

分析機器解説シリーズ(99)

◆フーリエ変換イオンサイクロトロン
共鳴型質量分析計の原理と応用 P1
ブルカー・ダルトニクス株式会社 齋藤 和徳

トピックス

◆走査電子顕微鏡における低加速電圧観察の最近の動向 P5
九州大学大学院工学研究院材料工学部門 大上 悟
エスアイアイ・ナノテクノロジー株式会社 大柿 真毅
ビーム・テクノロジー応用技術部

◆お知らせ P8

分析機器解説シリーズ(99)

フーリエ変換イオンサイクロトロン 共鳴型質量分析計の原理と応用

ブルカー・ダルトニクス株式会社 齋藤 和徳

1 はじめに

質量分析法は、物質の分子量や化学構造を知るための手法である。質量分析法では、測定対象となる分子を何らかの方法で気体状のイオンとする。イオンを真空中に置いて、電場や磁場による力で運動を与えると、質量と電荷に応じて分離するので、これを検出する。このとき質量を電荷の大きさを割ったものを質量電荷比 (m/z) と呼び、横軸に質量電荷比を取り、縦軸に信号強度を取ったものをマススペクトルと呼ぶ。例えば炭素の場合には、天然でも ^{13}C という同位体が1.1%存在しており、マススペクトルには、こうした同位体のピークも観察される。さらに、イオン化の過程や、真空中を飛行する間に、イオンが崩壊することによるフラグメントイオンピークも観察されるため、通常マススペクトルは複雑なものとなるが、同時にこれらは構造に対する多くの情報を与えてくれる。質量分析計

は、大きく分けてイオン源 (ion source) と分析部 (analyzer) からなる。これまでに、イオン化法、イオン分光法ともにさまざまな方法が開発されてきており、その組み合わせも、また多様である。さらに、多くのイオンの中から興味あるイオンを分離し、そのフラグメントイオンピークを得るMSn測定のために、分析計をふたつ以上組み合わせた装置もある。これらは分析の目的や、対象の物質に合わせて選択される。

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析計は、磁場中で荷電粒子が回転運動することを利用した、analyzerのひとつである。英語での頭文字 (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry) を取って、FT-ICR-MS、あるいはFTMSと省略される。現代のFT-ICR-MSには超伝導磁石が用いられており、安定した高磁場により、他の質量分析計には類を見ない高分解能 (磁場強度に比例する。9.4T磁石でFWHM > 1,000,000)、高精度 (1ppm以内) を得られることが、最大の特徴であ

る¹⁾。2002年に、イオン化中に開裂が起こりにくい、ソフトイオン化法であるMALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) の開発で田中耕一氏が、ESI (Electrospray Ionization) の開発でJohn B. Fenn氏が、それぞれノーベル化学賞を受賞したが、近年FT-ICR-MSとともによく用いられるのも、このふたつのイオン化法との組み合わせである。特に、ESI法では多価のイオンが生成しやすく、分解能が低い装置では、価数が大きくなると、その価数を決定できない。これは、同位体イオンピークの分布が密になるため、例えば50価のイオンであれば、 m/z 1/50すなわち m/z 0.02の差を明瞭に分離できなければならない。FT-ICR-MSでは、ウシ血清アルブミン (66kDa) の56価のイオンの同位体イオンピークの分離を得ることが可能であり (図1)、高分子への応用も期待されている。

