総合論文*

プラズマ分光法による生体試料の多元素定量分析

藤森 英治^{®**}, 稲垣 和三^{***}, 原口 紘宏^{***}

Multielement determination of major-to-ultratrace elements in biological samples by analytical plasma spectrometry

Eiji FUJIMORI^{**}, Kazumi INAGAKI and Hiroki HARAGUCHI^{***}

^{**}Waste Treatment Facility, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603

^{***}Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603

(Received 22 June 1998, Accepted 2 September 1998)

The multielement determination of major-to-ultratrace elements in biological samples by ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry) and ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) is reported. Matrix effects, especially due to organic compounds contained at high concentrations in biological samples, were examined in detail in terms of non-spectral interference and polyatomic ion interference. It was found that the interference of $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ with ^{52}Cr could be corrected by the CF (correction factor) method, which was estimated from the apparent ion counts of ^{52}Cr and the emission intensity of C at 247.8 nm. The major-to-ultratrace elements in freeze-dried human urine standard reference material (NIST SRM 2670; elevated) and human hair reference material (NIES CRM No. 13) were determined using both ICP-AES and ICP-MS. Furthermore, rare earth elements (REEs) in human blood serum (human blood serum reference material NIES CRM No. 4 and personal human blood serum samples) were determined by ICP-MS after acid digestion and chelating resin preconcentration. The REE distribution pattern of human blood serum showed some similarity to that of seawater.

Keywords : ICP-MS; ICP-AES; biological samples; multielement determination; rare earth elements.

1 緒 言

近年の機器分析法の急速な発展により、様々な分野に

おいて超微量レベルの元素の分析が可能になりつつある。医学、薬学、獣医学、歯学、栄養学など生体に直接関係する研究分野においても、生体試料中の微量元素への関心が高まっている¹⁾²⁾。生体を構成する元素は、国際放射線防護委員会が採用している「標準人間」において1%以上存在する多量元素(O, C, H, N, Ca, P)で全体の99.4%を占め、1~0.01の範囲にある微量元素(S, K, Na, Cl, Mg)を合わせると約99.7%とな

* 中部支部創立40周年記念

** 名古屋大学廃棄物処理施設: 464-8603 名古屋市千種区不老町

*** 名古屋大学大学院工学研究科応用化学専攻: 464-8603 名古屋市千種区不老町

る。一般に 0.01% (= 100 ppm = 100 µg/g) 以下の元素は微量元素と呼ばれるが、ヒトにおいては Fe よりも含有量が小さい元素がすべて微量元素となる。そのうち Fe, Zn, Cu, F, I, Mn, Se, Co, Cr, Mo はヒトにおいて必須性が証明されており、これらは必須微量元素とされている。このほか、動物実験の結果から Sn, V, F, Si, Ni, As, Sr, Pb などの必須性が示唆されている。これらの知見は、目的に応じた人工飼料の調製が可能になったこと、又空気清浄器の使用が可能になったことに加えて、機器分析の発展により微量元素の測定が可能になったことにより明らかにされてきた。しかし、生体試料中で超微量レベル (1 ppm 以下) の元素の分析法はいまだ十分に確立されておらず、今後超微量元素の定量が可能になれば、現在その必須性が知られていない元素や、有害性のみが知られている元素についても、超微量レベルにおいては必須である可能性がある。更に、Hg-Se, Zn-Cd のような、元素の共存による毒性の軽減化や、欠乏症の補完などの元素間の相互作用も知られており、生体微量元素の分析法としては、高感度であることとともに多元素を同時に分析することが今後重要になると考えられる。

現在、微量元素分析法としては主に黒鉛炉原子吸光法 (GFAAS)、中性子放射化分析法 (NAA)、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) 等が用いられている³⁾。GFAAS は基本的には 1~数元素の分析法であり、広範な多元素の同時分析は困難である。NAA は高感度で多元素分析が可能であるが、試料の放射化に原子炉が必要であるといった問題がある。一方、ICP-MS は実験室レベルで比較的容易に高感度多元素分析が可能であるため、近年急速に普及しつつあり、生体試料への応用も進んできている⁴⁾⁵⁾。そこで本研究では、ICP-MS を用いた生体試料中の微量元素の多元素定量分析について検討した。又、主成分元素の分析には ICP 発光分析法 (ICP-AES) を用い、ICP-MS と併用することにより主成分から超微量成分の範囲にある多元素分析が可能となった。

2 ICP-MS における非スペクトル干渉

血液試料や尿試料中には、主成分として無機塩のほかにタンパク質やアミノ酸などの有機物が多量に含まれており、ICP-MS 測定の際に分析値の誤差の要因、すなわち干渉の原因となる。ICP-MS における干渉については様々な研究がなされているが⁶⁾、有機物による干渉については十分な検討がなされていない。そこで本研究では有機マトリックスとしてグリシンを用い、ICP-MS の信号強度に対する影響について検討した⁷⁾。

Fig. 1 Effects of glycine on the signal intensities of analyte elements

Analyte elements: Ni, Ge, Mo, In, Ce, Bi; 10 ng/ml each. Glycine concentration: ● 10; ○ 20; ■ 30; □ 50 g/l. Signal intensities were normalized to those without glycine.

