

全反射蛍光 X線分析法による飲料・生体試料の分析

高原 晃里*

1. はじめに

試料基板に対し極めて浅い角度 (~0.1°) で X線が入射すると、入射 X線は基板表面で全反射する。この時の X線の試料への侵入深さは数 10 nm であり、基板表面の元素は効率よく励起されるが、基板に起因するバックグラウンド強度が低く、S/Nの良いスペクトルが得られる。全反射蛍光 X線分析法 (TXRF法) は、この全反射現象を利用し、基板表面の微量試料を高感度に元素分析する手法である。TXRF法により、液体試料中の μg/L (ppb) レベルの無機成分を、内標準定量法を用いて簡便に定量分析できる。食品分野では、飲料水、清涼飲料水、ミルク、コーヒー、お茶、ワイン等のアルコール類といったさまざまな飲料の TXRF分析が報告されている^{(1),(2)}。また、バイオ関連分野でも、生体試料を酸分解し、TXRF分析を行った研究が多数報告されている⁽³⁾。最近、国際標準化機構 (ISO) により TXRF法による水の分析方法が規定され⁽⁴⁾、さまざまな液体試料分析へ用途が広がっている。本稿では、TXRF法による液体試料分析を解説し、卓上型全反射蛍光 X線分析装置 NANO HUNTER II を用いた飲料、生体試料の分析例を紹介する。

2. 液体試料の分析

TXRF法による液体分析は、10 μL 程度の少量液体試料を石英ガラス基板に滴下・乾燥させて、その乾燥残渣を測定する。図1に蒸留水、お茶、ワイン、塩水の乾燥痕の様子を示す。水道水や飲料用の水には ~数 100 mg/L (ppb) の無機成分が含まれている。乾燥痕は 1 mm 程度と小さく、バックグラウンド強度の低い良好な TXRF スペクトルが得られる。一方、清涼飲料水、お茶、アルコール飲料などに代表される飲料には、ミネラルや塩分などの無機成分や、糖分やアルコールなどの有機成分が多く含まれるため、乾燥痕が大きくなる。TXRF スペクトルのバックグラウンドは、乾燥残渣の成分や乾燥痕の大きさ (高さ) に応じて高くなるため、検出下限が悪化する。また乾燥痕が不均質にな

ることも多く、分析値の再現性の低下や、吸収効果による分析誤差の原因となる。そのため試料や分析目的によって、希釈、酸分解、脱塩などの前処理が必要な場合もある。

3. 内標準定量法

TXRF法による液体分析では、内標準定量法が一般的に用いられる。これは、試料の乾燥痕の形状、残渣成分、位置ずれなどの影響を受けて、蛍光 X線強度が変化しやすいためである。内標準定量法は、液体試料中に既知濃度の内標準液を添加し、分析元素と内標準元素との X線強度比により、分析元素の強度を補正する。

