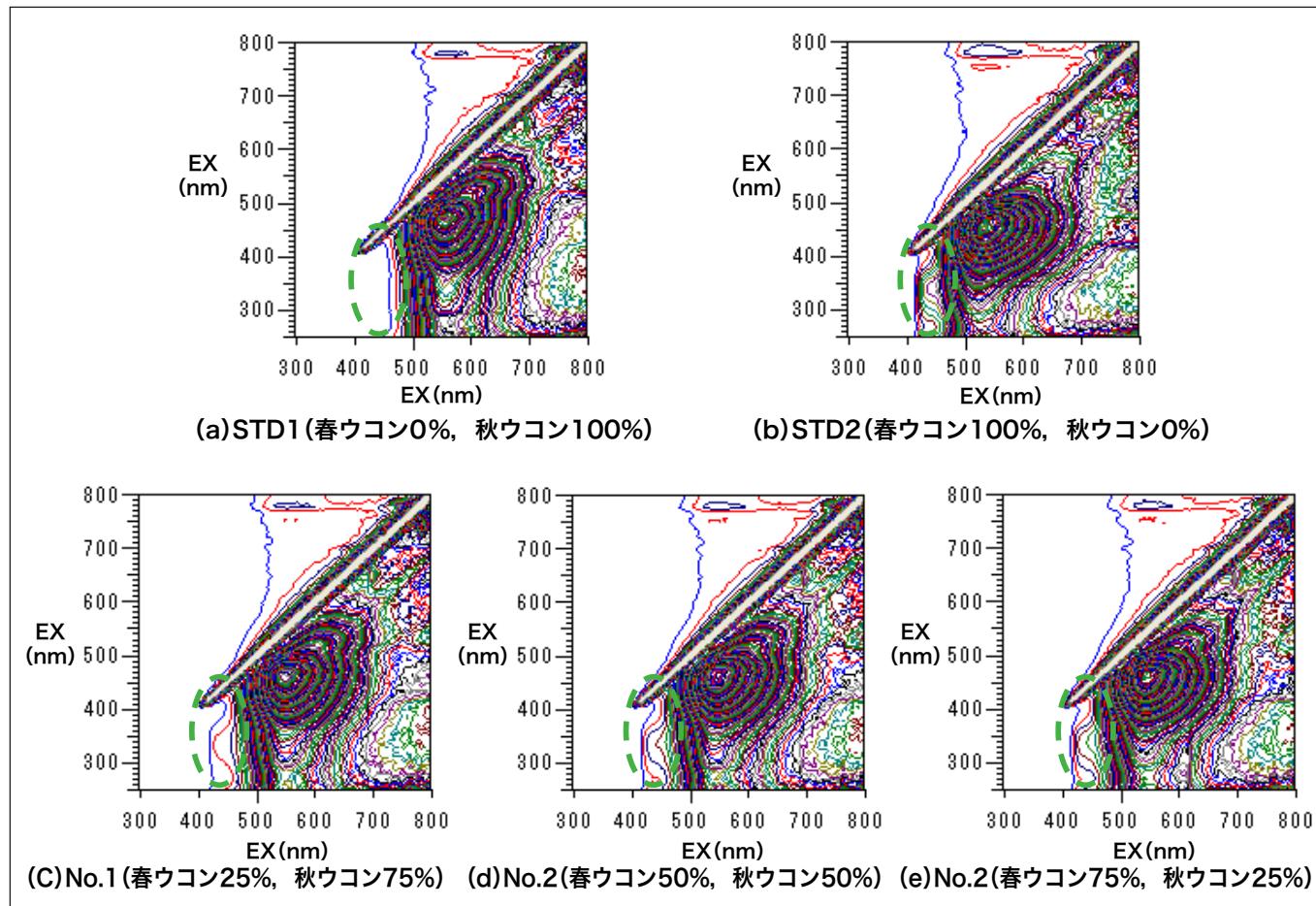


図6 ウコンの混合比別3次元蛍光スペクトル

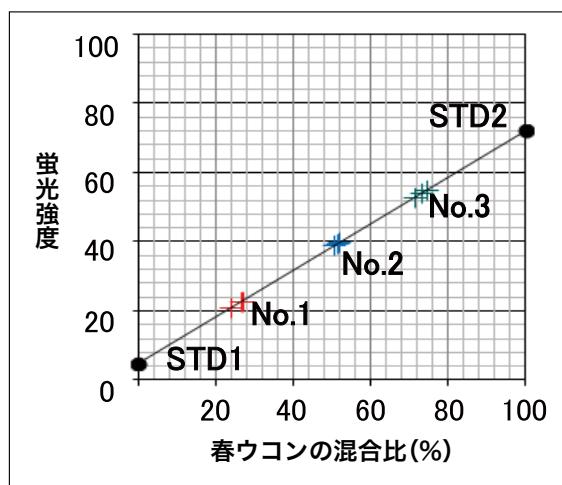


図7 蛍光強度と混合比(%)の相関

測定の結果、測定誤差の範囲内で理論混合比との一致が確認された(表1、表2)。試料特有の蛍光指紋から識別波長を探査し、その蛍光強度または蛍光強度比を用いることで、粉末試料の混合比率推定が可能となる。

表1 試料の蛍光強度 (N=3)

| | STD1 | STD2 | No.1 | No.2 | No.3 |
|-----|------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 5.51 | 72.58 | 22.90 | 39.86 | 54.10 |
| 2 | 4.68 | 72.76 | 20.96 | 39.51 | 55.15 |
| 3 | 4.91 | 71.29 | 22.98 | 38.94 | 53.05 |
| 平均値 | 5.04 | 72.21 | 22.28 | 39.44 | 54.10 |

表2 春ウコン混合比(%)の算出結果 (N=3)

| | No.1 | No.2 | No.3 |
|--------|------|------|------|
| 1 | 26.6 | 51.8 | 73.0 |
| 2 | 23.7 | 51.3 | 74.6 |
| 3 | 26.7 | 50.5 | 71.5 |
| 混合比算出値 | 25.7 | 51.2 | 73.0 |
| 理論混合比 | 25.0 | 50.0 | 75.0 |

4-3 オリーブオイルの判別分析例

市販のオリーブオイルとバージンオリーブオイルの蛍光指紋を測定した。図8に測定結果を記す。希釀などの前処理を行わず、PMMA製のセルに試料を入れ、試料表面からの蛍光を測光した。すべてのオリーブオイルで励起波長250 nm～450 nm、蛍光波長300 nm～600 nm付近(領域1)と励起波長300 nm～700 nm、蛍光波長650 nm～750 nm(領域2)の2つの領域で蛍光ピークが確認された。領域1は酸化生成物に相当する蛍光、領域2はクロロフィルに相当する蛍光と示唆されている⁷⁾。領域1から蛍光ピーク(i)励起波長320 nm、蛍光波長400 nmおよび領域2から蛍光ピーク(ii)励起波長415 nm、蛍光波長675 nmの蛍光強度をピックアップし、蛍光強度比((ii)/(i))を算出した。蛍光強度比を比較したところ、バージンオリーブオイルの方が、オリーブオイルよりも高い値を示した。バージンオリーブオイルは、オリーブの果実から搾り取った油であり、精製などの処理を行っていないことから、オリーブの果実に含まれるクロロフィルが高く検出されている。一方、オリーブオイルは、精製などの処理を行っているため、その過程でクロロフィルの含有量が低下したため低く検出されたものと考えられる。また、酸化生成物に相当する蛍光もバージンオリーブオイルの方が低い値となっている。実際には、バージンオリーブオイルは、酸度や香り・風味などの品質基準によって定められるので、本方法にてオリーブオイルの品質を決定付けることはできないが、偽造品などの簡易判定への応用が考えられる。

