

技術論文

非対称流れ流動場分離 (AF4)-ICP-MS法による鋼中微細NbCの サイズ・個数濃度分布の定量解析

Quantitative Analysis of the Size Distribution and the Number Concentration of NbC Fine Particles in Steels Using Asymmetric Flow Field-flow Fractionation (AF4)-ICP-MS Method

板 橋 大 輔*
Daisuke ITABASHI

谷 口 俊 介
Shunsuke TANIGUCHI

水 上 和 実
Kazumi MIZUKAMI

抄 録

様々なナノ粒子と鋼中 NbC を用い、非対称流れ流動場分離法 (AF4) により鉄鋼材料を評価する手法を検討した。金ナノ粒子の平均粒子径と粒子径分布の分布幅に関して、AF4、TEM の測定結果を相互比較することによって、AF4 による分析の確からしさを検証した。さらに、AF4 で測定した粒子径分布を補正するための拡がり係数 (broadening factor) を考案した。フローインジェクション法 (FI) を用いた鋼中微粒子の個数濃度の定量方法を検討し、定量分析値の確からしさについて、回収率に基づいた評価を行った。また、開発した FI-AF4-ICP-MS 法をフェライト鋼中の NbC の分析に適用し、その適用可能性を検証した。

Abstract

Application of asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for the analysis of fine precipitates in steels was investigated using various nano particles and niobium carbide (NbC) precipitates in steels. The performance of the size measurement by the AF4 results was investigated by comparing the measurement results of gold nanoparticles between AF4 and transmission electron microscopy (TEM). In addition, the broadening factors were devised to correct the particle size distribution measured by AF4. The quantification method of number concentration using the flow injection method (FI) was investigated and the accuracy of the quantification results was evaluated based on the recovery rate. The newly developed FI-AF4-ICP-MS method was applied for analysis of NbC in ferrite steels, and its performance was verified.

1. 緒 言

鉄鋼材料の開発において、ナノメートル～サブマイクロメートルの粒子径を有する微粒子を活用して、製品に様々な機械的特性を付与している^{1,2)}。ナノメートルサイズの析出物は鋼の析出強化³⁾や結晶粒径の制御⁴⁾に対して、重要な役割を果たしている。析出物のサイズ分布やその個数濃度は鋼の機械的な特性に影響を及ぼすため、合金設計や鉄鋼製造におけるプロセス条件を決定するために正確に評価する必要がある。多くの鋼では、析出物は幅広い粒子径分布 (例えば、数ナノメートルの粒子と数百ナノメートルの粒子の混合物) を有し、不均一な分散状態で存在していることが多く、観察領域が局所に限定される電子顕微鏡によ

る観察を適用することは難しい。また、従来の析出物、介在物の化学分析法は様々な鉄鋼試料に対して適用されているものの、析出物、介在物を酸⁵⁾やアルカリで溶解するために、そのサイズ情報を取得することができない。

異なる粒子径を有する粒子の混合物の粒子径分布を正確に測定するためには、試料の粒子径を測定する前に、何らかの手法でサイズ分離することが必要となる。サイズ排除クロマトグラフィー^{5,6)}、非対称流れ流動場分離法 (asymmetric flow field-flow fractionation; AF4)⁷⁾、ハイドロダイナミッククロマトグラフィー⁸⁾、キャピラリー電気泳動⁹⁾、ゲル電気泳動⁹⁾、超遠心分離法等、粒子径の違いに基づいた分離分析法が先行研究で多く報告されている。これらの中でも、多くの報告において、AF4 は金属ナノ粒子の分析に対して、

* 先端技術研究所 解析科学研究部 主幹研究員 博士(工学) 千葉県富津市新富 20-1 〒293-8511

いくつかの利点を有していると提唱されており^{10, 11)}, ナノメートルからマイクロメートルの範囲の様々な試料に対して, 系に共存する溶媒, 界面活性剤, 塩等のマトリックスの有無によらず適用されている。

AF4 法は液体クロマトグラフィーの分離カラムに用いられる固定相を必要とせず, サイズに依存した分離を達成できる特徴を有する。加えて, AF4 法は光散乱分析法, 紫外可視分光分析法, 誘導結合プラズマ質量分析法 (inductively coupled plasma-mass spectrometry; ICP-MS) 等の様々な分析法を検出手法として組み合わせることができ, 分離された試料に関する測定試料の粒子径分布およびその元素組成などを取得することができる。したがって, AF4 は不均一で幅広い粒子径分布を持つ粒子 (例えば, 鉄鋼材料中の析出物や介在物等) の粒子径分布を正確に測定する手法として有用であると期待されている。

そこで本研究^{12, 13)}では, 鉄鋼材料の評価に AF4 を適用する方法を検討した。最初に, 金ナノ粒子 (AuNPs) を用いて, AF4 による粒子径分布測定の性能を調査した。AuNPs の平均粒子径と粒子径分布の分布幅に関して, AF4, TEM の測定結果を相互比較することによって, AF4 による分析の確からしさを検証した。さらに, これらの結果に基づいて AF4 で測定した粒子径分布を補正するための拡がり係数 (broadening factor) を考案した。さらに, AF4-ICP-MS 分析の定量方法を検討した (以下, FI-AF4-ICP-MS 法と称する)。AF4 キャリア溶液と混合しながら測定した金属元素標準溶液のフローインジェクション (FI) クロマトグラムを積分し, 検量線を作成した。さらに, この手法で得られる定量分析値の確からしさについて, 数種類の金ナノ標準粒子 (AuNPs) の回収率に基づいた評価を行った。また, 開発した FI-AF4-ICP-MS 法をフェライト鋼中の NbC の分析に適用し, その適用可能性を検証した。

2. 実 験

2.1 ナノ粒子および試薬

実験には金ナノ粒子 (AuNPs, nanoComposix (USA)), 銀ナノ粒子 (AgNPs, nanoComposix (USA)) およびサイズ標準ポリスチレンラテックス粒子 STADEX (PSL, JSR ライフサイエンス(株)(日本)) を用いた。表 1 に標準ナノ粒子および試験材の仕様をまとめた。4 種類の AuNPs (AuNP-2, AuNP-5, AuNP-7, AuNP-10) を用いて, AF4 による粒子径測定の較正曲線を作成した。また, AF4, TEM の相互比較には AuNP-5.5 を用いた。AF4 では水中に分散した状態で AuNP-5.5 を測定し, TEM では, AuNP-5.5 の分散液を別途カーボン支持膜付きグリッドに乗せて乾燥させた後, 明視野 (bright field; BF) 像を観察した。形状の異なる粒子の AF4 および TEM による粒子径分布測定には, 2 種類の AgNPs (球状および板状, それぞれ AgNP-50s, AgNP-50p と以下記す) を使用した。加えて, 各 AgNP の AF4 による

