

Readout

HORIBA Technical Reports

創刊記念号 地球環境をはかる

July 1990 ■ No.1

顕微専用フーリエ変換 赤外線分光光度計 (FT-530)

An Innovative Fourier-Transform Infrared
Spectrophotometer Designed Especially for
Use with Microscopes : Horiba FT-530

池田昌彦・右近寿一郎・中田 靖

Masahiko IKEDA, Jyuichiro UKON, Yasushi NAKATA

(Pages57-65)

株式会社 堀場製作所

顕微専用フーリエ変換赤外線分光光度計(FT-530)

An Innovative Fourier-Transform Infrared Spectrophotometer Designed Especially for use with Microscopes: Horiba FT-530

池田昌彦・右近寿一郎・中田靖
Masahiko Ikeda, Juichiro Ukon, Yasushi Nakata

要 旨

フーリエ変換赤外線分光光度計に赤外顕微鏡を取り付け、微小な試料を測定する赤外顕微分光法は、5～6年前から注目され始めた。特に最近では、FTIRをさらに効率良く使用するために、顕微鏡とFTIRを一体化することが必要となってきた。今回、高性能、かつ操作が容易な顕微専用フーリエ変換赤外線分光光度計を開発した。本機は、微小領域を感度良く測定するための遮蔽用マスクを設け、このマスクの位置を観察するための光路を二分割することにより、スペクトルの測定領域が容易に観察できるようにした。さらに、カセグレン逆望遠鏡を用いたリレー光学系により測定光路長を短くし、水分や二酸化炭素ガスなどの影響を受け難くした。また、試料への入射光路と射出光路とをずらし、その間にATR結晶を設置することにより、0.7mm×1mmの微小なサンプルを全反射法を使って測定することが可能になった。

Abstract

The use of infrared microscopic spectrophotometry to measure very small samples or minute areas of a sample with a Fourier-transform infrared spectrophotometer (FTIR) has been a common practice in the field for the past five or six years.

Recently, demands for greater ease of use have made it necessary to integrate the microscope and FTIR into a single unit.

Horiba has developed a high-performance, easy-to-handle Fourier-transform infrared spectrophotometer specially for use with microscopes. The unit is provided with a cut-off mask to perform sensitive measurements in very minute ranges.

By dividing the light path into two in order to view the area to be measured, the measurement range of the spectrum can be easily determined.

In addition, an inverse telescope in the relay optical system shortens the infrared radiation path in order to reduce the influence of atmospheric moisture or carbon dioxide.

Furthermore, by placing an ATR crystal between the staggered path of the incident optics and objective optics it becomes possible to measure minute samples on the order of 0.7mm × 1mm using the attenuated total reflection method.

1. はじめに

最近、微小な物質の解析は、例えば、電子材料における微小部分の物質の同定や薬剤の断面の配合状態の管理¹⁾などの製造工程における品質管理、麻薬など痕跡結晶の鑑識や単繊維の配向性の研究など、幅広い分野で要求されている。このためには、可視光領域における分光学的手法としては顕微分光法や蛍光顕微分光法などがある。これらは分光素子や検出器の高性能化、とくに電荷結合素子 (Charge Coupled Device : CCD) の高感度化と分解能の向上により広く普及している。これに対し、顕微鏡による赤外スペクトルの測定はまだ十分には一般化していない。

顕微鏡による微小部分の観察とその赤外スペクトルを得ようとする試みは1940年代にはすでになされており、Bareは1949年に生体組織スペクトルに関する報告を行っている²⁾。とくに10年ほど前からは、光の利用効率が高いFTIRが普及するに伴い、また、高感度に赤外光を検出することができる水銀-カドミウム-テルル検出器 (Mercury Cadmium Telluride: MCT) が採用され始めることにより急速に実用化されてきた。

米国では1988年に Messerschmidt らによる FTIR/顕微分光法に関する単行本が出版された³⁾。また、B. Roush は装置に関することから偏光顕微測定、半導体および生物試料や、薬品関係の分析例についても紹介している⁴⁾。

赤外顕微鏡の場合は、可視域の顕微鏡と異なり、酸化物系のガラスレンズを用いて拡大像を作ることができない。このために、光の反射を使った顕微光学系が使われている。さらに実用上は操作性も非常に重要である。

従来は、汎用 FTIR に赤外顕微鏡を取り付けて微小試料の赤外スペクトルを測定していた。ところが、赤外顕微鏡の検出器の受光面は直径0.1mm程度であり、FTIRの光路に顕微鏡を取り付け光路を正確に合致させることが難しい。このために汎用 FTIR としてでなく、赤外専用顕微鏡として使われているのが実態である。

新しく開発した顕微専用 FTIR 『FT-530』は、測定光路を出来る限り短くし、大気中の水分や二酸化炭素ガスによる吸収を除くための窒素ガス置換が短時間で出来るようにした。このために、迅速な測定が可能となった。