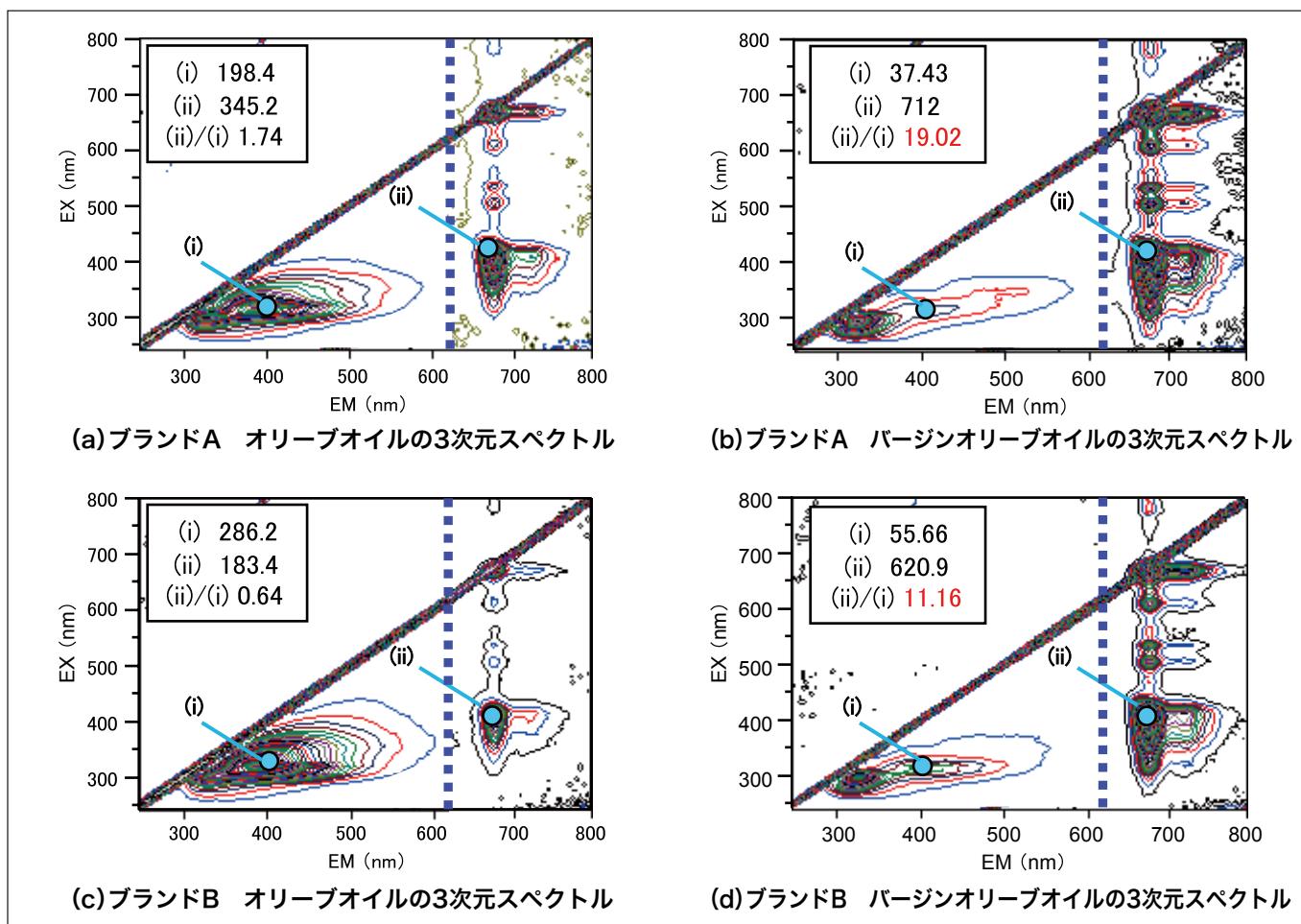


図8 オリーブオイルの3次元蛍光スペクトル

4-4 パイナップルの判別分析例

果実製品としてパイナップルを例に挙げ、3次元蛍光スペクトルを測定し種類の分別を行った。パイナップルジュースの蛍光指紋を図9に示す。3次元蛍光スペクトル測定の結果、アミノ酸、ビタミン、クロロフィルと推測される蛍光指紋が確認された。次に、各パイナップル試料にて3次元蛍光スペクトル（蛍光指紋）を取得し、主成分分析を行った。試料は、幅広セルに入れ、固体試料ホルダに設置した。ジャムや果実など不均一な試料は石英板に試料が密着するように封入して設置した。

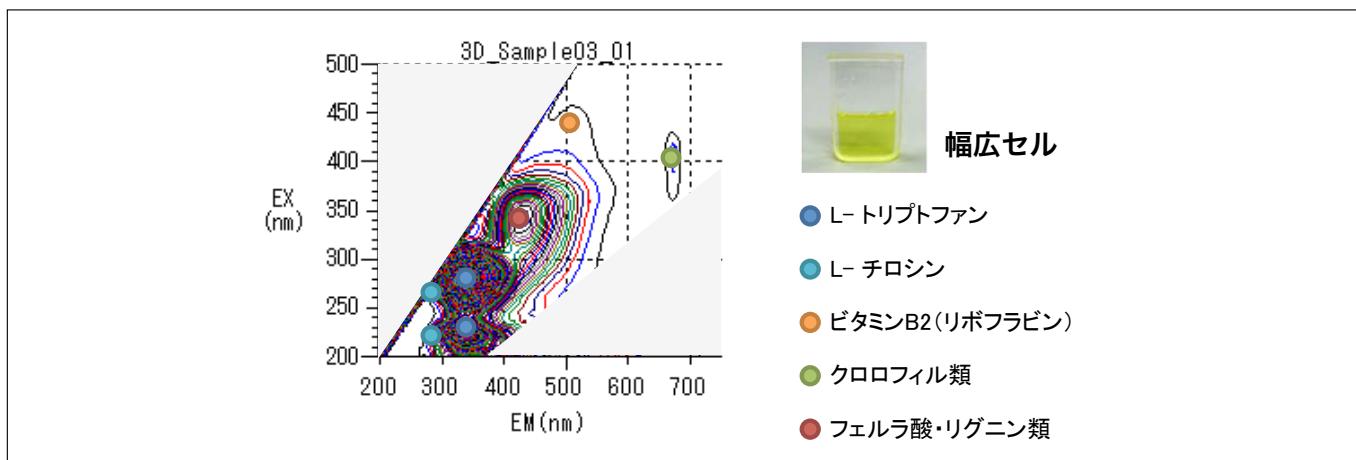


図9 パイナップルジュースの蛍光指紋と自家蛍光物質の予測

図10に各試料の主成分分析による判別例を示す。生のパイナップル果実は、主成分1と主成分2が正の値となり、缶詰のパイナップル果実は原点付近の値となった。パイナップルのみから作られたジャムは原点付近の値であり、マンゴーとのミックスジャムは主成分1が正の値、主成分2は負の値となった。ストレートタイプのパイナップルジュースは、主成分1が原点からわずかに負の値であり、主成分2はわずかに正の値であった。濃縮還元タイプのパイナップルジュースは主成分1と主成分2は負の値であった。今回の結果では、主成分1と主成分2の算出値が正であるほど加工されていない状態であるという特徴が得られた。

