

## 報 文

ニードル型コリメーターを用いる試料内部微小空間の  
蛍光 X 線分析松田 晃典<sup>1</sup>, 辻 幸一<sup>®1</sup>

ニードル型コリメーターを用いた試料内部の微小空間の蛍光 X 線分析法について提案し検討した。一次 X 線はニードル型コリメーターの中を通し、軟らかい試料内部を照射する。これにより発生した蛍光 X 線は同様のコリメーターを通して検出した。一定濃度の元素を含む寒天標準試料を準備し、試作した装置の分析性能の評価を行った。寒天中 K, Ca, Zn の検出下限は、それぞれ 154, 85.4, 5.95 mg/kg であった。また、生物試料への応用として牡蠣<sup>かき</sup>に対してスペクトルを測定し、試料内部の蛍光 X 線分析が可能であることが確認された。

## 1 緒 言

生体試料の構造や機能の研究、材料の品質管理や材料内部の界面の制御などを研究する際、大気中で迅速、非破壊的に微小部を定性、定量分析できる手法がますます重要となってきた。蛍光 X 線分析 (X-ray fluorescence, XRF) は、試料を非破壊的に大気中で迅速に測定でき、試料の形態、状態、大きさを選ばず、主成分から微量成分まで分析でき、試料の化学的な前処理を必要としないなどの特徴を有する。近年の X 線光学素子の開発、特にポリキャピラリー X 線レンズなどにより、放射光などを利用しなくても、実験室レベルで数十  $\mu\text{m}$  オーダーの微細な X 線による微小部蛍光 X 線分析 ( $\mu\text{-XRF}$ ) が行えるようになった<sup>1)2)</sup>。例えば Emoto ら<sup>1)</sup>の研究では、成長過程に伴い種子の元素が茎や根に移動する様子が元素マッピングとしてとらえられている。

更に、最近の傾向として、試料内部の微小空間における分析、つまり三次元 (3D) 蛍光 X 線分析の研究が注目を集めている。このために幾つかの方法が検討されており、例えば、マイクロ斜出射 3 次元分析<sup>3)</sup>、ポリキャピラリー X 線レンズを使用した共焦点型蛍光 X 線分析<sup>4)~6)</sup>が注目されている。これらは非破壊的に試料内部の微小空間の分析を行えるというメリットを有するものの、X 線が試料自身に吸収されるために分析できる深さは、試料のマトリックスや、測定する元素の蛍光 X 線のエネルギーなどに依存して異なるが、試料表面から数 mm 以下に限定されてしまうという分析的な限界を持っている。よって、これらの手法では試料内部や界面などの分析は難しいと言わざるを

得ない。

そこで、注射針を利用する微小空間蛍光 X 線分析を提案してきた<sup>7)</sup>。市販の注射針 (テルモ製) を、X 線を試料内部に導くニードル型コリメーターとして用いた。ニードル型コリメーターは、Fig. 1 の概略図に示すように、軟らかい試料に直接挿入することができる。これにより、ニードル型コリメーターの中を通し、試料内部にまで一次 X 線を照射し、蛍光 X 線を発生させ、同様のニードル型コリメーターにより、検出器で蛍光 X 線を検出する。しかし、市販の注射針はステンレス製であり、Cr, Fe, Ni などが含まれるため測定の妨害となる蛍光 X 線ピークが多数発生する。更にサイズなども規定のものしか入手できない。そこで、本研究では新たに注射針の形を模倣して Ti 製のニードル型コリメーターを製作した。耐食性があり、酸や食塩水中でも反応しにくく、さびにくいなどの理由からニードル型コリメーターの試作に原材料として Ti を用いた。

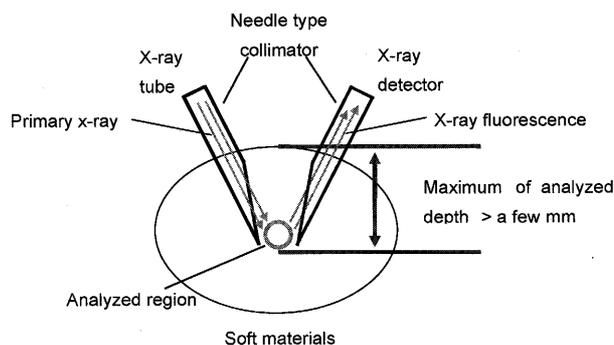


Fig. 1 Idea of X-ray fluorescence analysis of micro-volume inside sample by using needle-type collimators

