極微量水溶液試料に対する定量法の開発

後藤祥子[1]、高橋千衣子[1]、寺崎一典[2]、世良耕一郎[2]

[1]日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0173　岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

[2]岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173　岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1　はじめに

NMCC で開発が行われた「無標準法」により、多くの生物試料について、1 mg 以下の微少試料に対する定量分析法が確立されている[1)]。しかし、無標準法は有機成分を含まない水溶液試料に対しては適用できない。通常、水溶液試料の調製は、ピペットを用いて内部標準元素 5～10 ppm となるように原子吸光用標準溶液を添加して行う[2,3)]。内部標準液として最も多く用いられているのはインジウム標準液（1000 ppm）である。これを精度良く定量し添加するためには、元の試料量は 1 mL 以上であることが望ましい。例えば試料量が 100 μL しかない場合、通常の内部標準法と同じ量の内部標準液を加えてしまうと、内部標準の濃度が高過ぎて微量元素の定量は困難になる。また、通常の内部標準法と同じ濃度で測定しようとすれば、加える内部標準液の量は 0.5～1 μL となり、試料量がさらに少なくなれば通常のピペット操作で内部標準液を精度良く添加するのはほとんど不可能になる。しかし、試料の中には希少なものや、極微量しか採取できないものがある。今回、そうした極微量（50 μL 以下）の液体試料に適した定量法の開発を目的とし、次の 4 つの方法を想定した。

①均一ビームによる外部標準法（外部標準法）

図 1 に示すように、外部標準法にはターゲットの形状に応じて 2 通りの定量法がある。水溶液試料の場合は、バッキング膜上に滴下し、そのまま乾燥させたものを測定するため、スポット状のターゲットになる。このようなターゲットに対しては、均一ビーム法が適用される。

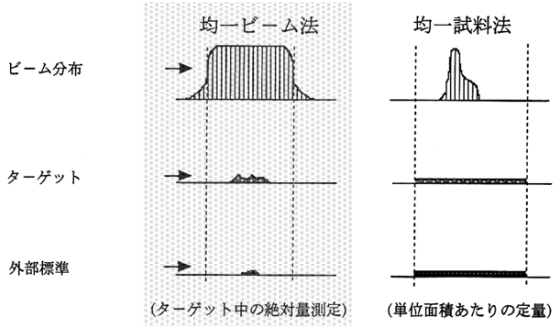


図 1　外部標準法

均一ビーム法は、ターゲット全体を均一なビームで抱え込むように照射し、試料中の代表的な一元素 X の絶対量を同一条件で照射した既知量の X の標準ターゲットとの比較から求め、それを内部標準とみなして他の元素の定量を行うという方法である。したがって、ビームの不均一性・不安定さや試料への当たり具合が分析の精度に大きく影響する可能性がある。しかし、内部標準を加える必要がないため、微少量の試料で定量分析でき、試料調製に関わる不確定要因も生じない。

②試料分割内部標準併用法（分割法）

測定試料を十分に均一化した後、マイクロチューブ 2 本（A、B）に分けて、A に通常の内部標準法の場合と同じ量(5～10 μL)の内部標準を加える。例えば、A に 10 μL の試料を入れた場合、10 μL のインジウム標準液を加えると、内部標準濃度は通常の 100～200 倍の 1000 ppm になる。この条件で A の測定を行い、試料中に最も高濃度で存在する元素 X を定量する。元素 X を内部標準とみなして B を測定することにより他の元素の定量を行う（図 2）。この方法の場合、内部標準液の添加量は通常の内部標準法と同じなので、そのピペッティング精度については問題ない。しかし、1 試料に 2 回の照射が必要で、測定・解析の手間も 2 倍になる。また、試料を分割するため、高感度分析のためには 20～30 μL の試料量が必要である。

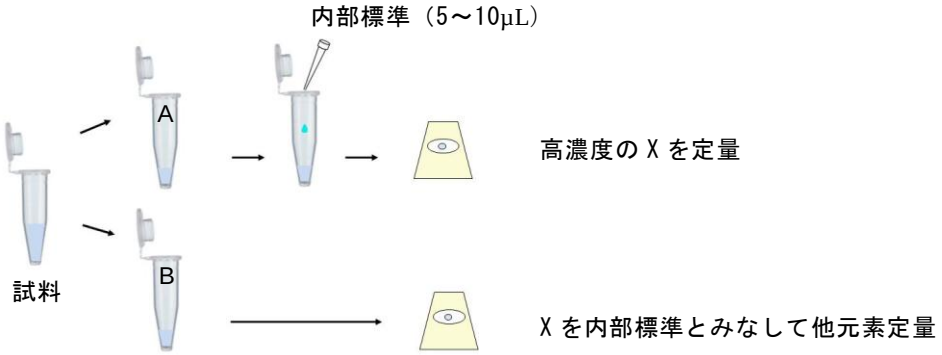


図 2　分割法

③内部標準液希釈添加法（希釈法）

内部標準液を希釈し、通常の内部標準法と同じ量を低濃度で試料に添加する。前記の 2 法より簡便だが、最適な希釈倍率をおさえる必要があり、希釈した時に濃度が均一になるように注意しなければならない。また、内部標準液を加えるため、少なくとも 10 μL の試料量は必要である。