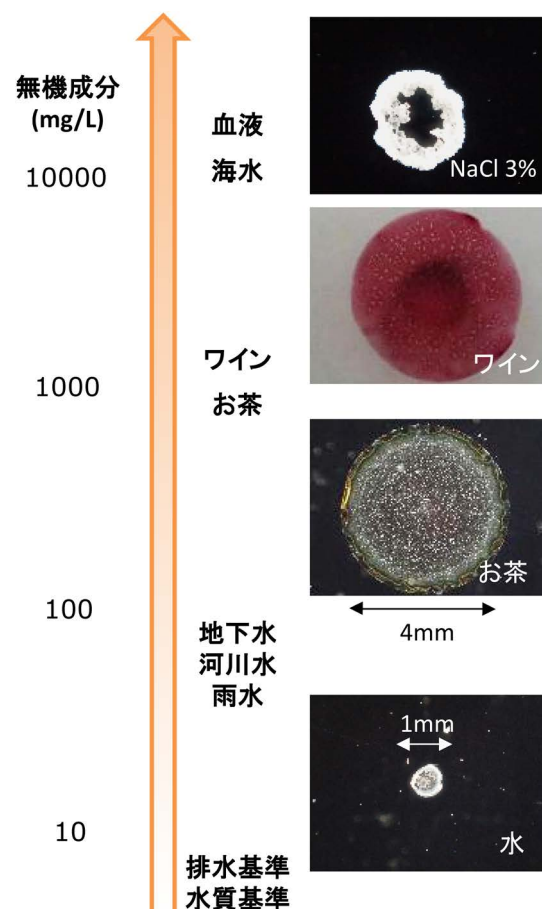


図1. 液体試料の乾燥痕の様子。

* 株式会社リガク X線機器事業部 SBU WDX

内標準定量法において、分析試料と内標準液を混合した調整液中の分析元素*i*の濃度*C_i'*は、下式により与えられる。

$$C_i' = \frac{C_{IS}' \times I_i \times k_{IS}}{I_{IS} \times k_i}$$

ここで相対感度係数*k*とは元素間の感度差であり、装置の光学系や分析線の物理定数を用いた理論計算⁽⁵⁾や実験により求められる。内標準元素と分析元素の相対感度係数の比を用いて、既知の内標準元素濃度から目的の分析元素濃度に変換する。調整前の分析試料中の分析元素濃度*C_i*は、調整時に混合した容量から算出する。

$$C_i = C_i' \times \frac{V_i + V_{IS}}{V_i}$$

- C_i'* : 分析元素の調整液中濃度
- C_{IS}'* : 内標準元素の調整液中濃度
- C_i* : 分析元素の試料中濃度
- C_{IS}* : 内標準元素の試料中濃度
- I_i* : 分析元素の X 線強度
- I_{IS}* : 内標準元素の X 線強度
- V_i* : 分析試料液の容量
- V_{IS}* : 内標準液の容量
- k_i* : 分析元素の相対感度係数
- k_{IS}* : 内標準元素の相対感度係数

内標準元素は試料に含まれず、スペクトルに重なりがない元素を選択する。比較的試料中に含まれにくい元素として、Sc, V, Ga, Yが挙げられるが、環境水や飲料の分析ではGaがよく用いられる。内標準液は、分析元素に同濃度レベルとなるように、かつ再現性の良いピーク強度が得られる濃度を添加する。例えば、飲料水に含まれる mg/L (ppm) レベルの成分分析を行う場合は、100 mg/L に調整済みの ICP・原子吸光用の標準液 10 μL を、試料 990 μL に添加し混合すればよい (調整液の内標準元素の濃度は 1 mg/L になる)。

4. 装置

TXRF 分析には、卓上型全反射蛍光 X 線分析装置 NANOHUNTER II を用いた。NANOHUNTER II は 600 W の高出力 Mo ターゲット X 線管と 50 mm² の大面積 SDD を搭載し、卓上機ながら高感度を実現している。人工多層膜ミラーで反射した Mo-K α 線および高エネルギーの X 線を励起源とし、Al~U の広い元素範囲の分析が可能である。測定条件は管電圧、管電流を 50 kV-12 mA、入射角度を 0.025°, 測定時間を 1000 秒とした。

5. 水の微量元素分析

淡水の標準物質 NIST 1643f (Trace elements in fresh water) を用いて、分析値および検出下限の評価を行った。試料調製は、10 mg/L に調整した Ga 内標準液 10 μL を試料 990 μL に添加した。調整後の試料溶液を 10 μL 採取し、石英ガラス基板に滴下し、真空乾燥した。石英ガラス基板はシリコンコート処理済みのものを用いた。5 検体を作製し、作製再現性の評価を行った。

TXRF 測定により得られたスペクトルを図 2 に示す。Si は主として石英ガラス基板に、Ga は内標準液 (Internal standard, IS) に由来するピークである。また Ga 内標準による定量分析結果を表 1 に示す。分析結果は標準値と良く一致しており、変動係数で 2~13% の良好な作製再現性が得られた。検出下限は、遷移金属元素について 1~0.6 μg/L (ppb) の結果が得られている。