<sup>1</sup> 大阪市立大学大学院工学研究科化学系専攻: 558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本 3-3-138

## 2 実験方法

### 2.1 実験装置

装置の概略図を Fig. 2 に示す。あらかじめ高輝度の X 線が得られるように、一次 X 線照射用ニードル型コリメーターの前に Cu 板を置き、発生する Cu の蛍光 X 線が最大になるように、位置調整を行った。更に蛍光 X 線検出用ニードル型コリメーターも Fig. 2 に示す X, Z 方向について最適位置に調整を行った。本研究で製作したニードル型コリメーターは Ti 製で外径 1.58 mm, 内径 0.78 mm で、不純物として, Fe: 0.25%, O: 0.2%, H: 0.015%, N: 0.05% を含む。これを試料に挿入した際に、先端の開口部より試料がニードル型コリメーター内に侵入するのを防ぐために、厚さ 7.5  $\mu\text{m}$  のポリイミドフィルム（ニラコ製, カプトン<sup>®</sup>箔）で先端部をカバーした。X 線管は X 線回折用封入型 X 線管（リガク 9407G8, ターゲット: Mo, Be 窓厚: 0.3 mm）を用いた。検出器は Silicon PIN 検出器（AMPTK 製 XR-100CR, Sensitive area: 7 mm<sup>2</sup>, エネルギー分解能 < 188 eV, FWHM at 5.9 keV）を用いた。Zr フィルターは連続 X 線バックグラウンドを低減する目的で使用した。なお、検出器, サンプルステージには精密 x-y-

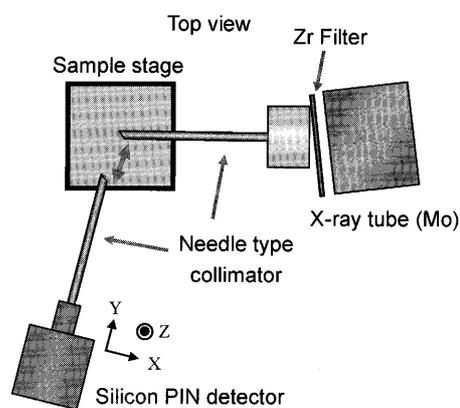


Fig. 2 Experimental set up for XRF using needle type collimators

z ステージ（シグマ光機製）を取り付けてあり、最小移動距離 10  $\mu\text{m}$  で調整できる。

### 2.2 試料準備

試作した装置の性能を調べるために、金属元素を含有させた寒天をマトリックスとした標準試料を準備した。試料は、Table 1 に示す試薬を含む水溶液を所定の元素濃度に調整し、作製した。この水溶液と寒天（和光純薬製）を 10:1 の割合で混合し、ホットプレートで 100°C 以上に加熱、沸騰させ、寒天が溶解した後、室温で冷やし固めて寒天試料を作製した。

生物試料への応用として、市販の生牡蠣（播磨灘産）を測定した。一般に生牡蠣には K 1900 mg/kg, Ca 880 mg/kg, Fe 19 mg/kg, Zn 132 mg/kg などが含まれている<sup>8)</sup>。

### 2.3 試料の測定手順

測定手順と測定装置の概観写真を Fig. 3 に示す。(a) 最適測定位置を確認した後、検出器を遠ざける。(b) 試料ステージにおいた試料を任意の位置まで一次 X 線照射用ニードル型コリメーターに挿入させる。(c) 試料に蛍光 X 線検出用ニードル型コリメーターを挿入する。この測定手順に従い、二つのニードル型コリメーターを試料に挿入した条件下で X 線スペクトルの測定を行った。

