<総説>

(受理: 平成 20 年 3 月 14 日)

FTIR-ATR イメージング法による微小域の分析
Analysis of Small Area with FTIR-ATR Imaging大西 晃宏*
Akihiro OHNISHI

1. はじめに

赤外分光分析法^{1~7)}とは、材料の同定、定量、反応機構の解明や構造解析が行える一般的な手法である。特に有機官能基の定性、定量分析が得意である。赤外分光分析法は赤外線を照射された材料が赤外線のエネルギーを吸収して、分子振動の変化を起こすという特徴を利用した方法である。原理を簡単に説明する。試料に赤外線を照射すると、分子振動の中でも双極子モーメントの変化を起こす場合に分子は赤外線を吸収する。この分子固有の振動数に伴う赤外線吸収度を測定している。

近年、IR は数 μm あるいはそれ以下の微小点の分析能力が求められている。その要因は、研究対象物や市場の製造品が微小化したことや製造品の高品質化のためであると目される。製品の微小化に伴ってその異物も今まで以上に小さいものまでが対象とされていく。このような理由もあって、IR は微小点の測定技術が開発されていき、現在では数 μm の空間分解能を有する製品が販売されている。

2. 赤外分光分析装置の歴史

赤外分光分析法は古い歴史を持ちながら、今日においても最先端の分析法として用いられている。初めて市場に登場した赤外分光分析装置は 1942 年に Beckman 社から発売された IR-1 である⁸⁾。その後、Perkin-Elmer 社から 1944 年に世界初の自記式の装置 Model 12 (測定技術に長けた研究者向け)、一般向けの Model 21 (図 1) が発売され、それ以降 IR は一般的な分析装置として扱われ続けている。これらの装置は分散型と呼ばれ、現在主流のフーリ

図 1 赤外分光分析装置 Model 21 (Perkin-Elmer 社 since 1950)

大西 晃宏

略歴: 2001年 湘南工科大学大学院
工学研究科 材料工学専攻
修士課程修了
2002年 株式会社パーキン
エルマージャパン 応用研究部
入社
現在 (株)パーキンエルマージャ
パン 分析機器事業部 分子
分光分析プロダクト 応用研
究チームリーダー
大学・大学院ではバラ系アラ
ミド繊維に新規表面処理を施
して、その新規表面処理が及
ぼす繊維強化複合材料への力
学特性について研究を行って
いた。その後、分析メーカー
へ入社し、FTIR の分析者と
して高分子、半導体、電気電
子、製薬、生化学など全分野
の分析業務に関わっている。
趣味: バイク、映画鑑賞 (特に邦画)

* (株) パーキンエルマージャパン 分析機器事業部
神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町 134 横浜ビジネスパーク
テクニカルセンター 4 階 〒240-0005
Perkin Elmer Japan Co., Ltd
Technical Center 4F, Yokohama Business Park 134,
Godo-cho, Hodogaya-ku, Yokohama, 240-0005, Japan

エ変換赤外分光分析装置 (FTIR) が市場に登場したのは 1960 年代後半である。FTIR はその後徐々に普及し、1980 年代後半にはほとんどが FTIR に変わった。現在 FTIR は市場の 95% 以上を占めている。

FTIR は様々な著書^{1~7,9~10)}や研究雑誌で活躍しており、分野を問わず幅広く研究に用いられている。最近では特に微小物や微小領域の分析に用いられる傾向にある。微小物の分析には本体の FTIR 装置に顕微鏡システムを取付けた顕微 IR が一般的である。顕微 IR は分散型 IR の時代から販売されている。世界初の顕微 IR は 1954 年に Perkin-Elmer 社から発売された¹⁰⁾。現在の顕微 IR は $10\mu\text{m}$ 程度の微小物も測定できる高性能なものになっている。これは中赤外の波長 $2.5\text{--}25\mu\text{m}$ (波数 $4000\text{--}400\text{cm}^{-1}$) を考えると驚異的なものである。