④内部標準上乗せ法（上乗せ法）

無調製の試料をバッキングフィルムに滴下して乾燥させ､それにかぶせるように内部標準液を滴下し、再び乾燥させて測定する。手法としては最も簡単で、外部標準法と同様に数 μL の試料量で定量可能であり、内部標準液を加える必要がないため試料調製に関わる問題も生じない。しかし、特に薄い溶液の場合、完全に乾燥させてしまうと痕跡が見えにくくなるため、内部標準液を正確な位置に滴下することが難しくなる。逆に濃い溶液の場合、痕跡が大き過ぎて内部標準液をかぶせきれない部分が残ってしまうことがある。さらに、バッキングフィルムが疎水性のため、滴下した試料はしばしばフィルム上を移動する。痕跡に内部標準液を正確に上乗せできたとしても、その位置まで試料が移動した道筋に元素が残存していることも考えられ、定量の際の誤差要因となる可能性がある。

これら 4 つの方法のうち､①は外部標準法､②～④は内部標準法である。それぞれ一長一短があるが、各々の方法で市販の標準液を測定することにより、確度、再現性を検討した。

2　定量方法

2-1　測定試料

測定に使用したのは米国 SPEX 社の原子吸光分析用標準試薬 MIXSTD-5A および XSTC-8 である（表 1）。MIXSTD-5A では Fe、PB、Tl、Ni について、XSTC-8 では Ti、Zr、Nb、Mo について測定を行った。試料が「極微量」であるという前提のため、外部標準法および上乗せ法では 50 μL（原理的には数 μL で可能だが、測定効率を考えて 50 μL とした）、分割法では 40 μL、希釈法では 10 μL をマイクロチューブに分取し、これを測定用サンプルとして試料調製を行った。

表 1　測定試料

溶液名	ベース溶液	元素及び濃度
MIXSTD-5A	5% Nitric Acid	Fe, Mg, Pb – 100 mg/L Tl – 50 mg/L Ni – 20 mg/L Be – 10 mg/L
XSTC-8	H_2O/trace HF	B, C, Ge, Mo, Nb, P, S, Si, Ta, Ti, W, Zr, Re – 10 mg/L

2-2　外部標準法による MIXSTD-5A の測定

試料中に含まれている Ni を指標元素とした。標準ターゲットは、和光純薬工業㈱原子吸光分析用 Ni 標準液（1000 ppm）を超純水で 10 倍および 100 倍に希釈し、100 ppm、10 ppm の溶液各々について、10 μL、20 μL、30 μL をバッキングフィルムに滴下したものを用意した。乾燥後、これらを 300 μm マイラー吸収体を用いて測定し、外部標準法の基礎データとした。MIXSTD-5A は、マイクロチューブに 50 μL 分取し、十分に攪拌した後、10 μL をバッキングフィルムに滴下して、乾燥後、標準ターゲットと同条件でビームを照射し、ここで得られた Ni 濃度を基準として内部標準法と同様、X 線発生断面積・吸収体の透過率・検出効率の 3 つの物理量を用い、Fe、PB、Tl の定量を行った。

2-3　分割法による MIXSTD-5A の測定

試料中に高濃度で含まれている Fe を指標元素とすることにした。40 μL の MIXSTD-5A から 10 μL をマイクロチューブに分取し、内部標準として 1000 ppm の In 標準液を 10 μL 加えて十分に攪拌した。ここから 10 μL をバッキングフィルムに滴下して、乾燥後、Fe の濃度を測定した。当初の計画では、ここで得られた Fe の定量値を基準にして残りの 30 μL の測定を行い、他の元素を定量することになっていたが、Fe の測定結果はすべて保証値より 20%程度低かった。原因として、試料中に高濃度で加えた In による X 線の自己吸収の影響が考えられたため、In を 10 倍に希釈して再度測定を行い、原液のスペクトルと比較してみると、原液では Fe の Kα のピークが 20%程度低く出ていることがわかった（図 3）。そこで、Fe の 1000 ppm In に対する自己吸収補正を行い、残りの 30 μL から 10 μL をバッキングフィルムに滴下して PB、Tl、Ni の定量を行った。