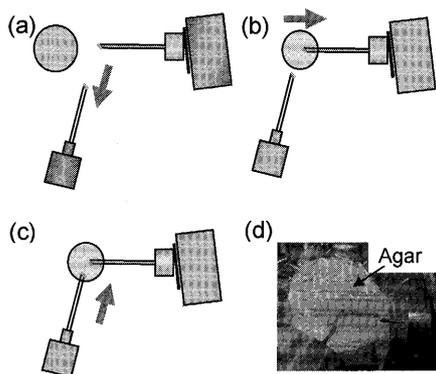
## 3 結果と考察

### 3.1 ビーム径の評価

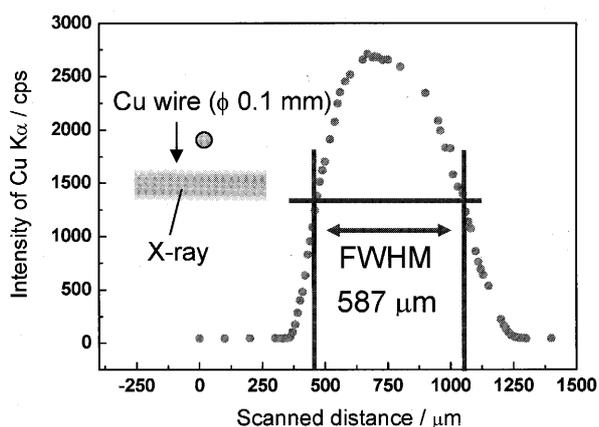
直径約 0.1 mm の Cu ワイヤを一次 X 線照射用ニードル型コリメーターの前に張り、この Cu ワイヤを一次 X 線に対して垂直な方向に走査させ、ビーム径を評価した。測定条件は X 線管の管電圧 40 kV, 管電流 10 mA, 測定時間 30 秒である。Cu ワイヤの走査距離と Cu の蛍光 X 線強度の関係を Fig. 4 に示す。一次 X 線のビーム径を半値幅（full width at half maximum, FWHM）より評価したところ、約 590  $\mu\text{m}$  であった。Ti の内径が 780  $\mu\text{m}$  であったので、半値幅として評価された 590  $\mu\text{m}$  という値は妥当

Table 1 Reagent for preparing the sample (agar)

Name of reagent	Chemical formula	Molecular weight	Manufacturer
Cobalt(II) nitrate hexahydrate	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	291.03	Kishida Chemical Co., Ltd
Potassium nitrate	$\text{KNO}_3$	101.1	Wako Pure Chemical Industries, Ltd
Calcium nitrate tetrahydrate	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236.15	Wako Pure Chemical Industries, Ltd
Zinc sulfate heptahydrate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.56	Wako Pure Chemical Industries, Ltd



**Fig. 3** Procedure of measurements (a) the detector is kept away from the original position, (b) the needle type collimator for X-ray tube is inserted into the sample, (c) the needle type collimator for X-ray detector is inserted into the sample, and (d) photograph of experimental devices



**Fig. 4** Relationship between X-ray intensities of Cu  $K\alpha$  and the position of the Cu wire

Measurement condition: 40 kV, 10 mA, 30 s

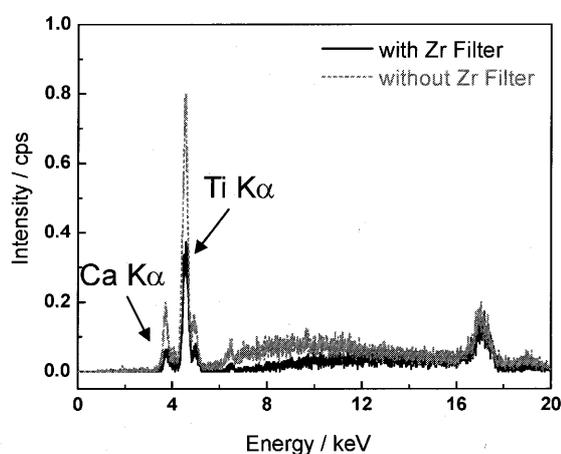
と考えられる。

### 3・2 S/B 比の評価

最適の励起条件を求めるため、寒天試料に実際にニードル型コリメーターを挿入し、様々な励起条件で X 線スペクトルを測定した。Zr フィルターを挿入する場合と挿入しない場合で測定した際の各元素の  $K\alpha$  線の強度とそのピークのバックグラウンドの比、S/B 比を Table 2 に示す。Table 2 に示していない励起条件 (30~50 kV, 30~40 mA) でも測定を行ったが、Table 2 に示す励起条件で一番高い S/B 比が得られた。また、K, Ca のような比較的軽元素では Zr フィルターを挿入しない場合のほうが挿入する場合よりも 2~3 倍高い S/B 比が得られ、Zn では Zr フィルターを挿入する場合のほうが良かった。ほかにも

Table 2 S/B ratios were measured (a) with Zr filter, (b) without Zr filter

(a)			
Element	Tube voltage	Tube current	S/B ratio
K	30 kV	40 mA	10.0
Ca	30 kV	30 mA	3.3
Zn	40 kV	30 mA	2.3
(b)			
Element	Tube voltage	Tube current	S/B ratio
K	30 kV	40 mA	2.9
Ca	30 kV	30 mA	1.8
Zn	40 kV	30 mA	3.0



