

## Application Note

# 一体型 FT-IR 顕微鏡 LUMOS による微小試料の分析

### はじめに

顕微赤外分光法は、FT-IR 単体では測定できない微小物や複雑な構造をもつ試料の分析において有用な手法のひとつです。顕微 FT-IR を用いることで、その高い空間分解能を活かした局所的な赤外スペクトル分析が可能となり、試料上の任意の部位の化学情報を得ることが可能となります。したがってこの手法は、各種工業製品の品質管理や科学捜査、生物医学領域における組成分析など、様々な分野において活用されています。対象試料は、繊維、塗料片、混入異物、複合材料（ラミネート、錠剤など）、生体組織など多種多様であり、様々な応用が期待できます。例えば、パッケージング材料の各層の化学組成を分析したり、電子部品上の微小異物やゴム材料に局在する不純物を同定したりすることが可能です。

ここでは、ブルカー・オプティクスが新たに提案する一体型 FT-IR 顕微鏡、“LUMOS”（ルーモス）による顕微分析の実例を紹介します。



図 1. フルオート、オールインワン FT-IR 顕微鏡 LUMOS

### 装置

測定に用いた LUMOS (図 1) は、FT-IR 分光計と顕微光学系を一体化した顕微 FT-IR 専用機で、主な仕様は以下のとおりです。

- 本体サイズ: 30 x 64 x 52 cm (W x H x D)
- 試料観察: 標準視野 1.5 mm x 1.2 mm  
デジタルズーム機構付 CCD カメラ
- 測定モード: 透過、反射、ATR (Ge)  
全モードでマッピング対応
- 対物鏡: 8 倍カセグレン型 NA= 0.6 (観察時 0.4)  
ワーキングディスタンス: 30 mm  
測定時 / 観察時の NA 自動切替機構装備
- コンデンサ: 8 倍電動式、自動焦点調整機能付き
- ATR プリズム: ピエゾ制御式 ゲルマニウム (Ge)  
接触圧力 3 段階切替機構付
- 視野絞り: 可視光透過型、電動 3 軸アパーチャ
- 試料ステージ: XYZ 電動式  
測定最大エリア: 75 mm x 50 mm  
全測定モードでマッピングに対応
- ソフトウェア: OPUS / LUMOS (図 2 参照)

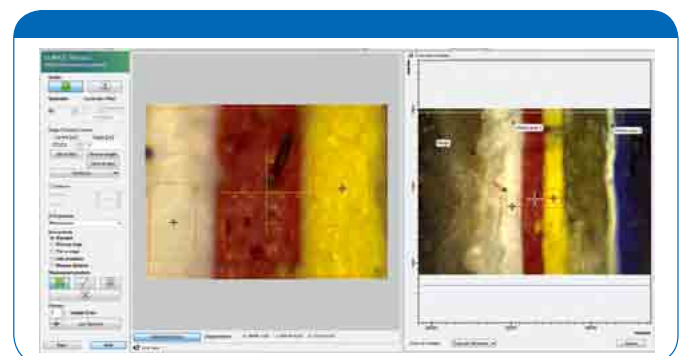


図 2. OPUS ウィザード - 測定ポイントの設定の様子

OPUS/LUMOS では、画面上の試料の可視観察像を観察しながら、測定ポイントやアパーチャのサイズを簡単に指定することが可能です。アパーチャの大きさは、試料のサイズにあわせて自由に設定することが可能で、それぞれのアパーチャサイズごとにバックグラウンドスペクトルの測定もすべて自動的に実行されます。

## アプリケーション例 1

### SMD チョーク上の汚染物質の同定

製品を構成する部品の汚染や異物の混入は、言うまでも無く、その品質と性能に悪影響を及ぼします。特に、小型化が進むマイクロエレクトロニクスの分野では、ますますその脆弱性が顕著となっており、ごくわずかな異物でも無視することはできません。たとえば、汚染された表面実装デバイス (SMD) は、ハンダ付けの不良に伴いリーク電流を発生するなど、最終的に様々なトラブルの原因になる可能性があります。異物や汚染物質の定性が最大の関心事となります。