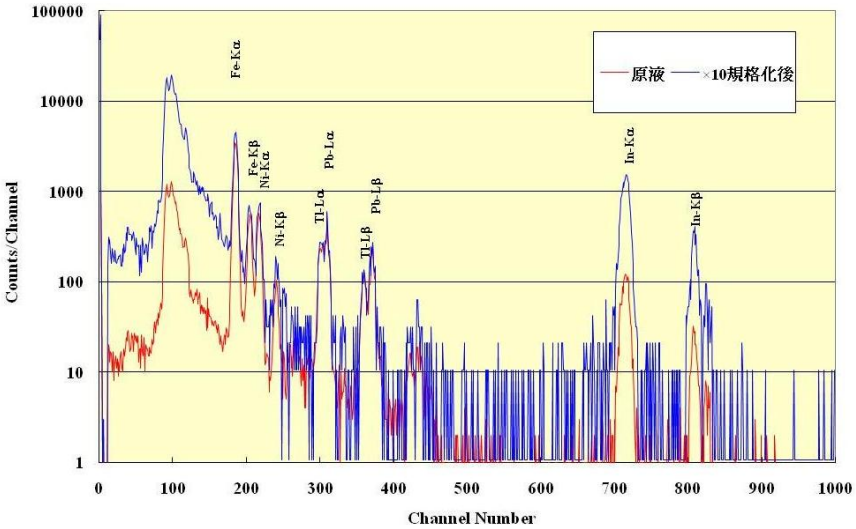


図３　異なる濃度の In による試料のスペクトル比較

2-4　希釈法による MIXSTD-5A および XSTC-8 の測定

内部標準液は 10 倍希釈（100 ppm）、100 倍希釈(10 ppm)の 2 種類を用意した。MIXSTD-5A と XSTC-8 は 10 μL ずつマイクロチューブに分取した。これに各々の濃度の内部標準液を 10 μL 加えて攪拌した後、10 μL をバッキングフィルムに滴下して乾燥後に測定した。

2-5　上乗せ法による MIXSTD-5A および XSTC-8 の測定

MIXSTD-5A と XSTC-8 をマイクロチューブに 50 μL 分取し、十分に攪拌した後、バッキングフィルムに 5 μL 滴下した。試料が乾ききってしまうと痕跡が見えにくくなるため、水滴がある程度小さくなったところでそれにかぶせるように内部標準液を 5 μL 滴下し、再び乾燥させて測定した。内部標準の濃度が影響するかどうかを見るため、In 標準液は原液（1000 ppm）、10 倍希釈液（100 ppm）、100 倍希釈液(10 ppm)の 3 種類を用意した。

3　照射・測定及び解析

島津製作所製医療用小型サイクロトロン（MCY-1750）から引き出された 2.9 MeV の陽子ビームは、真空散乱槽内のグラファイトコリメータにより整形されターゲットを照射する [4)]。今回はいずれの場合にも、6 mm φ のビーム径が用いられた。ビーム電流は 70 nA 前後、測定時間は 1 試料に対しおよそ 5 分であった。発生した X 線は二検出器同時測定システムにより検出され [5)]、高エネルギー用の検出器には 500 μm Mylar film が X 線吸収体として装着された。スペクトルは PIXE 専用スペクトル解析プログラム SAPIX 及び定量計算プログラム KEI により解析され [6)]、各元素濃度が求められた。

4　結果と考察

4-1　外部標準法

外部標準法による MIXSTD-5A の測定結果を図 4 に示す。試料 2 が全元素について保証値より 2 割ほど低いが、試料をバッキングフィルムに滴下する際のピペットチップからの液切れが悪かったか、ビームの照射位置から若干ずれていたためと考えられる。逆に、試料 4 が全元素について保証値より 2 割ほ

ど高い結果が出たが、これもピペット操作による誤差と思われる。また、試料 10 は Fe と Tl が保証値より 15%程度高い。前述のように、この測定法ではターゲット中の元素の絶対量を測定するため、試料を滴下する際のピペッティングおよびビームの照射位置の正確さが極めて重要となる。これらを厳密に調節することにより、確度の向上が期待できる。この方法は、試料調製を要しないため、同種の試料を多数測定する場合に有用と思われる。

