

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：63903

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26248010

研究課題名(和文) 軟X線内殻励起によるその場観測顕微分光法の確立と応用

研究課題名(英文) Development and application of in situ spectromicroscopy using soft X-ray inner-shell excitation

研究代表者

小杉 信博 (KOSUGI, Nobuhiro)

分子科学研究所・光分子科学研究領域・教授

研究者番号：20153546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 28,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、空間分解能30 nmの顕微XAS測定を用いた化学試料のその場観測手法を開発することを目的として、我々がこれまでに開発してきたその場観測用透過吸収セルを、走査型透過軟X線顕微鏡(STXM)に組み込んだ。これにより、トリエチルアミン水溶液の相分離、電気化学反応、薬物伝達系などの不均一な化学試料の顕微XAS測定から、その反応メカニズムを明らかにした。また、高効率な溶液反応を実現する有用な環境であるマイクロ流路の局所構造解析を空間分解能30 ミクロンのXAS測定により行った。

研究成果の概要(英文)：In order to apply soft X-ray absorption spectroscopy (XAS) to chemical materials with the spatial resolution of 30 nm, we have developed transmission-type in situ cells installed into scanning transmission X-ray microscopy (STXM). By using the spatially-resolved XAS, we have investigated the reaction mechanism of inhomogeneous chemical materials such as phase separation of aqueous triethylamine solutions, electrochemical reactions, and drug delivery systems. The local structure of microfluidics, which realizes highly efficient solution reactions, is also analyzed by using XAS with the spatial resolution of 30 micron.

研究分野：物理化学

キーワード：量子ビーム 内殻励起 X線顕微分光 その場観測 薬物伝達

### 1. 研究開始当初の背景

X線吸収分光法(XAS)は主に第一配位圏まで含めて化学的環境が異なる原子を区別できる局所化学状態解析手法である。重元素の内殻電子が励起できる硬X線領域は透過能に優れているため、試料に対する制約が少なく、金属原子周辺のその場観測状態分析が広く行われている。一方、1 keV以下の軟X線領域には炭素、窒素、酸素などの化学的に重要な軽元素の吸収端があるため、水や有機分子などの局所化学状態解析ができる。また軟X線分光は、最近の光源・分光技術の進歩により、硬X線よりエネルギー分解能や空間分解能の点で優位になっており、局所化学状態分析に強力なツールになりうる。ところが、軟X線は、分子を取り巻く環境(大気、溶媒等)に大きく吸収されるため、その場観測が非常に困難であった。最近、我々は液体層の厚さを20 nm - 2000 nmの範囲で制御できる液体セルを開発することで、溶液の透過法によるXAS測定を実現して、触媒反応や電気化学反応のその場観測に成功している。しかしながら、様々な化学試料の分析には均一な状態だけではなく、不均一な状態の局所構造解析が必要である。そのためには、空間分解能30 nmでの顕微XAS測定により、化学試料の局所構造解析を行う必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、空間分解能30 nmの顕微XAS測定を用いた化学試料のその場観測手法を開発することを目的とする。そのために我々がこれまで開発してきたその場観測用透過吸収セルを、走査型透過軟X線顕微鏡(STXM)に組み込む。これにより、溶液反応、電気化学反応、薬物伝達などの不均一な化学試料のその場観測顕微XAS法を開発することで、反応メカニズムを明らかにする。また、マイクロ流路は高効率な溶液反応を実現する有用な環境であり、空間分解能30 μmで、その局所構造解析を行うことも目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) STXMによる顕微XAS測定

図1に開発したSTXMによる液体試料の顕微XAS測定システムを示す。実験は分子研UVSOR-IIIの軟X線ビームラインBL4Uに設置されたSTXM装置に液体セルを組み込むことで行った。STXMの光学系では、ゾーンプレートを用いて、直入射光を防ぐセントラルストップとオーダーセレクトアパーチャーを通すことによって、入射軟X線を試料上に50 nmの空間分解能で集光する。そして、試料を二次元位置走査して、その時透過した軟X線を蛍光板付きのフォトマルチプライヤーチューブで検出する。軟X線の集光位置はアパーチャーから0.5 mmにあるので、集光位置に液体層が設置できるように液体セルを小型化する必要がある。