構造がより複雑化・微細化された電子素子の場合においては、たったひとつの微粒子によってデバイスがまったく動作しなくなるなど、その影響はますます大きくなります。

汚染源を排除するためには、その化学的性質を知ることが不可欠です。FT-IR 顕微鏡を使用することで、マイクロメートルオーダーの汚染物質や異物の同定が可能となります。ひとつの例として、SMD チョークのはんだ接点上の汚染物質を分析した事例を示します。

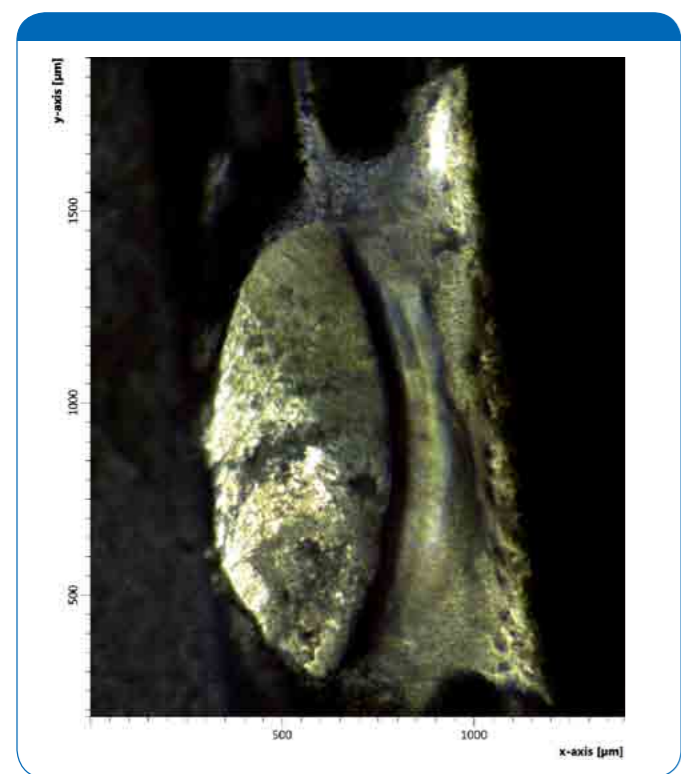


図 3. SMD チョーク不良品の接点部を撮影した可視像。

チョークの面積はおよそ 3.0mm x 2.5mm、高さは 2mm 程度です。LUMOS の可視光用対物鏡による観察では、ひとつの接点上に幾つかの黒い斑点状の物質が見られます (図 3)。その大きさは、直径 50 µm 程度です。

そこで、黒い斑点とその周辺部の違いを比較・解析するために、2 つの黒い斑点を含むエリアについて、反射モードによりラインマッピング測定を行いました (連続 20 ポイント)。その結果を図 4 に示します。ここでは、黒色斑点の領域のスペクトルにおいて顕著に見られた 1650cm<sup>-1</sup> 近傍のバンドについて、その積分強度の分布の状態を可視化し、試料の可視像に重ねあわせて汚染の様子を示しています。さらに測定により得られた各スペクトルを解析した結果、汚染の原因となっている未知の物質がタンパク質の一種であることが判りました。タンパク質の濃度は、明らかに黒い斑点上で高くなっており、こうして収集した情報により、汚染源の特定と問題の解決を実現することができました。

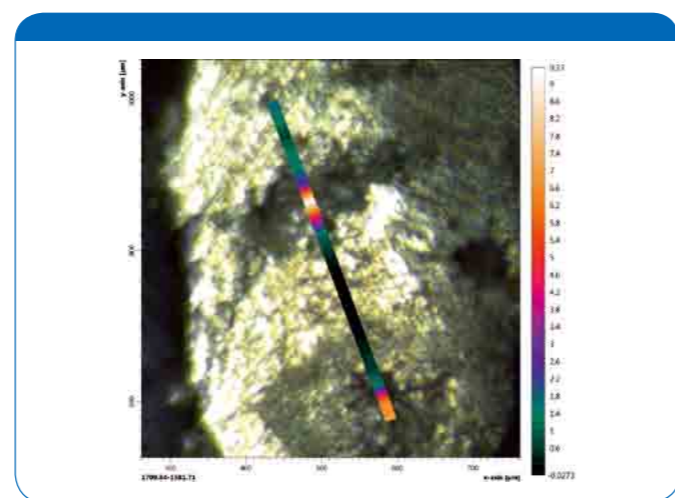


図 4. 汚染部のスペクトルにみられるアミドリバンドの積分値 (面積強度) により、汚染の様子を可視化。右側のスケールに従って色分けした積分値を SMD チョーク接点の可視像と重ね合わせています。

