

ES-2030 形 日立フリーズドライヤー

(凍結真空乾燥装置)

用途：含水試料の凍結乾燥に用いる

原理：t-ブチルアルコール凍結真空乾燥法

SEM 用含水試料（主に生物試料）に含まれる水分を、エチルアルコールにすべて置換（脱水）したのち、t-ブチルアルコールに置換し、更に冷蔵庫で凍結させてから真空排気装置内の 13.3Pa 程度の減圧下で昇華・乾燥させる乾燥法。

表 1-1 t-ブチルアルコールの性質

項目	数値
分子量	74.12
沸点	82.41 °C
蒸気圧 (25°C)	5.6 kPa
融点 (凝固点)	25.66 °C
比重	0.78086
粘度	$3.316 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$
表面張力	$8.0 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$

表 1-2 装置仕様

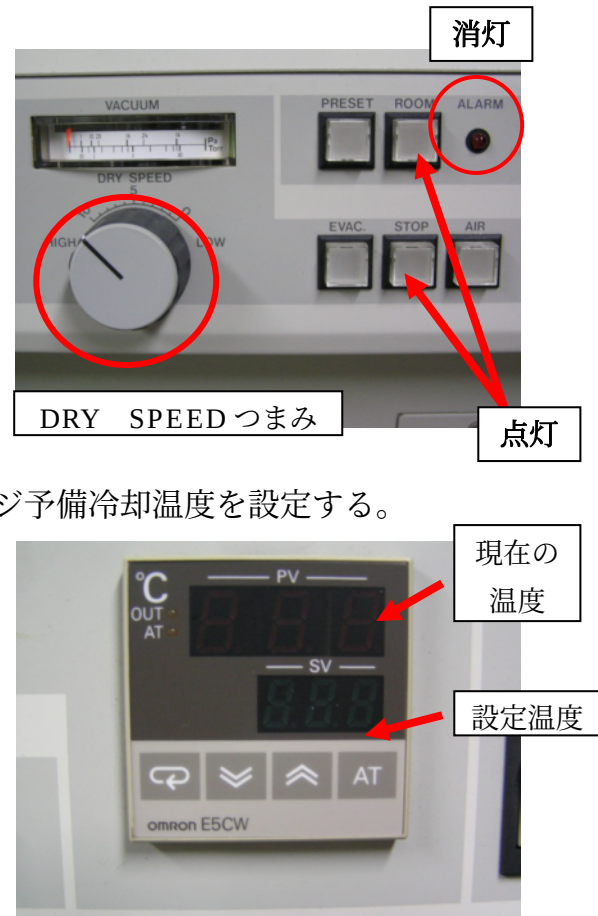
試料室		φ(内)106mm × H(内)100mm
試料容器	一般	φ(内)80mm × H(内)90mm (最大)
	専用	φ(内)14mm × H(内)15mm (約 2cc)
到達圧力		1 Pa ($7.5 \times 10^{-3} \text{ Torr}$)
試料ステージ温度 制御範囲		【室温】～【室温－30°C】 (室温範囲 15～30°C)
その他		排気速度可変