Fig. 1 には、Ni, Ge, Mo, In, Ce, Bi の濃度がそれぞれ 10 ng/ml の溶液に共存するグリシンの濃度を変化させた際の ICP-MS 測定における信号強度の変化を示す。図から分かるように、グリシンの共存により ICP-MS 測定時の分析元素の信号に増感が見られ、増感の大きさはグリシンの濃度が大きいほど大きく、又分析元素の質量数が小さいほど大きくなった。

試料溶液をネブライザーを用いてプラズマ中に導入した場合、試料中の主成分に由来するマトリックスイオンの密度 n は、式(1)のように表される⁸⁾。

$$n(\text{cm}^{-3}) = \frac{10^{-6} N F e_a C \beta_i}{Q e_f} \quad (1)$$

ここで、 N はアボガドロ数、 F は試料溶液流量 (cm^3/s)、 C はマトリックス濃度 (M)、 e_f はガス膨張係数、 Q はキャリアーアルゴンガス流量 (l/s)、 β_i はイオン化率、 e_a は原子化効率である。Table 1 には ICP-MS による微量元素の定量を行う場合の測定条件を示す。このような測定条件の場合には、 $F = 0.017 \text{ cm}^3/\text{s}$ 、 $Q = 0.0083 \text{ l/s}$ 、 $e_f = T_g/298$ (T_g はプラズマのガス温度、測定室の温度は 25°C とした)、 $e_a = 0.02$ となる。なお、原子化効率 e_a は、試料溶液の輸送効率とほぼ等しいと考えられるので、ネブライザーの噴霧効率と同じ 2% と仮定した。又、プラズマの励起温度が 6680 K のとき炭素のイオン化率 β_i は 0.0345 である⁹⁾。故に、ガス温度 T_g を 5000K

Table 1 Instrumental systems and operating conditions for ICP-MS and ICP-AES

ICP-MS	Seiko SPQ 8000
Plasma conditions	
Rf frequency	27.12 MHz
Rf power	1.2 kW
Outer gas	Ar 16 l/min
Intermediate gas	Ar 1.0 l/min
Carrier gas	Ar 0.47 l/min
Sampling conditions	
Sampling depth	9 mm from load coil
Sampling cone	Copper, 1.1 mm orifice diameter
Skimmer cone	Copper, 0.35 mm orifice diameter
Nebulizer	Glass concentric type (Meinhard TR-30-A2)
Sample uptake rate	1.0 ml/min
Data acquisition	
Scanning mode	Peak hopping
Data points	3 points/peak
Dwell time	10 ms/point
Integration	20 × 5 times
ICP-AES	Jarrell-Ash Plasma AtomComp Mk II
Plasma conditions	
Rf frequency	27.12 MHz
Rf power	1.0 kW
Outer gas	Ar 17 l/min
Intermediate gas	Ar 1.0 l/min
Carrier gas	Ar 0.5 l/min
Observation height	18 mm above work coil
Nebulizer	Cross-flow type
Polychromator	Pashen-Runge (75 cm focal length)
Grating	2400 grooves/mm
Entrance slit width	25 μm
Exit slit width	50 μm
Integration time	30 s

と仮定すると, 5% グリシン溶液を導入した場合に生成する炭素イオン (C^+) の密度は $5.9 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ となる。プラズマ中心部 (セントラルチャンネル) 付近の総マトリックスイオン密度は電子密度と等しく 10^{14} cm^{-3} 程度であるため⁽¹⁰⁾, グリシン濃度が 5% 程度であるときはプラズマ中のマトリックスイオンの総量に十分影響を与える濃度であると考えられる。そこで, グリシン溶液を導入した際のプラズマの状態変化について更に考察した。

グリシン溶液が導入された場合のプラズマの状態変化を表すパラメーターとしては電子密度が最も適当である。しかし, 電子密度の正確な測定は困難であるため, ここでは ICP-AES において励起温度 (T) を求める場合に用いられる測定元素の発光強度 (I) との関係式であるボルツマンプロット⁽¹¹⁾ {式(2)} に与えるグリシンの影響について調べた。

$$\log\left(\frac{I\lambda}{gA}\right) = -\frac{0.434\Delta E}{kT} + C \quad (2)$$

ここで, λ は測定波長, g は統計的重率, A はアインシュタインの遷移確率, ΔE は発光波長の励起エネルギー, k はボルツマン定数, C は定数である。測定元素には Fe 10 μg/ml (0.1 M HNO_3 溶液) を用い, マトリックスの有無における Fe I (中性原子線) 及び Fe II (イオン線) の発光強度の変化を測定した。マトリックスとしては, グリシンを 5% 添加した。又, 比較として NaCl 10 mM 溶液を添加した場合についても同様の実験を行った。Table 2 に使用した波長, 励起エネルギー及び gA 値を示す⁽¹²⁾。発光強度の測定には, 波長掃引型の ICP-AES 分析システム (Seiko SPS 1500V) を用いた。

測定した発光強度と, Table 2 にまとめた各波長に対する Fe I と Fe II の励起エネルギー及び gA 値を用いて,

Table 2 Atomic and ionic lines of iron used for emission intensity measurements and their excitation energies and gA values