3. 顕微 IR 法

先に述べたように、顕微 IR 法は微小点の分析を行う方法である。微小点の分析と云っても、無制限に焦点を絞れる訳ではない。顕微 IR の場合、光は光学系 (レンズ、ミラー、カセグレン鏡、ピンホールなど) を通過する。これらの光学系が空間分解能に依存する。空間分解能には光の回折現象として知られるエアリーディスクの大きさが関係してくる¹¹⁾。エアリーディスクの大きさ q は次式 (1) で定義される。

$$q = 1.22f\lambda/D \quad (1)$$

f はカセグレン鏡の焦点距離、 λ は光の波長、 D はカセグレン鏡の直径である。レイリー判断基準¹²⁾によれば、空間分解能の限界値 Δd は次式 (2) で示される。

$$\Delta d = 1.22f\lambda/D = 1.22\lambda/2NA \quad (2)$$

ここで、 D/f はカセグレン鏡の F 値であり、開口数 (NA) とは $F=1/2NA$ の関係にある。

顕微 IR のカセグレン鏡の開口数を 0.6 として計算すると、

$$\Delta d = 1.02\lambda \quad (3)$$

となり、推測される空間分解能の限界値は波長とほぼ同じになる。

したがって、各波数 (波長の逆数) での推定空間分解能は図 2 のようになる。しかし、この理論計算だけで空間分解能を求めることはできない。実際の測定ではアパーチャによってマスキングを行うので、このアパーチャ部分での回折現象なども影響する。

例えば、 1000cm^{-1} のときに推定される空間分解能の限界値は $10\mu\text{m}$ であるが、アパーチャを $10\mu\text{m}$ に設定しても、アパーチャで光の回折 (回り込み) が起こり、 $10\sim 20\%$ 程度の余分な光が検出される。

他にも空間分解能にはサンプルの厚みも影響する。顕微 IR の入射光は角度を持つので、サンプルの厚みに伴って

図 2 波数 (波長) に伴う推定空間分解能

表 1 顕微 IR 装置の性能

	顕微反射	顕微透過	顕微 ATR
サンプル形状	1) ミラー上の薄膜 2) 形状問わず	薄片 ($<10\mu\text{m}$ が望ましい)	ある程度形状問わず
バックグラウンド	ミラー	1) 窓板 (赤外透過材料) 2) 空気	空気
最高空間分解能	$10\mu\text{m}$	$10\mu\text{m}$	$5\mu\text{m}$
測定波数領域	$7800\text{--}600\text{cm}^{-1}$	$7800\text{--}600\text{cm}^{-1}$	$4500\text{--}650\text{cm}^{-1}$

* PerkinElmer 社製 Spotlight™ 400

目的より広い領域の情報が得られる。

以上のことを考慮すると、 $10\mu\text{m}$ の微小点を測定する際には、さらに小さなアパーチャサイズの設定が必要となる。ただし、これ以上アパーチャを絞れば赤外光のエネルギーがほとんど検出されなくなり、測定自体ができなくなるおそれがある。

ここまで理論的なことを述べてきたが、実際の顕微 IR 装置は非常に高感度であり、高い空間分解能を示している。表 1 には筆者の経験から推測した実機の空間分解能を示した。他にも、透過、反射および ATR 法について、測定上必要であると思われるサンプルの形状や測定可能な波数領域の情報も示したので参考にして欲しい。

4. IR イメージング法

IR イメージング法は顕微 IR の発展型とも云える。顕微 IR はサンプル情報を取得する検出素子が 1 つである。それに対して、IR イメージングは複数の検出素子を使用している^{13,14)}。したがって、IR イメージング法では一度

に複数のサンプル情報（スペクトル）を得ることができる。この特殊な検出素子（リニアアレイ MCT 検出素子）を用いてサンプルを2次元的にサーベイして、赤外情報による2次元イメージ（IR イメージ）を取得する。IR イメージはIR ピークの強度、面積や強度比など様々なパターンのイメージ像に変換できる。

IR イメージングは可視的に材料を評価できる非常に理解されやすい分析手法であり、今までの顕微 IR の常識を覆すような画期的なものであった。特に 2001 年に PerkinElmer 社（米国）から発表された高速 IR イメージングシステムはラビッドスキャン方式の干渉計を採用して、機能だけではなく性能的にも顕微 IR よりはるかに優れた装置である^{15~17)}。実際に IR イメージングは顕微 IR と比べて、高い SN 比を示し、空間分解能も高くなっている^{13,14)}。

本報では IR イメージング装置として PerkinElmer 社製の Spotlight™ 400 について記述する。IR イメージング法は透過法と反射法が行える^{13~17)}。また、2006 年に発表された PerkinElmer 社製の ATR イメージングアクセサリを取り付けることによって ATR イメージング法も行