表 1 ナノ粒子の仕様
Specifications of nanoparticles

Sample	Average diameter (nm)	Concentration (mg/L)	Dispersant	Shape
AuNP-2	2.1 ± 0.3	52.5	Glutathione	Sphere-like
AuNP-5	5.0 ± 0.6	1080	Citrate	Sphere-like
AuNP-7	7.5 ± 0.8	1070	Citrate	Sphere-like
AuNP-10	9.8 ± 0.8	1080	Citrate	Sphere-like
PSL-29	29 ± 1	5000	—	Sphere
PSL-48	48 ± 1	10000	—	Sphere
PSL-70	70 ± 1	10000	—	Sphere
PSL-100	100 ± 3	10000	—	Sphere
AuNP-5.5	5.5 ± 0.5	1090	Lipoic acid	Sphere-like
AgNP-50s	50 ± 4	20	Tannic acid	Sphere-like
AgNP-50p	55 ± 10	20	PVA	Plate-like
NbC precipitates in NCA5-1	—	—	SDS	Plate-like
	2.4 ± 1.0			
NbC precipitates in NCA5-3	(FOV-1)	—	SDS	Plate-like
	2.1 ± 0.4			
	(FOV-2)			

FOV: Field of view, PVA: Polyvinyl alcohol

粒子径測定では, 上記の AuNPs と PSL を用いて作成した較正曲線を使用した。5 種類の AuNPs (AuNP-5, AuNP-10, AuNP-30, AuNP-50, AuNP-100) を用いて, FI-AF4-ICP-MS 法による回収率を調査した。3 種類の AuNPs (AuNP-2, AuNP-5, AuNP-10) を用いて, 各試料の AF4 分析におけるサイズ測定を較正した。

AF4-ICP-MS 分析に使用した全ての試薬は市販のものを追加の精製なしに用いた。試料溶液の希釈と AF4 キャリア溶液の調製には, 超純水 (>18 MΩ・cm; Milli-Q 水精製システムおよび Elix UV10, Millipore Corp. (USA)) を使用した。AF4 キャリア溶液の調製には, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS, 純度 ≥ 99.0%, 富士フイルム和光純薬(株)(日本)) およびコール酸ナトリウム (SC, 純度 ≥ 98.5%, 富士フイルム和光純薬(株)(日本)) を用いた。いずれも関東化学(株)の硝酸 (純度 ≥ 60.0–61.0%), 塩酸 (純度 ≥ 35.0–37.0%), 原子吸光分析用金標準溶液 (Au1000, 1000 mg L⁻¹) を標準溶液の調製に使用した。

FI-AF4-ICP-MS 法により鉄鋼試料中の NbC を定量分析するために, 多元素標準溶液 (XSTC-8, 10 mg L⁻¹, SPEX CertiPrep (USA)) を用いた。

2.2 電解抽出法による鉄鋼材料中析出物の抽出および試料調製

0.1Nb-0.01C (wt%) の化学組成を有する NbC 析出フェライト鋼を, 真空誘導溶解法によって電解鉄から作製した。熱処理用のブロック試験片 (30×33×45 mm³) を鋳造したままのインゴットから切り出して, 溶体化処理 (1250℃, 24 時間) を施した後に水冷し, その後 600℃ で 1 時間および

10 時間保持することで、NbC を析出させた。この 600℃での熱処理の保持時間を調整することによって、NbC の粒子径や個数濃度を变化させた。さらに、試料を $25 \times 25 \times 2 \text{ mm}^3$ の大きさに切断し、後に続く分析に供した。

鉄鋼試料中の析出物を抽出するために、電解エッチング (selective potentio-static etching by electrolytic dissolution; SPEED) 法^{14, 15)} を適用した。電解液には 10%AA 系電解液 (10% (v/v) AA-1% (w/v) TMAC-メタノール) に、分散剤として SDS を $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ の濃度となるように添加したものをを用いた (以下、SPEED 溶液と称する)。ここで、抽出された析出物の表面に吸着する界面活性剤として SDS を添加することによって、SPEED 溶液中でこれら析出物が凝集することを防止することができる。電解抽出条件は既報と同様に、500mA の定電流電解とし、以下の 2 段階のステップで実施した。第 1 ステップでは、鉄鋼試料の表面上の汚染物や酸化層を溶解するために、15 分間の電解抽出操作を行った。第 1 ステップ完了後、鉄鋼試料を別途調製した同一組成の SPEED 溶液に移し替え、SPEED 溶液中に溶解した試料表面上の汚染物や酸化層を鉄鋼試料から分離除去した。続く第 2 ステップでは 120 分間の電解抽出操作を行った。この操作により、約 1.0g の鉄鋼試料を SPEED 溶液中に溶解することができる。その後、超音波処理を 1 分間行い、全ての析出物を SPEED 溶液中に分散回収した。この析出物を分散させた溶液試料について、AF4-ICP-MS 分析を行った。

2.3 TEM 観察

溶液中に分散させた AuNPs をカーボン支持膜付きグリッ

ドに置き、減圧下で乾燥させて調製し、TEM 観察に供した。次に、電界放出型透過電子顕微鏡 Tecnai F20 (FEI Inc. (USA)) を使用し、加速電圧 80kV の条件下でこれらの試料を観察した。AuNPs の明視野像を取得し、画像処理ソフトウェア Digital Micrograph (Gatan Inc. (USA)) を用いて処理した後、500 個の粒子の最大径を手動で測定した。さらに、上記の SPEED 溶液中に抽出した析出物を AuNPs と同様の方法で TEM 観察用に調製し、高角度散乱暗視野走査透過電子顕微鏡法 (high-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy; HAADF-STEM) による観察を行った。

2.4 AF4-ICP-MS のサイズ分離の原理概要と測定条件

図 1 (a) に ICP-MS 装置および FI 装置と組み合わせた Wyatt Eclipse AF4 装置 (Wyatt Technology Europe (Germany)) の概略図を示す。この装置は、高速液体クロマトグラフィー用のポンプ、オンライン脱気システムおよびオートサンプラー (Agilent Technologies 1260 Infinity series, Agilent Technologies (USA)) を備えている。AF4 分離チャンネルにナノ粒子試料を注入すると、これらの試料はこのチャンネル内で拡散し、チャンネルフローによって移動しながら、そのサイズに依存して分離される。

AF4 分析において、分離シーケンスは試料注入、フォーカシング、緩和、および溶出の 4 つのステップから構成されている¹⁰⁾。初めに、試料を AF4 分離チャンネルに注入してしばらくすると、AF4 分離チャンネルの水平方向両側からの流れによって、試料は徐々に一箇所に集められる。このステップをフォーカシングと呼ぶ (図 1 (b))。その後、これらの試料は AF4 分離チャンネルに対して垂直方向、上向きに拡