Fe I ^{a)}			Fe II ^{b)}		
Wavelength	Energy	gA	Wavelength	Energy	gA
356.54 nm	4.44 eV	$3.71 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	256.25 nm	5.82 eV	$12.8 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$
357.01	4.39	7.56	256.69	5.91	2.60
358.12	4.32	12.5	258.26	5.88	3.09
360.89	4.45	4.16	261.19	4.79	8.71
361.88	4.42	5.09	261.38	4.85	3.98
371.99	3.33	1.79	261.76	4.82	2.62
373.49	4.18	9.76	262.57	4.77	3.35
373.71	3.37	1.29	262.83	4.84	3.43
374.95	4.22	7.02	266.47	8.04	26.5
381.58	4.73	8.15	266.66	8.07	24.1
382.04	4.10	6.16	271.44	5.55	3.86
382.59	4.15	4.56	273.95	5.51	15.4
382.78	4.80	6.00	274.32	5.62	7.20
385.99	3.21	0.796	274.65	5.59	11.7
388.63	3.24	0.376	275.33	7.77	24.8
388.85	4.80	1.43	275.57	5.48	21.1

a) Atomic line, b) ionic line.

式(2)に従ってボルツマンプロットを作図した結果をFig. 2に示す。Fig. 2は観測高さ (sampling depth) 9 mmにおける結果である。Fig. 2, a) と b) から分かるように、グリシンがマトリックスとして共存した場合にはFe I, Fe IIともにボルツマンプロットにはほとんど変化が見られず、故にボルツマンプロットの傾きから求められる励起温度の変化もほとんどなかった。一方、NaClをマトリックスとした場合にはFig. 2に見られるようにFe I, Fe IIのいずれの発光線でも発光強度に増感が見られ、又励起温度にもわずかに変化が見られた。理論的にはボルツマンプロットの変化は電子密度の変化を間接的に表していると考えられる⁸⁾。従って、上記の結果はグリシンをマトリックスとした場合には電子密度の変化はほとんどないことを示唆する。このことはプラズマ中の陽イオン密度もほぼ一定であることを意味するので、ICP中で最も存在量の大きいアルゴンイオン(Ar^+)がグリシンに含まれる炭素のイオン化により生成した C^+ に一部置換された結果、プラズマ中のマトリックスイオンの総量が変化しなかったと考えられる¹³⁾。ICP-MSでは元々 Ar^+ による質量差別効果のために測定元素の減感が起こっている。Fig. 1のようなグリシンの共存によるICP-MSの信号強度の増感、 Ar^+ がより低質量の C^+ に置換された結果マトリックスが軽くなることで、 Ar^+ による減感作用が軽減されることが原因であると考えられる。質量差別効果による減感は一般的に低

質量側の測定元素のほうが受けやすいために、グリシンの共存によって低質量側の測定元素がより増感されている。一方、ICP-AES測定におけるNaClによる発光強度の増感、セントラルチャンネル付近での電子密度が増加したことを示唆している。

生体試料は複雑な組成のマトリックスを多量に含有しているため、ICP-AES及びICP-MS測定において種々の干渉が複合的に起こることが考えられる。又、四重極型質量分析計を用いたICP-MSにおいてはマトリックスに起因する多原子イオンによるスペクトル干渉も深刻な問題となる。従って、実際試料を分析する際には試料のより完全な分解、希釈、主成分の分離除去などの前処理を行うことが望まれる。又、測定の際には、適切なスペクトル線、測定同位体、内標準元素の選択が必要である。

3 ICP-MS/AES 複合分析システムによる多原子イオン干渉の補正

ICP-MSとICP-AESで用いられるプラズマは基本的に同一であるため、一つのプラズマのみをイオン源及び励起源として利用し、質量分析と発光分析を同時に行うことができる複合分析システムが開発されている^{14)~17)}。このような複合分析システムを用いると、(1)溶液中の $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ pg/ml レベルの同時分析を少量の試料で迅速に行うことができる、(2) ng/ml レベルの元素についてはICP-MS、ICP-AESの両方で定量が可能であるた

Fig. 2 Boltzmann plots of atomic and ionic emission lines of iron observed by ICP-AES

a) atomic lines, b) ionic lines. Analyte element: 10 $\mu\text{g/ml}$ Fe in 0.1 M HMO_3 solution, ● without matrix; ○ 5% Glycine; ▲ 0.1 M NaCl

め, 測定値の相互チェック (intercalibration) ができる, (3) ICP-MS におけるスペクトル干渉を, 干渉を与える元素を ICP-AES により測定することでスペクトル干渉を補正できる, (4) アルゴンの消費量を低減できる, といった利点がある. ICP-MS による生体試料の分析においては, 共存元素による多原子イオン干渉が特に m/z 80 以下で問題となる. 本研究では ICP-MS/AES 複合分析システムによる多原子イオン干渉の補正法について検討を行った¹⁸⁾.

分析に用いた試料は, NIST (National Institute of Standards and Technology) より頒布されている凍結乾

Fig. 3 The relationship between the emission intensity of C at 248.7 nm and ion count of $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ at m/z 52 measured by the ICP-MS/AES combined system

The emission intensity of C and the ion counts of ArC were simultaneously measured at different glycine concentrations.

燥ヒト尿標準試料 (NIST SRM 2670; elevated) である. 試料は NIST の指示に従って純水に溶解して原液に戻し, 内標準元素を添加後 5 倍希釈して使用した.