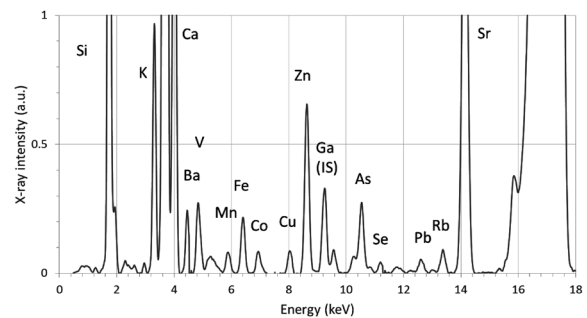


図 2. NIST 1643f (Trace elements in fresh water) の TXRF スペクトル。

表 1. NIST 1643f (Trace elements in fresh water) の TXRF 分析結果。
(単位: μg/L)

元素	標準値	分析値	標準偏差*	検出下限**
K	1913	2081	58	18.4
Ca	29140	30902	1292	13.9
V	36	66.0	5.8	2.6
Cr	18	13.7	1.8	4.4
Mn	37	47.8	2.4	1.8
Fe	93	101	4.2	1.4
Co	25	24.5	0.5	1.3
Cu	21	22.3	2.9	0.96
Zn	74	74.7	5.6	0.90
As	57	60.7	1.2	0.63
Se	12	11.5	0.8	0.73
Rb	13	14.3	0.5	0.82
Sr	311	380	9.6	0.84
Ba	513	1064	41	1.01
Pb	18	17.7	1.6	2.5

* 標準偏差は 5 検体の作製再現性試験から算出

** 検出下限 (LLD) は次式により算出

$$LLD = 3 \frac{C}{I_N} \sigma_B = 3 \frac{C}{I_N} \sqrt{\frac{I_B}{t}}$$

- C : 分析元素の濃度
- I_N : 分析元素のネット強度
- I_B : 分析元素のバックグラウンド強度
- t : 測定時間

6. ワインの成分分析

ワインには～1%のK, Caをはじめ、微量のFe, Mn, Cuなどが含まれており、その成分分析は微量金属元素の食事摂取や、産地・ブランド偽装防止などの観点から注目を集めている。ICPなどの化学分析法ではアルコールなどの有機成分の分解・除去が必要となるため、ワインを前処理なしでそのまま分析できることはTXRF法の利点である。チリ産の赤ワイン試料のTXRFスペクトルを図3に示す。ワイン試料は蒸留水を用いて1:1の希釈を行うことにより、K, Caなど軽元素に対するマトリクス効果が低減され、分析値の誤差が小さくなることが報告されている⁽⁶⁾。そこでワイン試料に対して蒸留水を1:1で希釈し、990 μLを採取し、100 mg/LのGa内標準液を10 μL添加した。調整溶液10 μLをシリコンコート済みの石英ガラス基

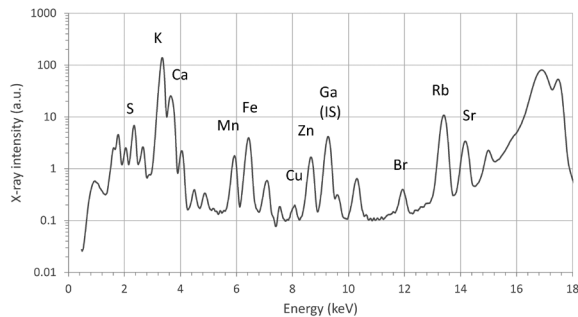


図3. チリ産赤ワインのTXRFスペクトル。

表2. ワインのTXRF分析結果。

(単位: mg/L)

元素	分析値	参考値 (1) ⁽⁶⁾	参考値 (2) ⁽⁷⁾
S	168	20-45	
K	803	250-880	254-757
Ca	66.7	41-100	41-101
Mn	1.86	0.5-1.4	0.5-0.9
Fe	3.25	0.3-4.2	0.3-3.8
Cu	0.05	0.02-0.37	0.02-0.37
Zn	0.72	0.1-1.4	0.1-1.4
Br	0.15	0.05-1.2	0.05-1.19
Rb	4.09	0.9-16	0.9-3.4
Sr	1.31	0.3-1.2	0.3-1.2

