

高分解能蛍光 X 線分析法による毛髪中の硫黄の状態分析

齊 文 啓* , 河 合 潤 , 福 島 整

飯田 厚夫**, 古谷 圭一***, 合志 陽一***

(1986 年 12 月 9 日受理)

生体試料の分析の分野においても、定性・定量分析だけでなく、含まれている元素の状態分析の必要性が高まっている。本研究では、ヒトの毛髪を試料に取り上げ、高分解能 XRF 法により試料に含まれる硫黄の状態分析が可能であることを示した。高分解能蛍光 X 線スペクトルは、二結晶型分光器 {分光結晶: Ge(111)×2} を用いて測定した。更に得られた高分解能 SK_{α} スペクトルに対し、最小二乗法によるピーク分離法を適用して解析を行い、定量的な状態分析を行った。22 種の標準物質の測定と、試料の測定及び解析から、ヒトの毛髪中の硫黄は S^{2-} (有機物) が主成分であり (95~96%), S^{6+} (無機物) がわずかに存在することが分かった。この二つの状態以外は存在しないことも分かった。中国人と日本人、男性と女性を対照させて検討した結果、硫黄の量、状態共に国籍の差が認められた。又、女性のほうが S^{6+} がわずかながら多いことも認められた。一方黒髪と白髪を対比して検討したところ、白髪は黒髪に対し S^{2-} が減少する傾向にあることが分かった。X 線照射による損傷については、本研究での条件程度の X 線 (Cr, 35 kV, 30 mA) であれば、1 時間強程度の照射ならば硫黄の状態が変化することはないことが明らかになった。

1 緒 言

人体中に含まれる硫黄の量は約 0.16% と言われ、酸素、炭素、水素、窒素などに次いで生体中に多く存在している重要な元素である。生体中の硫黄は、タンパク質、含硫アミノ酸及び無機化合物などの存在形態を取って、生体の生命過程に重要な役割を果たしている。従って、生体試料中の硫黄の状態を明らかにすることは、生化学などの分野でこれからますます必要になっていくであろうと考えられる。

XRF 法による硫黄の状態分析については、鉱物¹⁾ (石炭中の硫黄)、環境試料²⁾ (大気浮遊粉じん中の硫黄)、あるいは石油³⁾ (石油ピッチ中の硫黄) などへ応用したものが報告されている。しかし、生体試料中の硫黄に対する XRF 法による状態分析の例はほとんど見当たらない。XRF 法の特徴は、非破壊であり、結晶・非晶質なども問わないところにあるので、生体試料に対しても *in situ* で分析できる有力な手段となることが期待される。

ここでは、XRF 法、特に高分解能 XRF 法の生体試料への応用の可能性について、試料としてヒトの毛髪を取り上げて検討を行った結果について報告する。まず、状態分析のための標準データを得るために 22 種類の有機及び無機硫黄化合物における状態別の SK_{α} のエネルギー変化 (化学シフト) を測定した。次にこの結果をもとに、中国人、日本人の男女の毛髪中の硫黄の存在状態について検討を行った。又、黒髪、白髪とを対比させた検討も試みた。

2 実 験

2.1 測 定

高分解能蛍光 X 線スペクトルの測定装置及び条件を、Table 1 に示した。測定データに対しては、数え落としの補正、スペクトルの最大値による規格化、平滑化 (Savitzky-Golay 法⁴⁾、2 次 5 点 10 回) 処理を施した。化学シフトの測定誤差はピーク強度の違いにもよるが、0.001~0.011 eV であった。

複数の状態が同時に存在していると考えられる試料のスペクトルについては、非線形最小二乗法に基づくピーク分離を適用した。この手法は、 SK_{α} のピークの形が、状態が一つであればいずれであっても変化しないという過程に基づいたものである。本法を Al の配位数の決定に応用した報告⁵⁾ によると、分離に用いる基準のピークは、それぞれの状態に対応するものの中で最も線幅の狭