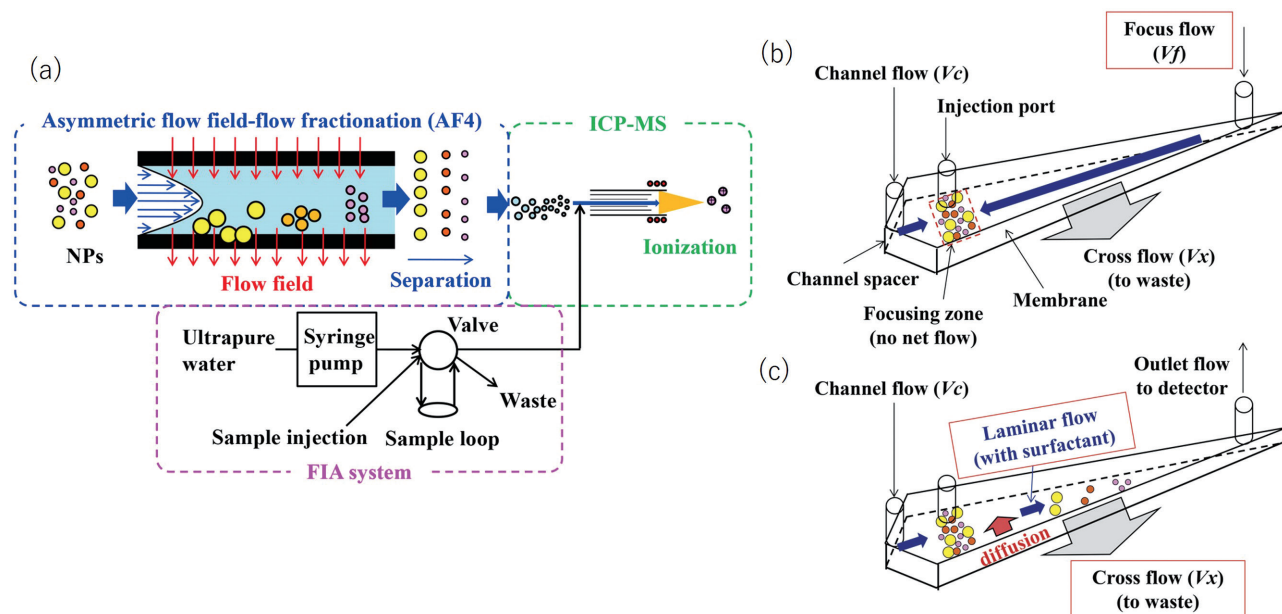


図 1 (a) AF4-ICP-MS および FI 装置の概略図¹³⁾、AF4 の分離シーケンス (b) フォーカシングステップ (c) 分離ステップにおける流れ場¹²⁾

(a) Schematic of AF4-ICP-MS and FI apparatus.¹³⁾ Flow profile observed during (b) the focusing step and (c) the elution step in the separation sequence of AF4 analysis.¹²⁾

散し、この拡散距離が試料の粒子径に依存する。すなわち、粒子径が小さくなるほど、試料は AF4 分離チャンネルの底部から遠くに拡散することができる。このステップは緩和と呼ばれている。最後に、溶出ステップにおいてチャンネルフローを一方向のみに変更すると、層流中の流速の違いによって試料中の各粒子をそれぞれ分離することができる (図 1 (c))。その結果、より小さな粒子ほど、より速い保持時間で検出される。この時、試料の保持時間により試料は拡散するため、AF4 による分離に対して、試料の拡散係数を考慮する必要がある¹⁷⁾。

本研究の AF4 分析では、300 mg L⁻¹ の SDS 溶液または 500 mg L⁻¹ の SC 溶液を AF4 キャリア溶液として用いた。さらに、分子量カットオフ径 30 kDa の再生セルロース (RC) 限外ろ過膜 (RC 30 kDa, Microdyn-Nadir (Germany)) を AF4 分離チャンネルの底部に使用した。続いて、AF4 分離装置には長さ 275 mm のチャンネル、厚さ 350 μ m または 490 μ m の非対称ダイヤモンド型チャンネルスペーサーを採用した。AF4 分離チャンネルは四重極型 ICP-MS 装置 (Agilent 8800, Agilent Technologies (USA)) に直接接続され、AF4 装置で分離されたナノ粒子の元素情報をオンラインで取得した。

ICP-MS 装置の試料導入には、自己吸引型のネブライザー (Conikal DC Nebulizer, Glass Expansion (Port Melbourne, Australia)), ベルチェ冷却装置を備えたスコット型チャンバーを用いた。

表 2 に ICP-MS 装置の測定条件を示す。AF4 分析を行う前に、少なくとも 30 分間、SDS または SC を含む AF4 キャリア溶液を AF4 分離チャンネルに流し、RC 限外ろ過膜を調整した。各 AuNPs 分散溶液の試料バイアル中での良好な

分散状態を保つために、これらを希釈することなしに直接分析に供した。また、SPEED 溶液中に分散させた析出物も同様に希釈せずに分析に供した。加えて、これら測定試料の AF4 分離チャンネルへの注入は、オートサンプラーを用いて行い、それぞれ分析を実施した。表 3 に AF4 分離条件をまとめて示す。

2.5 FI-AF4-ICP-MS 法による定量方法

AF4 装置本体とは独立して、標準溶液を流す流路 (FI 装置) を新たに設けた。図 2 に FI 装置の流路の模式図を示す。図 2 (a) は試料挿入時、図 2 (b) は試料吐出時の流路である。その流路はシリンジポンプ、6 方切り替えバルブ、およびサンプルループから構成されている。シリンジポンプならびに 6 方切り替えバルブをネブライザーに、サンプルループを 6 方切り替えバルブにそれぞれ接続し、サンプルループの容量は 552 μ L に調整した。また、洗浄用の流路を 6 方

表 2 ICP-MS 測定条件
ICP-MS operating conditions

Agilent 8800 ICP-MS	
RF power (W)	1 550
Nebulizer gas flow (L min ⁻¹)	(a) 1.05 (b) 0.82
Make-up gas flow (L min ⁻¹)	0.23
Cooling gas (L min ⁻¹)	15
Auxiliary gas (L min ⁻¹)	0.9
Sampling depth (mm)	(a) 8 (b) 7
Element (m/z)	Nb (93), Au (197)
Duration time (s)	0.1
Spray chamber temperature (K)	275.15

(a) size distribution, (b) number concentration analysis

表 3 AF4 分離条件
AF4 separation condition

		For AuNPs	For AuNPs	For AgNPs	For NbC precipitates
Channel parameters	Membrane nature	Regenerated Cellulose (RC)			
	Membrane cut-off (kDa)	30	30	5	30
	Spacer (μ m)	350	350	350	490
	Elution solvent	1.04 mmol L ⁻¹ SDS	1.04 mmol L ⁻¹ SDS	1.73 mmol L ⁻¹ SDS	0.035 mmol L ⁻¹ SDS
Fractionation time	Elution time (min)	1	35	1	1
	Focusing time (min)	1	0	1	1
	Focus + Injection time (min)	2	0	2	2
	Focusing time (min)	3	0	3	1
	Elution time (min)	35	0	35	45
	Injection volume (μ L)	1	1	100	20–100
Fractionation step, flow, and volume	Injection flow (mL min ⁻¹)	0.2	0.2	0.2	0.2
	Channel flow (Vout, mL min ⁻¹)	1	1	1	1
	Condition 1: 0.5 \rightarrow 0				
	Condition 2: 1.5 \rightarrow 0				
	Condition 3: 2.0 \rightarrow 0				
	Condition 4: 3.0 \rightarrow 0				
	Condition 5: 4.0 \rightarrow 0 (linear gradient)				
	Cross flow (Vc, mL min ⁻¹)	Condition 0: 0		3.0 \rightarrow 0 (linear gradient)	2.0 \rightarrow 0.1 (linear gradient)
	Focus flow (mL min ⁻¹)	3	0	3	3
Detector	UV absorbance (nm)	254	254	254	520