**Fig. 5** X-ray spectra of agar including Ca (10000 mg/kg) with Zr filter and without Zr filter

Measurement condition: 40 kV, 30 mA, 1000 s

Al, Ti, Ni, Cu などのフィルターを用いて同様の測定を行ったが、K では 30 kV, 40 mA でフィルターを挿入しない条件、Ca では 30 kV, 30 mA でフィルターを挿入しない条件、Zn では 40 kV, 30 mA で Zr フィルターを挿入する条件で、一番良い S/B 比が得られたので、以後の実験ではこれらの条件を採用した。最適の励起条件での 10000 mg/kg の Ca を含んだ寒天の X 線スペクトルを Fig. 5 に示す。K, Ca において、Zr フィルターを使ったほうが S/B 比が悪くなった理由としては、以下のような原因が考えられる。Fig. 5 示すように、もともと K, Ca の X 線のエネルギー付近 (3~4 keV) はバックグラウンドが小さい。Zr フィルターを挿入すると、バックグラウンドも下がるが、一次 X 線の強度が下がるため、発生する蛍光 X 線の強度も下がる。蛍光 X 線強度の下がる影響の方がバックグラウンドの下がる効果より勝ったため、S/B 比は悪くなったと思われる。逆に、Zn 付近 (8~9 keV) は連続 X 線が大きいので、Zr フィルターを付けることで、

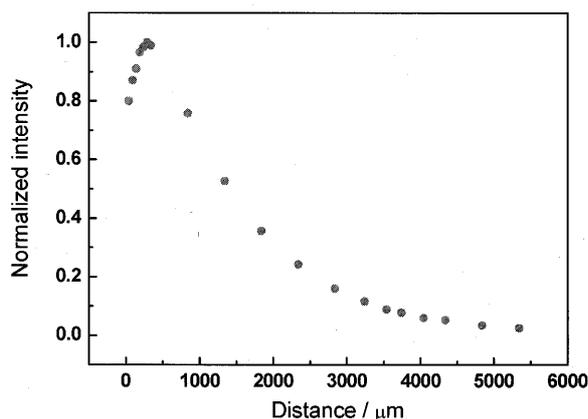


Fig. 6 Relationship between normalized X-ray intensities of Zn  $K\alpha$  and the distance between needle type collimators

Measurement condition: 40 kV, 30 mA, 300 s

バックグラウンドである連続 X 線を下げることの寄与のほうが大きく影響したため、S/B 比は向上したものと考えられる。

### 3.3 分析領域の最適化

蛍光 X 線検出用コリメーターを Fig. 2 の Y 方向に走査し、二つのニードル型コリメーターの先端間距離 (Fig. 2 の両矢印で表される二つのニードル型コリメーター間の距離) を変えて測定を行い、K, Ca, Zn を含む寒天に対して各元素の最大の蛍光 X 線強度が得られる位置を探り、どれほどの空間領域を分析しているのか調べた。

先端間距離と Zn の蛍光 X 線強度の関係を Fig. 6 に示す。この図では各測定箇所での強度は最大強度で規格化を行っている。Zn に対しては先端間距離が 290  $\mu\text{m}$  の際、最大の強度が得られた。同様の実験を K, Ca で行ったところ、それぞれ 30, 40  $\mu\text{m}$  であった。これらの結果とビーム径より、二つのニードル型コリメーター間の分析領域がディスク状であると近似して概算したところ、Zn  $9.1 \times 10^{-2}$ , K  $9.4 \times 10^{-3}$ , Ca  $1.3 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$  であった。このような結果になった理由としては、K, Ca, Zn の  $K\alpha$  線の持つエネルギーが異なり、試料マトリックスに対する吸収が異なるためと考えられる。先端間距離が大きくなると、分析領域が広がり、そこに存在する原子の数も増えるため、発生する蛍光 X 線強度が大きくなるというプラス因子と、一次 X 線及び発生した蛍光 X 線が試料中を通過する距離が長くなることにより、吸収されるといったマイナス因子が存在するため、ある位置で極大値を持ったと考えられる。