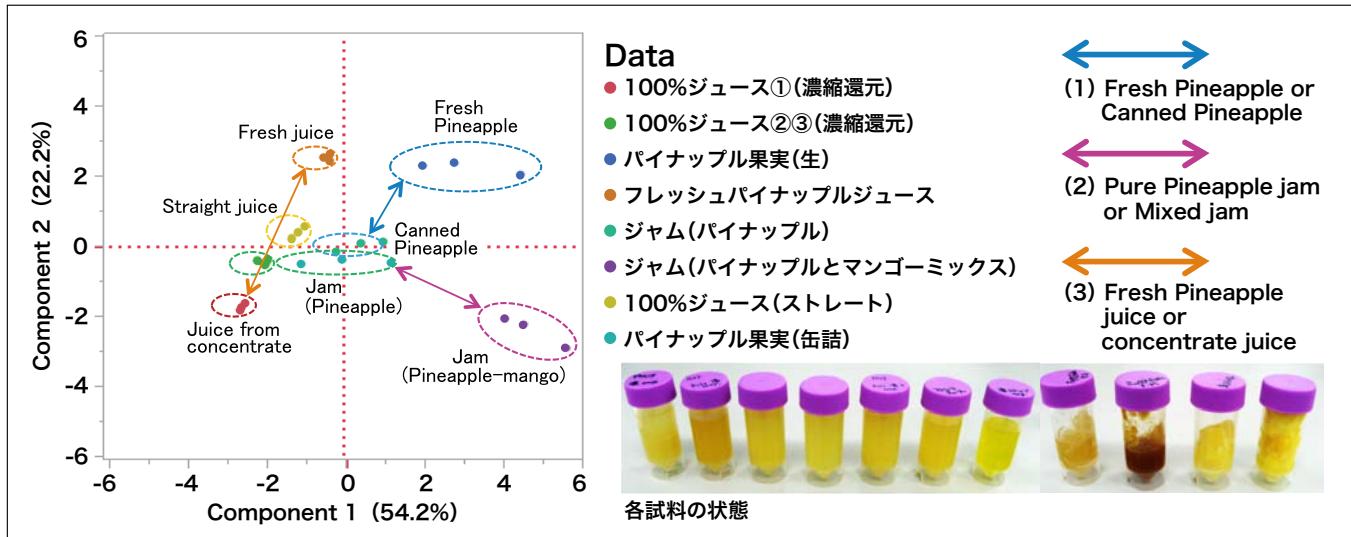


図10 各試料の主成分分析による判別例

5. 終わりに

食品分野では、多種多様な試料が存在し、分析によって着目する観点も目的によって大きく異なる。そのため、現在は試料・目的に応じた分析手法の確立など応用事例の拡充に関する研究がなされている⁵⁾。蛍光指紋分析を食品分野に応用する試みは、多方面の研究成果が報告されてきており、ここ数年で注目度が飛躍的に向上してきている。蛍光指紋分析が、従来の方法よりも簡便に迅速な測定手法として確立され、社会に貢献できる技術となることに期待している。

参考文献

- 1) 中村結花子, 藤田かおり, 杉山純一, 蔦瑞樹, 柴田真理朗, 吉村正俊, 粉川美踏, 鍋谷浩志, 荒木徹也, 「蛍光指紋計測によるマンゴーの産地判別」日本食品科学工学会誌, 59, 387-393 (2012)
- 2) 杉山武裕, 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 柴田真理朗, 粉川美踏, 荒木徹也, 鍋谷浩志, 相良泰行, 「励起蛍光マトリクスによるそば粉と小麦粉の混合割合の推定」, 日本食品科学工学会誌, 57, 238-242 (2010)
- 3) 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 「励起蛍光マトリクス計測を応用したデオキシニバレノールの新規判別法」日本食品科学工学会誌, 55, 177-182 (2008)
- 4) Fujita K., Tsuta M., Kokawa and Sugiyama J., Detection of deoxynivalenol using fluorescence excitation-emission matrix, *Food and Bioprocess Technol.*, 3, 922-927 (2010)
- 5) 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 久城真代, 柴田真理朗, 「蛍光指紋による小麦粉中のデオキシニバレノールの非破壊計測」, 日本食品科学工学会誌, 58, 375-381 (2011)
- 6) 藤田かおり, 杉山純一, 蔦瑞樹, 小澤徹, 柴田真理朗, 吉村正俊, 粉川美踏, 久城真代, 「蛍光指紋を利用したコムギ中のカビ毒の非破壊簡易検出法の開発」, 農業情報研究, 21, 11-19 (2012)
- 7) Jakob Christensen, Lars Nørgaard, Rasmus Bro, and Søren Balling Engelsen., Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems, *Chemical Reviews*, 106 (6), 1979-1994 (2006)

著者所属

*堀込 純

(株)日立ハイテクサイエンス 光学技術部

示差熱熱重量同時測定装置 STA7200RV

Simultaneous Thermogravimetric Analyzer

西村晋哉^{*1}

1. はじめに

日立ハイテクサイエンスでは、DSC、TG/DTA、TMA、DMAといった各種熱分析装置の開発・製造・販売を行っている。当社熱分析装置の特徴として、試料観察機能に対応していることが挙げられる。この試料観察機能とは、熱分析データと試料観察画像を同時に取得してリンクさせる機能であり、データの解釈の容易化と新たな知見の発見を支援する。

2012年にリリースしたTG/DTA7220では、TG/DTA測定を行いながらCCDカメラにより測定中の試料変化状態を500°Cまで同時観察ができる機能を実現した。例えば試料の熱分解による重量減少に伴って起こる分解ガス発生の様子、試料の色の変化といった現象をリアルタイムに観察することが可能である。

今回は市場のさらなるニーズに応えるために、測定温度範囲を拡大し、最高で1,000°Cまでの試料観察に対応したSTA7200RVを開発した(図1)。高分子有機材料の分解終了までの過程や、金属・ガラス等の無機材料のガラス転移、融解といった、これまで対応できなかった範囲まで試料観察が可能となっている。



図1 示差熱熱重量同時測定装置 STA7200RVの外観図

2. 示差熱熱重量同時測定装置の役割

示差熱熱重量同時測定装置（以下TG/DTA）は、試料の温度を一定のプログラムに従って変化させながら、その試料の質量を温度の関数として測定し、示差熱の信号も同時に取得できる。