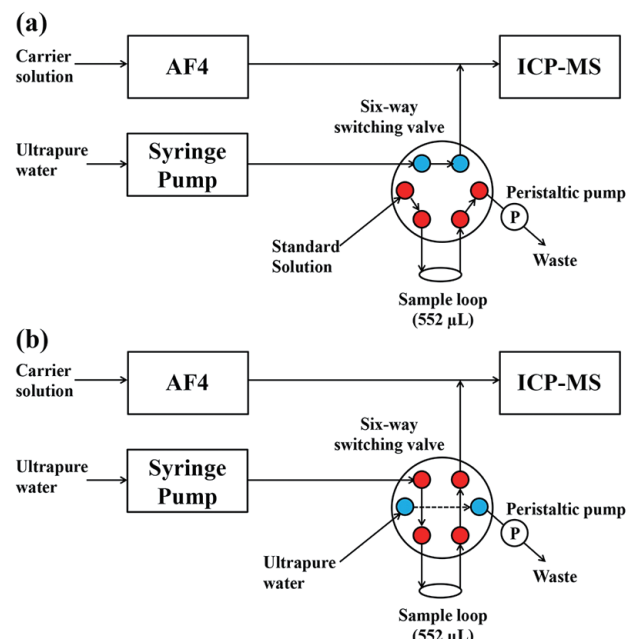


図2 FI装置の (a) 試料挿入時、(b) 試料吐出時の流路¹³⁾
Schematic of flow route of FI apparatus. (a) Sample load; (b) sample injection.¹³⁾

切り替えバルブに接続し、6方切り替えバルブによって各流路の切り替えができるようにした。金標準溶液は濃度がそれぞれ0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 mg L⁻¹となるように希釈し、マトリックスとして5% (v/v) 王水を含むように調製した (以下、Std1-5 と称する)。また、多元素標準溶液は濃度がそれぞれ0, 1.0, 3.0, 7.5, 10 ng L⁻¹となるように希釈し、マトリックスとして1% (v/v) 硝酸を含むように調製した。サンプルループがネブライザーに未接続の状態において、洗浄用流路からこれらの標準溶液をサンプルループに注入し、標準溶液でサンプルループを満たした。その後、流路を切り替え、シリンジポンプを用いて、一定量の標準溶液をネブライザーに送液した。この標準溶液はICP-MSによって時間分解分析法で検出され、その検出されたクロマトグラムのピーク面積を積分して、信号強度を求めた。標準溶液の注入量と得られたクロマトグラムのピーク面積の間の相関関係から検量線を作成した。

3. 結果と考察：粒子径分布解析

3.1 各ナノ粒子のTEM観察結果

初めに、AuNP-5.5, AgNPs, および鉄鋼試料中のNbCをTEMで観察した。図3にAuNP-5.5とAgNPsのTEM明視野像の一例と測定した粒子径分布を示す。AgNPの粒径分布は直径 (D_{max}) を測定し、厚み (D_w) は無視して求めている。AuNP-5.5とAgNPsは凝集しておらず、一次粒子として単分散していることが確認できた。一方、図4に示すように、NbCはいくつかの観察視野で凝集していることが明らかとなった。粒子の形状に関しては、AuNP-5.5とAgNP-50sはその大部分が球状であったが、一部の粒子は

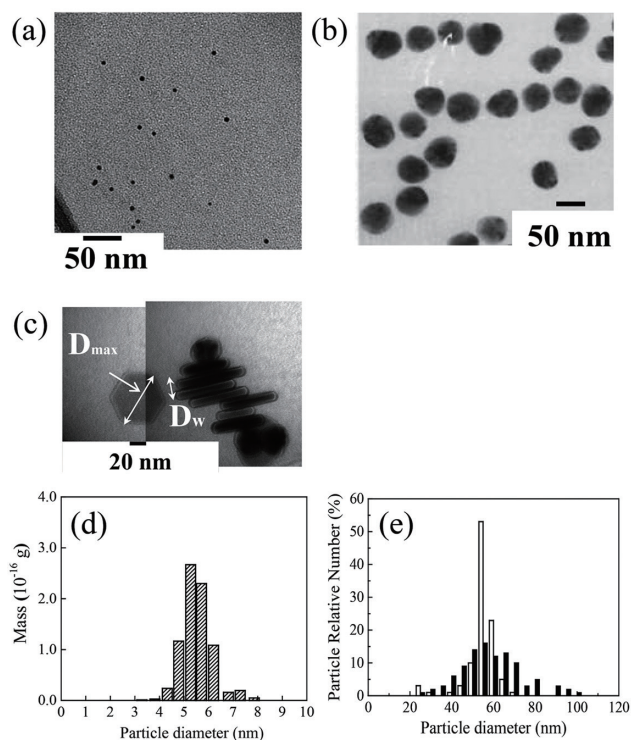


図3 (a) AuNP-5.5, (b) AgNP-50s, (c) AgNP-50p のTEM明視野像。TEMで求めた (d) AuNP-5.5, (e) AgNPのサイズ分布¹²⁾

TEM bright-field image of (a) AuNP-5.5, (b) AgNP-50s, and (c) AgNP-50p on a carbon-supporting grid. The size distribution of (d) AuNP-5.5 and (e) AgNPs determined by TEM.¹²⁾

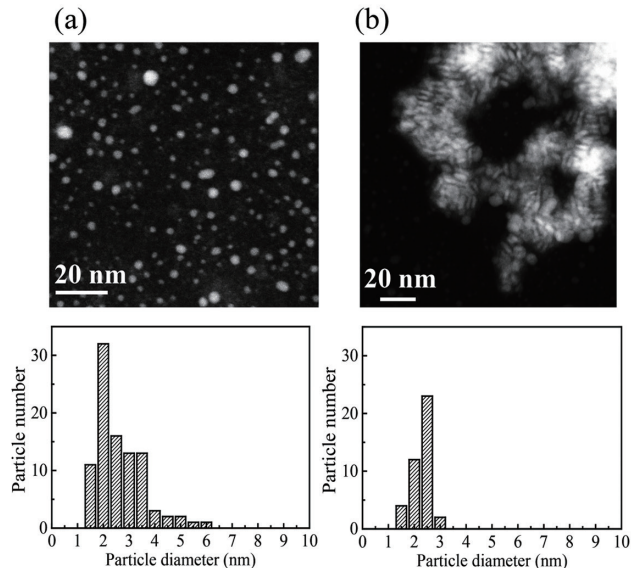


図4 鋼板 NCA5-3 から電解抽出したNbCのHAADF-STEM像とその粒子径分布¹²⁾

(a) FOV No.1, (b) FOV No.2

HAADF-STEM image of electrolytically extracted NbC from the steel sheet, NCA5-3, at two FOVs and size distributions at each FOV¹²⁾: (a) FOV No.1 and (b) FOV No.2.