* 中国科学技術大学：中華人民共和国合肥市

** 東京大学工学部工業化学科：113 東京都文京区本郷 7-3-1

*** 東京理科大学理学部応用化学科：162 東京都新宿区神楽坂 1-3

Table 1 Condition for the measurement of SK_{α}

X-ray fluorescence spectrometer : Toshiba AFV-701
Data processor : Hewlett-Packard 9845A
Multichannel analyzer : Tracor Northern TN-1710
X-ray path atmosphere : Vacuum
Detector : PR gas, proportional counter
X-ray tube
Target : Cr
Voltage : 35 kV
Current : 30 mA
Analyzing crystal : Ge(111) $\times 2$ ($2d=6.532 \text{ \AA}$)
Scanning angle ($2\theta^\circ$) : $110.15^\circ \sim 111.02^\circ$
Number of channel : 256 ch. (one spectrum)

いものを用いた場合が、誤差が最も少ない。このことから、本研究では最も線幅のせまい $\alpha\text{-S}(S_0)$ のピークを基準ピークに用いた。

試料中の全硫黄量の定量には、高周波誘導加熱赤外線吸収方式の、炭素・硫黄同時定量分析装置 (Leco CS-244) を用いた。毛髪試料は $0.01 \sim 0.015 \text{ g}$ を取り、助燃剤として W-Sn 合金を約 0.5 g 用いた。NBS SRM 1571 (Orchard Leaves, 参考値 S : 0.19%) を選び、これを $0.80 \sim 1.05 \text{ g}$ ほど量し標準試料とした。これを本装置によって定量したところ、測定値 0.19% 、それに対する相対標準偏差 1.7% という結果であった。

2.2 試料

ヒトの毛髪は、苦痛を伴うことなく非常に簡単に採取できる。又、採取された個体の健康状態を良く反映していることが医学的に良く知られており、分析対象としては大変興味あるものである。

個体から抜き取ることで採取した毛髪は、エタノールで3回洗浄した。その後、 $30 \text{ mm}\phi$ の薄い Al の円板上に幅約 1 cm 程度に密に並べ、毛髪の両端のみを粘着テープで留め固定した。

標準試料として用いた無機及び有機硫黄化合物は、市販の特級品もしくは半導体用のものである。これらの化合物をめのう乳鉢にて十分細かく粉碎した後、加圧成型してペレットの形にして測定試料とした。

3 結果及び考察

3.1 標準試料の化学シフト

標準試料についての SK_{α} の化学シフトの測定結果が、Table 2 に示されてある。

Table 2 SK_{α} chemical shift (eV)

S^{2-}	inorganic	$-0.216 \sim -0.176$
	organic	$-0.007 \sim -0.106$
S^0		0
S^{4+}		$+0.809$
S^{6+}	inorganic	$+1.195 \sim +1.215$
	organic	$+0.872 \sim +1.042$

S_0 : reference

これらのデータから分かるように、一部分の S^{2-} (有機物) と S^0 ($\alpha\text{-S}$) ではシフトはほとんど観測されない。一般に生体中には単離した硫黄はほとんどないと考えられているので、生体試料中でこの付近に出現するピークは S^{2-} であると考えてよいであろう。更に分解能を上げた精密な測定と合成試料による検討を行えば、この両者の区別も可能である。

Table 2 が示すように、酸化数及び無機・有機の違いによる SK_{α} の $\alpha\text{-S}$ からのシフトの作る領域は互いに独立しており、試料の K_{α} のシフトから状態判別が明確に行えることが分かる。

3.2 ピーク分離法応用のための基礎検討

S^{2-} 単一状態の SK_{α} の半値幅は、有機物で約 2.36 eV である。これに対して毛髪の SK_{α} の半値幅は 2.41 eV 以上と一般に広く、複数の状態が同時に存在していることが分かる。

複数の状態が同時に存在する場合のスペクトルのピーク分離による定量的状態分析に対し、まず標準試料物質の混合物を用い基本的な検討を行った。ヒトの毛髪にはケラチン質が豊富であることから、それに似通った試料として、シスチンと無水硫酸ナトリウムの混合物、あるいはこの系に更に ZnS を加えて、有機及び無機の S^{2-} と S^{6+} との比を変えた試料を作製した。