また、赤外顕微鏡は、試料の赤外スペクトル測定に必要な部分以外の赤外光を除去するためにマスクを設ける必要がある。本機では、マスク部の可視化を行うことにより測定操作の能率向上を計った。

さらに、試料に対する入射光路と射出光路とをずらし、その間に ATR 結晶を設置することにより顕微/ATR 測定も可能とした。

本稿では、FT-530 の特徴、構成、機能、および分析例について報告する。

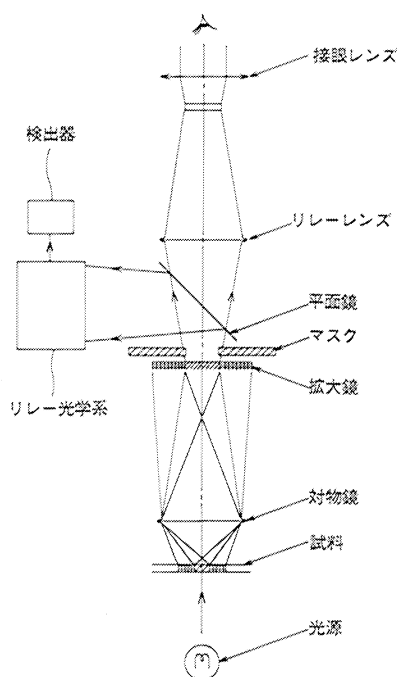


図1 一般的な赤外顕微鏡光学系
Typical optical system used in infrared microscopes

2. 原理と構成

2.1 全体構成

顕微分光測定装置は、図1に示す様に、顕微鏡により測定試料の拡大像を得、その拡大像の中からある特定の部分の分光スペクトルを測定する分光装置である。

試料が複数の物質から構成されている場合は、この拡大像全体の分光測定を行うと、観察視野全体の混合スペクトルが測定されてしまうことになる。したがって、顕微分光測定では近接する領域の分光スペクトルの混合を防ぎ、目的とする

領域のみの分光スペクトルを得るために像面に赤外光遮蔽マスク（以下マスク）を置く。このようにして測定視野を限定した光束はリレー光学系を介して赤外光検出器に導かれる。

顕微分光測定には透過法と反射法とがある。透過法では、干渉計から得た赤外光は試料の下部に位置する集光鏡を介して試料面に集光される。試料を透過した光束は対物鏡で拡大像を結像し、この結像面に置かれたマスクを通った光だけがリレー光学系を介して検出器に導かれる。

一方、反射法では図2に示す様に、干渉系から得た光束は顕微鏡上部に導かれ、ハーフカットミラーにより測定光束の1/2だけが反射され、対物鏡を介して試料面に集光される。試料で反射された光は、対物鏡を介して平行な反射光束となる。この反射光束はハーフカットミラーの残る部分を通り、リレー光学系を介して検出器に導かれる。

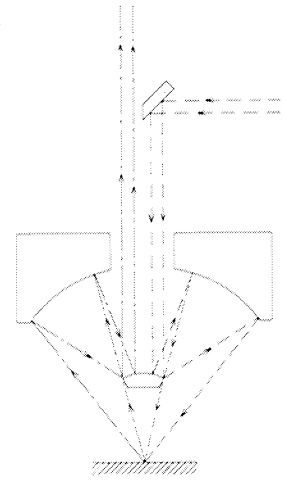


図2 対物鏡による反射法
Reflection method using objective lens

2.2 対物鏡と集光鏡

対物鏡は2枚の反射鏡により構成されており、拡大像を作るために用いる。試料から射出した光束は、凹面鏡（主鏡）で反射し収束光となり、凹面鏡（副鏡）に入り、ここで反射して拡大像を作る。このような鏡の配置をカセグレン配置と呼び、顕微鏡の対物鏡としては、図3に示す主鏡と副鏡の曲率中心を一致させたシュバルツシルド型が見つかわれる。このように反射鏡だけで構成されているために、色分散のない高倍率な顕微鏡となる。

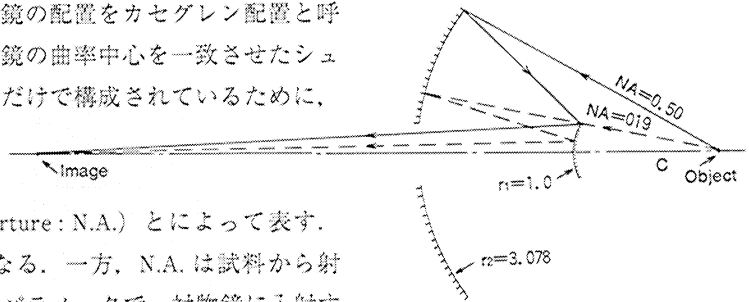


図3 シュバルツシルド型対物鏡
Cassegrain type objective lens

対物鏡の性能は倍率と開口数（Numerical Aperture: N.A.）とによって表す。倍率は（拡大像の大きさ）／（試料の大きさ）となる。一方、N.A.は試料から射出した光がどれだけの効率で結像されるかを示すパラメータで、対物鏡に入射する光線の最大角度 α の1/2の正弦（ \sin ）に媒質の屈折率 n を乗じたもので、 $N.A. = n \sin(\alpha/2)$ となる。また、光学系の解像力はN.A.に正比例し、焦点深度はN.A.の2乗に反比例、像の明るさはN.A.の2乗に比例する。