球状ではなかった。また、AgNP-50pとNbCは板状であり、AgNP-50pの直径と厚みはそれぞれ56 nm, 14 nm程度、NbCの直径と厚みは数 nmであった。これらのナノ粒子の粒子径を次のAF4で測定した。

3.2 AuNPs の AF4 および TEM 測定結果の比較 (平均粒子径と粒子径分布の幅)

AF4 による粒子径測定のパフォーマンスを確認するために、AF4、TEM で同一の AuNP-5.5 (一次粒子径 $5.5 \pm 0.5 \text{ nm}$) を測定した。まず初めに、AF4 の測定は数 nm のナノ粒子を十分に分離できるように最適化した条件下で行い、他の AuNPs の粒子径と保持時間の相関関係に基づいて作成した較正曲線を用いて、AuNP-5.5 の粒子径分布を見積った。得られた AF4 の測定結果をガウス関数でフィッティングし、AuNP-5.5 の平均粒子径と粒子径分布の半値全幅 (full width at half maxima; FWHM) を算出した。次に、AuNP-5.5 の TEM 観察では、TEM による粒子径測定の不確かさを確かめるために、測定を二度繰り返し行った。

表 4 および 5 に AuNP-5.5 の平均粒子径と粒子径分布の FWHM をそれぞれまとめた。まず、表 4 に示した AF4 と TEM でそれぞれ求めた平均粒子径を比較すると、予想した通りに両者は一致した。これは AF4 における粒子径の算出が TEM の測定結果に基づいた粒子径の較正曲線を使用しているためであると考えられる。

次に、表 5 に示した粒子径分布の FWHM をそれぞれ比較すると、AF4 の測定結果は TEM の測定結果と一致せず、TEM で得られた値の約 2 倍であった。この違いは、以下の 2 つの理由によるものであると考えられる。第一に、今回用いた粒子のキャラクタリゼーションは、それぞれ異なる原理の測定法を複数用いて行った。AF4 は粒子の移動度、TEM は電子線の回折という異なる原理で測定している。そのため、AF4 の測定結果は粒子の最外部の形状・大きさを

反映しており、TEM の測定結果は元素組成や結晶性に由来する電子線の回折コントラストを示している。ゆえに、粒子の形状に関する仮定の違いが、これらの結果に反映されたと考えられる。

第二に、AF4 で測定した粒子径分布の FWHM は、AF4 分離チャンネル内における粒子自身の拡散によって、TEM よりも大きな値になったと考えられる。なぜならば、AF4 による測定は粒子が流れている状態で行われるため、AF4 分離チャンネル内で粒子自身が拡散してしまうことは避けられない。この拡散によって粒子径分布が真値よりも拡がり、その結果、サイズ分解能が低下するため、AF4 を利用した粒子径分布の測定方法には改善の必要があると考えられる。

3.3 AF4 分析における粒子径分布幅の補正

前節で説明したように、AF4 での粒子径分布の FWHM は測定原理に大きく依存するため、AF4 の測定結果を他の解析手法に基づいて補正する方法を検討した。考案した AF4 の粒子径分布測定における FWHM の補正は以下の通りである。AuNP-5.5 の粒子径分布に関して表 5 に示した TEM の FWHM に対する AF4 の FWHM の比は 1.94 であった。この値を AF4 分析における broadening factor として定義した。加えて、上記と同様にして、他のナノ粒子に対する broadening factor を計算した結果を表 5 に示す。なお、2 種類の AgNPs は上記の AuNPs と比較して粒子の直径が 10 倍程度大きかったため、異なる AF4 測定条件で測定した。加えて、AF4 による AgNPs の測定を行う前に、いくつかの AuNPs および PSL 粒子を用いて粒子径測定の較正曲線を作成した (図 5)。AF4 および TEM によって測定した 2 種類の AgNPs の粒子径分布を図 6 に示す。その結果、AF4 分離チャンネル内での粒子の拡散は、粒子径に関係なく、AF4 クロマトグラムに影響を与える可能性があることが明らかとなった。ここで、broadening factor に対して得られた知見を以下にまとめた。

(i) 上記の AuNPs の測定結果から計算された broadening factor は、粒子の形状や種類に大きく依存する。球状の粒子に対して決定された broadening factor は、1.94 ~ 2.29 の範囲内であった。

表 4 TEM および AF4 で求めた平均粒径
Average diameter of each specimen measured by TEM and AF4

Sample	Average diameter (nm)		
	TEM	AF4 (raw data)	AF4 (corrected)
AuNP-5.5	5.5 ± 0.5	5.6 ± 1.0	5.6 ± 0.5
AgNP-50s	52.1 ± 7.1	54.1 ± 11.1	—
AgNP-50p	56.2 ± 14.6	59.6 ± 23.0	—
NbC precipitates in NCA5-1	—	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.2
NbC precipitates in NCA5-3	2.4 ± 1.0 (FOV-1) 2.1 ± 0.4 (FOV-2)	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.2

表 5 粒子径分布測定結果および AF4 分析における拡がり係数 (broadening factor)
Results of particle size distribution analysis and broadening factors in AF4 analysis

Ti	Average diameter (nm) (TEM)	Shape	Component of materials	Density/g·cm ⁻³	Broadening factor	FWHM (AF4)	FWHM (TEM)
AuNP-2	2.1 ± 0.3	Sphere-like	Gold	19.32	2.21	1.66	0.75
AuNP-5	5.0 ± 0.6	Sphere-like	Gold	19.32	2.05	2.56	1.25
AuNP-5.5	5.5 ± 0.5	Sphere-like	Gold	19.32	1.94	2.4	1.24
AuNP-7	7.5 ± 0.8	Sphere-like	Gold	19.32	2.29	3.09	1.35
AuNP-10	9.8 ± 0.8	Sphere-like	Gold	19.32	1.94	3.47	1.79
AgNP-50s	52.1 ± 7.1	Sphere-like	Silver	10.49	3.01	26.09	8.66
AgNP-50p	56.2 ± 14.6	Plate-like	Silver	10.49	1.64	54.05	32.9

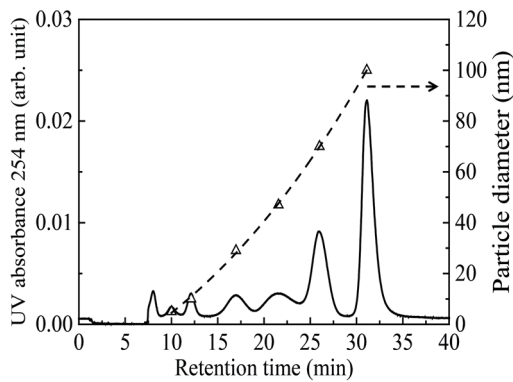


図5 金ナノ粒子とPSLの混合物のAF4による分離結果および粒径校正曲線¹²⁾

Separation results of AuNPs and PSL mixtures by AF4.¹²⁾ Bottom and right axes show the size calibration curve.

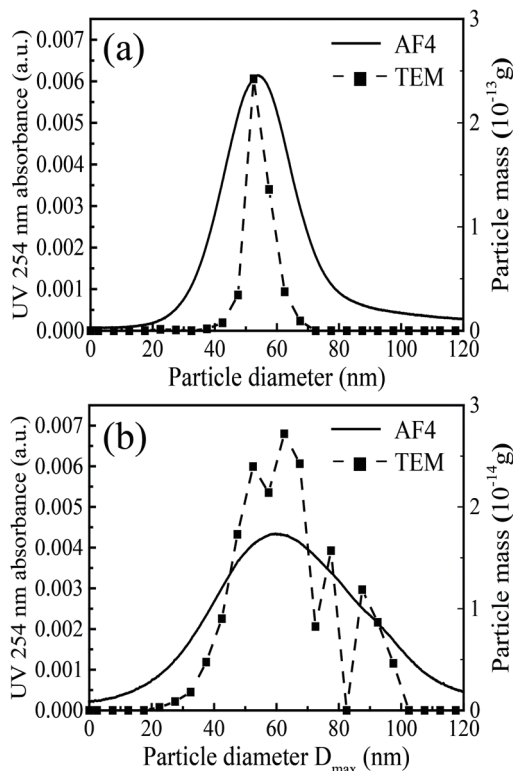


図6 TEMおよびAF4で求めた(a) AgNP-50sと(b) AgNP-50pの粒子径分布¹²⁾

Size distributions of AgNPs measured using TEM and AF4. (a) AgNP-50s and (b) AgNP-50p.¹²⁾