ピーク分離結果の一例を Fig. 1 に示す。Table 3 及び Table 4 に示されているように、試料それぞれにおける各状態の存在比とピーク分離による結果との一致は、かなり良好であった。ここで生じている誤差の原因は、試薬の混合状態の不均一性、密度差、粒度などによるものと考えられる。しかし、この程度の小さな誤差であるならば (2成分系で $\pm 1.2\%$, 3成分系で $-2 \sim +$

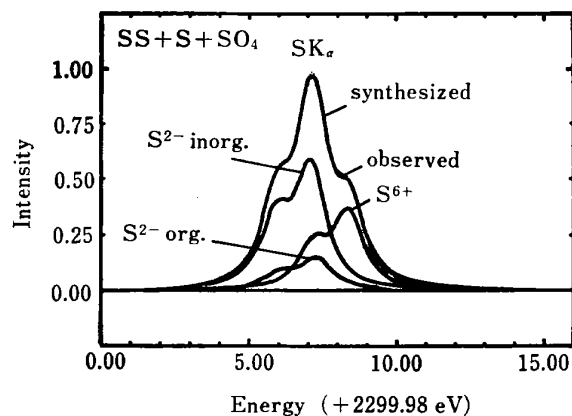


Fig. 1 SK_{α} spectrum from cystine + ZnS + Na_2SO_4 mixture

Cystine : 14% , ZnS : 54% , Na_2SO_4 : 32%

Table 3 Chemical state analysis of sulfur in cystine- Na_2SO_4 mixtures

No.	Cystine			Na_2SO_4			Error, $\pm\%$
	Added, %	Found, %	S. D., %	Added, %	Found, %	S. D., %	
1	30.0	31.2	0.5	70.0	68.8	0.2	1.2
2	77.0	77.4	0.6	23.0	22.6	2.1	0.4
3	85.0	85.5	2.8	15.0	14.5	17.5	0.5
4	88.0	88.4	0.2	12.0	11.6	1.3	0.4
5	93.0	92.6	0.2	7.0	7.4	2.3	0.4
6	95.0	95.8	0.4	5.0	4.2	8.4	0.8
7	96.0	96.3	0.6	4.0	3.7	15.6	0.3

Table 4 Chemical state analysis of cystine- ZnS - Na_2SO_4 mixtures

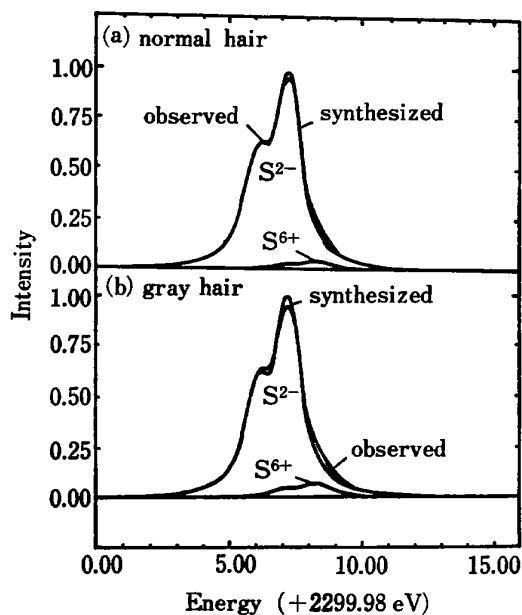
	ZnS	Cystine	Na_2SO_4
1. Added, %	54.0	14.0	32.0
Found, %	52.9	13.8	33.3
S. D., %	1.9	4.3	1.3
Error, %	-1.1	-0.2	+1.3
2. Added, %	8.0	58.0	34.0
Found, %	6.0	59.5	34.5
S. D., %	0	1.3	2.3
Error, %	-2.0	+1.5	+0.5

1.5%), 実際の試料に対してもある程度 S/N の良いスペクトルが得られれば, 2成分あるいは3成分系の定量的状態分析が可能であると結論できる. 特に, これらの結果は, S^{2-} 成分が有機物起因か無機物起因かまで容易に判別できることを示している. しかし, この両者のシフト差はごくわずかであるから, 十分な測定精度が必要となることは言うまでもない.