本稿においては、FT-ICR-MSの原理について概説し、ESI-FT-ICR-MSでのサンプルの調製法と応用例を紹介する。

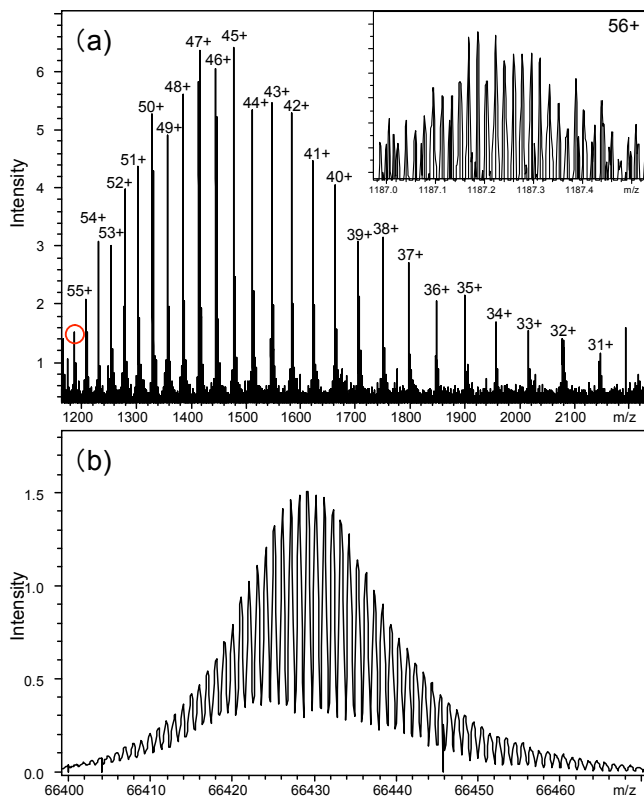


図1 ESI-FT-ICR-MSで測定した、ウシ血清アルブミンのマススペクトル。33価から55価までの多価イオンピークが観察されているが、55価のピークを拡大しても同位体イオンが分離していることが分かる。このときの分解能は、およそ200,000である(a)。この情報は、スペクトルをdeconvolutionしても失われない(b)。

2 ICRの原理

磁場中で荷電粒子が運動をすると、フレミングの左手の

法則に従い、磁場と運動が作る平面に対して垂直な方向に力が加わる。このため磁場中では、荷電粒子は磁場の方向を軸にして回転運動をする。この内向力をローレンツ力と呼ぶ。ローレンツ力と遠心力が釣り合うときの、荷電粒子の回転運動の角速度 ω を求めると、

$$\omega = \frac{qB}{m} \quad (1)$$

を得る。このとき、 q は荷電粒子の電荷の大きさ、 m は質量、 B は磁場強度である。角速度を周波数 f に直すと、

$$f = \frac{qB}{2\pi m} \quad (2)$$

となり、周波数は質量電荷比の関数となる。(2)式から、周波数に影響するファクターは、質量電荷比を除くと磁場強度だけとなるが、超伝導磁石の生み出す磁場は極めて安定であり、FT-ICR-MSが原理的にも高精度を保てることが理解できる。

Bruker Daltonics社製FT-ICR-MS Apexシリーズで用いられている分析セルを、図2に示した。磁場中のイオンは、ローレンツ力により、x-y平面に対しては運動の拘束を受けるが、z軸方向には運動を拘束されない。そこで、トラッププレートとよばれる電極をz軸に2枚置き、そこに正のイオンであれば正の静電場を与えることで、分析セルの中にイオンをトラップする。円筒を囲む形で4枚の独立した電極があり、対向する2枚を対にして、励起電極 (excitation plate) と検出電極 (detection plate) と呼んでいる。イオンを分析セル内にトラップした後、励起電極にRF波が印加されると、イオンは回転半径を増しながら回転運動を始める。 10^{-10} mbar以下の高真空中では、適当な時間の後にRF波を停止してもイオンは回転運動を続けるが、このとき検出電極につないだ閉回路には、イオンによる電磁誘導により微弱な電流が発生する。それをアンプにより増幅して検出すると、FID (Free Induction Decay : 自由誘導減衰) と呼ばれる波形を得る。この波形は、各イ

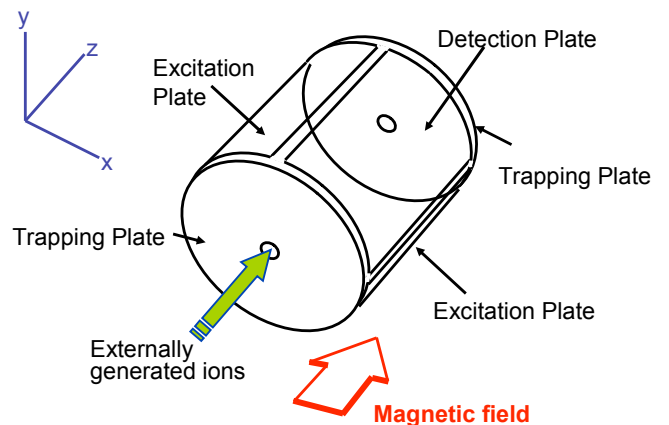


図2 Apex-Qで用いられているICR分析セル。

オンが生み出す、さまざまな強度を持った正弦波の混合波であり、これをフーリエ変換すると、縦軸に強度、横軸に周波数を取ったスペクトルが得られる。この周波数スペクトルは、(2)式より、マススペクトルに変換可能である。