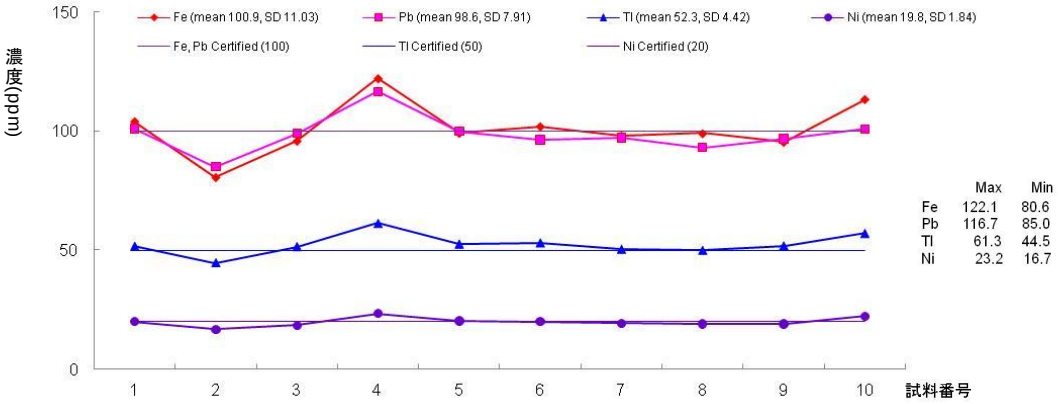


図 4　外部標準法による MIXSTD-5A の測定結果

4-2　分割法

分割法による MIXSTD-5A の測定結果を図 5 に示す。Tl を除いて保証値よりやや低めだが、平均すると概ね保証値±数%の範囲内に収まっている。しかし、分割法では高濃度の In を用いると自己吸収などの不確定要素が生じることがわかり、今回は希釈した In 標準液を用いて測定し直し、補正を行った。低濃度の In 標準液を使用するのであれば、結局、4-3 の希釈法と同じことになる。しかも、測定・解析の手間が 2 倍になるため、この方法は実用的とは言えない。