図 1-1 装置全体写真

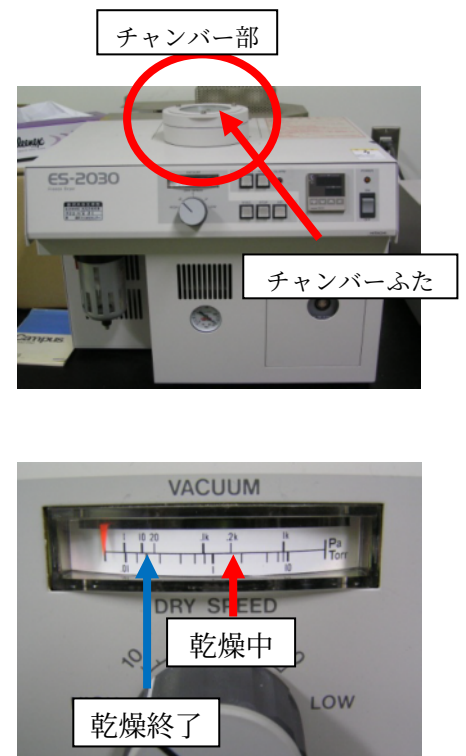
準備操作

1. POWER スイッチを ON にする。
POWER ランプ・STOP スイッチの内部ランプ・ROOM スイッチの内部ランプの点灯及び ALARM ランプの消灯を確認する。
2. DRY SPEED つまみを HIGH 方向一杯に回す。
3. チャンバーふたを閉め、チャンバーふたを軽く押さえながら EVAC スイッチを押して、試料室内を排気する。
4. ーPVー表示で、現在の試料ステージの温度を読み取る
5. ーSVー表示で、設定を確認しながら、希望試料ステージ予備冷却温度を設定する。
設定範囲は {室温 (現在の試料ステージ温度)} ~ {室温-30℃}
6. PRESET スイッチを押して、試料ステージ温度の制御を開始する。PRESET スイッチ内部ランプの点灯で確認する。



乾燥操作

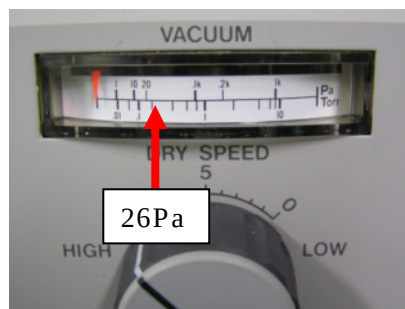
1. DRY SPEED つまみを希望する目盛位置に合わせる。
2. AIR スイッチを押し、試料室内圧力を大気圧にする。AIR スイッチ内部の点灯を確認する。
3. 試料室上部のチャンバーふたを開け、キャリアー（**試料を脱水して、t-ブチルアルコールで置換したのち、t-ブチルアルコールを冷凍庫で凍結させた前処理済のもの**）を試料室内に装着する。
4. チャンバーふたを閉め、チャンバーふたを軽く押さえながら EVAC スイッチを押して、乾燥を開始する。
5. 乾燥の終了は VACUUM メータの指示値の変化で判断する。
乾燥中の VACUUM メータは、約 200Pa (1.5Torr) 前後を示しているが、乾燥が終了すると、約 13Pa (約 0.1Torr) 未満を示すようになる。



6. 乾燥終了確認後、ROOM スイッチを押して、試料ステージ温度を室温に復帰させる。
試料の再吸水を防止するため、試料室内を大気圧にする前に必ず試料ステージ温度を室温に復帰させること
7. 試料ステージ温度が室温に復帰したら AIR スイッチを押し、試料室内圧力を大気圧にする。
8. 試料室が大気圧になったら、キャリアーごと試料を取り出す。試料は清浄な薬包紙上などに取り出し、SEM 試料台に貼り付ける。その後に、スパッタによる金コーティングを行う。