3 試料の調製

ESI法では、試料は水、またはメタノールやアセトニトリルなど、比較的極性の高い溶媒に溶解して測定される。水を使う場合にも、イオン化効率を高めるために、50%程度の有機溶媒を添加することが多い。さらに、正イオンモードでの測定の場合には、プロトンアダクトイオンの生成を促進するため、1~3%程度の酢酸、または0.1%程度のギ酸を加えることもある。クロロホルムなど、極性の低い溶媒にしか溶けない試料の場合、そのままではイオン化せずに測定が難しいこともあるが、試料によっては、水溶メタノール溶液などを添加しても、沈殿を生じないこともあり、ESI法で測定できることもあるので、試す価値はある。このイオン化法の適用範囲は広く、極性があれば低分子から、分子量数万のタンパク質まで、開裂させずにイオン化することができる。分子量約150kDaの免疫グロブリンも、開裂することなく観察されている。

このようにESI法は優れた手法ではあるが、塩類が混入したサンプルでは、イオン化が妨げられやすく、検出感度が低下してしまう面もある。特に生体由来のサンプルには塩類が多量に含まれていることが多く、脱塩、前処理が分析の成否を決める。質量分析法は高感度であるため、通常測定に供されるサンプルは少量であることが多く、前処理も少量で出来ることが重要である。まず検討すべきなのは、小さなチューブを用いた限外ろ過による処理である。対応する分子量も3kDa以上からあり、操作も遠心するだけと簡単である。次に、固相抽出カートリッジが挙げられる。これはカラムなどに使用される充填剤が詰まった小さなカートリッジのことで、有機溶媒で溶離でき、そのまま測定可能なことから、逆相系のものがよく用いられる。この充填剤をマイクロピペットのチップ先端に詰めたものもよく利用されるが、得られる溶液の量が10 μ L程度と少ないため、もっぱらナノスプレーESIでの利用となる。

4 応用例

近年注目を浴びている応用例として、タンパク質測定、特にトップダウンプロテオミクスがある。これは、タンパク質分子を大きな構造を保ったままイオン化し、さらには分析計内部で開裂を起こして、タンパク質の同定、アミノ酸配列解析、さらには翻訳後修飾を明らかにしようという試みである。図1に示したように、分子量70kDaぐらいまでのタンパク質では、多価のイオンにおいても同位体イオンピークが分離が得られるため、これまで質量分析計では知り得なかった構造情報が得られるケースがある。さらにイオンが開裂した複雑なスペクトルにおいても、FT-ICR-MSの高分解能を用いれば、ピークの帰属が可能である。

一方、分子量が2kDaを超えない低分子においても、FT-ICR-MSの高分解能、高精度が生かされるような分析例が、近年多く示されている。図3には、河川水中のフルボ酸の分析例を示す。フルボ酸とは、カルボキシル基、水酸基を多く含んだ多価有機酸のことで、天然中には、多くのバリエーションが見出される。この測定例では、 m/z 200から900の領域に非常に多くのピークが観察されたが、 m/z 411付近を拡大してみると、わずか m/z 0.35の間に21本のピークが観察され、しかもそのすべての組成式を同定可能だった²⁾。これまでフルボ酸混合物の分析には、赤外分光法や原子核磁気共鳴法が用いら