### 3.4 固/固界面及び内部分析

まず Zn を 3000 mg/kg と Co を 3000 mg/kg 含む寒天試料を別々に作製した。Zn を含む寒天を 300 秒で 3 回、X 線スペクトルを測定した。ピーク強度からピーク近傍のバックグラウンドを引いた Net 強度の平均値は 8822 counts, 標準偏差は 190 counts であった。これら 2 つの試料を組み合わせ、成分の異なる層を持つ寒天試料を作製した。その試料の写真を Fig. 7 に示す。この試料に Fig. 7 に示す矢印の方向から一次 X 線照射用ニードル型コリメーターを挿入し、Co/Zn 界面と Zn 層内部で測定を行い、Fig. 7 (a), (b) に示すような X 線スペクトルを得た。Fig. 7 (b) に示す界面を測定したときには Co のピークが検出されたが、Fig. 7 (a) に示す Zn 層では Co のピークは確認できなかった。また、Zn 層の 3 回測定を行ったところ、Net 強度の平均値は 8913 counts であり、前述した Zn のみの寒天試料を測定したときの Net 強度の平均値  $\pm 1\sigma$  (標準偏差) 内であった。以上の結果より、ニードル型コリメーターが通過してきた Co 層の情報は含まれず、試料内部の任意の位置 (Zn 層) に限定したスペクトルを測定できたと言える。

### 3.5 定量性及び検出下限

この装置の K, Ca, Zn の検出下限を求めるために、K, Ca, Zn の検量線を作成した。K は 0, 1690, 5040, 10200 mg/kg, Ca は 0, 2090, 5060, 10200 mg/kg, Zn は 0, 90, 270, 530 mg/kg のそれぞれ異なる濃度を含む 4 種類の寒天標準試料を作製した。測定時間は 1000 秒である。K, Ca, Zn の検量線を作成し、式(1)より検出下限値 (lower limit of detection, L.L.D.) を算出した。

$$C_{\text{L.L.D.}} = 3 \times \frac{\sigma}{a} \quad (1)$$

$C_{\text{L.L.D.}}$  は検出下限値 (mg/kg),  $\sigma$  は空試験試料の 5 回測定の標準偏差,  $a$  は検量線の傾きである。Zn の検量線を Fig. 8 に示し、K, Ca, Zn の  $C_{\text{L.L.D.}}$ ,  $\sigma$ ,  $a$  を Table 3 に示す。Fig. 8 において空試験 (0 mg/kg) のみ 5 回測定の gross 強度の平均値を、それ以外の濃度では 3 回測定の gross 強度の平均値をプロットしている。直線は最小 2 乗法により求めた近似直線を示す。上下のエラーバーは、(gross 強度の平均値)  $\pm$  [3 回測定 (空試験以外) の gross 強度の標準偏差もしくは、5 回測定 (空試験のみ) の gross 強度の標準偏差] をとっている。相関係数 ( $R$ ) は 0.9997 であり、良い直線性が得られた。Table 3 に示すように、検出下限は K で 154 mg/kg, Ca で 85.4 mg/kg, Zn では 5.95 mg/kg であった。本研究の検出下限が通常の XRF に比べ、同程度か、もしくは、さほど良くない理