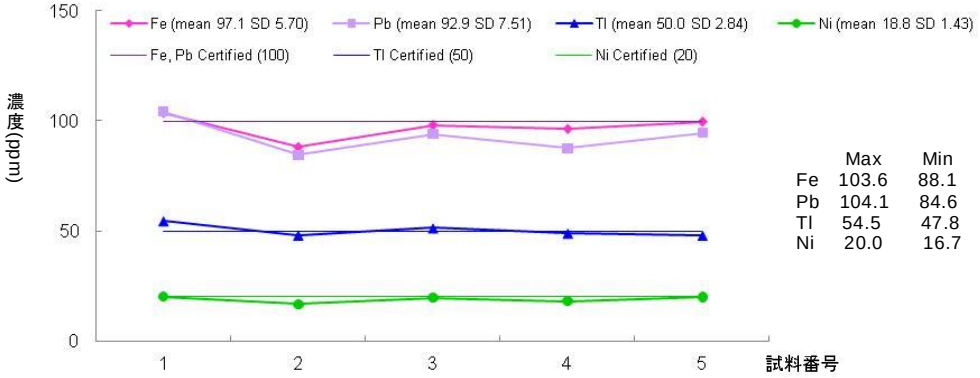


図 5　分割法による MIXSTD-5A の測定結果

4-3　希釈法

希釈法による MIXSTD-5A および XSTC-8 の測定結果を図 6 に示す。

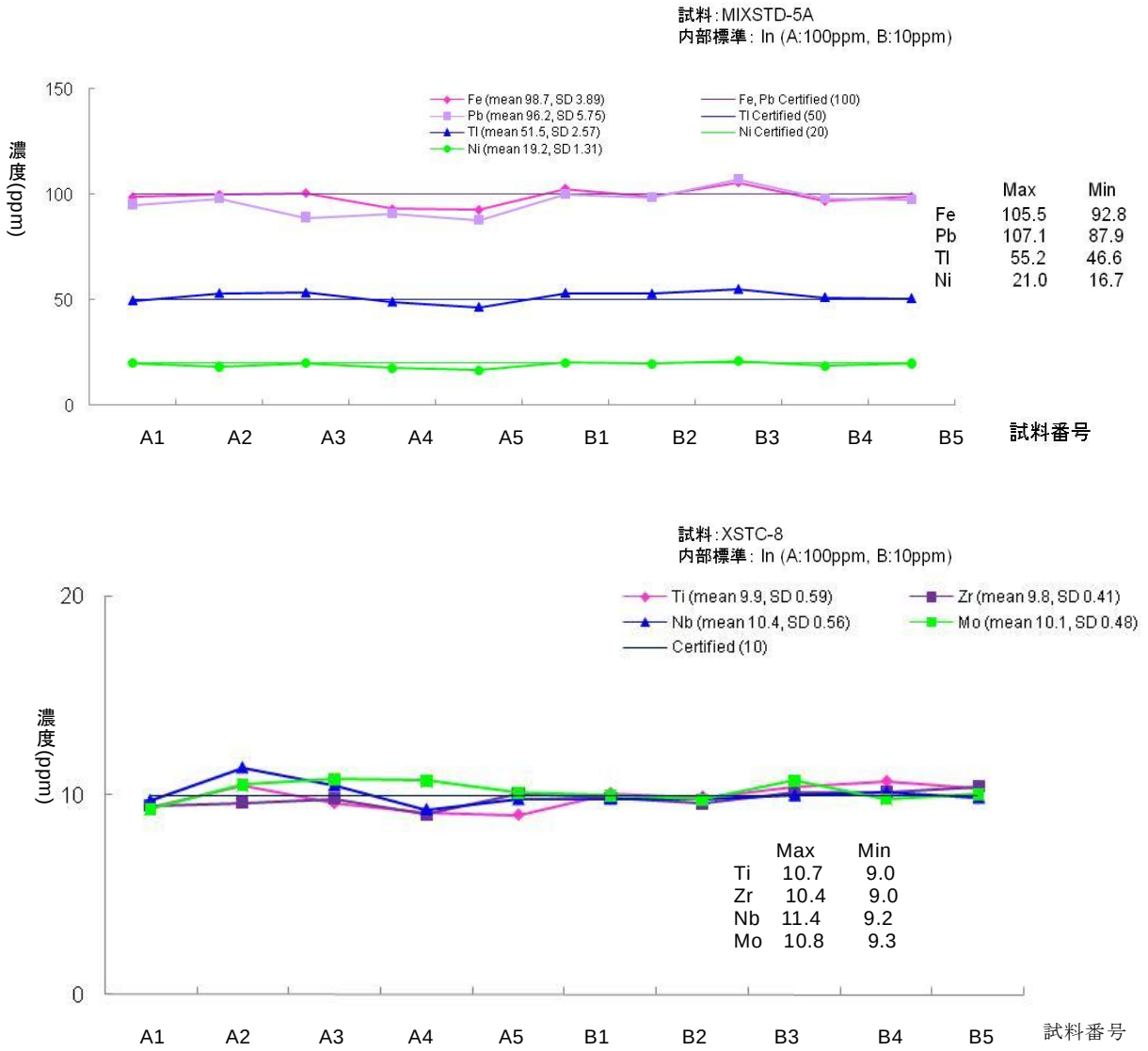
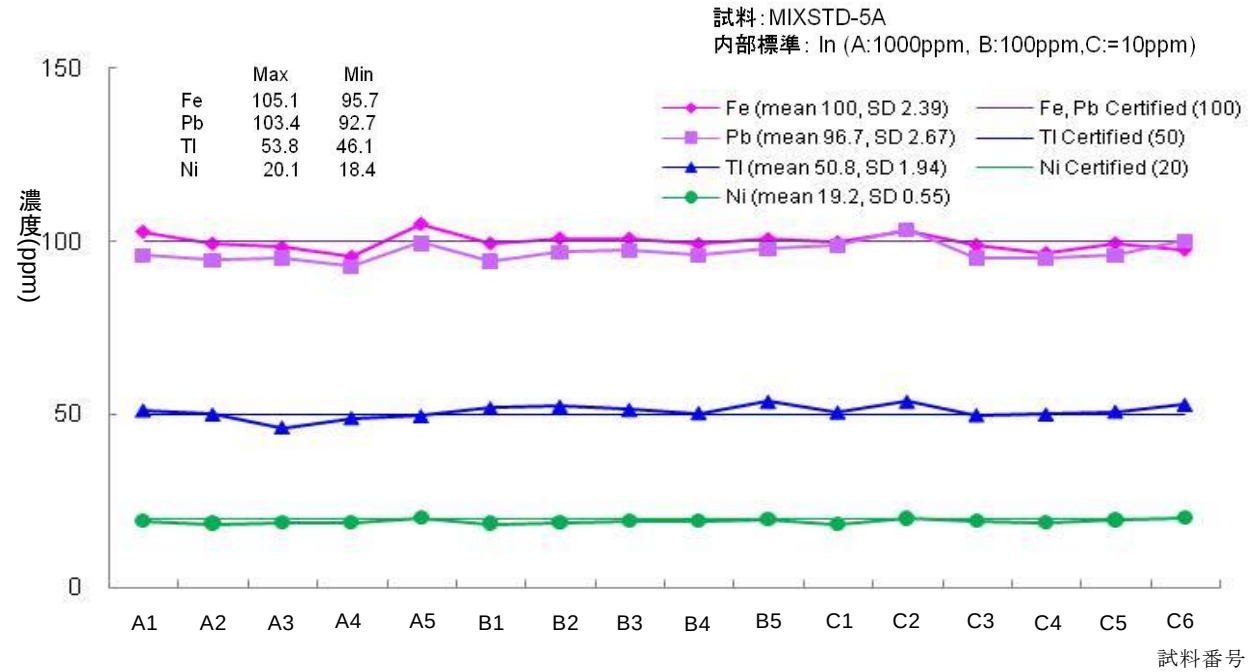