うことができる^{18~20)}。

透過・反射 IR イメージング法では IR イメージを形成する1つのピクセル（1ピクセルは1つのスペクトルで構成される）は $6.25\mu\text{m} \times 6.25\mu\text{m}$ 、 $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ あるいは $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ の3つのサイズから選択できる。最小ピクセルサイズを使用した場合には $5\mu\text{m}$ 程度のサンプル測定に成功している。さらに、Spotlight™ 400 は測定面積を任意に設定でき、 $50\text{mm} \times 50\text{mm}$ までの広範囲イメージ測定が可能であり、測定波数領域も $4000\text{--}650\text{cm}^{-1}$ を実現している。IR イメージングの応用分野は多彩で、高分子工業、食品、生化学、医療、医薬品など様々である。その一部を紹介する。

図3で紹介した分析例はマウスの頸骨の切片である。頸骨の透過 IR イメージング測定を行った。図の IR イメージは $4.5\text{mm} \times 3.5\text{mm}$ の領域が $25\mu\text{m}$ ピクセルに分割され、23,000 スペクトルによって形成されている。このように、IR イメージング法は広範囲に渡って赤外情報の分布を示すことが容易にできる。その他にも異物分析、積層材料、変性領域の分析例など多くの発表がされている^{18~27)}。

図3 マウスの頸骨の透過 IR イメージング例；(a) 可視画像，(b) IR イメージ，(c) IR スペクトル

図4 透過/反射の集光図 (a) と ATR の集光図 (b)

5. FTIR-ATR イメージング

上述したように, Spotlight™ 400 には ATR イメージングアクセサリを取り付けることができる。ATR イメージングとはサンプルに ATR クリスタルを接触させたまま IR イメージングを行う手法である。

ATR イメージング法の最大の特長は透過あるいは反射法では測定ができないサンプルの測定を可能にすることである。さらに, 高屈折率の ATR クリスタルを用いることによって空間分解能を向上させることができる。

現在のところ, ATR イメージングの原理は2通り存在する²⁸⁾。一つは六角形のヘキサゴナルクリスタルを用いた方法, もう一方は半球型のクリスタルを用いた方法である。PerkinElmer 社の ATR イメージングアクセサリは半球型 ATR クリスタルを採用している。また, 半球型クリスタルを独自に開発して性能を向上させている。この半球型 ATR イメージングアクセサリを用いた場合の特長を以下に挙げる。ただし, ここに記している特長は Spotlight™ 400 と組み合わせた場合である。

半球型 ATR イメージングアクセサリの特長;

- i) 空間分解能が向上する (ピクセルサイズ: $1.56\mu\text{m}$)
- ii) $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ の広範囲測定ができる
- iii) 可視画像とはほぼ一致した ATR イメージを取得できる

この特長のうち空間分解能の向上について説明する。ATR イメージングによって空間分解能が向上する理由は ATR クリスタルに高屈折率の Ge クリスタル (屈折率 4.0) を用いたからである。空間分解能が赤外波長に大きく依存されることは式 (3) によって示されている。この時, 屈折率 n_1 の中の波長 λ_1 は λ_0/n_1 となることを考えると, Ge クリスタル中の赤外波長は $1/4$ となる。この原理を利用して空間分解能を向上させることができる。

図4にサンプルへ赤外光を照射した時の集光模式図を示す。透過および反射の場合 (図4(a)), 赤外光の波長によって集光点の大きさは制限を受ける。ATR クリスタルを用いればその集光点を小さくすることができる。Ge ク

表2 IR イメージング装置の性能

	反射イメージング	透過イメージング	ATR イメージング
サンプル形状	1) ミラー上の薄膜 2) 形状問わず	薄片 ($<10\mu\text{m}$ が望ましい)	平面
バックグラウンド	ミラー	1) 窓板 (赤外透過材料) 2) 空気	空気
最高空間分解能 (設定最小ピクセルサイズ)	$10\mu\text{m}$ ($6.25\mu\text{m} \times 6.25\mu\text{m}$)	$10\mu\text{m}$ ($6.25\mu\text{m} \times 6.25\mu\text{m}$)	$3\mu\text{m}$ ($1.56\mu\text{m} \times 1.56\mu\text{m}$)
測定波数領域	$7800\text{--}650\text{cm}^{-1}$	$7800\text{--}650\text{cm}^{-1}$	$4500\text{--}680\text{cm}^{-1}$
最大測定面積	$5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$	$5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$	$400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$