TG/DTAは、無機、有機、高分子等さまざまな材料の耐熱性評価に用いられている。具体的にはさまざまな条件下での物質の熱分解温度、分解量の定量、付着水や結晶水の定量、脱水温度等を測定し、耐熱性の評価に用いている。

ゴム材料やコピー用トナーでは、成分分析やカーボンブラックの定量にも用いられる。その他、食品、薬品の含水量、乾燥条件の決定、熱安定性評価、金属の酸化反応測定でも利用されている。またTG曲線から反応速度論的解析もよく行われている。

3. STA7200RVの特長

3-1 試料観察窓(ビューポート)搭載加熱炉

これまでのTG/DTAでは、試料は加熱炉に覆われているため、試料状態を観察することはできなかった。このためTG信号（質量変化）およびDTA信号（示差熱変化）から試料に生じた現象を判断する必要があり、判断が難しい場合には現象を推測するしかなかった。そこでSTA7200RVでは、新たに加熱炉に石英ガラス製ビューポートを搭載し、測定中の試料観察を可能とした（図2）。



図2 STA7200RVの新加熱炉構造

合わせて、ガス雰囲気を制御するため加熱炉内に備えられたファーナスチューブも石英ガラス製とすることで、容器内の試料が直上のCCDカメラから観察できるように設計されている。この構造によって1,000°Cまでの試料観察に対応した（特許出願中）。一方で石英ガラスの弱点として、TG/DTA測定中に発生する分解ガスの成分によっては、経時的に失透が進み、試料の観察が不鮮明になることがある。

そこでSTA7200RVでは、ユーザーでもファーナスチューブを交換できる加熱炉機構を採用し、いつでも鮮明な試料観察データを得られるようメンテナンス性に配慮した設計となっている。

3-2 DTA信号の安定性

DTAは、試料の変化に伴い発生する吸発熱を基準物質との温度差として捉えた信号である。TG/DTA測定では、加熱によって試料形状や表面状態、色彩などが変化するため、試料自身の輻射率も変化し、この影響が示差熱信号に含まれてしまうことがある。STA7200RVのビューポート形状は、試料観察が可能になるだけでなく、試料直上からの輻射の影響を低減するよう設計されており、図3に示すようにDTA信号の安定性向上に寄与している。

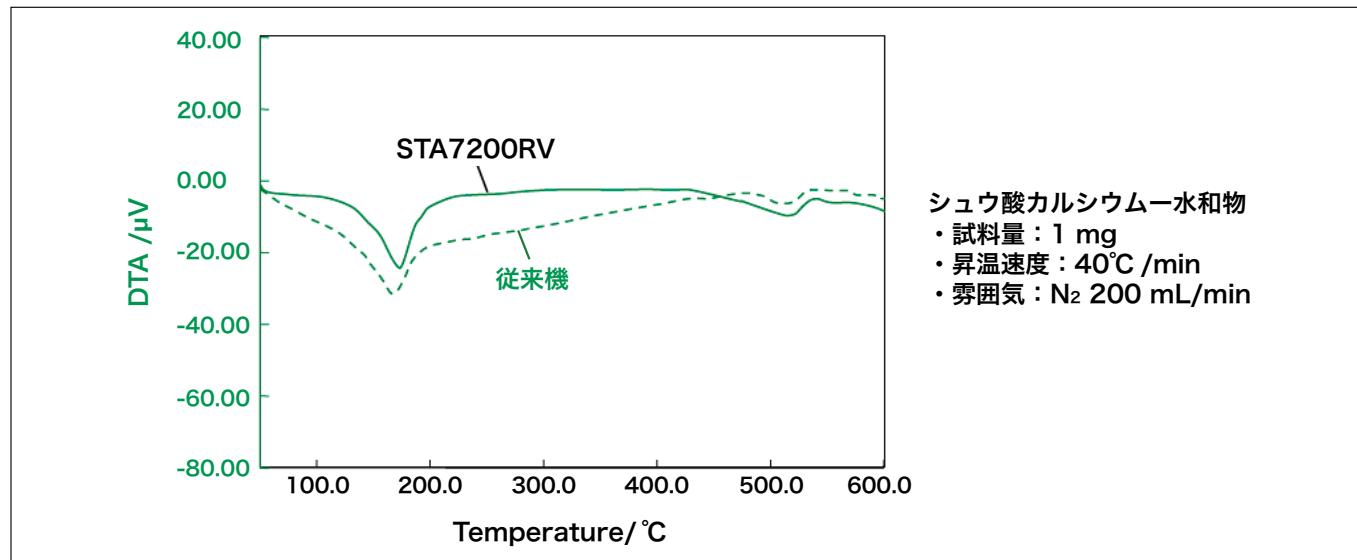


図3 DTA信号の安定性データ

3-3 解析ソフトウェア

解析ソフトウェアも試料観察機能に対応させた(図4)。保存した測定データをロードする際、各測定信号と観察画像が自動的にリンクして表示され、分かりやすくデータ解析が行えるようになっている。

表示機能は2種類を用意した。スライド表示(図4(a))は観察画像を動画のように再生するモードで、試料の変化が感覚的に理解しやすい。もう一方のサムネイル表示(図4(b))は、測定データと試料画像を対応させながら確認でき、詳細に解析するときに向いている。