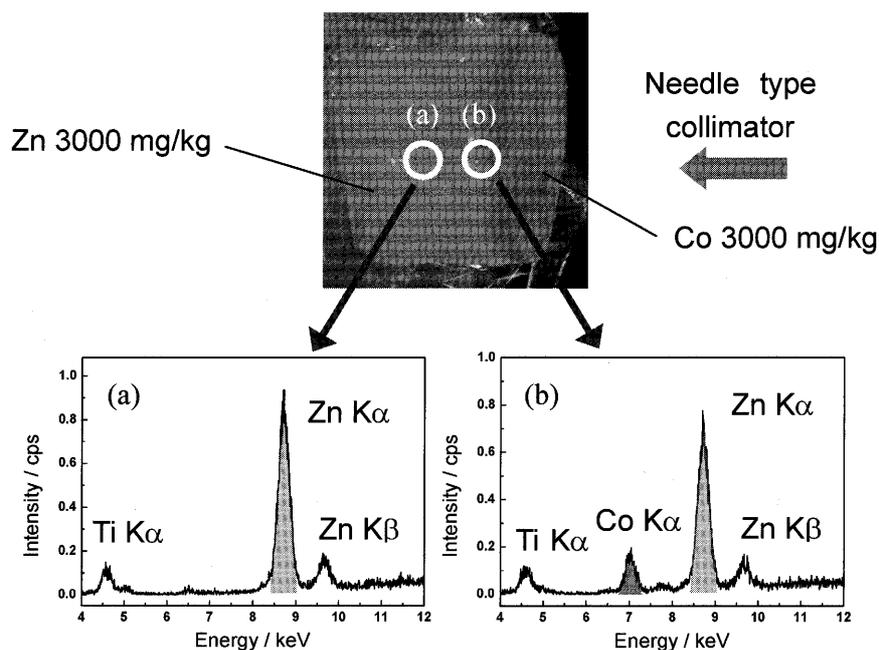


Fig. 7 X-ray spectra measured at (a) Zn layer and (b) Zn-Co interface in agar  
Measurement condition: 40 kV, 30 mA, 300 s

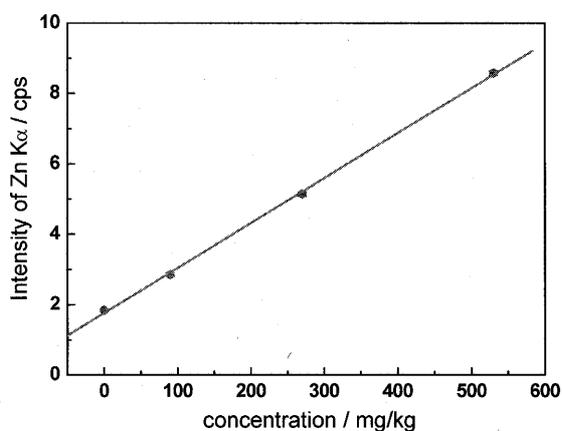


Fig. 8 Calibration curve of Zn  
Measurement condition: 40 kV, 30 mA, 1000 s

由としては次のことが考えられる。一次 X 線をニードル型コリメーターにより微細化しているのに、輝度が十分ではなかった点、及び Mo ターゲットの X 線管を用いているので、K K $\alpha$ 、Ca K $\alpha$  では励起効率が良くなかった点である。更に蛍光 X 線のエネルギーが低いために、容易に試料（寒天）に吸収された点も大きい。K、Ca については、今回用いた X 線管よりも励起効率の良い Cu、Cr のようなターゲットの X 線管を用いれば、もっと良い検出下限が得られるものと考えられる。

Table 3 Parameters and lower limit of detection

Element	$\sigma \times 10^{-3}$	$a \times 10^{-3}$	$C_{LLD}$
K	13.3	0.259	154
Ca	11.1	0.390	85.4
Zn	25.4	12.8	5.95

$\sigma$ : Standard deviation;  $a$ : Slope of the calibration curve;  
 $C_{LLD}$ : Lower limit of detection

### 3.6 生牡蠣の測定

生物試料への応用として、生牡蠣を測定した。測定した牡蠣の写真及びそれぞれの測定箇所での X 線スペクトルを Fig. 9 に示す。寒天試料に対して最適な Zn の測定条件で測定を行った。測定時間は 300 秒である。

測定した 3 箇所 [Figs. 9 (a), (b), (c)] でそれぞれ Zn の強度が異なっているので、牡蠣中で Zn は異なる濃度で分布していると考えられる。また、Fig. 9 (b) の測定箇所では Cu K $\alpha$  が検出された。寒天中の Zn の検出下限が 5.95 mg/kg であったことから Cu も同程度の検出下限であると同様である。報告値によると、一般的な生牡蠣中に 8.9 mg/kg の Cu が含まれる<sup>8)</sup>。この報告値は、予想される Cu の検出下限以上であるにもかかわらず、Fig. 9 (a), (c) では Cu が明確には検出できなかった。この 8.9 mg/kg という数値は試料全体の平均的な値なので、この結果から Cu は牡蠣中の Fig. 9 (b) で計測した近傍に局在しているものと考えられる。