* PerkinElmer 社製 Spotlight™ 400

リスタルの屈折率 4.0 によって赤外波長を $1/4$ にすると同時に半球型 Ge クリスタルを集光レンズとして利用すれば, 図4(b)のように, 光学系を変えずに透過や反射測定の時よりも集光点を小さくすることができる。このようにして, 半球型 ATR イメージングアクセサリは空間分解能を向上させている。最終的には Spotlight™ 400 と半球型 ATR イメージングアクセサリの組み合わせはピクセルサイズを $1.56\mu\text{m}$ まで小さくすることができている。表2にイメージング法の空間分解能などを示した。表からわかるように, ATR イメージング法の空間分解能は透過, 反射イメージング法と比べて飛躍的に向上する。

6. ATR イメージングの実例

前節では ATR イメージングの概要について説明した。ここでは ATR イメージング法によるサンプルの分析例を示す。

6.1 反射イメージングと ATR イメージングの比較

サンプルにはシリカ粒子を含有したポリエチレンフィルムを用いた。シリカ粒子は数 μm から数十 μm の粒径を持つ。サンプルはフィルムが厚く透過測定は行えないため,

(a) 反射IRイメージング法

(b) ATRイメージング法

図5 反射IRイメージング法(a)とATRイメージング法(b)のIRスペクトル

反射とATRによるイメージング測定を行った。測定面積は $300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ とした。反射IRイメージング法では $6.25\mu\text{m}$ ピクセルサイズ, ATRイメージング法では $1.56\mu\text{m}$ ピクセルサイズによって測定を行った。それぞれのイメージング測定の結果, 図5に示すようなIRスペクトルが得られた。反射IRイメージング法では明らかに解析が困難なスペクトルが得られている。一方, ATRイメージング法では良好なスペクトルが得られ, 測定場所によってはシリカの Si-O-Si ピーク (1100cm^{-1}) が検出されている。図6にシリカ粒子 (Si-O-Si ピーク) の分布図の一部を拡大して示した。ポリエチレンフィルム中のシリカ粒子の分布像が明瞭にされたことがわかる。今回は特に ATR イメージングを行ったことによって微小な $2\sim 3\mu\text{m}$ のシリカ粒子も検出することができた。

このように, 混合物中の微粒子についても検出でき, 従来の顕微IRとは比べ物にならないほどの空間分解能を示していることが証明された。

図6 シリカ粒子のIRイメージ(3D表示)

6.2 ATR イメージングによる多層フィルムの層構造分析

本項では ATR イメージングを用いて, 多層フィルムの層構造分析を行った。

サンプルには食品用包装フィルム(4層)を用いた。このフィルムを市販のナイフで切断して断面出しを行った。その断面を ATR イメージングによって測定した。図7に

図7 ATR イメージング法による積層材料各層のIRスペクトル;

(a) ポリプロピレン, (b) 塗膜成分, (c) ポリエステル,
(d) ポリエチレン, (e) エチレンビニルアセテート

図8 各層の分布イメージ；(a) ポリプロピレン，(b) 塗膜成分，(c) ポリエステル，
(d) ポリエチレン+エチレンビニルアセテート，(e) エチレンビニルアセテート

はATRイメージングデータから抽出した各層のスペクトルを示す。各層の成分を的確に捉えてスペクトルを検出していることがわかる。今回の分析結果は4層のフィルムの他に塗膜層まで検出することができた。それぞれの層は図の上側から順にポリプロピレン，塗膜成分，ポリエステル，ポリエチレン，エチレンビニルアセテートであった。図8に各層の分布をイメージ化した。このように，特別な前処理をせずに10 μm 以下の層が正確に検出できることが証明された。以上のことから，ATRイメージング法を用いれば，僅か10 μm 以下の厚みであっても，簡単な前処理で多層，多成分の分布が解析でき，視覚化できる。

7. まとめ

ATRイメージング法は顕微IR法や透過，反射IRイメージング法と比べて空間分解能が飛躍的に向上する。ATRイメージング法の開発によって今まで分析できなかった数 μm のサンプルや透過，反射測定ができないサンプルの分析も可能になり，FTIRの応用用途もこれまで以上になると期待される。