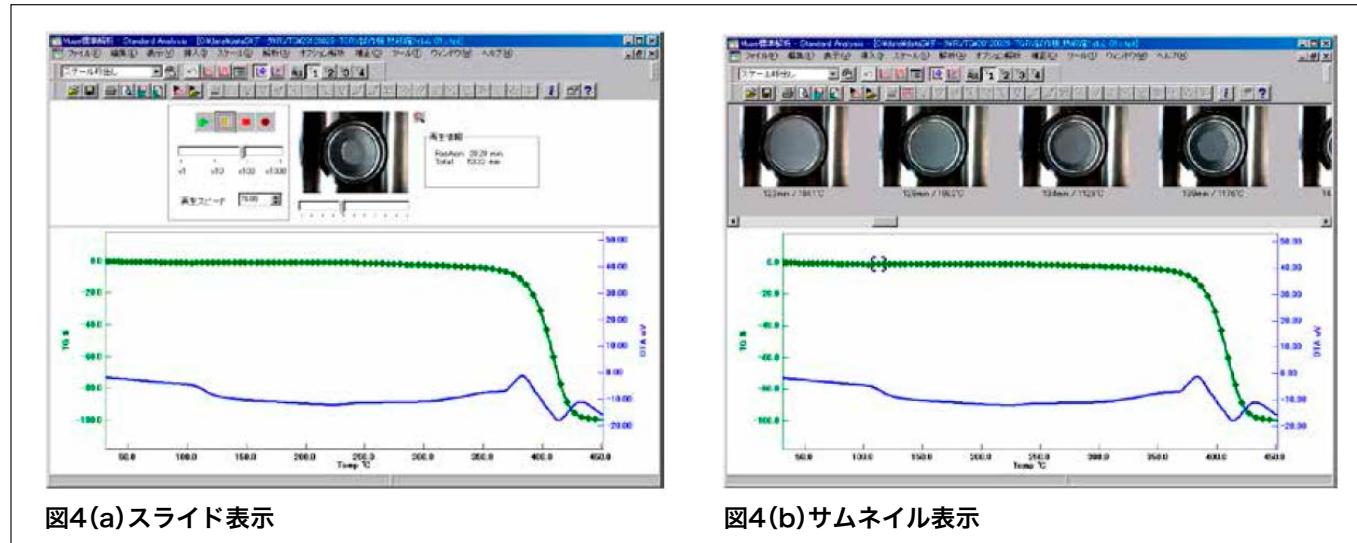


図4 解析ソフトウェア

4. 試料観察TG/DTAの測定例

次に試料観察 TG/DTA の測定例として医薬品のウルソデオキシコール酸の測定データを図 5 に示す。本サンプルは、胆石や肝臓病に用いる薬であり、胆汁の流れをよくして肝臓を守る効果がある。②の 120°C 付近では結晶化が起こり、DTA に発熱ピークが見られる。試料像にはあまり変化が見られない。200°C 付近では融解が起こり試料像でもその様子が確認できる。

また融解直後から重量減少が始まっている。試料も褐色に変化して劣化や分解が始まっている様子が見られる。300°C 以上では、二段の分解が起こり最終的には 500°C 以上で 100% 分解まで至っていることがよく分かる。

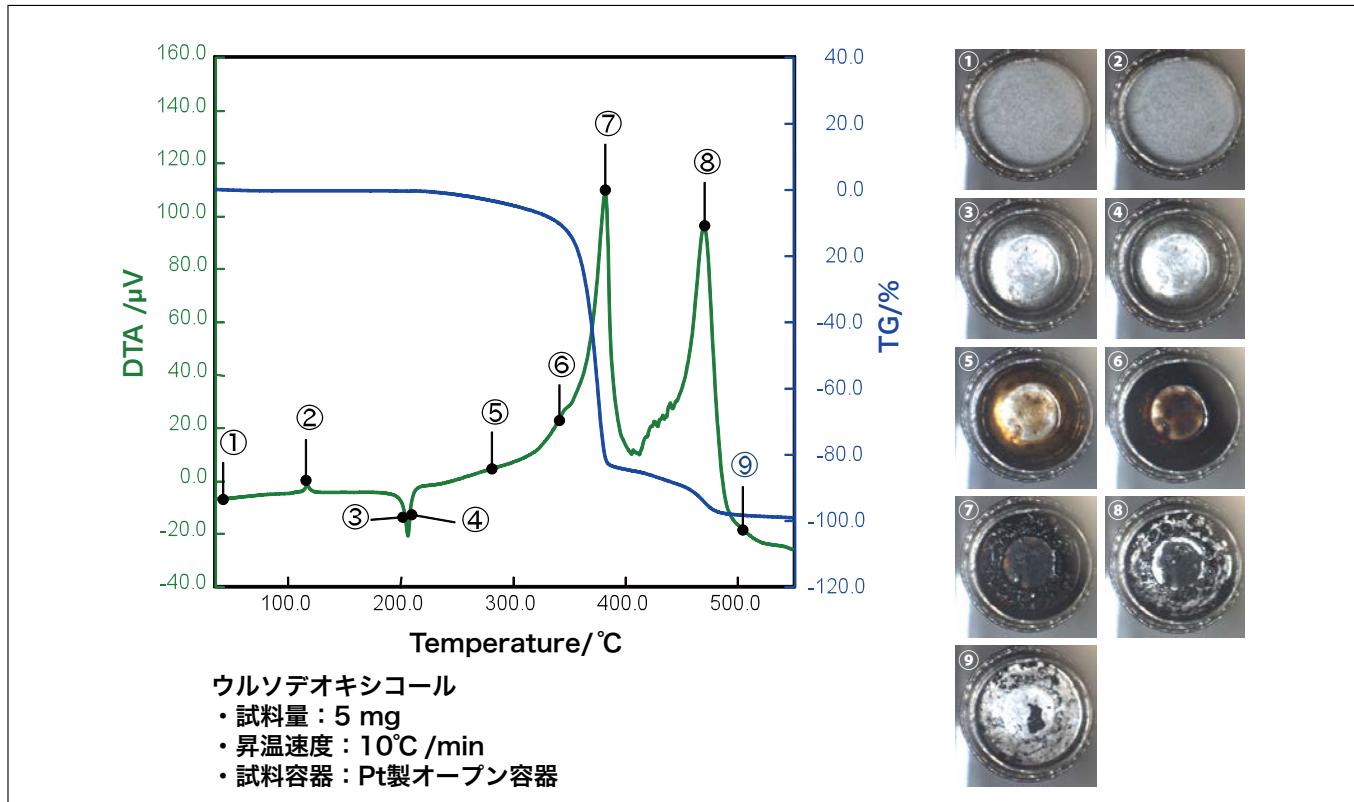


図5 ウルソデオキシコール酸の測定データ

5. 終わりに

STA7200RV では、試料の実像を観察できるため、形状や色彩の変化といった情報が熱分析の結果に加わる。①データの解釈のしやすさ、②今まで気づかなかつた現象に対する知見の取得、③異常と思われる現象の原因解析など新たな利点を備え、これまで以上に幅広い用途での普及を期待している。

著者所属

*¹西村晋哉

(株)日立ハイテクサイエンス 分析技術部

ChromasterUltra Rs 6440 蛍光検出器の紹介

Introduction of ChromasterUltra Rs 6440 Fluorescence detector

清水克敏^{*1}, 青田俊道^{*1}, 和田宏之^{*1}, 秋枝大介^{*1}, 宝泉雄介^{*2}, 伊藤正人^{*1}

1. はじめに

ChromasterUltra Rs は高分離、高感度分析を実現する UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) である。システム耐圧 140 MPa を有していることから分析圧力が上がりやすい移動相を使用することが可能であり、微粒子充填剤を用いた LaChromUltra II カラムシリーズと組み合わせて、さまざまな分析バリエーションが提供できる。今回、新たに ChromasterUltra Rs シリーズの検出器として、ChromasterUltra Rs 6440 蛍光検出器をラインアップした。



図1 装置外観

2. ChromasterUltra Rs 6440 蛍光検出器の特長

2-1 シャープなピーク形状

ChromasterUltra Rs 6440 蛍光検出器は、カラムから蛍光検出器までの配管に内径 ϕ 0.1 mm を使用し、3 μL (照射容量) のフローセルを採用している。徹底的にピーク拡散の要因を低減することで成分ピークの可能な限り拡散を抑え、シャープなクロマトグラムピーク形状を実現する。

図2に多環芳香族15成分を分析した例を示す。多環芳香族炭素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons : PAHs) は、ベンゼン環を複数持つ化合物であり、発がん性に関する知見も報告されている。多環芳香族15成分について、14分で分離可能であった。また、本結果では合わせて各成分が感度良く検出できるよう、ChromasterUltra Rs 6440 蛍光検出器の検出波長をタイムプログラムにより切り替えて測定している。