尿標準試料溶液中には多量の有機物が存在するため, 炭素に起因する多原子イオン ($^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$) の干渉によりクロム (^{52}Cr) の定量が困難となる. そこで本研究では以下のような補正を行った. まず, グリシン溶液を用い, ICP-MS 測定における $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ (m/z 52) のイオンカウントと ICP-AES 測定における C I (247.8 nm) の発光強度の関係を調べたところ, Fig. 3 のように両者はグリシン濃度が 0~30 g/l の間で直線関係にあることが分かった. そこでグリシン 10 g/l 溶液を用いて ICP-MS におけるクロムのイオンカウントの補正係数 CF を式 (3) によって求めた.

$$CF = \frac{(\text{apparent ion counts of } ^{52}\text{Cr})_{\text{glycine}}}{(\text{emission intensity of C}_{247.8})_{\text{glycine}}} \quad (3)$$

この補正係数 CF を用い, 試料溶液の見掛けのイオンカウントから干渉分を見積もって差し引くことで, 補正後のイオンカウントを得た.

Table 3 Analytical results for chromium in freeze-dried human urine standard reference material (NIST SRM 2670; elevated)

(unit: ng/ml)

ICP-MS/AES ^{a)}		HR-ICP-MS ^{a)}	Certified value ^{b)}
Observed value	Corrected value	Observed value	
87.7 ± 0.5	81.2 ± 0.5	82.6 ± 1.5	85 ± 6

a) Mean ± SD (n = 3). b) The uncertainties are the statistical tolerance intervals at the 95% confidence limit.

$$\begin{aligned}
 & (\text{corrected ion counts of } ^{52}\text{Cr}) \\
 & = (\text{apparent ion counts of } ^{52}\text{Cr})_{\text{sample}} \quad (4) \\
 & \quad - (\text{emission intensity of } \text{C}_{247.8})_{\text{sample}} \times CF
 \end{aligned}$$

グリシン 10 g/l 溶液にクロムの濃度がそれぞれ 1.0, 5.0, 10 ng/ml になるように標準溶液を添加したモデル溶液で実験を行った結果, クロムの濃度が多原子イオンによる干渉相当濃度 (interference equivalent concentration, IEC) より大きい場合には本補正法が十分機能することが分かった. そこで本法を尿標準試料 SRM 2670 中のクロムの定量に応用した. 結果を推奨値とともに Table 3 に示す. 補正前及び補正後のクロムの測定値はそれぞれ 87.7, 82.1 ng/ml であり, クロムの濃度はマトリックスによる IEC (5.6 ng/ml) よりも十分に高く, 補正は有効であると考えられる. しかし補正前, 補正後のいずれの値も推奨値の濃度範囲内に入っており, このままでは補正法の評価が困難である. そこで同一の試料を高分解能 ICP-MS (HR-ICP-MS) で測定し, 定量値の比較を行った. HR-ICP-MS は日本電子製 ICP-MS 装置 PLASMAX 1 を用い, 分解能約 5000 で測定を行った. Table 3 に HR-ICP-MS で得られたクロムの測定値も示したが, 本補正法を用いた補正值と良く一致しており, 炭素に起因する多原子イオン干渉の補正がほぼ完全に行われていることが確認できた. 本補正法は, ICP-MS における多原子イオン干渉を共存元素の発光強度を用いて補正できるため, 特に干渉を与える共存元素の濃度が高い場合に有効である.

ICP-MS/AES 複合分析システムでは発光分析と質量分析が同時に行えるために, 主成分から微量成分までの多元素分析が迅速に行える. そこで本複合システムを用い, 前述の尿標準試料の多元素分析を行った. 通常の ICP-AES 測定では, 発光強度は ICP の NAZ (normal analytical zone) で観測される. そのため, イオン化干渉などの主成分による干渉はあまり問題とならない. しかし, 本研究で使用した ICP-MS/AES 複合分析システ

ムでは, 装置条件をより高感度である ICP-MS の最適条件に設定するため, 発光強度は IRZ (initial radiation zone) での観測となる. このような条件では高濃度のマトリックスにより発光強度の減感や増感などが起こるため, 本研究では試料溶液中の Na, K, Mg, Ca によるマトリックスの総濃度が 100 µg/ml 程度になるように試料溶液を 25 倍希釈して ICP-AES, ICP-MS の測定を行った. Table 4 に示すように P の 610 µg/ml から Cs の 21.5 ng/ml まで 18 元素の定量が可能であった. 得られた測定値は NIST より報告されている推奨値又は参考値と良く一致しており, 又精度も良好であった. ICP-MS/AES 複合分析システムは液体試料など比較的前処理の不要な試料の迅速分析にも有用な方法である.

4 生体標準試料の分析

4.1 ICP-AES, ICP-MS による頭髮標準試料 NIES No. 13 の多元素定量分析

頭髮試料は, ① 比較的手入が容易である, ② 多くの元素について蓄積性がある, ③ 元素含有量が食生活や生活環境に影響される, ④ 過去の暴露や摂取の記録を保存している, などの理由から生体試料としてかなり広い分析対象となっている. 近年では特に頭髮試料中の元素濃度と疾病の相関に関心が持たれており, 多変量解析法を用いた相関解析も行われている¹⁹⁾²⁰⁾. このような解析においては, 頭髮中の多元素を高感度かつ高精度で測定することが非常に重要である. そこで本研究では ICP-AES 及び ICP-MS を用い, 頭髮試料の多元素定量分析について検討した.