液体セルは我々がこれまで開発してきた

技術を基にして作成した。液体層は100 nm厚の2枚のSi<sub>3</sub>N<sub>4</sub>膜で挟むことにより構成している。そして液体セル周りは常圧のヘリウム環境下であり、液体層の厚さは1 μm以下になっている。液体セルの位置を走査することで、STXM装置に適した厚さの液体層を見つけることで、液体試料の顕微XAS測定を行った。電極を備えた電気化学セルも同様にSTXM装置に設置することで、電気化学反応中の液体の顕微XAS測定を行った。

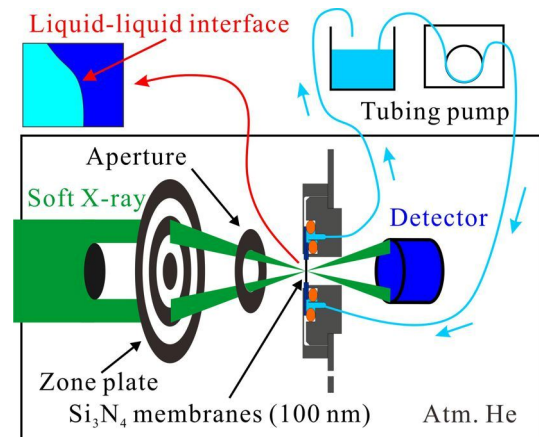


図1. STXMによる液体試料の顕微XAS測定システムの模式図。

#### (2) マイクロ流路の顕微XAS測定

マイクロ流路の局所構造解析を行うには、30 μmの空間分解能の顕微XAS測定が必要である。そこでUVSOR-IIIの軟X線ビームラインBL3Uにマイクロ流路セルを組み込んだ。図2にその模式図を示す。マイクロ流路はPDMS樹脂に50 μmの幅で作成して、その上に100 nm厚のSiC膜を接着した。マイクロ流路セルは常圧ヘリウム環境下であり、超高真空下のビームラインとは30 × 30 μm<sup>2</sup>程度のサイズのSiC膜で遮られている。軟X線のビームサイズはSiC膜の大きさで決まる。マイクロ流路の顕微XAS測定は、マイクロ流路への軟X線照射により発生する蛍光をシリンドリフト検出器で測定することにより行った。

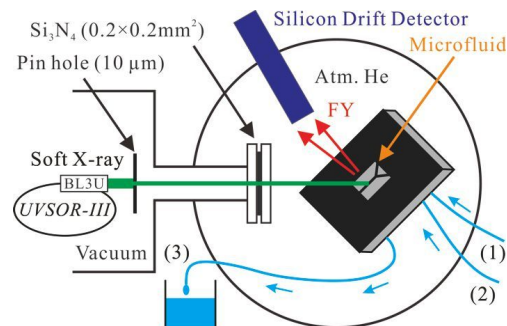


図2. マイクロ流路の顕微XAS測定の模式図。

### 4. 研究成果

#### (1) トリエチルアミン水溶液の顕微XAS測定

トリエチルアミン(TEA)水溶液は、低温で混合して高温で相分離する、通常とは逆の挙動である下部臨界温度を持つことが知られているが、その相転移の機構は分かっていない。相転移現象を調べるには均一な液体試料だけでなく、相分離により生じる液液界面の状態を調べる必要がある。そこで、STXMを用いてTEA水溶液の相分離後(29.9 °C)の液液界面の顕微 XAS 測定を行った。

図 3(a)に TEA と水の液液界面の O-K 吸収端の顕微 XAS を示す。相分離により、水が中心部分の水相に集まることが分かる。O-K, C-K 吸収端後の強度から、液液界面の位置ごとの水と TEA のモル濃度が分かり、そのモル比率が過去の相図と一致しているのを確認した。また、図 3(b)に水の水素結合に対応する O-K XAS の Pre-edge ピーク(535 eV)のエネルギーシフトの位置依存性を示す。水相では水同士の水素結合が形成している。そして TEA 相に行くにつれて、水の水素結合距離が延びて、Pre-edge ピークが低エネルギーシフトすることが分かった。これは、水相から TEA 相に行くにつれて、水の量が減るため、水の水素結合が弱くなり、TEA のエチル基と水の間で反発相互作用が優勢になるためである。このように、TEA 相と水相の液液界面は、水の水相への移動により、水の水素結合と TEA の反発相互作用の寄与が同等になる領域で生成することを明らかにした。