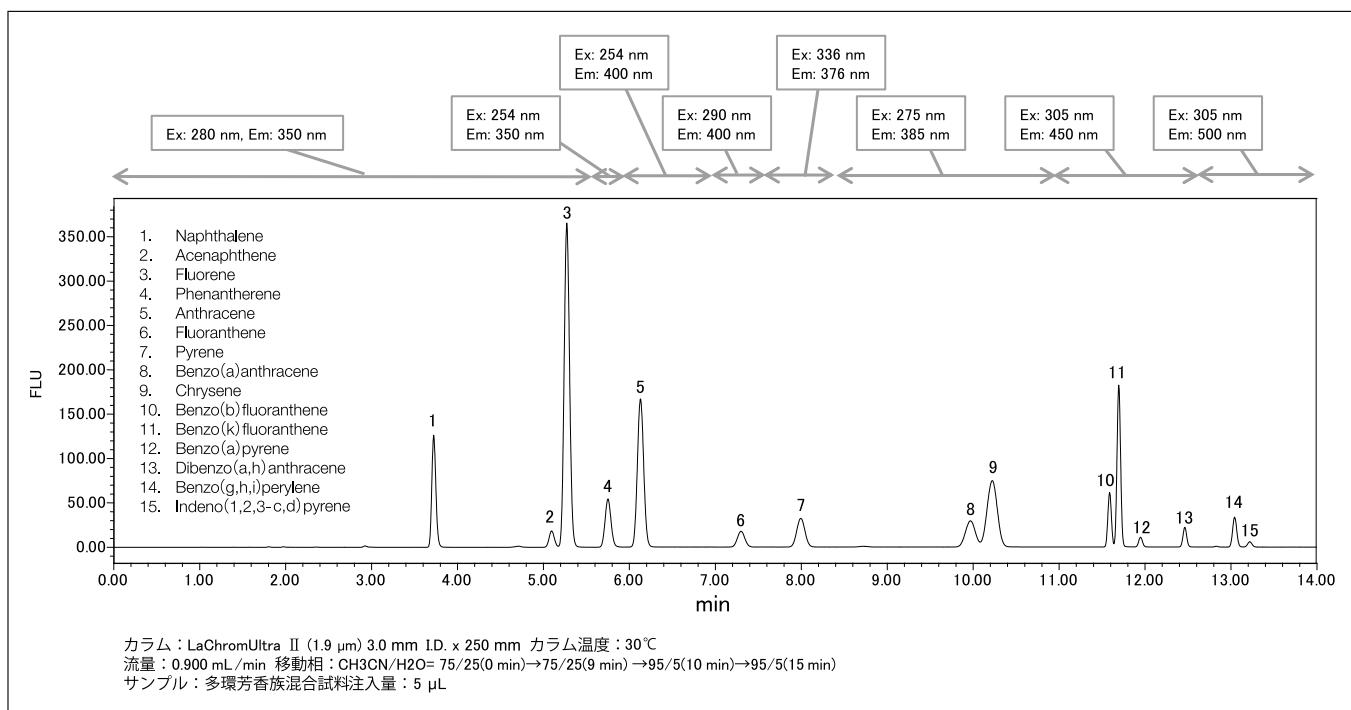


図2 タイムプログラムを用いた多環芳香族の分析

2-2 ダイナミックレンジの拡大

従来からのダイナミックレンジに、新たにワイドモードを追加した。ワイドモードは、図3に示すように、従来のスタンダードモードと比較して、検量線範囲が約5倍に拡大する。

その結果、従来よりも注入量を増やして感度を上げることも可能であり、また、成分に濃度差があり、従来では同時に測定できなかった成分の測定も可能である。

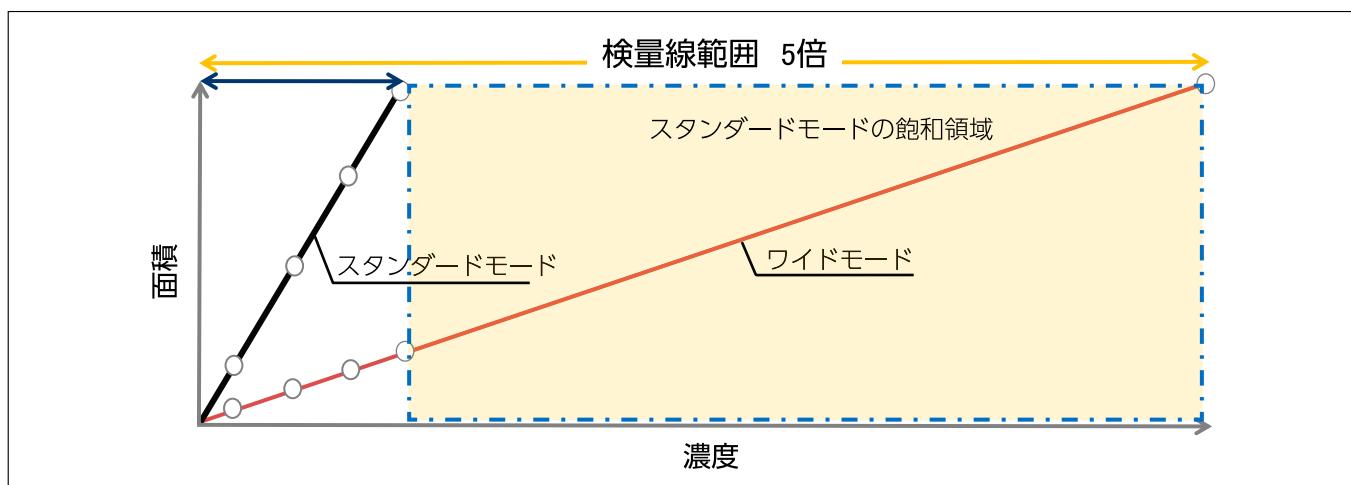


図3 ダイナミックレンジの比較

ダイナミックレンジの設定によるクロマトグラムの比較として、図2に示した多環芳香族をスタンダードモードおよびワイドモードについて測定した結果を図4に示す。約5.3分に検出されるFluoreneピークはスタンダードモードではピークが飽和し定量ができないが、ワイドモードにすることによりピークの検出が可能である。