最後にマウスの頸骨を分析するにあたってサンプルをご提供下さいました(株)クレハ分析センターの大和英之博士に感謝致します。

参考文献

- 田中誠之，飯田芳男，機器分析，裳華房(1993)。
- 小川雅彌ら，第2版 機器分析のてびき(1)，化学同人(1996)。
- (社)日本分析化学会 高分子分析研究懇談会，新版 高分子分析ハンドブック，紀伊國屋書店(1995)。
- 平石次郎ら，日本分光学会 測定法シリーズ10 フーリエ変換赤外分光法—化学者のためのFT-IR，学会出版センター(1985)。
- 田隅三生，FT-IRの基礎と実際，化学同人(1986)。
- 錦田晃一，岩本令吉，赤外法による材料分析，講談社(1986)。
- 中田宗隆，なっとくする機器分析，講談社(2007)。
- A. O. Beckman, W. S. Gallaway, W. Kaye, W. F. Ulrich, "History of Spectrophotometry at Beckman Instruments, Inc." *Anal. Chem.* 49(3), 280 A-300 A. (1977)。
- A. Lee Smith, "Applied Infrared Spectroscopy", John Wiley & Sons, Inc. (1979)。
- Robert G. Messerschmidt, Matthew A. Harthcock, "Infrared Microspectroscopy: Theory and Applications", MARCEL DEKKER, Inc. (1988)。
- E. Hecht and A. Zajac, *Optics*, Addison-Wesley pub., 329 (1974)。
- G. B. Airy, *Trans Camb. Phil. Soc.* 5, 283 (1835)。
- (株)パーキンエルマージャパン, *PolyFile*2003, 40(476), 32-35 (2003)。
- 西尾悦雄，榛葉明日香，大西晃宏，木村史子，実用分光法シリーズ 顕微赤外分光法，アイビーシー，180-203 (2003)。
- P. R. Griffiths, J. A. de Haseth, "Fourier Transform Infrared Spectrometry" Wiley-Interscience (1986)。
- R. A. Hoult, Bethel, Conn. U.K. Patent 2163548 (1986), U.S. Patent 4881814 (1988)。
- R. A. Hoult, R. A. Spragg, "Comparing Approches to FT-IR Imaging" Eastern Analytical Symposium and Exposition (2001)。
- G. V. Dalen, P. C. M. Heussen, R. D. Adel, R. B. J. Hoeve, "Attenuated Total Internal Reflection Infrared Microscopy of Multilayer Plastic Packaging Foils" *Appl. Spec.*, 61(6), 593-602 (2007)。
- B. M. Patterson, G. J. Havrilla, C. Marcott, G. M. Story, "Infrared Microspectroscopic Imaging Using a Large Radius Germanium Internal Reflection Element and a Focal Plane Array Detector" *Appl. Spec.*, 61(11), 1147-1152 (2007)。
- 大西晃宏, *PolyFile*2007, 44(524), 32-35 (2007)。
- 榛葉明日香，大西晃宏，木村史子，辻井哲也，森本光彦，恩田宣彦，清水一郎，岡林博文：2003年高分子年次大会発表要旨集，52 (2003)。
- F. Kimura, A. Shimba, A. Ohnishi, M. Morimoto, N. Onda, *Proc. of the 1st International Cellulose Conference*, 94 (2002)。
- 小林正敏，原久仁子，秋山康博，大西晃宏，第22回日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集，22 (2004)。
- 大西晃宏，森本光彦，西尾悦男，高須賀信夫，津田洋幸，前田満和，恩田宣彦，日本鑑識科学技術学会誌，9, 15 (2004)。
- A. Rodriguez-Casado, I. Alvarez, A. Toledano, E. De Miguel, P. Carmona, "Amphetamine Effects on Brain Protein Structure and Oxidative Stress as Revealed by FTIR Microspectroscopy" *Biopolymers*, 86(5-6), 437-446 (2005)。
- P. Spencer, Y. Wang, J. L. Katz, A. Misra, "Physicochemical interactions at the dentin/adhesive interface using FTIR chemical imaging" *J. Biomed. Opt.*, 10(3), 031104/1-031104/11 (2005)。
- K. Hara, M. Kobayashi, Y. Akiyama, "Influence of bone osteocalcin levels on bone loss induced by ovariectomy in rats" *J. Bone Miner. Metab.*, 25, 345-353 (2007)。
- L. L. Lewis, A. J. Sommer, *Appl. Spec.*, 54(2), 324-330 (2000)。