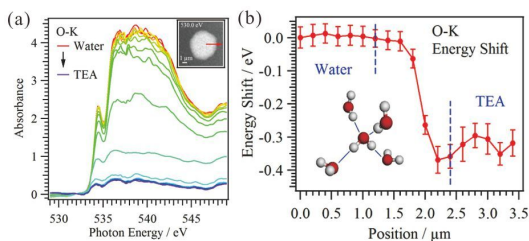


図 3. (a) 液液界面の O-K XAS, (b) Pre-edge ピークのエネルギーシフトの位置依存性。

### (2) 電気化学反応の顕微 XAS 測定

開発した STXM による液体試料の顕微 XAS 測定システムを用いて、0.1 M FeSO<sub>4</sub> 水溶液の電気分解のその場観察実験を行なった。水溶液の保持に用いる 2 枚の Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 膜のうち、上流側の一枚の窓部分に 3 本の Au 電極(厚さ 50 nm)を描画したものを用いた。これらの電極には、試料セル外部コネクタを介して電流を流すことが可能となっている。これらの電極をそれぞれ Working (WE)、Counter (CE)、Reference (RE)として用いることによって 0.1 M FeSO<sub>4</sub> 水溶液の電気分解を行なった後に、これら電極付近の Fe 2p の 2 次元吸収スペクトルを取得し、これに Fe(II)と Fe(III)の参照スペクトルのフィッティングを行なうことで、それぞれの価数の 2 次元分布像を得た。使用した参照スペクトル及び得られた 2 次元分布を図 4 に示す。(b)において、赤と緑はそれぞれ Fe(II)と Fe(III)の分布、そして青はスペクトルに特徴のない定数項、こ

こでは Au 電極の分布を示している。ここで得られた Fe(II)と Fe(III)の分布は予想とは逆であり、現在、その原因を検討中である。

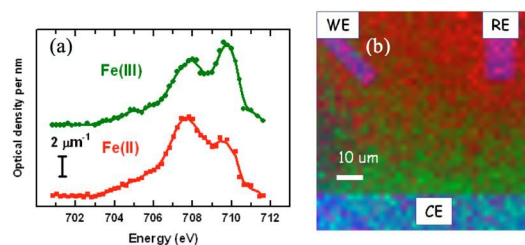


図 4. (a) Fe(II)と Fe(III)の参照スペクトル、(b) 電極部周辺の Fe の価数分布。

### (3) 経皮薬物伝達の分布の顕微 XAS 観察

ドラッグデリバリーシステムの開発において、薬剤が実際にターゲットとなる部位に蓄積される様子を観察することは、極めて重要である。これまでに、様々な手法が開発され、実際に利用されてはきたが、何れも一長一短であり、決定的な手法が存在しなかった。例えば経皮薬剤の場合、テープで皮膚を角質から徐々に剥がして分析する手法では空間分解能が不十分である。薬剤を標識し蛍光顕微鏡や電子顕微鏡で観察する方法では、薬剤そのものの分子量が変化するために、適切に浸透しない可能性が高い。電子顕微鏡では電子線ダメージも深刻である。そこで、内殻励起の化学シフトを用いることで、ラベルフリーでの高感度の分析かつ高分解能の観察が可能で、しかも試料ダメージが少ない軟 X 線 STXM で経皮薬剤の分布観察を行なった。

薬剤(デキサメタゾンを含む) core-multishell nanocarriers: CMS とヒト皮膚の O 1s 吸収スペクトルから(図 5(d)), π\*共鳴のピーク(531.4 eV)と σ\*の(535.9 eV)における吸光度の差を利用し、それらのエネルギーでの差分画像から皮膚深さ方向への構造における薬剤の浸透状態の分布を高分解能観察した(図 5(a)~(c))。これらの結果から、薬剤は角質細胞間に存在する脂質層に蓄積することが分かった。また処置時間の経過に伴って蓄積量が増加する様子も観察する事ができた。