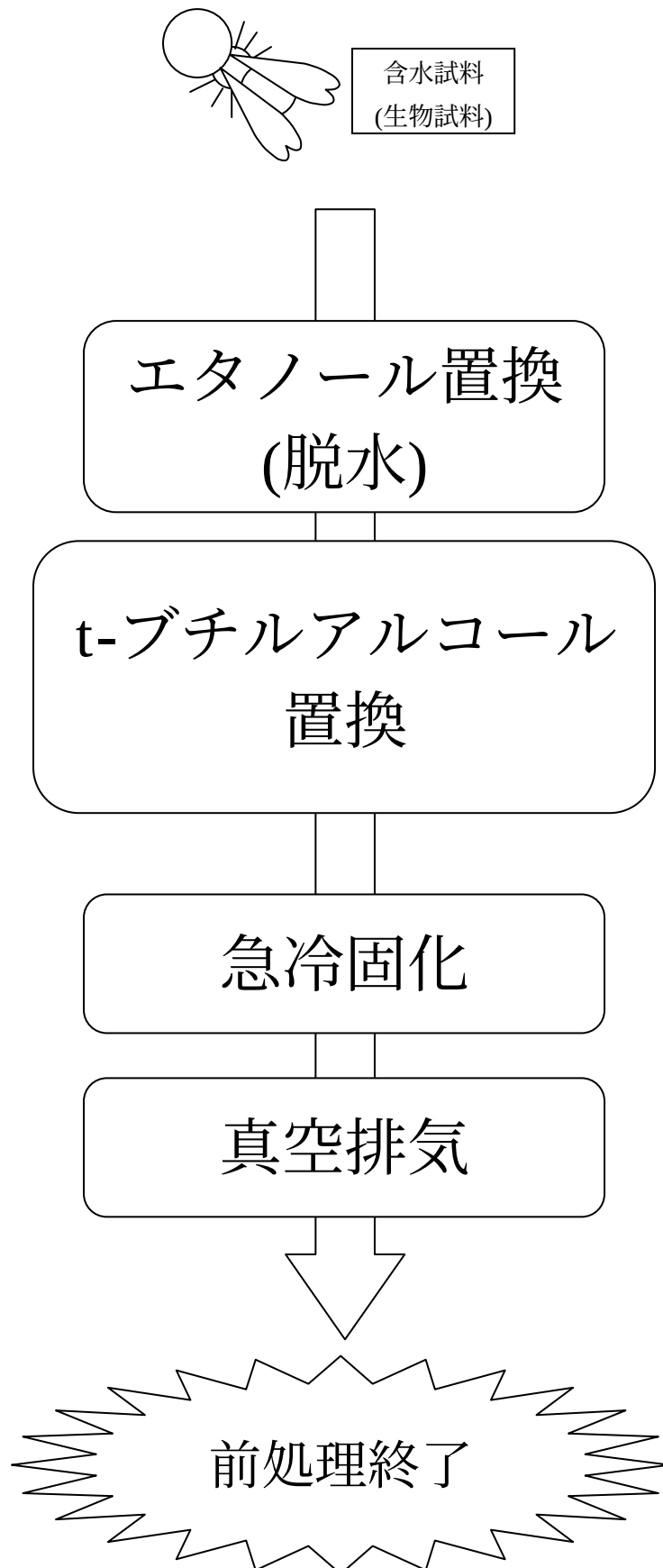
終了操作

1. DRY SPEED つまみを HIGH 方向一杯に回す。
2. チャンバーふたを閉め、チャンバーふたを軽く押さえながら EVAC スイッチを押して、再び試料室内を真空排気する。
3. VACUUM メータの指示値が約 26Pa（約 0.2Torr）前後になったら、STOP スイッチを押してから、POWER スイッチを OFF にする。
4. t-ブチルアルコールトラップ株のドレインの下にビーカーなどの容器を置き、ドレインつまみを緩めて t-ブチルアルコールをトラップから排出させる。
5. トラップからの t-ブチルアルコールの流出が止まったら、ドレインつまみを締める。



t-ブチルアルコール凍結真空乾燥法

手順チャート



t-ブチルアルコール凍結真空乾燥法

使用薬品：エタノール、t-ブチルアルコール

壱：エタノール置換

脱水操作：試料の中に含まれる水分を何らかの有機溶媒に置き換える操作を脱水という。

通常はエタノールを使用して行う。

高濃度のエタノールをいきなり用いると、試料が収縮してしまうため、50%、70%、80%、90%、(95%)の水溶液を作製し、それぞれの溶液に順番に浸ける。最後に100%のエタノールにて処理を行う。処理後、乾燥の操作を行う。

漬ける時間は、それぞれ、10～30分程度

エタノール置換を行う前に試料を緩衝液で洗浄を行うと、エタノール脱水による試料へのダメージを低減できることもある。

1. 各濃度のエタノール水溶液を準備する。溶液の量は、試料を溶液に完全に浸せるぐらいで十分。
2. 50%エタノールに試料を浸し、15～30分ほど待つ
3. 50%エタノールから試料を取り出し、すぐに70%エタノールに入れて15～30分ほど待つ
4. この操作を100%エタノールまで行う
5. t-ブチルアルコール置換操作を行う

注意

1. 脱水の操作の途中で試料を乾燥させないこと。特に高濃度のエタノールの時に注意が必要。
2. 高濃度のエタノールに長時間試料を放置すると、脂質成分が、低濃度のエタノールでは水溶性の成分が流出する。
3. 100%のエタノールは市販の99.5%特級エタノールで代用する。水の吸着剤を用いて準100%エタノールを作製する場合は汚染に注意する。