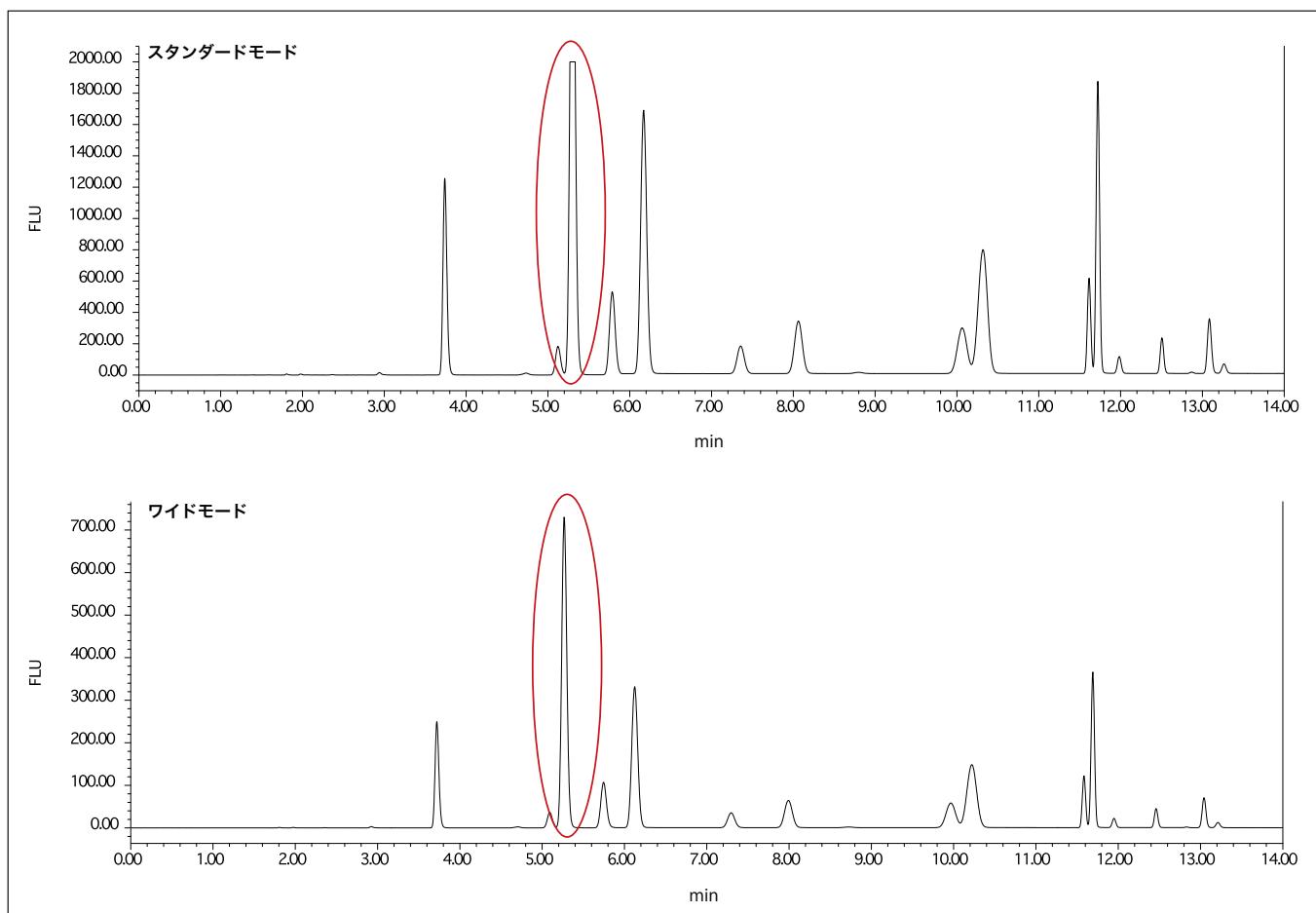


図4 ダイナミックレンジ設定によるクロマトグラムの比較

3. アプリケーションの紹介

超高速液体クロマトグラフのアプリケーションの一つとして、アミノ酸分析が注目されている。日立ハイテクサイエンスでは、従来から、精密定量が可能なポストカラム誘導体化法を採用した専用機（L-8900形）および汎用HPLC（Chromasterシリーズ）に関するアプリケーションがあるが、今回これに加えて ChromasterUltra Rs 6440 蛍光検出器を用いて超高速アミノ酸分析に対応したアプリケーションを紹介する。

超高速アミノ酸分析では、あらかじめ誘導体化試薬と反応させたアミノ酸（プレカラム誘導体化法）をODSカラムで分離する。誘導体化試薬としてはNBD-F（4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole）を用いた。本手法はUV検出器でも検出可能であるが、蛍光検出器との組み合わせにより、超高感度分析が可能（fmol単位でアミノ酸を検出可能）である。本手法ではアミノ酸19成分を9分間で分析可能である。

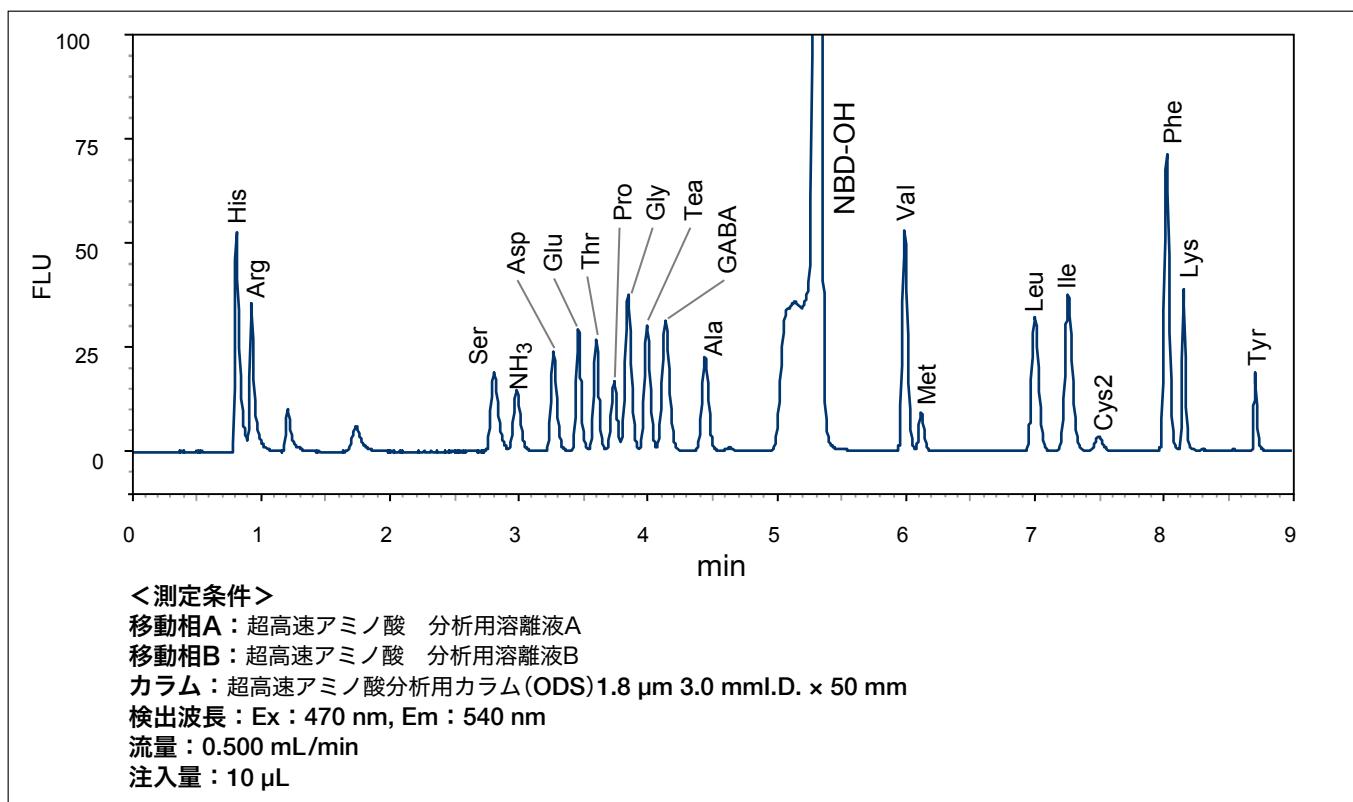


図5 ChromasterUltra Rs 蛍光検出器システムによるNBD-Fアミノ酸標準試料の測定

4. まとめ

蛍光検出器は励起波長と蛍光波長の二つの波長を設定して測定することから、一般的に目的物質に対する選択性が高く、UV検出器と比較して高感度に測定することが可能であり、微量成分の分析に適している。今後も ChromasterUltra Rs 6440 蛍光検出器を用いた新規アプリケーションの対応を図る。