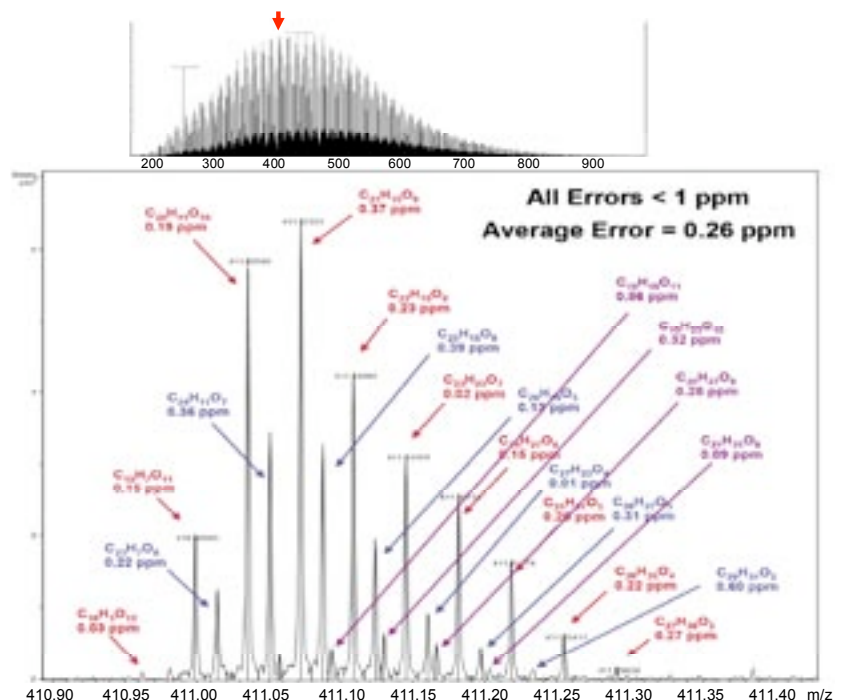


図3 スワニー川（アメリカ・ジョージア州）でサンプリングされたフルボ酸の、FT-ICR-MS分析結果。 m/z 411付近を拡大してみると、21本のピークが観察され、すべて元素組成を同定できた。このときの誤差は1 ppm以内であり、平均誤差はわずか0.26ppmであった。

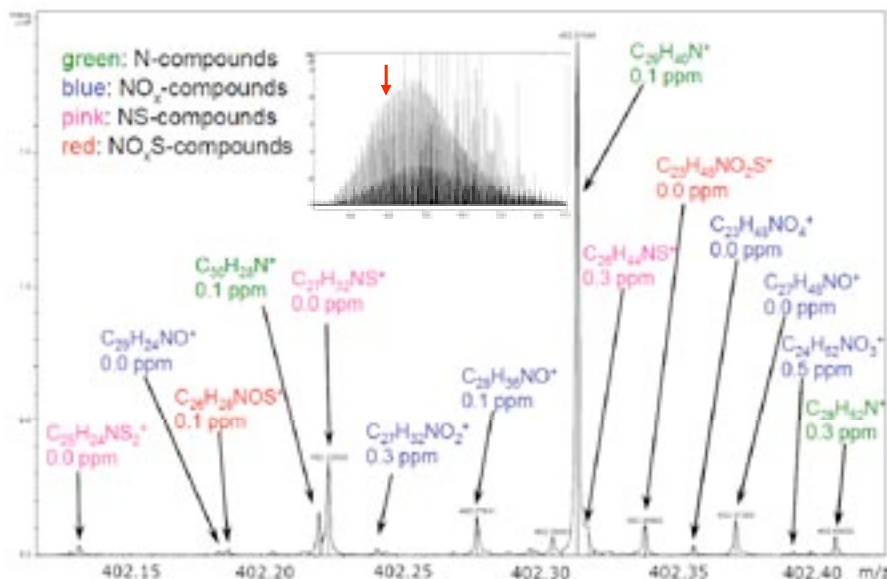


図4 原油の分析例。m/z402付近を拡大すると、14本のピークが観察され、いずれもその元素組成を同定することができた。

れてきたが、これらの方法では混合物の組成の傾向は分かるものの、個々の分子の同定までは不可能であった。FT-ICR-MSにおいては、一斉分析により分子組成の同定が可能であり、より詳細な組成の分析や、環境中での動態の解明が期待される。図4には、原油の分析例を示す。原油の分析においても、m/z200から800の領域に多くのピークが観察されるが、一例としてm/z400付近を拡大してみると、わずかm/z0.3の間に14本のピークが観察され、すべての元素組成を同定できた³⁾。このように、FT-ICR-MSを低分子に応用すると、これまで得られなかったような情報を、一度の分析で得られることが可能であり、サンプルのスループットの向上が期待されている。

今後、低分子分野への応用として期待されているのが、メタボロミクス分野である。これは、生体内で起きている変化を、代謝物から見ていこうと言う試みである⁴⁾。従来の質量分析計をこの目的に用いる場合には、液体クロマトグラフィー法やキャピラリー電気泳動法と言った、分離技術との組み合わせが必須であったが、すでに述べたように、FT-ICR-MSでは低分子を分離することなく一斉に分析し、その元素組成を明らかにすることが可能であり、サンプルのスループットを著しく向上させることが期待されている。このことは、omicsと呼ばれる、多くのサンプルを扱う分野においては極めて重要であり、今後の発展が期待される。