カセグレン対物鏡では、試料から出た光束は主鏡に到達する前に一部が副鏡に当たり遮蔽される。このために得られる像の明るさが低下する。

集光鏡は透過測定の際に光束を測定試料に集光するためのもので、集光鏡のN.A.は対物鏡のN.A.に対して等しいか、もしくは大きくする必要がある。集光鏡も赤外光用としてはカセグレン鏡から成り立っている。

2.3 リレー光学系

対物鏡によって結像した赤外光はマスクを通過した後は発散する光束となる。一般に赤外線検出器は受光素子の大きさに反比例して検出特性が良くなる。この

(A) カセグレン対物鏡を用いたリレー光学系
Relay optical system using Cassegrainian objective lens

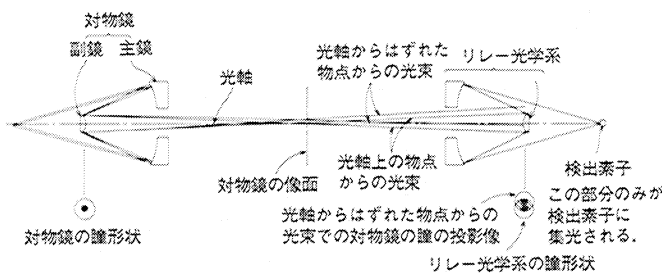
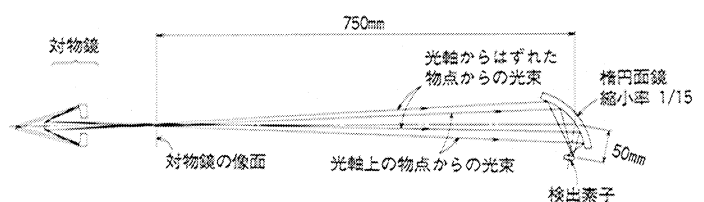


図4 リレー光学系
Relay optical system

(B) 楕円面鏡を用いたリレー光学系
Relay optical system using ellipsoidal lens



ため赤外光受光面の小さなものを使用される。この小さな受光面に効率よく赤外光を集光するための集光系がリレー光学系である。

リレー光学系には、従来からは、図4(A)に示すカセグレン対物鏡や、図4(B)に示す楕円面積が使用されている。ここで、前者は試料の光軸上からはずれた部分からの赤外光がカセグレンの副鏡の外に出てしまい、逆に副鏡を大きくすると、副鏡による遮蔽が大きくなって赤外光を効率よく検出器に導くことができなくなる欠点がある。一方、後者は副鏡による遮蔽はないが、楕円面積の長焦点側の距離が1m近くと光路が長くなり、結果として水分や二酸化炭素ガスの影響を受け易くなる欠点がある。そこで、出来る限り遮蔽率が小さく、かつ光路の短い光学系が必要となる。

以上の諸点を考慮して開発した顕微赤外分光光度計が、顕微専用フーリエ変換赤外分光光度計 FT-530 (以下 FT-530) である。主な仕様を表1に、外観を図5にそれぞれ示す。