著者所属

*¹清水克敏 青田俊道 和田宏之 秋枝大介 伊藤正人
(株)日立ハイテクサイエンス 光学技術部

*²宝泉雄介
(株)日立ハイテクサイエンス 経営改革部

ハイブリッドイオンミリング装置 IM4000Plus

日立ハイブリッドイオンミリング装置IM4000は、半導体デバイス分野や各種材料分野をはじめ多方面でその有効性が認められ、SEM観察用試料の表面層除去や試料断面の最終仕上げとして幅広く利用されています。IM4000の受注累計は、2010年11月発売以来500台を超え、その需要の高まりと共に、さらなる加工の高速化、高精度化の要望を頂いています。

そのようなニーズに対応して、新開発のイオンガンを搭載したイオンミリング装置IM4000Plusをラインアップに加えました。

主な特長

- (1) 断面ミリングレート 500 $\mu\text{m}/\text{hr}$ を実現¹⁾
- (2) イオンビーム間欠照射機能により試料の熱ダメージを低減²⁾
- (3) 冷却温度調整機能による試料の過冷却防止（オプション）³⁾
 - 1) 加速6 kV/突出量100 μm にて60分間Siを加工した際の最大深さ
 - 2) 断面イオンミリング、平面イオンミリングに対応
 - 3) 冷却温度調整機能付きIM4000シリーズ、断面イオンミリングに対応



冷却温度調整機能付きIM4000Plusの外観

走査型プローブ顕微鏡用ステーション AFM5000II

AFM5000 IIは、ナノ領域での形状観察や物性分析が可能な走査型プローブ顕微鏡の制御とイメージングを行うコントローラです。測定パラメータ自動調整機能Real Tune IIを標準搭載し、再現性の高いデータが取得できます。

主な特長

(1) 自動測定

主要なパラメータを予測し調整する新アルゴリズムを開発し、スタートボタンを押すだけのワンクリック測定が可能になりました。

(2) 新GUIと解析機能

形状像と物性像を重ね合わせて表示し、さらに3D像として描画することができるので、物性の分布を視覚的に捉えることが可能になりました。



装置外観

蛍光X線膜厚計 FT150シリーズ

蛍光X線膜厚計「FT150シリーズ」はX線集光系（ポリキャピラリ）を採用した最上位モデルで、小型化・微細化が進む電子部品に対応し、100 μm以下の微小部のメッキ膜厚や組成を迅速、安全、容易に検査・管理することができます。

主な特長

(1) 高速測定

代表的アプリケーションである、金／パラジウム／ニッケル／銅の多層メッキ測定のスループットが従来機（FT9500X）の2倍以上になりました。

(2) 超小型チップ部品に対応

FT150hでは、超小型チップ部品のスズ／ニッケル／銀のアプリケーションにも対応しました。

(3) 安全性と使いやすさを両立

X線漏えいリスクの少ない密閉型筐体と、軽快な開閉ができる試料扉の採用で、安全性と使いやすさを両立しました。FT150Lでは600×600 mmの大型プリント基板の測定が可能になりました。



FT150/FT150h



FT150L

Chromaster 5610質量検出器 MS Detector

Chromaster 5610 質量検出器は、「より正確に」「より手軽に」「よりコンパクトに」をコンセプトとした四重極型質量分析計を採用したHPLCユーザーのための新しい検出器です。

本検出器から質量情報を得ることで、定性分析の信頼性を大幅に向上させることができます。

また、高速液体クロマトグラフChromasterと同等の設置面積、AC100 V電源対応、N₂ガスの低減に加え、新開発の大気圧イオンフィルタの搭載によりメンテナンス性を大幅に向上させるなど、質量分析計を初めて使用するHPLCユーザーでも気軽にご使用いただけます。

※Chromasterは株式会社日立ハイテクノロジーズの日本およびその他の国における登録商標です。



Chromaster® 5610質量検出器 (MS Detector)



装置内部写真 (大気圧イオンフィルタ)

シーケンシャル型高分解能ICP発光分析装置 PS3500DDII

従来機に搭載した高機能のダイレクトドライブによるスキャニング技術により、高いスループットを有しながら、光学素子の最適化、分光光学系の精密加工により波長分解能（半値幅）を世界最高水準の0.003 nmへと向上させたPS3500DDIIをリリースしました。

主な特長

- (1) 高い分解能
波長分解能を従来機の0.0045 nmから世界最高水準の0.003 nmへ向上し、複雑な材料中の微量元素分析などの波長分解能を必要とする測定が可能になります。
- (2) 精度・再現性
試料導入系の改良により霧化試料の導入安定性が増し、繰り返し再現性が向上しました。さらに信頼性の高い測定が可能になります。



装置外観図

MOCON 酸素透過率測定装置 OX-TRANシリーズ

酸素透過率測定装置 OX-TRAN 2/22Hは、タッチパネル操作、パラメータ自動調節、シーケンシャル測定、容器内高速ページなどの新機能を追加し、測定効率と使い易さを向上させました。また、OX-TRAN 2/21 10xは、新開発の検出器を搭載し、従来のOX-TRAN 2/21シリーズより酸素検知感度が飛躍的に向上しました。



OX-TRAN 2/22H



OX-TRAN 2/21 10x

平沼全有機炭素測定装置 TOC-2350

このたび平沼全有機炭素測定装置TOC-2300のパソコンタイプとして、TOC-2350の発売を開始いたしました。定評のある光触媒酸化チタン酸化法による測定はそのままに、パソコン制御による優れた操作性をご提供します。

主な特長

- (1) 測定条件の設定やレポート作成などのデータ処理が簡単です。
- (2) 日本薬局方、上水試験方法など各種公定法に対応しています。
- (3) 高価な白金触媒や高純度空気が不要です。また、酸化剤も使わず、有害な廃液を排出しません。



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 (050)3139-4566
北海道支店 札幌 (050)3139-4994 関西支店 大阪 (050)3139-4801
東北支店 仙台 (050)3139-4985 九州支店 福岡 (050)3139-4151

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 12:45~17:30
(土・日・祝日および弊社休日を除く)

本ニュースに関するお問い合わせは、下記へご連絡ください。

HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS March 2015 VOL. 58 No. 1

発行日 2015年3月27日 発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ
〒105-8717
編集人 多持隆一郎 東京都港区西新橋1-24-14
発行人 飯泉 孝 電話(050)3139-4298(ダイヤルイン)

ホームページ URL: www.hitachi-hightech.com/jp/science/