図 6　希釈法による MIXSTD-5A（上）と XSTC-8（下）の測定結果

A1～5 が 10 倍希釈、B-1～5 が 100 倍希釈の In 標準液を加えて測定したグループである。いずれの測定においても 100 倍希釈の方が確度、再現性とも優っている。In 標準液を 100 倍に希釈することにより、通常の内部標準法と同程度の濃度条件で測定できることになるため、希釈が正確にできれば確度の高い定量が可能と思われる。

4-4　上乗せ法

上乗せ法による MIXSTD-5A および XSTC-8 の測定結果を図 7 に示す。



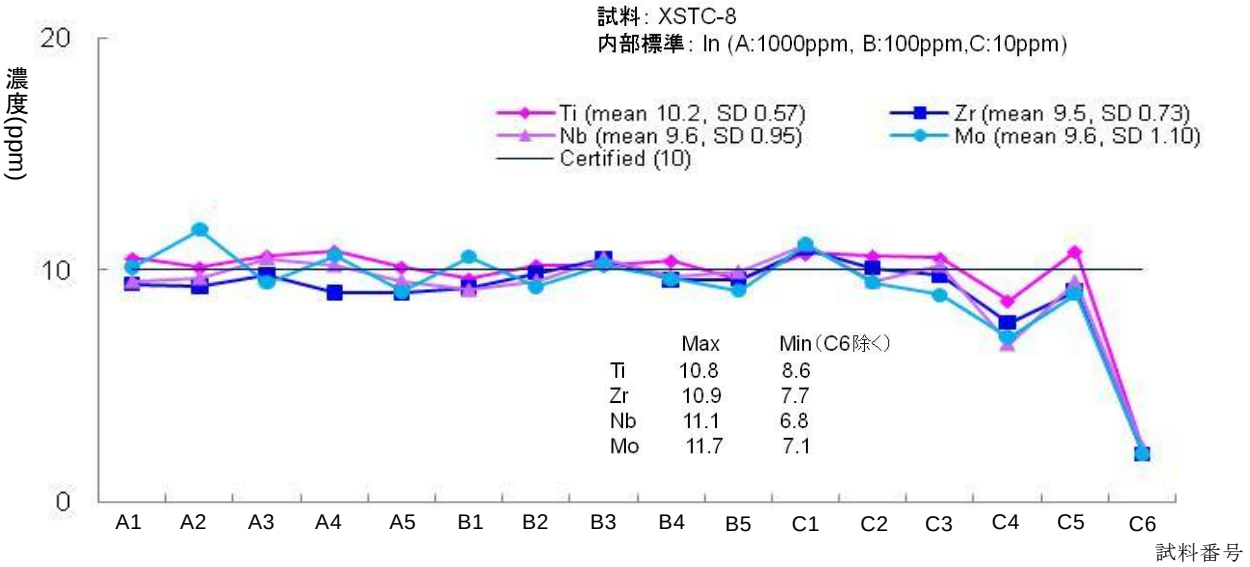


図 7　上乗せ法による MIXSTD-5A（上）と XSTC-8（下）の測定結果

A1～5 が原液、B-1～5 が 10 倍希釈、C-1～6 が 100 倍希釈の In 標準液を試料に上乗せして測定したグループである。XSTC-8 の C-6 は明らかに上乗せポイントを見失ってしまったものであり、C-4 もポイン

トがずれてしまった可能性が高い。In の濃度で比較すると、両方のグラフで B グループが安定しているように見えるが、MIXSTD-5A の測定では、平均すればどのグループも保証値±数%と良好な結果が得られた。XSTC-8 のグラフでは Mo の変動がやや目立つが、標準試料とはいえ、念入りに均一化しても、分取量が微少であったため、サンプル中に元素濃度のばらつきがあったということも考えられる。上乗せ法は、試料全体をカバーするように、内部標準を正確に上乗せする手法を確立することにより、確度の高い定量が期待できる。また、原液の内部標準液を使用しても概ね保障値と一致した結果が得られており、ターゲット作成も簡便であるため、特に試料中の元素濃度の大まかな傾向を効率的に把握したい場合などには有用性が高いと思われる。

4-5　4 法の比較

図 8、9 に各々の方法で得られた定量結果（平均値±S.D.）を示す。各々の方法で使用した試料量およびターゲットとした試料量が異なるため（表 2）一概には比較できないが、今回の測定では 100 倍希釈の In 標準液を用いた希釈法が確度、再現性において最も優れていた。このことは、内部標準液を正確に希釈できれば、これを試料に加えて均一化するという通常の内部標準法と同じ調製法が、最も誤差要因が少なく、確実な方法であることを示すものと考えられる。