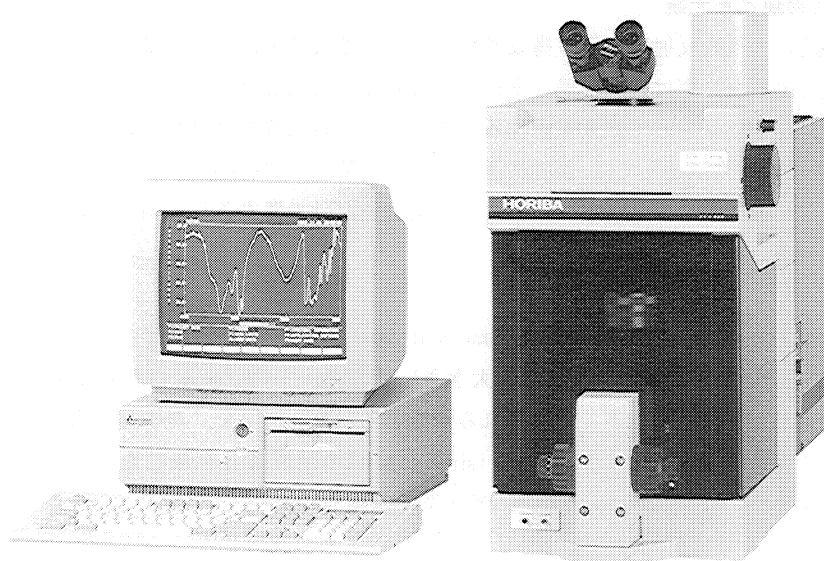


図5 FT-530の外観
The FT-530

● FT-IR 部	● データ処理部	● 顕微光学部
測定波数範囲：4000～700cm ⁻¹ 表示波数範囲：7800～200cm ⁻¹ 分解能：4 cm ⁻¹ , 16cm ⁻¹ 演算波数間隔：2cm ⁻¹ , 8cm ⁻¹ 演算波数精度：±0.01cm ⁻¹ ミラー走査速度：12.5mm/秒 測光レンズ：(透過率)フルスケール設定範囲0～300%T (吸光度)フルスケール設定範囲±5Abs 光学系：シングルビーム方式 干渉計：マイケルソン型 ビームスプリッター：Ge 蒸着膜 (KBr 基板) ミラー走査部：メカニカルベアリング方式 検出器：高感度検出器 (MCT) 光源：特殊金属発熱体 データサンプリング：He-Ne レーザ干渉信号使用	IBM PC/AT コンパチ汎用パソコン 20M バイトハードディスク標準装備 1.2M バイトフロッピーディスク標準装備 14インチカラーディスプレイ 6色カラープロッタ データ処理機能： ①高速フーリエ変換 (FFT) ⑥スムージング ②%T→ABS 変換 ⑨ピークサーチ ③クベルカ・ムンク変換 ⑩ベースライン補正 ④波数↔波長変換 ⑪微分 (1～5次) ⑤差スペクトル ⑫定量分析 ⑥四則演算 ⑬ライブラリーサーチ ⑦面積積分 (サドラー)標準装備	測光方式：透過・反射 (ワンタッチ切換方式) 分光測定・観察同一視野方式 (特許出願中) 測定視野：250～10μm 以下 (任意の角形) 対物鏡：16倍カセグレン (N.A.=0.4) 標準仕様 カバークラス厚み補正機能付 集光鏡：N.A.=0.4 標準仕様 試料ステージ：ストローク76×52mm 6インチ大型ステージ オプション 接眼鏡筒：双眼シーデン・トップ型 (視度調整付) 標準仕様 3眼鏡筒 オプション 外形寸法：(分析部) W335×D870×H685mm (演算部) W480×D460×H460mm 電源：AC100V 50/60Hz 800VA 重量：分析部 85kg 演算部 31kg オプション：モニターシステム (VTRカメラ・モニター) 写真撮影システム カラービデオプリンター

表1 FT-530の仕様
Specifications FT-530

3. 特長

3.1 測定／観察ワンタッチ切り替え

図6にFT-530の光学系の構成を示す。

透過法および反射法における赤外スペクトル測定と、可視光による試料観察のための光路をそれぞれを図7(A)および図8(A)に示す。顕微鏡部のミラーは全部で18枚から構成されており、固定ミラーは8枚であり、残る10枚は可動ミラーとなっている。