板に滴下、乾燥した。表2にTXRF分析結果を参考値と併せて示す。成分濃度は分類や産地などで異なるが、典型的な参考値とよくあっていることがわかる。

7. 外国産茶葉浸出液中のAs, Pb, Cdの分析

茶葉は土壌汚染の影響が懸念されており、お茶の消費量が多い日本や、茶葉を中国やインドなどからの輸入に頼るヨーロッパで、浸出液に含まれる有害成分の分析が検討されている。外国産茶葉の浸出液の有害元素成分、特にAs, PbおよびCdの微量有害元素分析について検討した。中国産緑茶の茶葉を95°Cで10分浸出した浸出液のTXRFスペクトルを図4に示す。浸出液970 μLに対して、Ga 5 mg/LのGa内標準液10 μLおよび100 mg/LのAg内標準液20 μLを添加した。Gaは18 keV以下の領域のAsおよびPb分析の内標準として、Agは18 keV以上の高エネルギー領域のCd分析の内標準として用いた。試料溶液10 μLをスライドガラス(松浪硝子工業製S6213)に滴下し、乾燥した。定量分析結果を表3に示す。数千mg/LレベルのKをはじめ、数mg/L～数十mg/LレベルのTi, Mn, Fe, Zn, Rb等の無機成分が検出された。着目した微量有害元素であるAs, PbおよびCdは未検出だった。As, PbのICP-MS分析値は、それぞれ1.0, 0.6 μg/Lであり、非常に低い値であることがわかった。図5はPb標準液を20または50 μg/L添加した浸出液ならびに、Cd標準液を0.5

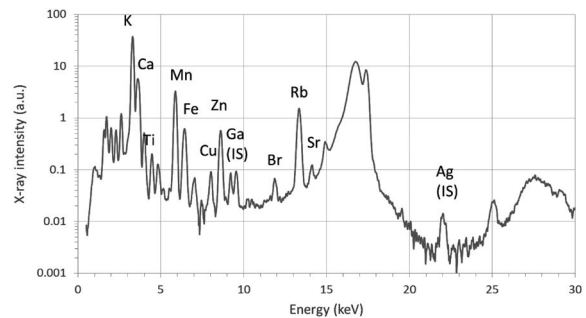


図4. 中国産茶葉の抽出液のTXRFスペクトル。

表3. 中国産茶葉の抽出液のTXRF分析結果。

(単位: mg/L)