表 2　使用試料量およびバッキングフィルム滴下量　(μL)

	使用試料量(A)	内部標準添加量(B)	滴下量
外部標準法	50	－	10/A
分割法	40 → ①10	10	10/A＋B
	②30	－	10/A
希釈法	10	10	10/A＋B
上乗せ法	50	5	5/A＋B

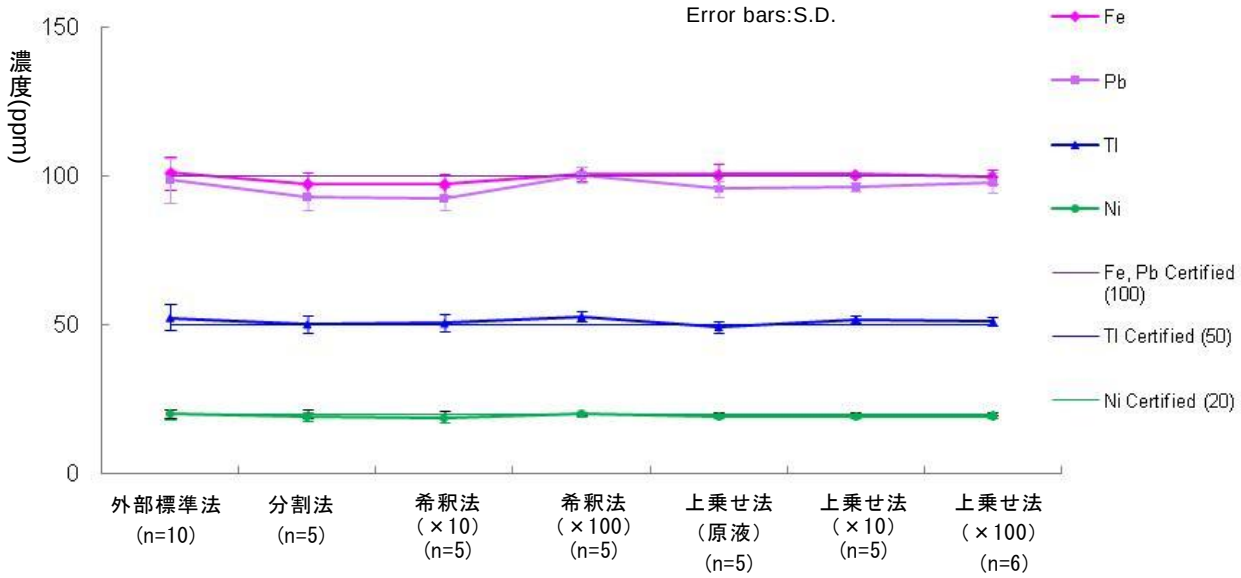


図 8　　4 法による MIXSTD-5A の定量結果（各元素平均値）

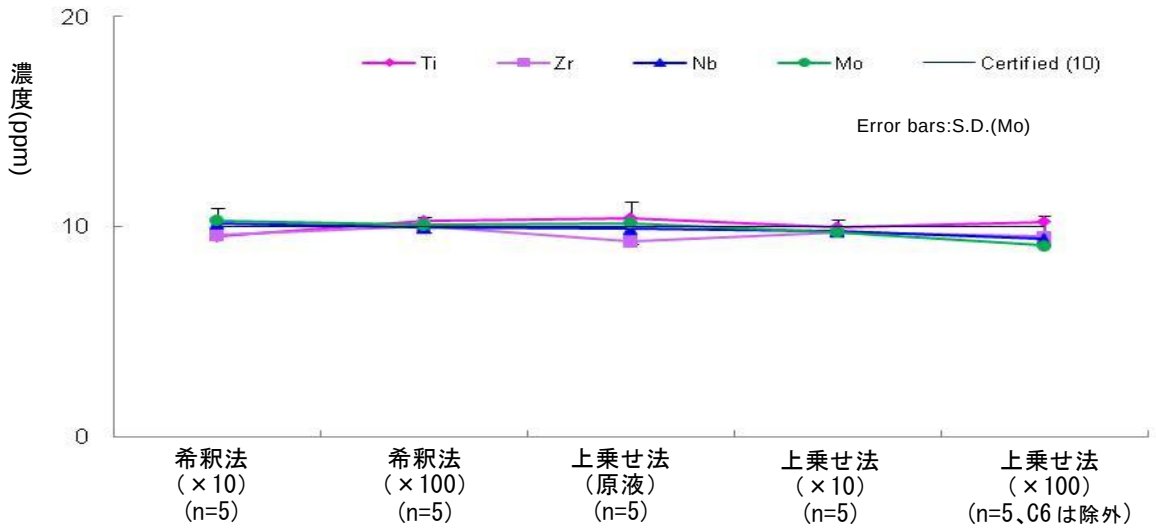


図９　２法による XSTC-8 の定量結果（各元素平均値）

5　まとめ

微少量（50 μL 以下）の水溶液試料に適用しうる定量分析法として、均一ビームによる外部標準法、内部標準を用いた分割法、希釈法、上乗せ法の４法を検討した。外部標準法と上乗せ法は、各々照射位置や内部標準の上乗せ位置の微妙なずれが定量誤差につながるため、これらを厳密に調節することが重要となる。しかし 5 μL 以下の超微少量試料の定量分析を可能とするため、貴重な試料に対しては有用と思われる。分割法は、高濃度の内部標準液を使用すると、自己吸収の影響など定量に不確定要因が生じることがわかった。低濃度の内部標準液を使用するのであれば希釈法と同じことになり、しかも測定・解析の手間が２倍になるため実用的ではない。希釈法は、内部標準液を正確に希釈できれば、確度、再現性の良い定量が可能である。極微量の試料で高感度の測定ができるということが PIXE の特長だが、本研究により、微少量の液体試料でも、簡易なターゲット作成により確度の高い定量が可能であることが確認できた。今後さらに確度、再現性の向上を目指し、分析法の確立に努めていきたい。

参考文献

1) Standard-free Method of Quantitative Analysis for Bio-samples
Sera, K., Futatsugawa, S., Matsuda, K. and Miura, Y.
Int'l Journal of PIXE Vol. 6-3,4, 467-481 (1996)

2) Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples
Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitou, Y. and Sera, K.
Int'l Journal of PIXE Vol. 3-4, 319-328 (1993)

3) PIXE Analysis of Mineral Water (Effect of Sample Preservation)
Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitou, Y. and Sera, K.
Int'l Journal of PIXE Vol. 4-2, 3, 107-116 (1994)

4) The Takizawa PIXE Facility Combined with a Baby Cyclotron for Positron Nuclear Medicine
Sera, K., Yanagisawa, T., Tsunoda, H., Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Suzuki, S. and Orihara, H.
Int'l Journal of PIXE Vol. 2-1, 47-55 (1992)

5) Bio-PIXE at the Takizawa Facility (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron)
Sera, K., Yanagisawa, T., Tsunoda, H., Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitoh, Y., Suzuki, S. and Orihara, H.
Int'l Journal of PIXE Vol. 2-3, 325-330 (1992)
6) Personal Computer Aided Data Handling and Analysis for PIXE
Sera, K. and Futatsugawa, S.
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 109/110, 99-104 (1996)

Quantitative analysis of minimal aqueous sample by PIXE

S. Goto[1], C. Takahashi[1], K. Terasaki[2] and K. Sera[2]

[1]Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

[2]Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