試料には国立環境研究所 (National Institute for Environmental Studies, NIES) より頒布されている頭髮標準試料 NIES CRM No. 13 を用いた. 試料は, 硝酸-塩酸-過塩素酸-フッ化水素酸の混酸を用い, 次のようなマイクロ波加熱分解により溶液化した. 試料約 0.15 g をテフロン小容器に分取し, 硝酸 1.5 ml を添加して常温で 8 時間予備分解を行った. その後, 硝酸 2

Table 4 Analytical results for freeze-dried human urine standard reference material (NIST SRM 2670; elevated) obtained by ICP-MS/AES combined system

Element	Wavelength and/or m/z	Observed value ^{a)}		Certified value ^{b)}
		ICP-AES	ICP-MS	
P	213.6 nm	610 ± 60		
Ca	393.4 nm	96.2 ± 2.2		105 ± 5
Mg	279.5 nm	60.1 ± 0.2		63 ± 3
Si	251.6 nm	18.1 ± 0.4		
Ba ^{c)}	455.4 nm/138	1.3 ± 0.1	1.08 ± 0.06	
Rb	85		1.02 ± 0.01	
Zn	66		0.925 ± 0.016	
Cu	63		0.387 ± 0.004	0.37 ± 0.03
Mn	55		0.350 ± 0.004	(0.33)
Ni	60		0.253 ± 0.002	(0.30)
Sr ^{c)}	407.7 nm/88	0.23 ± 0.01	0.193 ± 0.001	
Au	197		0.174 ± 0.001	(0.24)
Pb	208		0.118 ± 0.001	0.109 ± 0.004
Co	59		0.113 ± 0.002	
Cd	114		0.0909 ± 0.0006	0.088 ± 0.003
Bi	209		0.0563 ± 0.0010	
Mo	98		0.0402 ± 0.0039	
Cs	133		0.0215 ± 0.0001	

a) Mean ± SD ($n = 3$). b) The uncertainties are the statistical tolerance intervals at the 95% confidence limit. The values in parentheses are information values. c) These elements were determined by both ICP-AES and ICP-MS.

ml, 塩酸 0.3 ml, 過塩素酸 0.3 ml, フッ化水素酸 0.15 ml を添加してマイクロ波加熱を行い分解した²¹⁾. 分解溶液をホットプレート上でいったん乾固し, 残留物を 1 M 硝酸 15 ml に溶解した後, 内標準元素 Ge, In, Re, Tl をいずれも最終的に 2.5 ng/ml になるように添加して 2 倍に希釈したものを測定溶液とし, ICP-AES (Jarrell-Ash Plasma AtomComp Mk II) 及び ICP-MS (Seiko SPQ 8000A) により測定を行った. 分析結果を推奨値²²⁾及び参考値²³⁾とともに Table 5 に示す. 本法により頭髪標準試料について Ca の 812 µg/g から Lu の 0.439 ng/g まで 39 元素の定量が可能であった. 今回の実験で得られた分析値は推奨値及び参考値と良く一致し, 繰り返し測定の精度も良好なものであった. 又, Table 5 には INAA (機器中性子放射化分析法) による分析結果も参考値として併記した. INAA では検出限界以下となっている多くの超微量元素についても本法では分析値が得られており, ICP-MS が頭髪中の超微量元素の定量に適した方法であることが示された. 頭髪中には体内で不要になった物質が排出, 蓄積されるため, 頭髪中の超微量元素の定量は, 極低レベルの元素の暴露や代謝過程の解明に有用であると考えられるので, 今後

ICP-MS による応用研究が期待される分野である.

4・2 キレート樹脂濃縮/ICP-MS によるヒト血清試料中の全希土類元素定量法の開発

生体試料のなかでも血液試料はヒトの健康や病態を診断するための簡便かつ適当な臨床試料であるため, 多くの研究者により血液や血清中の元素濃度が測定されている. しかし, ng/ml レベル以下で存在する超微量元素についてはまだ十分な研究がなされておらず, その濃度や役割については不明な点が多い. 希土類元素 (rare earth elements, REEs) は, 研磨剤, ガラス添加物, 蛍光体, 磁石などの工業材料として近年広く用いられている. 又, Gd や Dy は磁気共鳴イメージング (MRI) の造影剤として直接生体内に投与される場合があるために, 将来希土類元素の生体影響が問題となることも懸念されており, 実験動物への希土類元素化合物の投与実験などが行われている^{24)~26)}. しかし, 希土類元素の人体中におけるバックグラウンドレベルはほとんど明らかにされていない. そこで本研究では, ICP-MS による血清試料中の希土類元素の定量法を開発した^{27)~29)}.