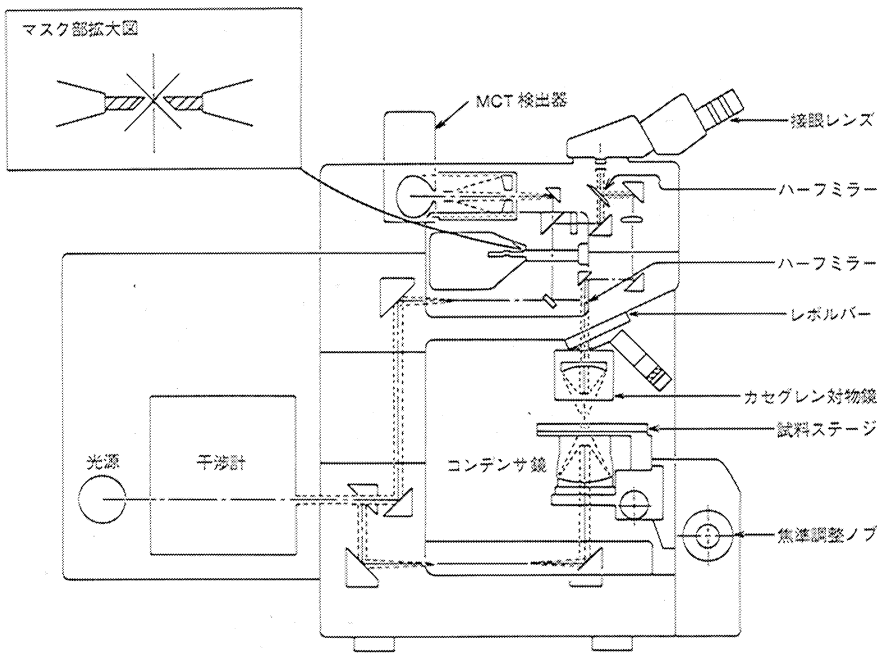


図6 FT-530の光学系の構成
Configuration of the optical system used in the Model FT-530

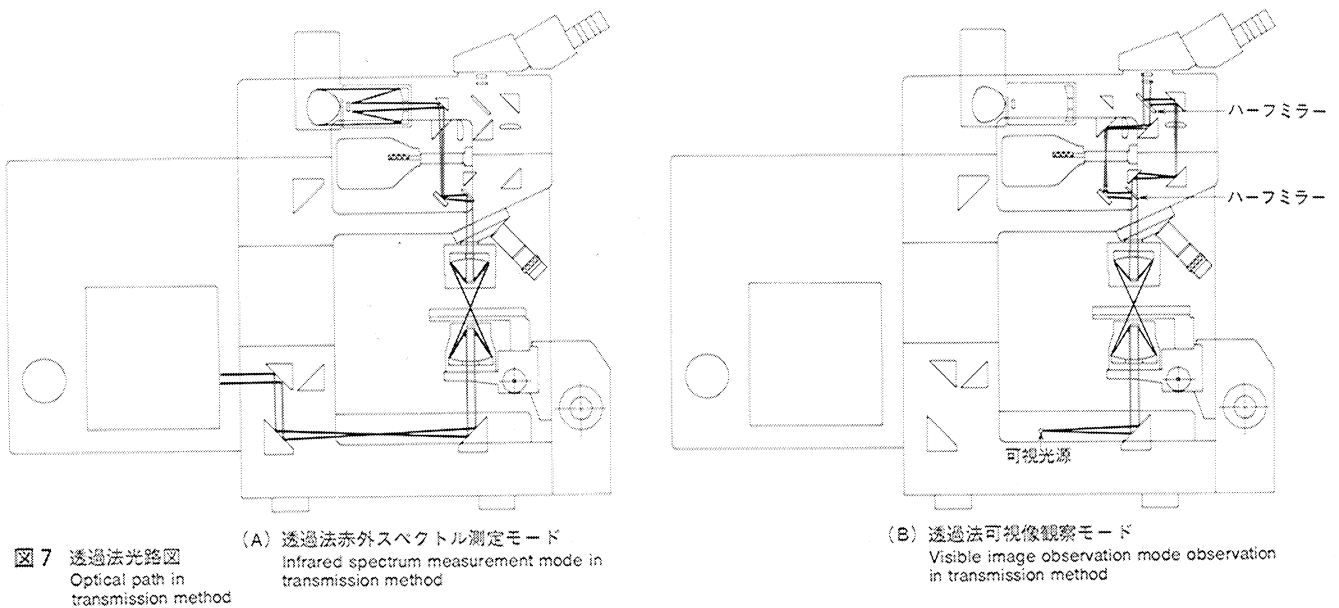


図7 透過法光路図
Optical path in transmission method

(A) 透過法赤外スペクトル測定モード
Infrared spectrum measurement mode in transmission method

(B) 透過法可視像観察モード
Visible image observation mode observation in transmission method

透過法と反射法それぞれに測定と観察のモードがあり、これらの4つのモードの選択は、10枚の可動ミラーを切り替えて行う。また、このミラー切り替えは電動モータを使って1つのダイヤル操作で簡単に行う。これらの機構を組み込むことによって迅速なスペクトル測定が可能となった。

3.2 View in View 方式

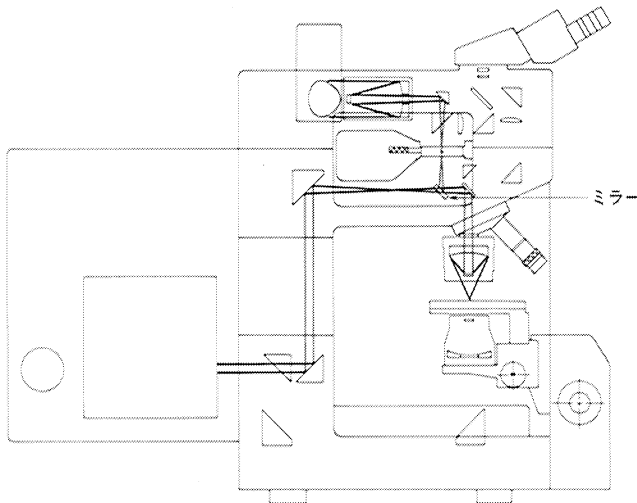
従来は、赤外スペクトル測定のためには目的とする測定部分を顕微鏡を覗きながら探し、不必要な部分にマスクをかけていた。このマスクは長方形のスリット構造で、各辺はナイフエッジの任意に動かせる機構となっている。所望の領域を測定するためには像面上のナイフエッジを移動させる。したがって、試料の測定部を $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ の領域に対して $\pm 10\%$ の精度でマスクをかけるためには、拡大率が160倍の場合には、ナイフエッジの設定は $160\mu\text{m}$ 以内の精度で行われなければならないことになる。

1つの試料で多点の測定を行うためには、そのたびにマスクの測定を繰り返し行わなければならない。従来は、ナイフエッジの駆動機構は顕微鏡の本体内部に設置され、空間的な制限があり、その操作は非常に手間がかかっていた。