5 おわりに

FT-ICR-MSで得られる分解能は、他の質量分析計と比べて桁違いに高い。分解能が高いと言うことは、得られる

情報量が多いということであり、FT-ICR-MSを利用することによって、これまでの質量分析では得ることが出来なかったような、詳細な情報が得られるようになることが期待される。特に、環境分析やメタボロミクス分野など、複雑な組成の混合物から、特定の物質を同定することが可能になると期待される。また、紙面の都合上割愛したが、FT-ICR-MSは多彩なMSn測定が可能な装置でもある。Apex-Qにおいては、分析セルの前段に四重極のマスフィルターと六重極の衝突室を備えており、簡単にMSMS測定を行うことも可能である。こうした柔軟性もFT-ICR-MSの特徴のひとつであり、今後さらに応用例が増えていくのではないだろうか。

参考文献

- 1) Amster, I. J. 1996. Fourier transform mass spectrometry. *J. Mass Spectrometry* 31, 1325-1337.
- 2) Fuchser, J., Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., Hertkorn, N. 2006. Analysis of complex, natural Suwannee river fulvic acid mixtures by FTMS : Revealing homologous series by analyzing ultra-high resolved mass spectra by Kendrick and van-Krevelen plots. *Proceedings of International Mass Spectrometry Conference 2006*.
- 3) Witt, M. 2007. Crude oil analysis by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry using different ionization techniques. *Proceedings of American Society for Mass Spectrometry Annual Conference 2007*.
- 4) 松田史生, 及川彰, 草野都, 菊地淳, 斉藤和季. 2007. メタボローム解析技術の現状と展望. *化学と生物* 11, 754-760.

走査電子顕微鏡における低加速電圧観察の最近の動向

九州大学大学院工学研究院材料工学部門 大上 悟
 エスアイアイ・ナノテクノロジー株式会社 大柿 真毅
 ビーム・テクノロジー応用技術部

1. はじめに

走査電子顕微鏡（SEM）は、産業を担う各分野にわたり広く用いられているナノテクノロジー観察装置である。SEMは二次電子検出器（SE）以外の多様な各種検出器を装着することで、観察対象の多面的な特性評価が可能である。光学顕微鏡よりも高分解能／長焦点深度であることから光学顕微鏡の延長線上の形状観察装置として位置づけられ、最近では研究室レベルの予算で導入できる安価なものも出現している。また透過電子顕微鏡（TEM）ほど試料の作製（100nm以下の薄膜化が必要）に要する時間やノウハウが必要ないこともあり、試料の表面形状を簡便に観察する有能なツールとして用いられている。SEMにおける空間分解能は加速電圧に依存し、これまで高分解能の試料観察を行うには比較的高い加速電圧を用いなければ電子線径を小さくすることができなかつた。しかし高加速電圧では入射電子が試料に深く進入し、表面以外の「必要のない」内部情報を得てしまう。また導電性の乏しい試料の観察においては、チャージアップ現象を克服するためにその表面に導電性物質のコーティング（蒸着／スパッタ

など）を施す必要がある。数十万倍率レベルの高分解能観察においては蒸着膜を構成する粒子が観察されはじめ、「真の試料表面」を観察することはできない。さらにコーティングによって試料表面の物性の多くは失われていることは明らかである。

本稿では低加速電圧で高分解能を実現した独Carl Zeiss製のSEMについて解説する。写真1は、GEMINI鏡筒を持つCarl Zeiss製のSEMシリーズであるULTRA55機の外観写真である。

2. GEMINI対物レンズ

Carl Zeissでは、ショットキー型電界放出銃と磁界／静電界を組み合わせたユニークな電子光学設計の“GEMINI対物レンズ”により前述の問題を克服し、低加速電圧領域での高分解能観察と高コントラスト観察を可能にしている。GEMINI対物レンズを搭載したFE-SEMは、SUPRA／ULTRA各シリーズがラインナップされている。いずれにも共通する特長は、磁界と静電界を組み合わせた対物レンズにある（図1）。