分析試料としては NIES より頒布されている凍結乾燥

Table 5 Analytical results for human hair certified reference material (NIES CRM No.13) obtained by ICP-AES and ICP-MS

(unit: $\mu\text{g/g}$)				
Element ^{a)}	Wavelength or m/z	Observed value ^{b)}	Certified value ^{c)}	Reference value ^{d)}
Ca [†]	393.4 nm	812 $\pm$ 6	(820)	810 $\pm$ 40
P [†]	178.3 nm	179 $\pm$ 2		
Zn [†]	213.5 nm	152 $\pm$ 1	172 $\pm$ 11	179 $\pm$ 5
Fe [†]	259.9 nm	143 $\pm$ 4	(140)	144 $\pm$ 5
Mg [†]	279.0 nm	143 $\pm$ 1	(160)	164 $\pm$ 9
Al [†]	308.2 nm	119 $\pm$ 3	(120)	130 $\pm$ 5
Na [†]	589.0 nm	67.4 $\pm$ 0.8	(61)	65 $\pm$ 4
K [†]	766.5 nm	43 $\pm$ 3		70 $\pm$ 8
Cu [†]	324.7 nm	14.8 $\pm$ 0.2	15.3 $\pm$ 1.3	14.5 $\pm$ 1.3
Ti [‡]	47	11.1 $\pm$ 1.6		10.8 $\pm$ 1.5
Pb [‡]	208	4.40 $\pm$ 0.08	4.6 $\pm$ 0.4	
Mn [‡]	55	3.94 $\pm$ 0.59	(3.9)	4.0 $\pm$ 0.4
Sr [†]	407.7 nm	2.49 $\pm$ 0.02		8.7 $\pm$ 0.8
Ba [†]	455.4 nm	1.83 $\pm$ 0.07	(2.0)	2.0 $\pm$ 0.1
Ni [‡]	60	1.14 $\pm$ 0.08		1.95 $\pm$ 0.013
Sn [‡]	120	0.451 $\pm$ 0.015		0.59 $\pm$ 0.09
Cd [‡]	111	0.213 $\pm$ 0.004	0.23 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.02
Zr [‡]	90	0.110 $\pm$ 0.009		0.69 $\pm$ 0.08
Co [‡]	59	0.0654 $\pm$ 0.0047	(0.07)	0.072 $\pm$ 0.002
Mo [‡]	98	0.0573 $\pm$ 0.0003		<0.036
Sb [‡]	121	0.0474 $\pm$ 0.0013	0.042 $\pm$ 0.008	0.045 $\pm$ 0.02
Bi [‡]	209	0.0144 $\pm$ 0.0004		
Th [‡]	232	0.0106 $\pm$ 0.0020		0.0104 $\pm$ 0.0028
Cs [‡]	133	0.00751 $\pm$ 0.00053		0.0089 $\pm$ 0.0005
U [‡]	238	0.00510 $\pm$ 0.00036		<0.0041
La [‡]	139	0.0816 $\pm$ 0.0082		0.128 $\pm$ 0.030
Ce [‡]	140	0.139 $\pm$ 0.017		0.184 $\pm$ 0.032
Pr [‡]	141	0.0172 $\pm$ 0.0019		<0.13
Nd [‡]	146	0.0491 $\pm$ 0.0050		<0.064
Sm [‡]	147	0.0062 $\pm$ 0.0009		0.0070 $\pm$ 0.0011
Eu [‡]	151	0.00149 $\pm$ 0.00013		0.0020 $\pm$ 0.0002
Gd [‡]	157	0.0085 $\pm$ 0.0007		<0.12
Tb [‡]	159	0.00106 $\pm$ 0.00008		0.00132 $\pm$ 0.00026
Dy [‡]	163	0.00573 $\pm$ 0.00053		<0.0069
Ho [‡]	165	0.00116 $\pm$ 0.00010		<0.0097
Er [‡]	167	0.00303 $\pm$ 0.00033		
Tm [‡]	169	0.000480 $\pm$ 0.000064		<0.0042
Yb [‡]	174	0.00299 $\pm$ 0.00043		<0.0035
Lu [‡]	175	0.000439 $\pm$ 0.000056		<0.00082

a) †: Determined by ICP-AES, ‡: Determined by ICP-MS. b) Mean $\pm$ SD ($n = 3$). c) The values in the parentheses are reference values. d) Cited from Ref. 23.

ヒト血清標準試料 (NIES CRM No. 4) を用いた。試料は硝酸又は硝酸-過塩素酸の混酸を用いて分解し、分解溶液についてキレート樹脂濃縮法を適用して主成分元素の分離と希土類元素の濃縮を行った。キレート樹脂濃縮の操作は海水試料の場合とほぼ同様である³⁰⁾。Table 6 に希土類元素の添加回収率及び測定値を示す。硝酸-過塩素酸分解を行った場合の回収率は 80～95% であり、

硝酸のみの場合と比べて 10～15% ほど高い回収率が得られた。分解溶液中にはアルブミンやグロブリンなどの血清タンパク質由来のアミノ酸やペプチド類などの有機物が残存し、キレート樹脂と希土類元素の錯形成に競合するために回収率の低下の原因となる。過塩素酸を併用した場合、硝酸のみの分解に比べ有機物の分解をより完全に行えることで、タンパク質由来の有機物に取り込ま

Table 6 Analytical results for REEs in human blood serum certified reference material (NIES CRM No. 4) obtained by chelating resin preconcentration and ICP-MS