式：t-ブチルアルコール置換・急冷固化・真空排気

凍結乾燥法：物質に含まれている液体成分を一旦固体の状態（水の場合は氷）にして固体の状態から気体の状態（昇華）にして取り除く方法。蒸発という過程を通らないので試料に、表面張力が生じることがなく試料の形状変化を防ぐことができる。

1. t-ブチルアルコールの入った溶液を2つ用意する。26℃以下の場合t-ブチルアルコールは、凝固するため、白熱球などを用いて、暖めて融解させる。
2. 試料をt-ブチルアルコールに2回ほど浸す。各30分程度浸せば十分。
3. 装置からキャリアを取り出し、キャリアに備え付けてある試料皿内に試料を移す。試料が入っているさらにt-ブチルアルコールを約2cc入れ、冷凍庫（冷蔵庫）で急冷する。
4. 10～20分後t-ブチルアルコールが凝固したら、真空凍結乾燥装置内にキャリアを導入し真空排気操作を行う。（真空排気操作は、乾燥操作を参照のこと）
5. 真空排気中の試料を確認できる場合は、白く見えるt-ブチルアルコールが肉眼で確認できなくなり、真空度がよくなったら乾燥完了

番外編：緩衝液の作製方法

(EMTS HP 参照)

化学固定における緩衝液の役割…

1. pH の低下による細胞・組織の自己融解を防ぐ。
2. 固定液の pH を調節する。
3. 固定液の浸透圧を調節する。
4. 固定効果を一定に保つ

【1】 リン酸緩衝液

もっとも一般的な緩衝液。モル濃度を変えれば浸透圧の調節ができる。
カルシウム、酢酸ウラニルと反応する。

保存 A 液	0.2M 第一リン酸ナトリウム一水和物溶液 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27.8g を溶かして 1000ml の溶液を作製
保存 B 液	0.2M 第二リン酸ナトリウム七水和物溶液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	53.65 g を溶かして 1000ml の溶液を作製
処方	希望する緩衝液の pH に応じて A 液と B 液を混合する A 液：B 液＝28：78 で pH7.0 の 0.2M 緩衝液ができる	

【2】 コリジン緩衝液

保存 A 液	S-コリジン (pure)	2.67ml を溶かして総量を 50ml にする
保存 B 液	1N 塩酸	市販品を使用
処方	A 液 50ml + B 液 9.0ml に蒸留水を加えて 100ml にすると 0.2M の緩衝液ができる	

【3】 トリス緩衝液

保存 A 液	0.2M トリス・アミノメタン (tris hydroxymethyl aminomethane)	24.2g を溶かして 1000ml の溶液を作製
保存 B 液	0.2N 塩酸	市販品を使用
処方	A 液：B 液＝50：44.2 の割合で混合すると pH7.2 となる。全量を 200ml として使用	

【4】 カルコジ酸緩衝液

リン酸緩衝液の短所を補うことができる緩衝液。この緩衝液は「ヒ素」を含むので取扱いには注意が必要。

保存 A 液	0.2M カルコジ酸ナトリウム	42.8g を蒸留水に溶かして 1000ml の溶液作製
保存 B 液	0.2N 塩酸	市販品を使用
処方	A 液：B 液＝50：6.3 でおおよそ pH7.0 の 0.2M 緩衝液が出来上がる	

【5】 ベロナール緩衝液

グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムの混合固定液、酢酸ウラニルのブロック染色液に使用。

保存 A 液	酢酸ナトリウム Sodium acetate-hydrated 1.15g	ベロナール酸ナトリウム (バルビタール) 2.89g	蒸留水を加えて 100ml とする
処方	5ml の保存液に蒸留水 15ml を加えて、5ml までの 0.1N 塩酸を加えて希望の pH にする		

注意

1. 作製時には、pH とモル濃度に注意が必要
2. 処方した緩衝液は時間の経過とともに pH が変化するので、使用時に pH の変化をチェックする。
3. 固定液作成用の緩衝液のモル濃度は、固定液の最終モル濃度を考えて決定する。例えば、固定液の最終モル濃度が 0.1M の場合で、固定剤が半量であるとする 0.2M の緩衝液を作成しておく必要がある。

参考

走査電子顕微鏡試料作製のフローチャート