## アプリケーション例 2

### ワニス被膜の透過マッピング測定

2 番目の例として、2 層構造のワニス被膜片の分析を示します。測定に先立ち、試料を樹脂包埋し、さらにマイクロームを用いて切片を調製しました。多くの有機化合物は赤外光に対して強い吸収を与えるため、吸収の飽和を避けるためにも最適な厚みの試料を準備することが重要となります。

調製した試料切片について、透過モードによるエリアマッピング測定を行いました。LUMOS では、内蔵 CCD によりキャプチャされた試料の可視観察像の上でマウスを操作するだけで、測定エリアを簡単に指定することが可能です。ここでは、測定点のサイズ、すなわち空間分解を規定する視野絞りアパーチャのサイズを 10 µm x 10 µm とし、波数分解能 4cm<sup>-1</sup>、各測定ポイントでの積算回数を 12 回 (約 6 秒) として測定を実行しました。

その結果を、図 5 に示します。この図では、試料の可視像にスペクトルマップを重ね合わせて示しています。

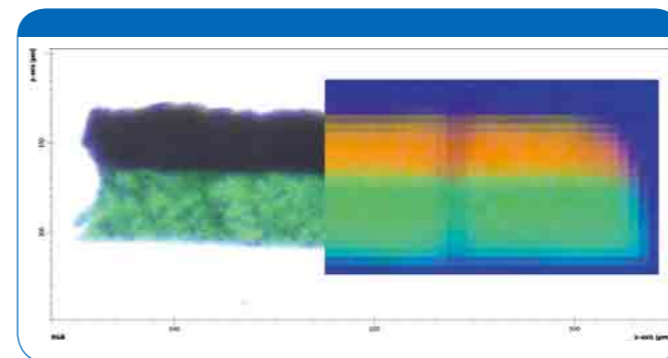


図 5. 可視像に重ね合わせたワニスの薄切片の RGB 画像。測定は透過モードで実施しています (空間分解能 10µm x 10µm)。

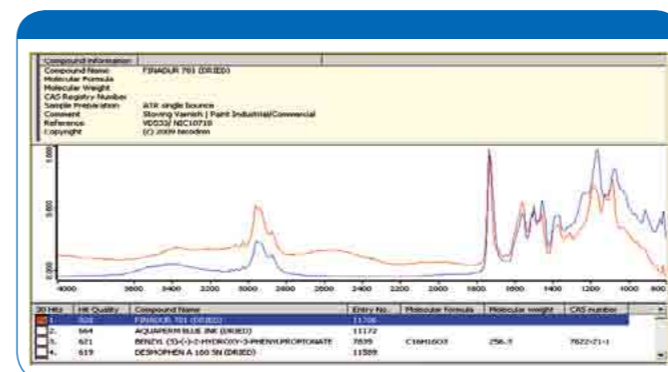


図 6. スペクトル検索による緑色の層の定性解析。スペクトルライブラリ検索の結果、緑色の層は市販エナメル塗料 "Finadur 781" と同様の成分から構成されていると推測されました。

スペクトルマップは、試料片に含まれる 3 つの成分 (第 1 層、第 2 層、包埋材) に特徴的なバンドの強度をもとにマップを構築し、さらにそれぞれの成分に対して 1 色ずつ割り当て、その相対量を RGB 像として示しています。このようにすることで、着目する化学成分の空間的な広がり様子を簡単に把握することができます。この測定データにおいても、各層の化学的な組成の違いを高い空間分解能で明確に描出しており、可視観察像と良い一致を確認することができました。