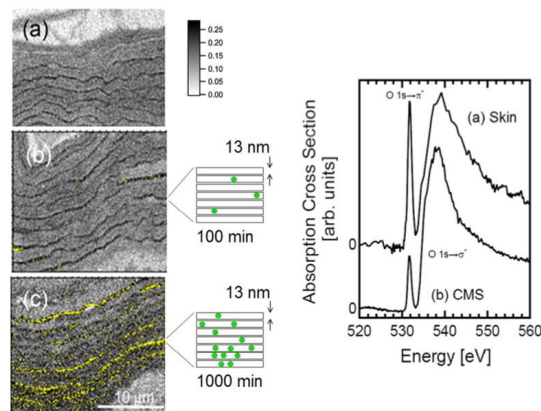


図 5 CMS のヒト皮膚の表皮部分での分布。(a) コントロール、(b)塗布後 100 分経過、(c) 1000 分経過、(d)皮膚と CMS の O 1s スペクトル。



#### (4) T字型マイクロ流路によるピリジン-水混合系の顕微 XAS 測定

マイクロ流路は高効率な溶液反応を実現する有用な化学環境である。マイクロ流路の顕微 XAS 測定のテストとして、T字型マイクロ流路によるピリジン-水混合系の顕微 XAS 測定を行った。図 6(a)に 550 eV の軟 X 線励起による T字型マイクロ流路の 2 次元蛍光イメージを示す。この時の軟 X 線のビームサイズは使った窓サイズから  $36 \times 23 \mu\text{m}^2$  である。T字型マイクロ流路の上部から水が来て、下部から液体ピリジンが流れる。そして、合流地点を経て、混合した溶液が右側に流れていく。軟 X 線励起エネルギーが 550 eV のため、水がある部分が強い蛍光強度を示す。図 6(b)にマイクロ流路の異なる位置における N-K 吸収端 XAS スペクトルを示す。ピリジンの位置( $X=200, Y=100$ )における  $N 1s \rightarrow \pi^*$  ピークに対して、混合部分( $X=350, Y=200$ )では、 $\pi^*$  ピークが高エネルギーシフトしていることが分かる。このエネルギーシフトはピリジンと水の間の水素結合により起こり、過去の我々の XAS 測定の結果とよく一致する。以上のように、軟 X 線領域の顕微 XAS 測定をマイクロ流路の局所構造解析に適用することに成功した。

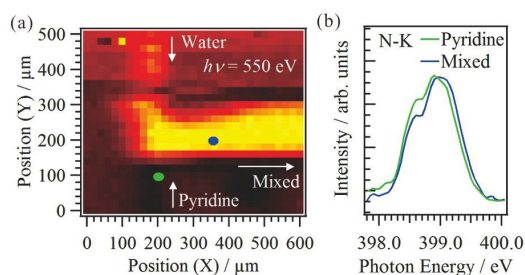


図 6. (a) 550 eV の軟 X 線励起による T字型マイクロ流路の蛍光イメージ。(b) マイクロ流路の異なる位置の N-K XAS スペクトル。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

M. Nagasaka, T. Ohigashi, N. Kosugi, “Development of In-Situ/Operando Sample Cells for Soft X-ray Transmission Spectromicroscopy at UVSOR-III Synchrotron”, *Synchrotron Radiat. News* 30(2) 巻, 3-7 頁, 2017 年, 査読無, DOI: 10.1080/08940886.2017.1289798

T. Petit, L. Puskar, T. Dolenko, S. Choudhury, E. Ritter, S. Burikov, K. Laptinskiy, Q. Brzustowski, U. Schade, H. Yuzawa, M. Nagasaka, N. Kosugi, M. Kurzyp, A. Venerosy, H. Girard, J.-C. Arnault, E. Osawa, N. Nunn, O. Shenderova, E. F. Aziz, “Unusual Water Hydrogen Bond Network around Hydrogenated

Nanodiamonds”, *J. Phys. Chem. C* 121 巻, 5185-5194 頁, 2017 年, 査読有, DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b00721

M. Yoshida, S. Onishi, Y. Mitsutomi, F. Yamamoto, M. Nagasaka, H. Yuzawa, N. Kosugi, H. Kondoh, “Integration of Active Nickel Oxide Clusters by Amino Acids for Water Oxidation”, *J. Phys. Chem. C* 121 巻, 255-260 頁, 2017 年, 査読有, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b08796