元素	分析値
K	382
Ca	23.9
Ti	0.93
Mn	8.36
Fe	0.67
Cu	0.10
Zn	0.62
Rb	1.33

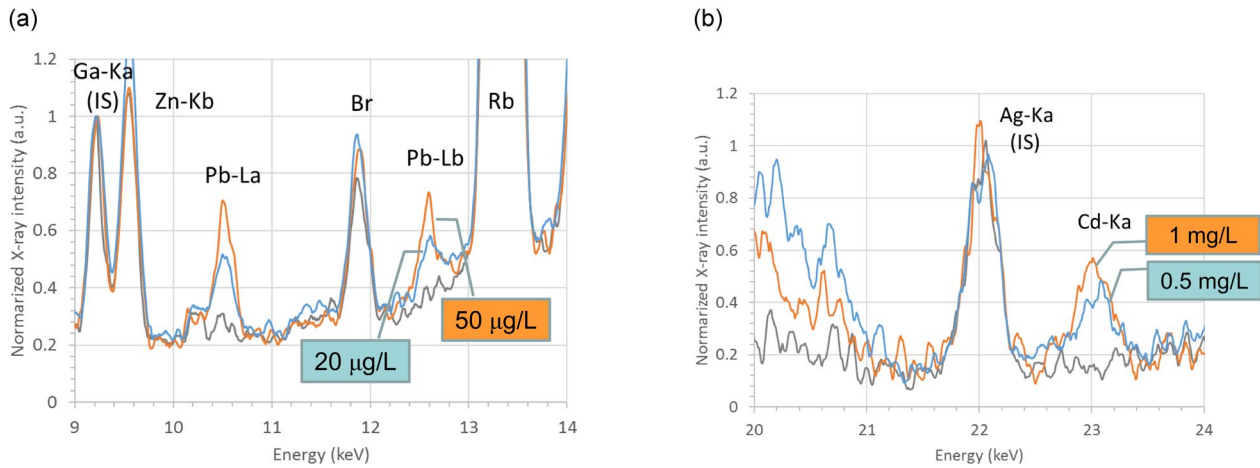


図5. 中国産茶葉の抽出液のTXRFスペクトル。
 (a) Pb標準液を20または50 μg/L添加, (b) Cd標準液を0.5または1 mg/L添加。

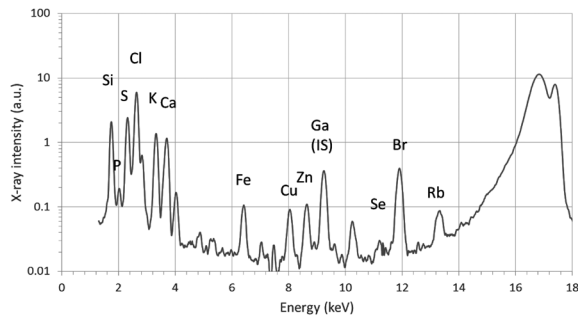


図6. 血清のTXRFスペクトル。

表4. 血清試料のTXRF分析結果. ICP-MS分析値との比較.

(単位: mg/L)

元素	TXRF	ICP-MS
P	127	120
S	1016	1128
K	161	170
Ca	96.7	93.7
Fe	2.14	1.27
Cu	1.15	1.02
Zn	1.26	0.875
Se	0.140	0.136
Rb	0.512	0.165

または1 mg/L添加した浸出液のTXRFスペクトルである。どちらの元素も添加量に応じてピーク強度が増加することが確認できた。検出下限はAs, Pb, Cdについて、それぞれ1.7, 6.4, 112 μg/Lと見積もられた。

8. 血清試料の分析

生体試料のようにたんぱく質などの有機物を高濃度を含む試料は、まず酸分解により有機物を分解した後、希釈を行う。これにより、乾燥残渣が低減され、

分析可能なTXRFスペクトルが得られる。図6に血清試料のTXRFスペクトルを示す。酸分解処理後の血清試料を、蒸留水を用いて10倍に希釈し、990 μLに対して10 mg/LのGa内標準液を10 μL添加した。調整溶液10 μLをシリコンコート済みの石英ガラス基板に滴下、乾燥した。表4にTXRF分析結果をICP-MS分析値と比較した。主成分のP, S, K, Caや微量成分のFe, Cu, Zn, Se, Rbが検出され、ICP-MS分析値とも近い値が得られた。

9. まとめ

卓上型全反射蛍光X線分析装置NANO HUNTER IIを用いた水や飲料の分析を紹介した。TXRF法は液体試料を基板に滴下、乾燥するだけで測定できる。ICP法と比較して試料処理が簡便であり、また内標準法を用いて検量線作成の手間なしに定量分析ができる。さまざまな液体試料の成分分析やスクリーニング検査にTXRF法の活用が期待される。

参考文献

- (1) L. Borgese, F. Bilo, R. Dalipi, E. Bontempi and L. E. Depero: *Spectrochim. Acta B*, **113** (2015), 1–15.
- (2) Y. Tabuchi and K. Tsuji: *X-ray Spectrometry*, **45** (2016), 197–201.
- (3) V. Salomone, M. Riera and C. Muniain: *Int J Exp Spectroscopic Tech*, **2**: 011, (2017)
- (4) ISO20289: 2018, *Surface chemical analysis—Total reflection X-ray fluorescence analysis of water*.
- (5) ISO14706: 2014, *Surface chemical analysis—Determination of surface elemental contamination on silicon wafers by total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectroscopy*.
- (6) R. Dalip, E. Margui, L. Borgese, F. bilo and L. E. Depero: *Spectrochim. Acta B*, **120** (2016), 37–43.
- (7) 国村伸祐, 河合潤: *分析化学*, **58** (2009), 1041–1054.