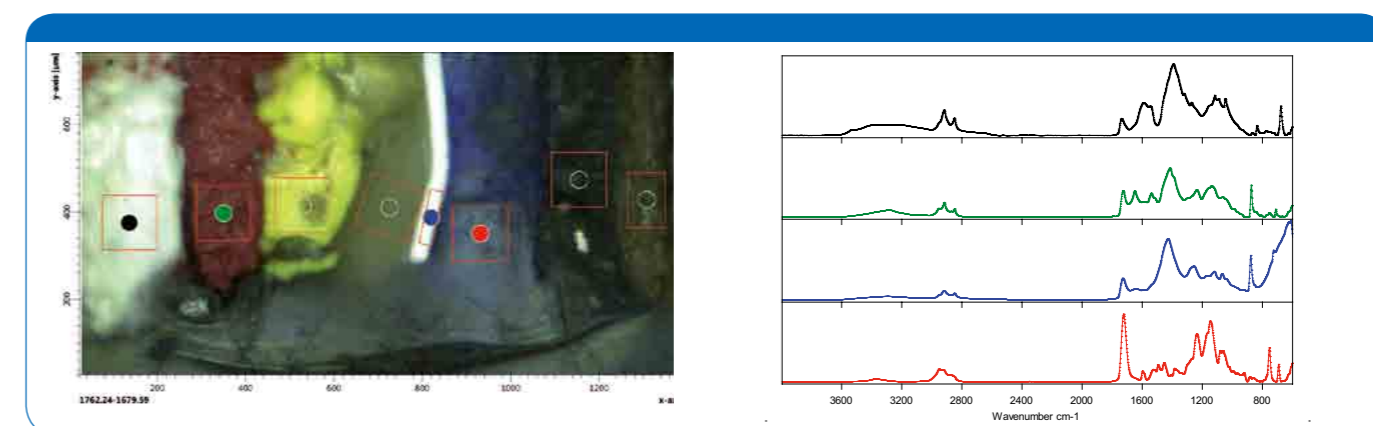


図 7. 左) 試料塗装片の断面像。測定ポイントと視野絞りアパーチャのサイズを重ねて表示。右) 測定により得られた代表的な赤外スペクトル。左図の各測定ポイントの色は、右図に示されているスペクトルの表示色に対応します。

さらに、マッピングデータ上の、ワニスの各層に対応するエリアから抽出したスペクトルを個々に観察することで、それぞれの成分について、より詳細な解析が可能となります。たとえば、緑色の層の成分については、抽出したスペクトルをスペクトルライブラリ検索に掛けることで、その主成分が市販塗料である "Finadur 781" に近いものであることが判明しました。ワニスをはじめとする塗料片の迅速な成分分析は、法科学等の分野で非常に重要です。

## アプリケーション例 3

### 塗料片の ATR 測定

3 つ目の例として、積層構造を持つ塗料片の化学組成分析について紹介します。この試料は非常に柔らかく、透過測定が可能な厚みの切片に調製することができません。このように厚みを持った試料に対しては、顕微 ATR モードが非常に有効です。LUMOS では、測定位置はもちろん、各測定ポイントにおける測定エリアの大きさ (=アパーチャの大きさ) を自由に設定することが可能で、それぞれのアパーチャサイズにあわせてバックグラウンドスペクトルの測定もすべて自動的に実行されます。ここで紹介する測定においても、試料を構成する 8 つの層について、それぞれの厚みに合わせてアパーチャのサイズを設定し、連続自動測定を行いました。波数分解能は 4cm<sup>-1</sup>、積算回数は 32 回としました。

測定によって得られた各層のスペクトルのうち、特徴的な 4 つの層に対応するスペクトルを図 7 に示します。図 7- 左の、試料の顕微鏡像に重ねあわせて示される赤枠は、測定時のアパーチャの大きさに相当します。赤枠内の丸いスポットの色は、右図に示した各スペクトルの表示色に対応します。得られたスペクトルは、厚みが 20 µm を切る白色の薄層を含め、各層の成分の違いを明瞭に現しており、このことは LUMOS の ATR マッピング機能の精度の高さと、複雑かつ微細な構造をもつ試料の分析において、非常に有効であることを示しています。