一方、FT-530では図7(B)、図8(B)の可視モードの光路図に示すように、対物鏡を出た可視光の光束をハーフミラーで分割し、一方を赤外スペクトルを測定するためのマスク側に、他方をマスクのかからない光路に通し、それを再びハーフミラーで一つにするようにした。こうすることにより試料マスクによって遮蔽された試料の他の部分も顕微鏡下で直接観察できる。つまり、測定領域の可視化ができることとなった。これを我々は『View in View 方式』と名付けた。

(A) 反射法赤外スペクトル測定モード

Infrared spectrum measurement mode in reflection method



(B) 反射法可視像観察モード

Visible image observation mode in reflection method

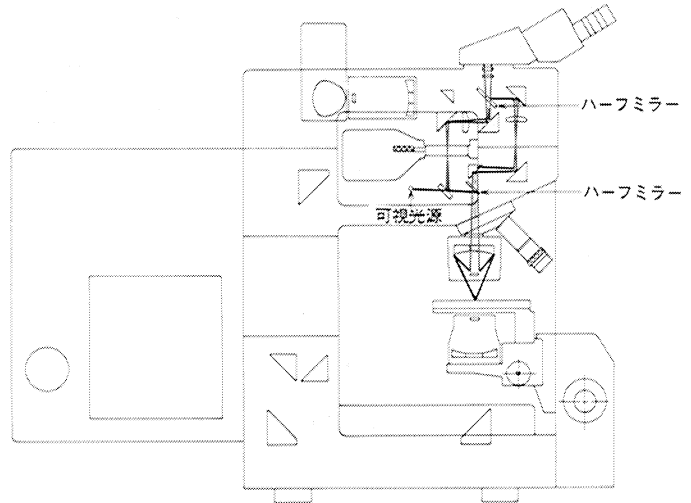


図8 反射法光路図

Optical path in reflection method

この方式を開発することにより、赤外スペクトル測定中のナイフエッジのマスクはそのままにして、試料ステージをX、Y方向に移動させることにより、容易に測定部分の変更をすることが可能となった。試料ステージの駆動機構は、ナイフエッジの可動機構に比べ、より精密な構造にすることが可能なため、測定部分の変動が迅速かつ簡単に行えるようになった。

図9に、『View in View 方式』が従来方式に比較し、測定対象部分を容易に確認できる様子を示す。

3.3 カセグレン逆望遠鏡

FT-530は図10に示すカセグレン望遠鏡を逆にしたリレー光学系により赤外光を検出器に導く方式とした。カセグレン逆望遠鏡を用いたリレー光学系は、カセグレン対物鏡を用いたリレー光学系に比べ、副鏡による遮蔽率が $1/2$ となる。

したがって、光軸からはずれた赤外光は、副鏡を大きくしても遮蔽されることが少なくなり、効率良く検出器へ導くことができ、ノイズの少ないスペクトルが得られるようになった。

また、カセグレン逆望遠鏡系は、楕円面鏡系に比べ光路が短くなる。このことは顕微鏡全体の容量を小さくすることにもなり、赤外スペクトル測定において大きな影響を及ぼす水分や二酸化炭素ガスを、赤外線吸収がない窒素ガスと速やかに置換することができ、迅速なスペクトル測定が可能となった。

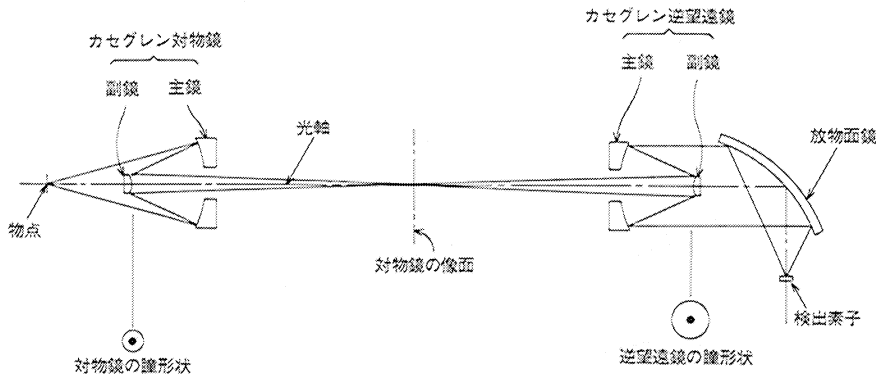


図10 カセグレン逆望遠鏡を用いたリレー光学系
Relay optical system using Cassegrainian reverse telescope