(ii) 異なる種類の粒子間の直接比較は容易ではないため、2種類のAgNPsに対して、粒子形状の影響を以下の通り考察した。板状の粒子に対するbroadening factorは、球状の粒子に対するbroadening factorよりも見かけ上小さくなった。これは、AF4分離チャンネル内の流れが板状の粒子自身のブラウン拡散よりも支配的になるという事実に起因しており、その結果として、板状の粒子のブラウン運動がAF4分離チャンネル内の流れに対して、水平方向に抑制されたと考えられる。

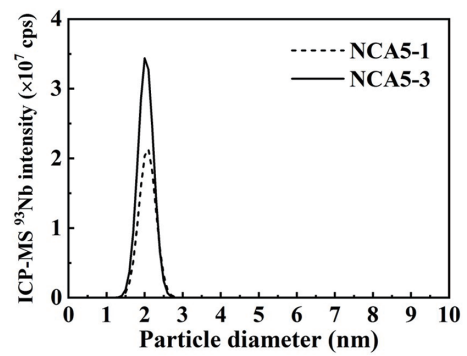


図7 鋼材 NCA5-1 および NCA5-3 中 NbC の AF4-ICP-MS 測定結果¹²⁾

Results of AF4-ICP-MS measurement for NbC in steels NCA5-1 and NCA5-3¹²⁾

3.4 broadening factor を適用した AF4 による粒子径分布測定法の鉄鋼材料中 NbC への応用

AF4 分析における FWHM の補正の適用可能性を調査するために、鉄鋼試料から抽出した NbC を AF4 で測定した。その結果、FWHM の補正は、鉄鋼材料中のナノメートルサイズの析出物の粒子径をより精度良く測定するのに、効果的であることが分かった。

まず、AuNPs と同一の AF4 測定条件で NbC を測定した。図 7 に AF4 で測定し broadening factor を適用して補正した NbC の粒子径分布を示す。これらの試料への熱処理は、NbC の粒子径を増大させる目的で施しており、熱処理時間の長い NCA5-3 の粒子径の方が大きくなると想定していた。しかし、これらの NbC を TEM で観察したところ、鋼板試料中に不均一に分散し、粒子径は大きく変わらないことが分かった。TEM で求めた NbC の粒子径分布は、図 4 のように視野間で一致しない場合があったが、粒子径分布の平均情報が得られる AF4 と近い結果であった。熱処理の保持時間の増加とともに NbC の粒子径は変化せず、個数濃度が増加する（ピーク面積で約 1.5 倍）ことが明らかとなった。

4. 結果と考察：個数濃度の定量

4.1 FI-AF4-ICP-MS 分析における検量線作成

Au 標準溶液と AuNP-2 を AF4-ICP-MS 法のみで分析し、各クロマトグラムのピーク面積を比較した。AuNP-2 のピーク面積は AF4 分離チャンネルへの Au 注入量が Au 標準溶液の約半分であるにもかかわらず、Au 標準溶液のピーク面積よりも約 3.3 倍大きかった。Au 標準溶液の ICP-MS への導入量が大幅に減少した理由として、大量の Au イオンが AF4 分離チャンネル内部の透過膜を通過し、廃液として除去されてしまったことが考えられる。以上の結果から、AF4 分離チャンネルへの Au 標準溶液の注入は、正確な検量線を作成するには適していないことが明らかになった。

そこで、AF4-ICP-MS 法で得られた分析結果の正確な定量のために、FI 法の適用を検討した。初めに、Au 標準溶

液を用いた検量線の作成方法を検討した。ICP-MS 分析におけるマトリックスマッチングを行うために、AF4 キャリア溶液の濃度を AF4 分析で使用した濃度の 2 倍に調製し、AF4 キャリア溶液をネブライザーの直前で、5% (v/v) 王水もしくは 1% (v/v) 硝酸を含む Au 標準溶液と、同一の体積比で速やかに混合した。超純水を AF4 キャリア溶液として用いた際の Au 標準溶液 (Std 1-5) の FI クロマトグラムを図 8 に示す。Std 1-5 の各クロマトグラムのピークを積分し、これらのピーク面積を用いて検量線を作成した。各 AF4 キャリア溶液を用いて作成した Au 標準溶液の FI 法を適用した場合の検量線を図 9 に示す。AF4 キャリア溶液に SDS 溶液を用いた場合、検量線は良好な直線性を示し、AF4 キャリア溶液を超純水とした場合とほぼ同等の結果であった。その一方で、SC 溶液を AF4 キャリア溶液とした場合、検量線の良好な直線性が得られず、各点のばらつきが大きかった。この理由として、AF4 キャリア溶液に含まれる各界面活性剤の酸解離定数の違いが影響したと考えられる。SDS および SC の酸解離定数はそれぞれ 1.84, 4.98 であり、マトリックスとして 5% (v/v) 王水を含む Au 標準溶液を各界面活性剤溶液と混合すると、溶液の pH は SC の酸解離

定数よりも低くなると考えられる。SDS 溶液と 5% (v/v) 王水を同一の体積比で混合しても、溶液は透明であったが、SC 溶液と 5% (v/v) 王水を同一の体積比で混合した溶液では塩の析出が見られた。このことから、SC の塩の析出によって、ネブライザーもしくは PFA チューブが閉塞し、安定した ICP-MS の信号が得られず、FI 法を適用した検量線において信号強度に大きなばらつきが生じたと考えられる。したがって、FI-AF4-ICP-MS 分析において、安定した信号強度が得られないために、SC 溶液の使用は適さないことが明らかになった。それゆえ、本分析では界面活性剤の酸解離定数を考慮して、適切に界面活性剤を選択する必要があると考える。

4.2 FI-AF4-ICP-MS 分析による AuNPs の定量

FI 法の確からしさと精度を調査するために、AuNPs の AF4-ICP-MS 分析を行った。AF4-ICP-MS 分析で検出された AuNPs に対して、FI 法を適用した検量線を用いてそれぞれ定量した。式 (1) に示した回収率を用いて、本分析における確からしさと精度を評価した。また、サンプリングの不確かさを考慮して、AF4 分離チャンネルにチャンネルフローのみを流した条件下で等量の AuNPs の AF4-ICP-MS 分析を行い、FI 法を適用した検量線を用いて検出された量を定量することで、注入量を決定した。

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{The amounts quantified by FI analysis (g)}}{\text{The injected amounts of samples (g)}} \times 100 \quad (1)$$

本研究では、AF4 分析によって得られる回収率に対する試料の保持時間 (t_R) の影響を調査した。AF4 分離条件は式 (2)^{10, 11)} に示した通りに、チャンネルフロー流量、クロスフロー流量、AF4 分離チャンネル体積、温度、溶媒の粘度を変更することで、調整可能である。特に、チャンネルフロー流量、クロスフロー流量は AF4 分離条件を変えるのに、最も簡単なパラメーターである。

$$t_R = \frac{w^2 R_h \pi \eta}{kT} \ln \left(1 + \frac{V_c}{V_0} \right) \quad (2)$$