Element	m/z	HNO ₃ -HClO ₄		HNO ₃	
		Recovery Value ^{a)}	Observed Value ^{a)}	Recovery Value ^{a)}	Observed Value ^{a)}
La	139	94.7 ± 5.1%	131 ± 13 pg/ml	81.3 ± 2.7%	206 ± 20 pg/ml
Ce	140	93.5 ± 6.3	319 ± 29	79.6 ± 3.5	440 ± 72
Pr	141	88.1 ± 2.4	27.3 ± 3.0	79.7 ± 2.4	42.3 ± 5.2
Nd	146	86.6 ± 2.1	123 ± 17	79.6 ± 3.0	171 ± 18
Sm	147	84.1 ± 2.7	38.3 ± 3.4	74.3 ± 2.5	35.9 ± 2.5
Eu	151	85.0 ± 2.2	2.1 ^{b)}	74.4 ± 1.7	3.1 ^{b)}
Gd	157	92.8 ± 1.9	28.0 ± 1.5	73.4 ± 0.8	46.5 ± 1.0
Tb	159	87.7 ± 2.2	6.6 ± 0.9	74.2 ± 1.2	7.3 ± 0.8
Dy	163	84.4 ± 1.9	33.6 ± 3.9	75.0 ± 0.7	43.2 ± 6.2
Ho	165	87.4 ± 2.6	6.3 ± 1.2	73.6 ± 0.9	10.2 ± 0.6
Er	166	85.4 ± 2.1	22.2 ± 2.7	73.8 ± 1.9	31.2 ± 1.8
Tm	169	85.8 ± 1.4	5.2 ± 1.4	72.1 ± 1.0	5.1 ± 0.4
Yb	174	84.3 ± 2.0	26.2 ± 2.8	70.5 ± 2.0	44.7 ± 8.7
Lu	175	83.7 ± 1.1	5.9 ± 1.6	67.2 ± 2.5	5.6 ^{b)}

a) Mean ± SD (n = 3). b) n = 2.

Table 7 Analytical results for REEs in human blood serum samples

Element	Observed value			Detection limit
	A	B	C	
La	36.5	17.6	29.5	0.1
Ce	170	99	108	0.2
Pr	6.5	2.9	4.5	0.1
Nd	19.8	11.0	13.4	0.5
Sm	2.7	<1.8	<1.8	0.6
Eu	<0.2	<0.2	<0.2	0.2
Gd	<2.7	3.9	<2.7	0.9
Tb	0.5	0.5	0.8	0.1
Dy	5.2	3.1	2.0	0.3
Ho	0.99	0.83	0.44	0.08
Er	4.6	4.5	1.3	0.2
Tm	0.79	0.74	0.24	0.08
Yb	6.0	4.6	1.5	0.4
Lu	0.79	0.94	0.23	0.07

れる希土類元素の量が減少し、回収率が向上したのと思われる。上記の方法を用い、実際のヒト血清試料を分析した結果を Table 7 に示す。試料には健康成人男性から採取したヒト血清 A, B, C を用いた。本研究により、ヒト血清中の pg/ml レベルの希土類元素の定量が初めて可能となった。しかしヒト血清標準試料と比較して実際のヒト血清試料の希土類元素濃度は低濃度であるため、Ba に起因する BaO の干渉の補正が困難であり、

Fig. 4 Rare earth element distribution patterns for human blood serum and seawater

○: human blood serum (mean values for 3 persons); □: NIES CRM No. 4 (HNO₃ method); ■: NIES CRM No. 4 (HNO₃-HClO₄ method); ◆: coastal seawater (Ref. 30)

Eu は定量値を求めることができなかった。

Fig. 4 には、ヒト血清（標準及び実際試料）と沿岸海水中³⁰⁾の希土類元素存在度パターンを示す。希土類元素存在度パターンは、横軸に希土類元素を原子番号順にと

り、縦軸に試料中の希土類元素濃度を基準となる物質（ここでは Leedey chondrite いん石）中の希土類元素濃度で規格化したものの常用対数をプロットしたものである。ヒト血清と海水のパターンを比較すると、濃度レベルに差はあるものの比較的類似したパターンとなった。これは、ヒト血清がその起源として考えられている海水の元素存在度を恒常的に保存している可能性を示唆している。しかし、海水で見られる Ce の負異常が血清では見られないこと、中希土類元素から重希土類元素にかけて (Gd~Lu) の傾斜が異なるなど、生体内になんらかの希土類元素の分別過程も存在することが考えられる。今後このようなプロットを詳細に検討することにより、生体内での希土類元素の分布や存在状態が解明できるものと思われる。このような解析は全希土類元素を正確に定量することによって初めて可能になることであり、本研究が生体中の希土類元素の研究に大きく貢献できるものと考えられる。

5 ま と め

ICP-MS は微量元素の高感度多元素分析法として有用な方法である。しかし、共存元素による干渉についてはいまだ未解明の点も多いので、実際試料の測定の際には主成分元素の分離除去などの前処理や、測定時の干渉補正を行うことが必要である。HR-ICP-MS は、特に m/z 80 以下において多原子イオン干渉が問題となる元素の精密な測定には有用であるが、多元素測定を行う場合には測定時間がかかり、試料消費量が大きい点が現状の生体試料分析では問題となる。一方、主成分や少量成分元素の定量では ICP-AES は測定精度が良く、かつ正確な分析法である。故に、試料の種類や測定目的に応じた適切な前処理法や測定法の選択が必要である。

生体試料中の微量元素に関する研究は今後ますます盛んになっていくと思われる。プラズマ分光法の高感度かつ多元素分析が可能であるという特徴を生かし、微量レベルにおける多元素の相関から病態解析や生理活性機能発現機構の解明などの研究の発展の可能性もある。又、本稿では言及できなかったが、ICP-MS や ICP-AES をクロマトグラフィーなどの分離分析法と結合した複合分析システムの利用により、生体試料中の微量元素の存在形態やその生化学的機能などに関する研究の進展も今後大いに期待される。

文 献

- 1) 桜井 弘, 田中英彦編: “生体微量元素”, (1994), (廣川書店).