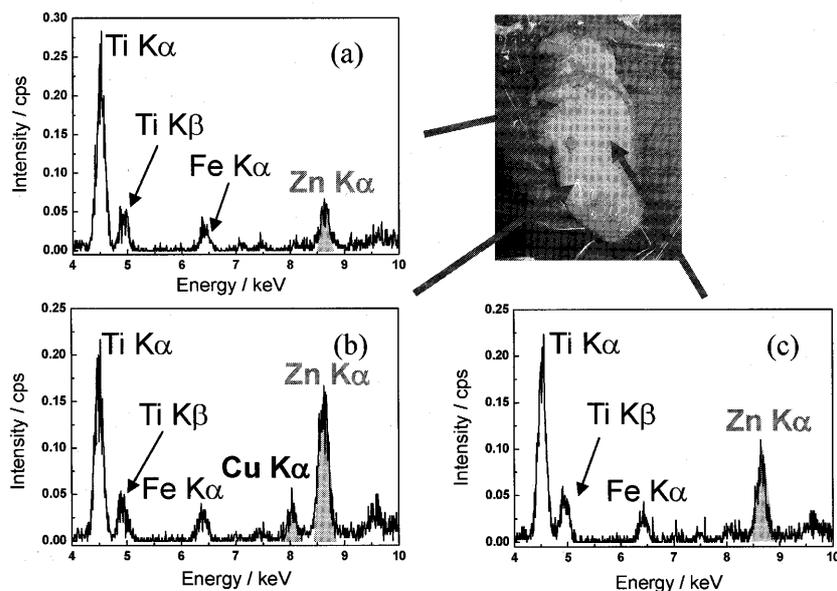


Fig. 9 X-ray spectra measured at different xyz positions (a), (b), (c) in oyster  
Measurement condition: 40 kV, 30 mA, 300 s

#### 4 結 言

本研究は、分析深さに限界を有しない、かつ簡易に試料内部の微小空間の分析が行える新しい分析手段の確立と装置の試作を目的として行った。通常のXRFでは試料内部の情報だけを得るのは困難であったが、この方法を用いることにより試料内部の微小部分分析が行えた。ただ、実際に生きている生物試料にニードル型コリメーターを挿入して測定するというのは困難な場合が多い。

しかし、更なる高輝度なマイクロX線ビームを用いれば、ニードル型コリメーターの外径も小さくすることができ、生物試料へのニードル型コリメーター挿入時のダメージも小さくなるので、測定も可能となると期待される。更に試料内部の微小空間の蛍光X線分析が可能であるというメリットを生かし、今後、固/液界面、水溶液中の反応や拡散現象などの研究への応用が期待される。

#### 文 献

- 1) J. Xie, Y. He, X. Ding, Q. Pan, Y. Yan: *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 391 (1999).
- 2) T. Emoto, Y. Sato, Y. Konishi, X. Ding, K. Tsuji: *Spectrochim. Acta, Part B*, **59**, 1291 (2004).
- 3) K. Tsuji, F. Delaieux: *Spectrochim. Acta, Part B*, **58**, 2233 (2003).
- 4) X. Ding, N. Gao, G. Havrilla: *Proceedings of SPIE* 4144, p. 174 (2000).
- 5) L. Vincze, B. Vekemans, F. E. Brenker, G. Falkenberg, K. Rickers, A. Somogyi, M. Kersten, F. Adams: *Anal. Chem.*, **76**, 6786 (2004).
- 6) B. Kanngießer, W. Malzer, A. F. Rodriguez, I. Reiche: *Spectrochim. Acta, Part B*, **60**, 41 (2005).
- 7) K. Tsuji, A. Matsuda, K. Nakano, A. Okhrimovskyy: *Spectrochim. Acta, Part B*, **61**, 460 (2006).
- 8) 食品成分研究調査会編: “五訂 日本食品成分表”, p. 176 (2001), (医歯薬出版).

## X-Ray Fluorescence Analysis of Micro-Volume of Sample Inside by Using Needle-Type Collimators

Akinori MATSUDA<sup>1</sup> and Kouichi TSUJI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka City University, 3-3-138, Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka-shi, Osaka 558-8585

(Received 7 April 2006, Accepted 5 July 2006)

We proposed and investigated the X-ray fluorescence analysis of a micro-volume inside a sample by using needle-type collimators. The primary X-rays were passed into a needle-type collimator, and the inside of the soft sample was irradiated. Generated X-ray fluorescence was detected through a similar collimator. Standard samples of agar that included elements with certain concentrations were prepared. The analytical performance was evaluated using those standard samples. The lowest limits of detection of K, Ca, and Zn in agar were 154 mg/kg, 85.4 mg/kg, and 5.95 mg/kg, respectively. Moreover, oyster was measured as an application to a biological sample. It was confirmed that X-ray fluorescence analysis inside sample was possible.

**Keywords** : XRF; micro-volume analysis; needle-type collimators; inside sample.