3.3 毛髪の状態分析結果

66人の毛髪試料の測定結果を, Table 5 (a) に示した. 毛髪中の硫黄は, いずれの試料中에서도2種類存在していることが分かる. ピーク分離の例を, Fig. 2 に示す. 測定スペクトルと, 分離後の各成分から合成したスペクトルは良く一致しており, 更に他の状態が存在することはないことは, これからも明らかである.

分離後の各成分のシフトから, いずれの試料について

Fig. 2 Results by peak separation analysis for $\text{S K}\alpha$ lines of human hair samples

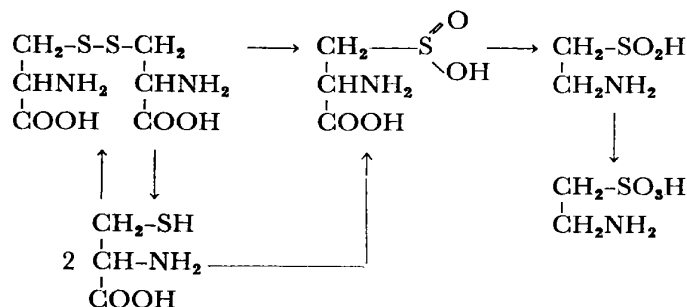
も S^{6+} で存在しているものは無機の硫酸塩であり, S^{2-} は有機硫黄であることが分かった. この有機の S^{2-} は, 毛髪のケラチン質中に含まれる $-\text{S}-\text{S}-$ 結合に対応しているものと考えられる.

3.4 国籍及び性別による各状態の分布

試料を採取した 66 人の内訳は, 中国人男性 25 名,

Table 5 Content ratio of S^{2-} and S^{6+} (a), and amount of S^{2-} and S^{6+} (b) in the hairs

	(a)				(b)		
	S^{2-}		S^{6+}		$\text{S}^{2-}/$ mg g^{-1}	$\text{S}^{6+}/$ mg g^{-1}	$\text{S}^{2-}+\text{S}^{6+},$ %
	Range, %	Mean, %	Range, %	Mean, %			
Chinese, male	97.86~94.20	95.97	5.80~2.14	4.03	46.45	1.95	4.84
Chinese, femal	99.15~92.58	95.25	7.47~0.85	4.75	44.77	2.23	4.70
Japanese, male	97.47~92.75	95.64	7.25~2.53	4.36	57.96	2.64	6.06
Japanese, femal	95.93~92.55	94.70	7.45~4.07	5.30	54.74	3.06	5.78



同女性 13 名, 日本人男性 14 名, 同女性 14 名である。

Table 5(a) の結果から, 毛髪中の S^{2-} と S^{6+} の相対存在比については, 国籍あるいは性別に関した著しい差は認められないが, 例えば S^{2-} の相対存在比が中国人男性, 日本人男性, 中国人女性, 日本人女性の順で減少傾向にあることが分かる。男性より女性のほうが S^{2-} が少なく, 中国人より日本人のほうが S^{2-} が少ない傾向にある。 S^{6+} については, 当然ながらこれとは逆の傾向である。

Table 5(b) は, 全硫黄の燃焼法による定量分析結果とピーク分離による解析結果を合わせて, 各状態の存在量を求めたものである。Table 5(b) から分かるように, 毛髪中の全硫黄量は日本人男性が最も多く, 中国人女性が最も少なかった。又, 日本人の毛髪は中国人に比べて約 1% 程度含硫量が高い。一方同じ国籍であれば, 男女間の差はほとんどない。

更に, 日本人の毛髪のほうが S^{2-} , S^{6+} 共に中国人の毛髪中の含有量より多いこともこの Table から分かる。

この原因の一つとしては, 生活習慣, 特に食習慣の違いなどが考えられる。更に, 頭髪用の化粧品類の影響なども挙げられるであろう。

3.5 黒髪と白髪との対照

12 人の黒髪と白髪とを対照測定した結果を, Table 6 にまとめた。黒髪と白髪は同一個体から採取したものである。12 人中, 11 人においては明らかに黒髪中に含まれている S^{2-} は白髪より多く, 又 S^{6+} では逆になることが分かった。