ここで、 V_0 はチャンネルフロー流量、 V_c はクロスフロー流量、 w はスパーサー厚み、 η は溶媒の粘度、 k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 R_h は流体力学的直径である。

本検討ではクロスフロー流量のみを使って AF4 分離条件をそれぞれ変更して、試料の保持時間を任意に変化させた。表 3 に示した各 AF4 分離条件 (Condition 1~5, 0) における AuNP-50 の AF4-ICP-MS 分析のクロマトグラムを図 10 (a) に示す。クロスフロー流量を増大させるほど、試料である AuNP-50 の保持時間が長くなる傾向が見られた。また、AuNP-50 の回収率を図 10 (c) に示した。保持時間が長くなるほど、AuNP-50 の回収率は低下し、保持時間が 25 分を超えると、その影響が著しくなることが分かった。この結果は、AuNP-50 の凝集と AF4 分離チャンネル内部の透過膜への吸着によって生じていると考えられる。図 10 (b)

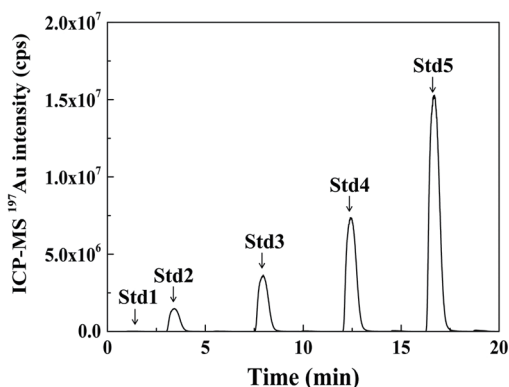


図 8 Au 標準溶液 (Std. 1-5) の FI クロマトグラム¹³⁾
FI chromatogram of Au standard solution (Std. 1-5)¹³⁾

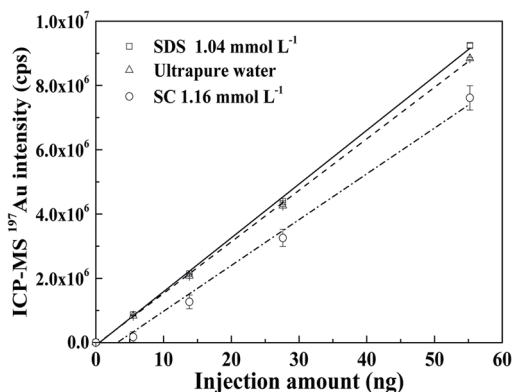


図 9 キャリア溶液を超純水, SDS 溶液, SC 溶液とした場合の Au 標準溶液の FI 校正曲線の比較¹³⁾
Comparison of FI calibration curves of the Au standard solution among ultrapure water (Δ), SDS solution (\square), and SC (\circ) solution¹³⁾

に示したように、AF4 分離条件 2～5 では AuNP-50 の凝集体に由来するピークが観測されており、今回はこの凝集体に由来するピークを考慮せずに回収率を求めたが、仮にこれらのピークを考慮したとしても、回収率は 100% にならなかった。このことから、AuNP-50 の凝集だけではなく、AuNP-50 の一部が AF4 分離チャンネル内部の透過膜に吸着し、ICP-MS でそれらが検出されていないことが明らかになった。したがって、AF4 分析における試料の保持時間は 20 分以内となるように調整する必要がある。

さらに、5 種類の AuNPs を適切な AF4 分離条件下で AF4-ICP-MS 法によってそれぞれ 3 回ずつ分析し、FIA に

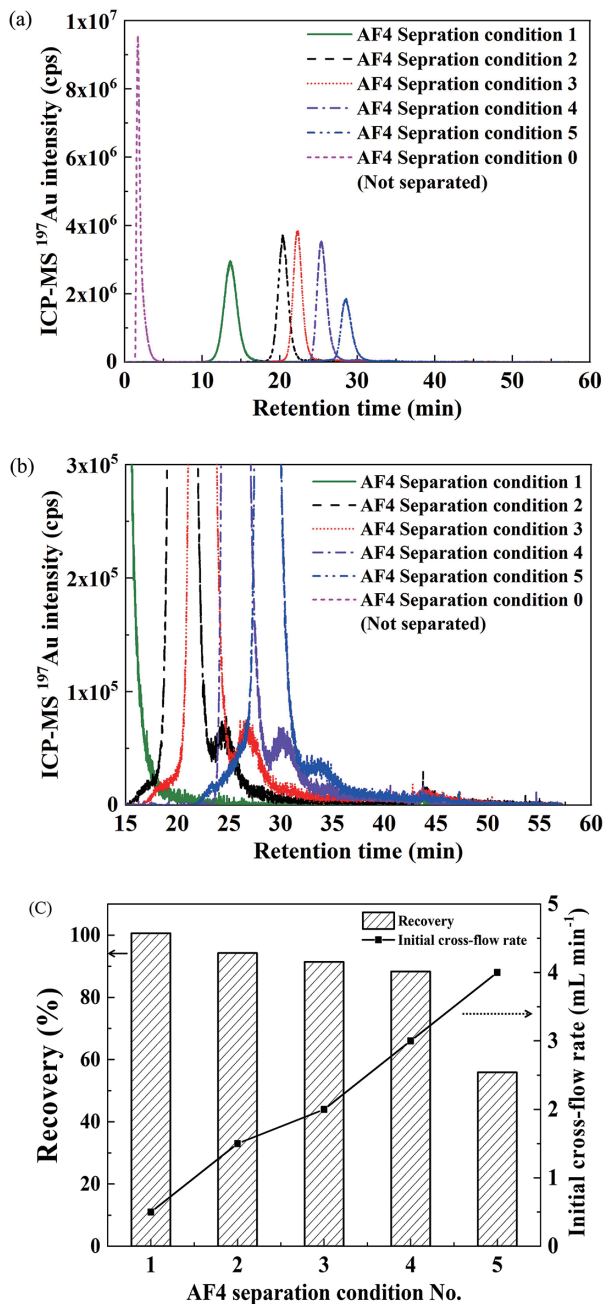


図 10 AuNP-50 の (a) AF4-ICP-MS クロマトグラム、(b) (a) の拡大図および (c) その回収率¹³⁾
(a) AF4-ICP-MS chromatogram, (b) enlarged part of (a) and (c) recovery of AuNP-50 under each AF4 separation condition¹³⁾

より定量した。各 AuNP の回収率を図 11 に示す。開発した FIA によって、いずれの AuNP に対しても良好な分析結果が得られた。回収率は全て 93% を超え、その変動係数は 5% 以内であった。回収率に対する粒子サイズの影響は確認されなかったが、試料のサンプリングにおけるばらつきや試料の分散状態が僅かな回収率の低下に影響した可能性がある。

4.3 FI-AF4-ICP-MS 分析による鉄鋼試料中 NbC の定量

FI-AF4-ICP-MS 法により分析した NbC の個数濃度を図 12 に示す。AF4 法で測定した平均直径 (約 2 nm)⁹⁾ と NbC の密度を用いて、FI-AF4-ICP-MS 分析で定量した Nb の質量を NbC の個数濃度に変換した。今回の試験に供した鉄鋼試料は、600℃ で 1 時間または 10 時間時効処理を施しており、時効処理時間の増大により NbC の個数濃度は約 6 倍に増加していることが明らかとなった。加えて、TEM 観察ではこれらの NbC が鋼中に不均一に分散していることが確認されたため、TEM 観察では正確な個数濃度を評価することができなかった。それに対し、FI-AF4-ICP-MS 分析は TEM やアトムプローブトモグラフィー (APT) よりも