静電レンズは対物レンズ最先端付近に配置され、入



写真1 ULTRA55の概観

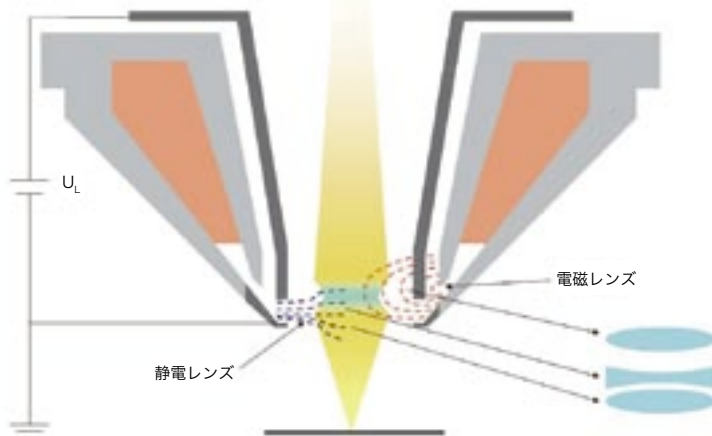


図1 Gemini鏡筒の対物レンズ断面図

射電子ビームに対して減速電界として作用する。図1の“ U_L ”は電子ビームを鏡筒内で高エネルギーに保ち加速するが対物レンズ終端通過時点でグラウンドに落ち、結果電子ビームは最初に設定された加速電圧で試料に入射する。つまり加速電圧が500Vの場合、電子ビームは鏡筒内では $(500 + U_L)$ eVのエネルギーを持ち、試料入射時には500Vになる。低加速電圧条件下で分解能の低下を招く色収差の問題は、この静電界レンズにより大幅に低減される¹⁾。また同時にこのレンズは、低いエネルギーの二次電子を対物レンズ直上に配置された環状二次電子検出器へと加速させる役割も持つ(図2)。さらに、この静電レンズシステムにより、光軸は加速電圧を変化させてもシフトが少なく、最適観察条件の設定作業が非常に簡便である。

3. 低加速電圧観察

低加速電圧条件下での高分解能観察が可能になると、観察の応用範囲は格段に広がる。非導電性物質の表面構造観察を単にコーティングなしで実行可能にできるだけでも、これまでコーティング処理によって失われていた試料の最表面の物理学的情報や微細構造を得る上で非常に有効である。また試料マトリックス上に極薄く形成された酸化物の情報を得る際にも、低加速電圧観察は電子線の侵入深さを浅く抑えられるメリットがある²⁾。応用例の一つとして加速電圧250Vでの電圧コントラストによる90nmプロセスでの半導体デバイスpn接合像を示す(図3)。