- 2) 千葉百子, 鈴木和夫編: “健康と元素”, (1996), (南山堂).
- 3) 原口紘彦, 寺前紀夫, 古田直紀, 猿渡英之共訳: “微量元素分析の実際”, (1995), (丸善); C. Vandecasteele, C. B. Block: “Modern Methods for Trace Element Determination”, (1993), (J. Wiley & Sons, Chichester).
- 4) 吉永 淳: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 895 (1995).
- 5) H. Vanhoe, R. Dams, J. Versieck: *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 23 (1994).
- 6) S. H. Tan, G. Horlick: *J. Anal. At. Spectrom.*, **2**, 745 (1987).
- 7) 藤森英治, 猿渡英之, 千葉光一, 原口紘彦: 日本分析化学会第 43 年会講演要旨集, p. 306 (1994).
- 8) D. S. Hanselman, N. N. Sesi, M. Huang, G. M. Hieftje: *Spectrochim. Acta*, **49B**, 495 (1994).
- 9) A. Montaser, D. W. Golightly (Ed.): “Inductively Coupled Plasma in Analytical Atomic Spectrometry”, 2nd ed, (1992), (VHC Publisher, New York).
- 10) N. Furuta, Y. Nojiri, K. Fuwa: *Spectrochim. Acta*, **40B**, 423 (1985).
- 11) 原口紘彦: “ICP 発光分析の基礎と応用”, (1986), (講談社).
- 12) Z. Walker, M. W. Blades: *Spectrochim. Acta*, **41B**, 761 (1986).
- 13) J. A. Olivares, R. S. Houk: *Anal. Chem.*, **58**, 20 (1986).
- 14) J. R. Garbarino, H. E. Taylor, W. C. Batie: *Anal. Chem.*, **61**, 793 (1989).
- 15) K. Lepla, M. A. Vaughan, G. Horlick: *Spectrochim. Acta*, **46B**, 967 (1991).
- 16) S. E. Hobbs, J. W. Olesik: *Anal. Chem.*, **64**, 274 (1992).
- 17) H. Sawatari, F. Fujimori, A. Itoh, M. Aikawa, H. Haraguchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 1635 (1995).
- 18) E. Fujimori, H. Sawatari, K. Chiba, H. Haraguchi: *Anal. Sci.*, **12**, 465 (1996).
- 19) Y. Ren, Z. Zhang, Y. Ren, W. Li, M. Wang, G. Xu: *Talanta*, **44**, 1823 (1997).
- 20) B. Nowak: *Sci. Total Environ.*, **209**, 59 (1998).
- 21) H. Isoyama, T. Uchida, K. Oguchi, C. Iida, G. Nakagawa: *Anal. Sci.*, **6**, 385 (1990).
- 22) J. Yoshinaga, M. Morita, K. Okamoto: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, 279 (1997).
- 23) 鈴木章悟, 平井昭司, 三頭聡明: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 845 (1994).
- 24) R. J. Palmer, J. L. Butenhoff, J. B. Stevens: *Environ. Res.*, **43**, 142 (1987).
- 25) S. Hirano, N. Kodama, K. Shibata, K. T. Suzuki: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**, 301 (1990).
- 26) S. Hirano, N. Kodama, K. Shibata, K. T. Suzuki: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **121**, 224 (1993).
- 27) E. Fujimori, Y. Tomosue, H. Haraguchi: *Tohoku J. Exp. Med.*, **178**, 63 (1996).
- 28) 藤森英治, 稲垣和三, 林 達也, 千葉光一, 原口紘彦: *Biomed. Res. Trace Elements*, **7**, 121 (1996).

29) K. Inagaki, H. Haraguchi: *Chem. Lett.*, **1997**, 775.

30) H. Sawatari, T. Toda, T. Saizuka, C. Kimata, A.

Itoh, H. Haraguchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 3065 (1995).

要 旨

プラズマ分光法として現在広く利用されている誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) 及び誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いた生体試料の多元素定量分析法について報告する。生体試料中に高濃度に含まれるマトリックスは ICP-AES, ICP-MS, いずれの測定の際にも大きな問題となる。本研究では特に ICP-MS による生体試料の分析で問題となる有機物による非スペクトル干渉について基礎的な検討を行った。ICP-MS におけるスペクトル干渉については、尿標準試料中のクロムの定量を例として ICP-MS/AES 複合分析システムによる補正法について検討した。ICP-AES, ICP-MS を用いた生体試料の多元素定量分析例として頭髮標準試料の分析を行い、約 40 元素の定量値を得た。又、ICP-MS/AES 複合分析システムを用いた尿標準試料の分析も行った。更に生体試料中超微量元素の測定例として、ヒト血清試料中の希土類元素について酸分解後キレート樹脂濃縮を用い、ICP-MS によって定量する方法を開発した。