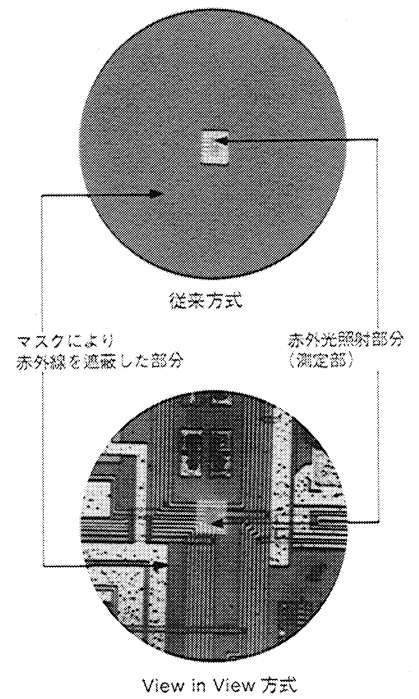


図9 View in View方式による測定ポイントの確認
Visible image observation by View-in-View method

3.4 顕微/ATR

FT-530では、図11に示す様に、試料に対し入射光路と射出光路の光軸とを最大20mmまでずらすことができる。このために、ATR結晶を光軸上に設置することができ、微小試料のATR測定が可能となった。従来、微小試料ATR測定（マイクロATR）は光軸の調整に熟練を必要としていたが、顕微/ATRでは可視光を試料の観察に使用しており、光路を光軸方向からも確認できるために簡単にATR結晶をFT-530の光軸にセットすることができる。

顕微/ATRの特長の1つは通常のATRに比べて光束径が小さいことにある。さらに、この特長を生かしATR結晶に対して赤外光入射又は射出位置を変化させることにより、ATR結晶面内でのスペクトルの分布測定も可能となる。

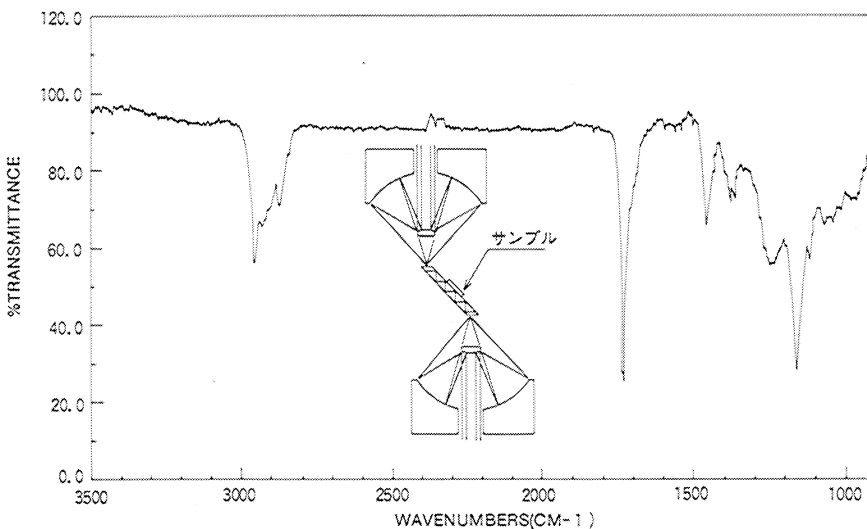


図11 顕微-ATR法による接着テープの赤外吸収スペクトルの測定
Measurement of infrared absorption spectrum of adhesive tape by microscope-ATR method

3.5 顕微/ATRの実測例

図12に示すように、測定試料となるシリコンゴム試料を10mm×5mm×1mmのATR結晶の第1回反射面の中央に、0.7mmの幅で接着テープ（スコッチテープ）により固定した。このATR結晶をサンプルステージに乗せて、赤外光の通過方向に対して直角に結晶を0.5mm間隔で移動させて線分析を行った。得られた吸収スペクトルを図13に示す。また図14は、各測定位置における、シリコンゴムおよびスコッチテープそれぞれの主吸収波数（787cm⁻¹、1731cm⁻¹）における吸収強度を示す。これらの図から、0.5mmの測定間隔でも吸収強度が顕著に変化している様子が読み取れる。このことは、さらに微小（量）な試料の分析も可能であることを示唆している。