1 例のみ例外が存在するが, この人は 25 才で, いわゆる若白髪である。この例外が何に起因するのかも, 興味深い問題であろう。

全硫黄量については, Table 中の No. 1 及び No. 8 の 2 試料のみの測定となった。その結果によると, 白髪 of 全硫黄量は黒髪よりもわずかに 0.3~0.4% 程度, すなわち 3~4 mg/g 低い。又, S^{2-} の量も幾らか低く (4~5 mg/g), 白髪中の全硫黄量の減少は主として S^{2-} の減少によるものと見られる。

Table 6 Content ratios of S^{2-} and S^{6+} in normal and gray hairs

Sample No.	Normal hair		Gray hair	
	S^{2-} , %	S^{6+} , %	S^{2-} , %	S^{6+} , %
1	96.4	3.6	94.6	5.4
2	95.1	4.1	93.8	6.2
3	96.7	3.3	96.0	4.0
4	97.9	2.1	95.2	4.8
5	95.7	4.3	94.1	5.9
6	94.8	5.2	94.1	5.9
7	96.4	3.6	96.4	3.6
8	96.8	3.2	94.8	5.2
9	97.3	2.7	95.4	4.6
10	96.9	3.1	95.0	5.0
11	95.4	4.6	94.7	5.3
12	95.4	4.6	95.7	4.3

3.6 試料の安定性

X線の照射による毛髪の損傷があるならば, 測定結果に対する信頼性や再現性にも大きく影響を与えるものと考えられる。この点について, X線照射時間 (測定時間に関連する) に対する毛髪試料中の硫黄の状態の変化について検討した。その結果, 照射時間が約 70 分を越えると, S^{6+} の相対存在比の明らかな増加が観測された。

これは, X線を照射することによる毛髪中の S^{2-} (有機物) の酸化によるものであることは明らかである。その過程としては, 例えば毛髪中のシスチンに含まれている $-\text{S}-\text{S}-$ の上のような酸化過程などが, 考えられる。

通常の測定条件では, スペクトルの 1 回の測定に約 30 分程度かかる。ここでの測定はすべて, 2 回以内の繰り返し, すなわちほぼ 60 分程度の X線照射によるデータであるため, 結果に対する X線照射の影響は十分少ないものと考えられる。

以上の結果により, 高分解能 XRF 法により毛髪試料中の硫黄の定量的状態分析が可能であることを示した。又, この結果から, 生体試料に対する状態分析が可能であり, 興味ある結果を得ることができる可能性が強いと指摘できるのである。

文 献

- 1) 合志陽一, 柳ヶ瀬健次郎 : 燃協, **52**, 96 (1973).
- 2) K. Furuya, Y. Kato, T. Kikuchi, Y. Gohshi : *Microchim. Acta*, **1983 II**, 263.
- 3) 安田誠二, 垣山仁夫 : 分析化学, **29**, 447 (1980).
- 4) A. Savitzky, M. J. Golay : *Anal. Chem.*, **36**, 1627 (1964).
- 5) 白 友兆, 福島 整, 合志陽一 : 燃協, **92**, 475 (1984).

☆

Chemical state analysis of sulfur in hair samples by high resolution XRF. Qi WENQI*, Jun KAWAI, Sei FUKUSHIMA, Atsuo IIDA**, Keiichi FURUYA*** and Yohichi GOHSHI** (*China University of Science and Technology, Hefei City, the People's Republic of China; **Department of Industrial Chemistry, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113; ***Department of Chemistry, Science University of

Tokyo, 1-3, Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162)

Double-crystal high resolution XRF was applied to the chemical state analysis of sulfur in biological samples of human hairs. Both S^{2-} (average value 95.4%) and S^{6+} (average value 4.6%) states are present in all hairs. The total sulfur and S^{2-} state sulfur in male hairs were higher than those of female hairs in the same country. Furthermore, the abundance of S^{2-} state in gray hairs was found to be less than normal, but S^{6+} content was slightly higher than that in normal hairs.

(Received December 9, 1986)

Keyword phrases

chemical state analysis using high-resolution XRF; oxidation state analysis for sulfur in human hair; chemical shift of sulfur $K_{\alpha 1,2}$ corresponding to oxidation state; peak separation for quantitative chemical state analysis.