T. Fransson, Y. Harada, N. Kosugi, N. A. Besley, B. Winter, J. J. Rehr, L. G. M. Pettersson, A. Nilsson, “X-ray and Electron Spectroscopy of Water”, *Chem. Rev.* 116 巻, 7551-7569 頁, 2016 年, 査読有, DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00672

T. Brandenburg, R. Golnak, M. Nagasaka, K. Atak, S. S. N. Lalithambika, N. Kosugi, E. F. Aziz, “Impacts of Conformational Geometries in Fluorinated Alkenes”, *Sci. Rep.* 6 巻, 31382 頁 (7 頁), 2016 年, 査読有, DOI: 10.1038/srep31382

M. W. Lin, K. C. Wang, J. H. Wang, M. H. Li, Y. L. Lai, T. Ohigashi, N. Kosugi, P. Chen, D. H. Wei, T. F. Guo, Y. J. Hsu, “Improve Hole Collection by Interfacial Chemical Redox Reaction at a Mesoscopic NiO/CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>PbI<sub>3</sub> Heterojunction for Efficient Photovoltaic Cells”, *Adv. Mater. Interfaces* 3 巻, 1600135 頁(12 頁), 2016 年, 査読有, DOI: 10.1002/admi.201600135

K. Yamamoto, A. Klossek, R. Flesch, T. Ohigashi, E. Fleige, F. Rancan, J. Frombach, A. Vogt, U. Blume-Peytavi, P. Schrade, S. Bachmann, R. Haag, S. Hedtrich, M. Schäfer-Korting, N. Kosugi, E. Rühl, “Core-multishell nanocarriers: Transport and release of dexamethasone probed by soft X-ray spectromicroscopy”, *J. Control. Release* 242 巻, 64-70 頁, 2016 年, 査読有, DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.08.028

長坂将成, 小杉信博, “軟 X 線透過吸収法: 分子間相互作用解析のための化学シフトと測定技術”, *J. Vac. Soc. Jpn.* 59 巻, 301-306 頁, 2016 年, 査読有, DOI: 10.3131/jvsj2.59.301

大東琢治, 小杉信博, “UVSOR-III の走査型透過軟 X 線顕微鏡における化学状態分析法の開発”, *放射光*, 19 巻, 287-293 頁, 2016 年, 査読無

T. Ohigashi, A. Ito, K. Shinohara, S. Tone, M. Kado, Y. Inagaki, Y-F. Wang, N. Kosugi, “Observation of DNA and protein distributions in mammalian cell nuclei using STXM”, *AIP Conf. Proc.* 1696 巻, 020027 頁 (4 頁), 2016 年, 査読有, DOI: 10.1063/1.4937521

M. Nagasaka, H. Yuzawa, N. Kosugi, “Development and Application of

In Situ/Operando Soft X-ray Transmission Cells to Aqueous Solutions and Catalytic and Electrochemical Reactions”, 200 卷, 293-310 頁, 2015 年, 査読有, DOI: 10.1016/j.elspec.2015.05.012  
K. Yamamoto, R. Flesch, T. Ohigashi, S. Hedtrich, A. Klossek, P. Patoka, G. Ulrich, S. Ahlberg, F. Rancan, A. Vogt, U. Blume-Peytavi, P. Schrade, S. Bachmann, M. Schäfer-Korting, N. Kosugi, E. Rühl, “Selective Probing of the Penetration of Dexamethasone into Human Skin by Soft X-ray Spectromicroscopy”, Anal. Chem. 87 卷, 6173-6179 頁, 2015 年, 査読有, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00800  
H. Yuzawa, M. Nagasaka, N. Kosugi, “In Situ Soft X-ray Absorption Spectroscopy Applied to Solid-Liquid Heterogeneous Cyanopyrazine Hydration Reaction on Titanium Oxide Catalyst”, J. Phys. Chem. C 119 卷, 7738-7745 頁, 2015 年, 査読有, DOI: 10.1021/jp512891t  
長坂将成, 大東琢治, 小杉信博, “軟 X 線吸収分光法による電気化学反応の局所構造解析”, 分析化学, 64 卷, 163-172 頁, 2015 年, 査読有, DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.163

〔学会発表〕(計 15 件)