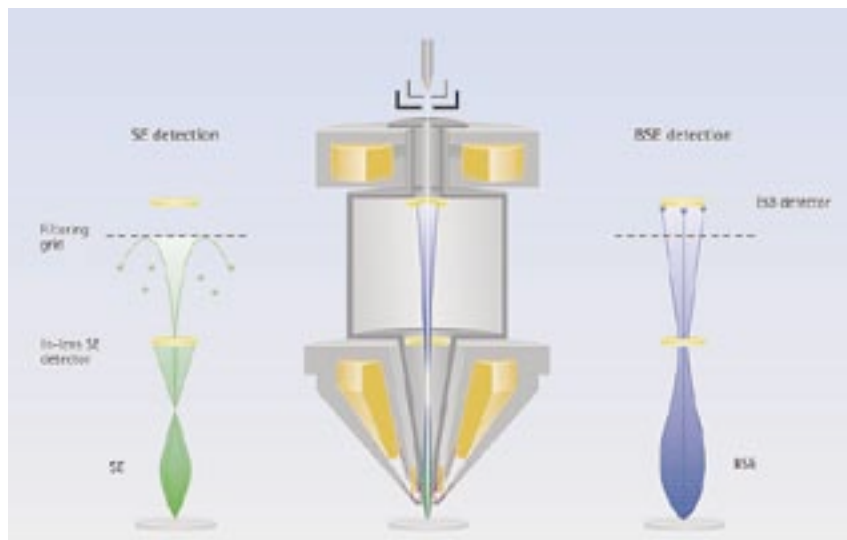


図2 Gemini 鏡筒断面図と検出器の配置

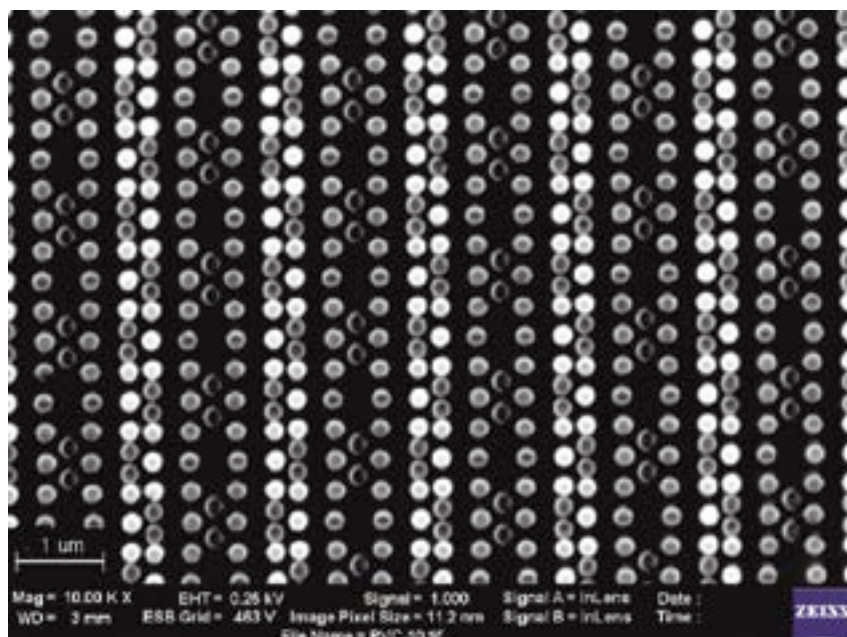


図3 加速電圧250Vでの半導体デバイスpn接合観察像

4. 検出系の特徴

ULTRAシリーズのSEMは前述の光学設計に加え、鏡筒内に光軸対称に配置した反射電子検出器（EsB：Energy selective Backscatter electron detector）を有し（図2）、対物レンズ直上の環状二次電子検出器のホールを通り抜ける反射電子（高角度散乱された電子）を検出する。さらに、これらの検出器に電子が入る直前に電極に逆バイアスをかけて、低いエネルギーの電子が検出器に入射するのを防ぐ機構も備える。これにより、高角度で散乱された反射電子をエネルギー選択しつつ検出することが可能になっている。また、検出器が鏡筒内に配置されていることにより、WDの制限も非常に少なくなり、低加速電圧領域における反射電子観察も可能である³⁾。図4はアルミニウム基板上に陽極酸化皮膜を形成した試料であるが、加速電圧が1.0kVと低いため導電コーティング処理の必要がなく、EsBによる組成強調コントラストに悪影響を及ぼさない。試料の最表面の約100nmはBを2%ドーピングしており、平均原子番号の差は $Z < 0.05$ であることがわかる。このように、軽元素物質同士で構成された試料に対しても低加速電圧条件で反射電子像を観察することによって、その分布を組成強調コントラストとして観察することが出来る。

またUltra55はもう一つ反射電子検出器（AsB：Angle Selective Backscattered Electron Detector）を搭載している。EsBが高角度散乱反射電子を検出するのに対して、AsBは極低角度散乱反射電子を検出することが可能である。低角度散乱反射電子は表面の凹凸ならびにチャンネルングコントラストと呼ばれる結晶の方位情報を持っており、それを検出することによって結晶粒内のサブグレインなどを判別することが可能である。

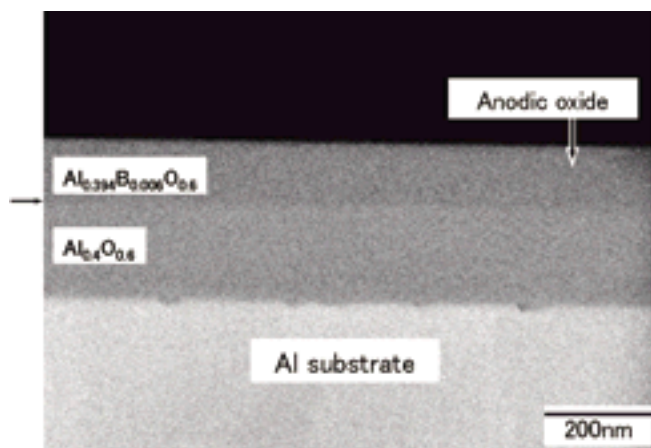


図4 Al基板上の Al_2O_3 (2% B Dope) 皮膜の断面観察像 (1kV)

TEMは高分解能観察は得意であるものの、一度に観察できる領域が非常に狭い。高分解能観察したい場所が試料全体に「均等」に分布しているのであれば問題はないが、それがごく局所的にしか存在しない場合、大量の連続撮影を行わなくてはならない。Ultra55では低倍率でEsBによる「組成強調コントラスト」とSE像を「同時に」取得して局所的な観察場所を特定し、その場所を高分解能観察することが可能である。