## アプリケーション例 4

### 生体試料の赤外スペクトルマッピング

顕微赤外分光法は、生体試料の分析においても有用な手法です。生体組織を構成する化学成分の分析においては、着目する成分と特異的に反応する試薬等を用いて染色し、その着色の様子を“間接的に”観察する方法が一般的です。これに対して顕微赤外分光法では、赤外スペクトルがもたらす化学情報をもとに、それぞれの成分をダイレクトに捉えることが可能となります。ここでは、シンプルなデモンストレーションとして、赤外スペクトルマッピング法による玉ネギの組織小片に関する測定結果を紹介します。

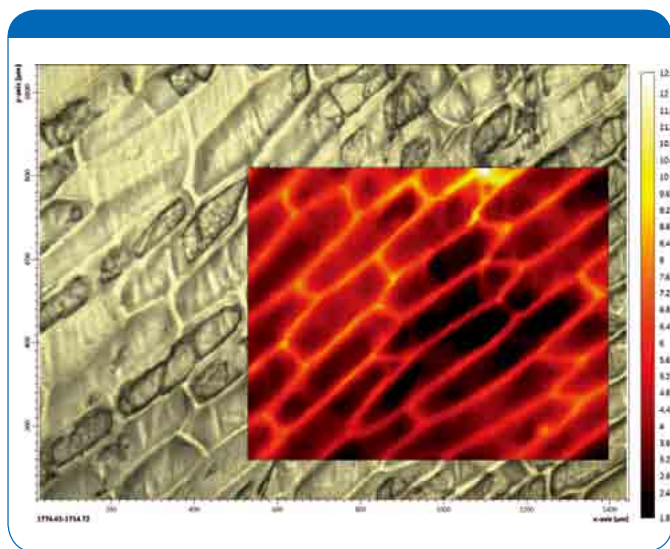


図 8. タマネギ組織片の脂質成分の分布状態を示す赤外スペクトルマップ（脂質由来の  $1740\text{cm}^{-1}$  バンドの積分強度分布図）を、可視像に重ね合わせて表示。

図 8 に、透過マッピング法で得られたデータを示します。ここでは、試料片の  $870\mu\text{m} \times 705\mu\text{m}$  のエリアについて、空間分解  $15\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$ 、波数分解  $8\text{cm}^{-1}$ 、積算時間 1.5 秒/ポイントの条件を用い、合計 2,726 本 ( $58 \times 47$ ) のスペクトルを連続的に測定しました。図 8 では、組織に含まれる脂質成分に由来する  $1740\text{cm}^{-1}$  近傍のバンド強度の分布を可視化し、試料可視顕微鏡像と重ね合わせて表示しています。細胞の一つひとつが鮮明に見て取れ、さらにスペクトルマップからは、予想された通り、脂質二重層が含まれる細胞壁の内側で脂質の濃度が高くなっていることが容易に確認できました。

### まとめ

各種工業製品に発生する不具合の原因特定において、異物や汚染物質の同定は、非常に重要です。また、科学捜査の分野では、事故や事件の現場に残された繊維や塗料等の断片に関する分析の結果が、重要な証拠となる場合があります。さらに、多層ポリマーや生体組織などの不均一系試料の化学組成分析は、その機能や性能を把握・向上するうえで必須と言えます。ここで紹介した分析事例が示す通り、顕微 FT-IR は、微小異物や汚染物の定性分析や微細構造を持つ試料の化学的な解析において貴重な情報をもたらすことが可能であり、現在では無くてはならない分析手法のひとつとなっています。

ブルカー・オプティクスの新型顕微 FT-IR “LUMOS” は、誰もが使える優れた操作性と、誰もが満足する高い分光性能を併せ持ち、短時間で精度の高い分析結果を提供するシステムです。LUMOS を用いることで、顕微赤外分光分析がさらに身近となり、迅速かつ高精度な分析をととして、製品の品質改善や生産性のさらなる向上が可能となります。