長坂将成, “軟 X 線吸収分光法による液体と液液界面の局所電子状態の解明”, 日本化学会第 97 春季年会・若い世代の特別講演会, 2017 年 3 月 16 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市).  
N. Kosugi, “Liquid and Liquid-liquid interface studied by soft X-ray absorption in transmission mode”, International Workshop on Liquid X-ray Spectroscopy, 2017 年 1 月 18 日, Saclay (France).  
T. Ohigashi, Y. Inagaki, N. Kosugi, “Development of Scanning Transmission X-ray Microscopy for in situ/operando chemical analysis at UVSOR-III”, Mechanical Engineering Design of Synchrotron Radiation Equipment and Instrumentation, 2016 年 9 月 12 日, Barcelona (Spain).  
N. Kosugi, “Optimal Energy and Spatial Resolutions for in situ/operando Soft X-ray Absorption Spectroscopy”, 2<sup>nd</sup> International Workshop on Soft X-ray Science Opportunities using Diffraction-limited Storage Rings, 2016 年 8 月 19 日, Hefei (China).  
T. Ohigashi, Y. Inagaki, A. Ito, K. Shinohara, N. Kosugi, “A quantitative 3-dimensional observation method for scanning transmission X-ray microscopy”, International Conference X-ray Microscopy,

2016 年 8 月 15 日, Oxford (U. K.).  
T. Ohigashi, Y. Inagaki, N. Kosugi, “Chemical Applications of a Scanning Transmission X-ray Microscope Developed at UVSOR-III Synchrotron”, 39<sup>th</sup> International Conference on Vacuum Ultraviolet and X-ray Physics, 2016 年 7 月 4 日, Zurich (Switzerland).  
N. Kosugi, “Chemical Shifts in Inner-shell Excitations arising from Molecular Interactions”, International Conference on the Future of X-ray and Electron Spectroscopies, 2016 年 6 月 16 日, Uppsala (Sweden).  
湯沢勇人, 長坂将成, 小杉信博, “軟 X 線吸収分光法によるチオシオン酸カリウム水溶液の局所構造観察”, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 28 日, 同志社大学 (京都府・京田辺市).  
小杉信博, “分子の内殻励起に関する先導的実験および理論”, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 25 日, 同志社大学 (京都府・京田辺市).  
長坂将成, 湯沢勇人, 望月健爾, E. Rühl, 小杉信博, “軟 X 線吸収分光法と赤外分光法による液体ベンゼンの分子間相互作用の観測”, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 24 日, 同志社大学 (京都府・京田辺市).  
N. Kosugi, “Quantum Chemical Approaches to Molecular X-ray Spectroscopy”, Workshop on Prediction and Interpretation of Core-level (K-, L-edge, etc.) Spectroscopy, 2015 年 10 月 6 日, Berkeley (U. S. A.).  
M. Nagasaka, “Soft X-ray Absorption Spectroscopy of Liquid and Application to In Operando Observations”, International Workshop on Soft X-ray in Energy and Time, 2015 年 8 月 20 日, Berlin (Germany).  
長坂将成, “軟 X 線吸収分光法による溶液の局所構造解析とオペランド観測への展開”, 第 37 回溶液化学シンポジウム, 2014 年 11 月 12 日, アバンセ (佐賀県・佐賀市).  
N. Kosugi, “Energy Shifts in X-ray Absorption and Photoelectron Spectra of Liquid Water”, NORDITA Conference on Water, 2014 年 10 月 30 日, Stockholm (Sweden).  
H. Yamane, “Advanced spectroscopic studies on molecular electronic states at UVSOR-III facility”, Asia-Oceania Forum for Synchrotron Radiation Research, 2014 年 9 月 17 日, Hsinchu (Taiwan).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小杉 信博 (KOSUGI, Nobuhiro)  
分子科学研究所・光子科学領域・

教授

研究者番号：20153546

(2)研究分担者

大東 琢治 (OHIGASHI, Takuji)

分子科学研究所・極端紫外光研究施設・  
助教

研究者番号：50375169

繁政 英治 (SHIGEMASA, Eiji)

分子科学研究所・極端紫外光研究施設・  
准教授

研究者番号：90226118

(3)連携研究者

長坂 将成 (NAGASAKA, Masanari)

分子科学研究所・光分子科学研究領域・  
助教

研究者番号：90455212

山根 宏之 (YAMANE, Hiroyuki)

分子科学研究所・光分子科学研究領域・  
助教

研究者番号：50402459