EsBによる組成強調コントラストだけでは観察箇所がどのような元素で構成されているかを同定することはできない。しかしながら、試料をEsBとEDSで観察し、組成強調コントラストと元素の対応をひも付けしておけば、長時間かかるEDS面分析に頼らなくても、二次電子線像と「同時に（すなわち高速に）」取得できるEsBだけで組成分布等を考察することも可能である。またEDSの分解能は1～数 μm 程度といわれているが、Ultra55に増設したEDSでは最小31nmという分解能を得たという事例もある⁴⁾。

5. まとめ

光学系と検出系が相補するシステムを持つGeminiカラムは、安定して低加速電圧領域での観察が可能であり、単に最表面観察を容易にするだけでなく、スループットや扱いやすさにおいても非常にユニークである。SEMはビーム径によって定義される高分解能観察性能に重きを置かれる面があるが、それに留まらず高コントラストによる“情報”の取得機能の多様さも、これからは重要になるとと思われる。

参考文献

- 1) H. Jaksch. Field Emission SEM for true surface imaging and analysis, Materials World 1996.
- 2) 佐藤 馨、名越 正泰、濱田 悦男. 日本顕微鏡学会第59回学術講演会予稿集.
- 3) H. Jaksch, J-P. Vermeulen. Microscopy Today, Vol13, No.2, p. 8-10 (2005).
- 4) JFE技報, No.13, p. 103-105 (2006).
(<http://www.jfe-steel.co.jp/research/giho/013/pdf/013-20.pdf>で閲覧可能)

<http://www.jfe-tec.co.jp/analysis/physical03.html>も参考になる

お 知 ら せ

- (1) 中央分析センターでは、2007年7月より民間企業を対象とする「先端研究施設共用イノベーション創出事業【産業戦略利用】」を開始しています。詳細はHPをご覧ください。
- (2) 外部資金による利用料金支払いについて
中央分析センター（筑紫地区）では、科学研究費、受託研究費、協同研究費などの外部資金による支払いが可能です。（科学技術振興調整費を除く）。科研費の場合は、4月の交付申請書提出時、機器使用料の項目を記入して申請して下さい。伊都分室では本年4月から支払いが可能になります。
- (3) 「ネットワーク物性解析システム」について
センターニュース98号でお知らせしましたように、データ解析用のノートパソコンの貸し出しを行います。利用にあたってはHPより「解析PC利用申込書」をダウンロードしてご提出下さい。また利用時の留意事項を熟読の上、ご利用下さい。

解析ソフトセットアップ一覧

管 理 部 署 PC番号 ソフト種類	中央分析センター筑紫地区					中央分析センター伊都分室（伊都地区）				
	BUNSEKI 01	BUNSEKI 02	BUNSEKI 03	BUNSEKI 04	BUNSEKI 05	BUNSEKI 06	BUNSEKI 07	BUNSEKI 08	BUNSEKI 09	BUNSEKI 10
N M R	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
単結晶X線 構造解析	○ 325-036-R		○ 320-780-R		○ 325-035-R					
粉末X線 データベース									○	○
F T - I R	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
A F M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F E - S E M						○	○	○	○	○
熱 分 析						○	○	○	○	○
S E M - E D X						○	○	○		
X G T						○	○	○	○	○
Office 2003	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Internet Security 2008	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

登 録 装 置 募 集 中 で す

中央分析センターでは、全学的な分析機器の共同利用の一層の充実を図るため、随時「登録装置」を募集しています。

登録装置 Q and A

- **利用料金は？**／各研究室で自由に設定できます。全額研究室に移算されます。
- **利用料金の計算は？**／利用料金の計算及び移算手続きは分析センターが代行します。
- **装置の設置場所は？**／現在設置されている場所です。移動する必要はありません。
- **負担が大きくなるのでは？**／負担分を考慮して、利用経費を設定して下さい。
- **面倒では？**／否定はできませんが、全学的視点から装置が効率的に利用でき、学内の相互協力の実現というメリットをご考慮いただければ幸いです。
- **手続きは？**／登録装置システムにご賛同いただけましたら、「装置登録依頼書」（用紙はダウンロードするか、センターに要求して下さい）に必要事項をご記入の上、分析センターへお送りいただくだけです。

九州大学中央分析センターニュース

第99号 平成20年1月31日発行

九州大学中央分析センター（筑紫地区）

〒816-8580 福岡県春日市春日公園6丁目1番地
TEL 092-583-7870/FAX 092-593-8421

九州大学中央分析センター伊都分室（伊都地区）

〒819-0395 福岡市西区元岡744番地
TEL 092-802-2857/FAX 092-802-2858

ホームページアドレス <http://www.bunseki.cstm.kyushu-u.ac.jp>