For quantitative analysis of liquid sample by PIXE, internal standard method is commonly used by adding a standard solution to the sample to an optimal concentration usually at 5-10 ppm. In order to add the standard accurately with a micropipette, the amount of the sample is favorably more than 1 mL. But some kind of liquid, such as $[^{18}O]H_2O$, the material of F-18 labeled PET pharmaceutical, is too scarce or precious to get enough amount of sample for analysis by the ordinal internal standard method. With the aim of developing techniques for quantitative analysis applicable to minimal sample of such liquid, we have tested the following four methods by analyzing two multi-element standard solutions and examined their accuracy and reproducibility.

1. External standard method for a spot target: the whole target is irradiated with a uniformly adjusted beam and a specific element in the target is firstly quantified by comparing the spectrum with that of equally irradiated standard target. The remaining elements are quantified by taking the element's value as the internal standard.
2. Two-step method: a portion of the minimal sample is firstly analyzed by adding the internal standard of the ordinal amount (usually 10 µL to a 1 mL sample, so it is too much for the minimal portion) to identify the highest element in the sample and obtain its value. Taking the value as the internal standard, the rest sample is analyzed.
3. Standard dilution: the standard solution is diluted by 10 or 100 times to be added accurately to the minimal sample.
4. Standard covering: after drying 5-10 µL of the sample on the backing film, the appropriate amount of the standard solution is dropped to cover the whole residue.

The results were mostly satisfactory with 10-15 per cent accuracy except two-step method where the self absorption of indium, the excessively added internal standard, affects the measurement. For external standard method and covering method, correct adjustment and positioning of the beam, and precise location of the standard dropping are found to be crucial respectively. As both the methods require no sample conditioning, they are expected to be applicable even to a sample of less than 10µL. Standard dilution method with a 100 times diluted solution is shown to be most stable in accuracy and reproducibility. The ordinal internal standard procedure using optimally diluted solution is supposed to be most advantageous though it takes more amount of sample than the former two methods.