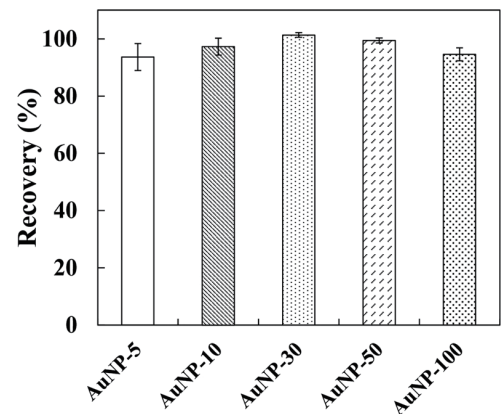


図 11 AuNP の AF4-ICP-MS 分析時の回収率¹³⁾
Recovery of AuNPs in AF4-ICP-MS analysis¹³⁾

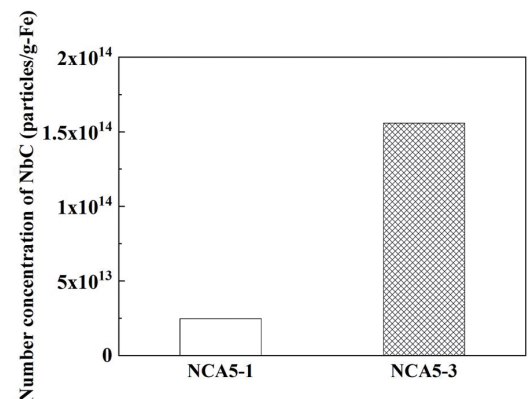


図 12 NCA5-1 および NCA5-3 中の NbC 析出部の個数濃度¹³⁾
Quantification of number concentration of NbC precipitates in NCA5-1 and NCA5-3 steels¹³⁾

多くの鋼中析出物を分析できるため、試料代表性の観点から有利である。したがって、FI-AF4-ICP-MS 分析は鋼中析出物のサイズと個数濃度を定量的に分析するのに有効な分析手法であると考えられる。

以上の知見より、AF4-ICP-MS 分析への FIA の適用は、鉄鋼試料中の様々なナノ析出物の定量解析を可能にする。しかしながら、本分析法では鋼中から析出物を抽出するため、鉄鋼試料中の位置情報は失われてしまう。したがって、AF4-ICP-MS 分析は TEM や APT 等の局所観察手法と相補的に利用されるべきであり、このような多面的な評価が鉄鋼製造プロセスにおける様々な現象を解釈するために必要不可欠であると考えられる。

5. 結 言

本研究では様々なナノ粒子を用いて、TEM を伴った AF4 による粒子径分布の測定方法を検討した。また、FI 法による AF4-ICP-MS 分析の定量方法に関して、AuNPs と鋼中 NbC を用い、検討を行った。本研究で得られた知見を以下にまとめる。

- (1) AF4 で測定した平均粒子径は TEM で測定した平均粒子径とほぼ同じであった。
- (2) AF4 の測定では、AF4 分離チャンネル内で粒子自身が拡散するために、ピークの拡がり現象が起こる。
- (3) AF4 分析における粒子径分布の FWHM の補正は、AF4/TEM の FWHM 比として定義される broadening factor を用いることにより可能であることが確認できた。
- (4) 球状の粒子に対する broadening factor は約 2.0 と決定されたが、その一方で、板状の粒子に対する broadening factor (約 1.6) はブラウン運動の抑制によって、見かけ上球状の粒子の値よりも小さくなった。
- (5) 適切なマトリックスマッチングを行うために、検量線を得るのに必要な標準溶液を AF4 キャリア溶液と混合する必要がある、その AF4 キャリア溶液に用いる界面活性剤は、界面活性剤の酸解離定数を考慮して選択する必要がある。

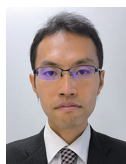
- (6) AF4 分離チャンネル中での試料の凝集、AF4 分離チャンネル内部の透過膜への試料の吸着を回避するために、AF4 分析における試料の保持時間は 20 分以内となるように分離条件を調整する必要がある。

- (7) FI-AF4-ICP-MS 分析により、鉄鋼試料の時効処理時間を 1 時間から 10 時間に増大させると、微細な NbC の個数濃度が約 6 倍になることを定量的に明らかにした。

以上の結果から、broadening factor を適用することにより、AF4 分析は様々なナノ粒子の粒子径の評価に対して有効となり、AF4 分析における FWHM の補正の適用可能性が示された。さらに、FIA は AF4-ICP-MS 分析を利用した様々なナノ粒子の定量評価に有効であるため、本分析法は、鋼中の様々な析出物のサイズ分布および個数濃度を決定するのに有用な手法であると考えられる。

参照文献

- 1) Kamikawa, N. et al.: ISIJ Int. 54 (1), 212 (2014)
- 2) Kataoka, T. et al.: ISIJ Int. 56 (11), 2062 (2016)
- 3) Ohta, H. et al.: ISIJ Int. 48 (3), 294 (2008)
- 4) Kinoshita, S. et al.: Tetsu-to-Hagane. 99 (5), 362 (2013)
- 5) Wei, G.-T. et al.: Anal. Chem. 71 (11), 2085 (1999)
- 6) Krueger, K.M. et al.: Anal. Chem. 77 (11), 3511 (2005)
- 7) Gray, E.P. et al.: J. Anal. At. Spectrom. 27 (9), 1532 (2012)
- 8) Liu, F.-K. et al.: J. Chromatogr. A. 1062 (1), 139 (2005)
- 9) Xu, X. et al.: J. Chromatogr. A. 1167 (1), 35 (2007)
- 10) Giddings, J.C. et al.: Science. 193 (4259), 1244 (1976)
- 11) Giddings, J.C.: Science. 260 (5113), 1456 (1993)
- 12) Itabashi, D. et al.: ISIJ Int. 60 (5), 979 (2020)
- 13) Itabashi, D. et al.: ISIJ Int. 62 (5), 860 (2022)
- 14) Takimoto, K. et al.: J. Jpn. Inst. Met. 40 (8), 834 (1976)
- 15) Kurosawa, F. et al.: J. Jpn. Inst. Met. 43 (11), 1068 (1979)
- 16) Kato, H.: AIST Bulletin of Metrology. 6 (4), 185 (2007)
- 17) Schimpf, M.E. et al.: Field-Flow Fractionation Handbook. New York, Wiley-Interscience, 2000



板橋大輔 Daisuke ITABASHI
先端技術研究所 解析科学研究所
主幹研究員 博士(工学)
千葉県富津市新富20-1 〒293-8511



谷口俊介 Shunsuke TANIGUCHI
先端技術研究所 解析科学研究所
主幹研究員



水上和実 Kazumi MIZUKAMI
日鉄テクノロジー(株)
本社 営業本部 東日本エリア営業部
富津営業室 専門主幹 博士(工学)