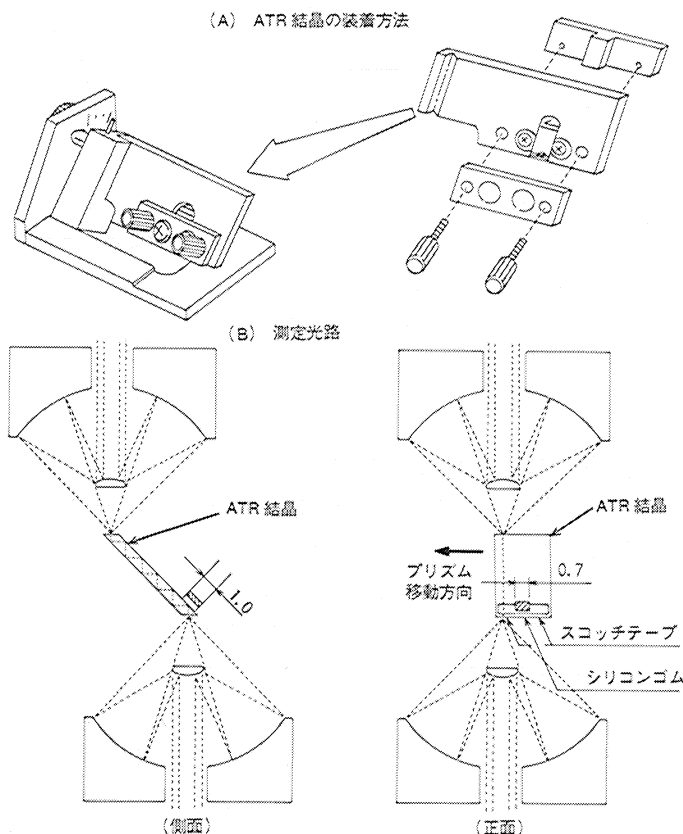


図12 シリコンゴムのATR結晶への固定方法
Fixing the silicone rubber sample to the ATR crystal

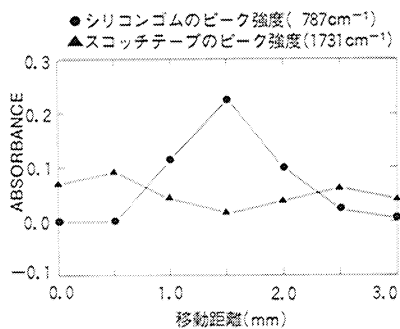


図13 赤外光照射位置の変化にともなう赤外吸収スペクトルの変化
Infrared absorption spectrum variation with changes of the beam position of the infrared ray

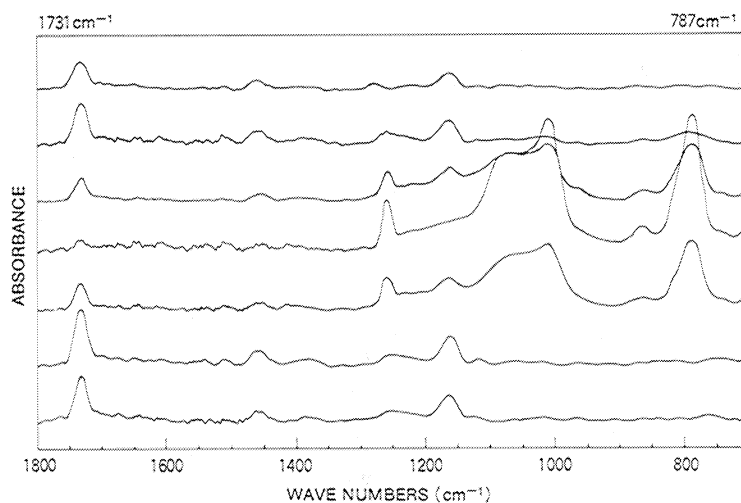


図14 赤外光照射位置の変化にともなう吸収強度の変化
Absorption strength variation with changes of the beam position of the infrared ray

4. まとめ

赤外顕微鏡分光分析は過去から、微小な試料分析に有効な分析法として広く知られてはいたが、実際には操作が複雑であることや、コストパフォーマンスの点がその普及を阻害していた。今回開発した FT-530 はこれらの問題を一挙に解決したものと自負している。

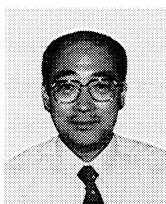
赤外顕微鏡分光分析においては、試料の絶対必要量は非常に少なくすむ。例えば、形状が $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}\times 0.1\mu\text{m}$ で比重 1 の試料とすればその重さは約 10pg となり、サブナノグラムまでの測定が可能となる。このためには、試料の微小成形や、マイクロームによるスライスなどの微量試料の取扱い方法もまた重要である。これらの前処理技術は、赤外顕微鏡分光分析の成否に大きく影響するので、分析機器や周辺機器の高度化と合わせ、測定者自身が熟達することもまた重要と言える。

今後は顕微専用フーリエ変換赤外分光での偏光分光分析による微小試料の配向性の研究など、広い分野で応用されることを期待している。

(1990年3月、第25回応用スペクトロメトリー東京討論会において一部発表²⁾)

引用文献

- 1) 岩岡貞樹, 田畑富美子, 堤 信也; 第25回応用スペクトロメトリー東京討論会 3 A09 63 (1990)
- 2) R. Barer, A.R.H. Cole, H.W. Thompson; Nature, 163 198 (1949)
- 3) R.G. Messersmidt, M.A. Harthcock; Infrared Microspectroscopy MARCEL DEKKER, INC
- 4) B. Roush
The Design Sample Handling and
Applications of Infrared Microscopes,
ASTM SPECIAL TECHNICAL PUBLICATION 949 (1985)
- 5) 右近, 佐竹, 西村, 山口, 池田;
第25回応用スペクトロメトリー東京討論会
3 A07 59 (1990)



池田昌彦

営業本部分析センター課長
昭和19年8月15日生
立命館大学理工学部化学科
理学博士, 技術士 (応用理
学)



右近寿一郎

開発本部開発1部係長
昭和28年2月22日生
関西大学工学研究科応用化
学専攻



中田 靖

営業本部製品開発部
昭和35年9月2日生
京都府立大学農学研究科農
芸化学専攻

