—技術報告—

レーザーアブレーション—誘導結合プラズマ質量分析法による
血痕中の微量元素の分析

笠松正昭, 井川貴雄, 鈴木康弘

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

**Forensic analysis of trace elements in blood stain by
laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry**

Masaaki Kasamatsu, Takao Igawa and Yasuhiro Suzuki

*National Research Institute of Police Science**6-3-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**(Received 16 February 2017; accepted 5 October 2017;**Published online 21 November 2017 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.733)*

Analytical results for trace elements in biological sample can provide useful information to prove that a victim had taken toxic inorganic elements. In this study, we aimed to establish a detection method to detect toxic elements in a blood stain. Simulated blood samples prepared by mixing thallium standard solution in horse hemolysis blood were dropped and dried on a filter paper. Micro X-ray fluorescence spectrometry and scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray analysis could detect only major elements in the blood stain but not the added thallium. Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry made it possible to detect those elements in the blood stain. Calibration curve obtained by measuring filter paper made from aqueous solution or horse hemolysis blood containing thallium exhibited good linear relationship in the range of 0~500 ng/mL. The present method can be used for the qualitative screening of toxic elements in blood stains.

Key words: LA-ICP-MS, Blood Stain, Toxic Element**緒 言**

生体試料中の微量元素濃度は、個体が外界から受けた影響や個体の健康状態に関する有用な情報をもたらす場合がある。生体中に通常含有されない特異な元素が見いだされればその摂取が、また元素濃度が正常範囲を外れていれば何らかの疾患もしくはそ

の元素の過剰摂取が疑われる。このため、医学分野では疾病の診断を目的とした生体試料中金属元素の分析^{1,2)}が行われており、抗原抗体反応を用いたウィルスの検出など³⁾にも利用されている。有害元素による中毒や健康被害が疑われる事案でも、生体試料の分析⁴⁾が行われる。生体試料中の微量な有害元素の分析には、この目的に必要な感度を有する誘導

結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) が用いられている¹⁻⁴⁾。一方、無機毒物が使用された犯罪では、被害者が毒物を摂取した事実を証明するために、被害者から採取した生体試料を分析して、有害元素の濃度が健常人の値を有意に上回ることを確認する必要がある。しかし、被害者が行方不明であるような状況では試料の採取が不可能であるため、犯罪現場に被害者のものと推定される血痕が残されていれば、これに含有される有害元素を分析しなければならない。血痕のような微量の試料を通常の ICP-MS で分析すると、分解して溶液化する前処理の過程で希釈されるため、装置に導入される試料溶液の段階では分析対象元素の濃度が検出限界以下となる可能性がある。溶液化による希釈を伴わない微小な固体の元素分析手法としては微小部蛍光エックス線分析などが考えられるが、市販の装置では十分な感度が得られず微量元素の検出は困難という問題を抱えている。

ICP-MS にレーザーアブレーション (LA) を組み合わせた LA-ICP-MS は、固体試料中の微量元素を溶液化せずに直接分析できることから、その適用範囲を広げている。法科学の分野でもガラス⁵⁻⁹⁾、セラミックス¹⁰⁾、塗膜^{11,12)}、紙¹³⁾、繊維¹⁴⁾などの微量元素分析と微量元素濃度を異同識別の指標に用いた研究例が報告されている。生体試料への応用例としては、全血中の微量元素分析^{15,16)}や、ろ紙に滴下乾固した血液をフェムト秒レーザー、セクター型 ICP-MS、マルチコレクター型 ICP-MS を組み合わせた大掛かりなシステムを使用して分析する¹⁷⁾という興味深い報告が認められる。しかしその目的は通常含有される元素の定量や安定同位体比を求めるものであり、前述のような犯罪に使用される有害元素の分析は試みられていない。

LA-ICP-MS を利用することで抽出や分解などの前処理なしに、乾固した血痕から有害元素を迅速簡便に検出することは可能と考えられるが、LA-ICP-MS による定量を行う場合、検量線のマトリックスを分析対象元素が含有されるマトリックスに合わせる必要がある。法化学において取り扱う試料の中には微細でありマトリックスが未知であるというものもあり、このような試料に対する知見を積み重ね

ておく必要がある。そこで本研究では、犯罪に用いられたことのある有害元素の一例としてタリウムを採り上げ、タリウムを添加した模擬血液試料の血痕を作成して、固体試料中無機元素の汎用分析法である微小部蛍光エックス線分析法 (μ -XRF) や走査型電子顕微鏡/エネルギー分散型エックス線分光法 (SEM/EDX) による検出の可能性を比較することにより、LA-ICP-MS を使用する本法の有用性を示した。また定量性については、マトリックスの異なる検量線から算出した定量値を比較することでその特性について考察した。

材料および方法

1. 装置

血液試料の酸分解には、株式会社パーキンエルマージャパン製マイクロウェーブ試料前処理システム Multiwave 3000 を使用した。 μ -XRF は、アメテック株式会社製エネルギー分散型微小部蛍光エックス線分析装置 Orbis PC を用いた。装置条件は X 線管電圧 20 kV、管電流 100 μ A、照射径 30 μ m、真空雰囲気とし、有効時間 100 秒でスポット分析を行った。SEM/EDX は日本電子株式会社製 JSM-6610LV にオックスフォード・インストゥルメンツ社製 X-Max を装着した INCA Energy システムを用いた。加速電圧は像観察時 15 kV、EDX 分析時は 25 kV で行った。ICP-MS はアジレント・テクノロジー株式会社製誘導結合プラズマ質量分析装置

Table 1 Operating Conditions for LA-ICP-MS.

Laser ablation system	New Wave Research UP-213
Wavelength	213 nm
Repetition rate	10 Hz
Diameter	100 μ m
Sweep	20 μ m sec ⁻¹
Fluence	10-13 J cm ⁻²
ICP-MS system	Agilent 7500c
RF frequency	27.12 MHz
RF power	1.5 kW
Plasma gas flow rate	14.8 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.9 L min ⁻¹
Carrier gas flow rate	1.1 L min ⁻¹

7500c を使用し、LA-ICP-MS による元素分析を行う際は、本装置にニューウェーブリサーチ株式会社製 UP-213 型レーザーアブレーションシステムを結合した。LA-ICP-MS の測定条件を Table 1 に示す。

2. 試料

血液試料として、コージンバイオ株式会社製ウマ溶血血液を用いた。タリウムは、和光純薬工業株式会社製のタリウム標準液 (Tl 1000) を用い、適宜希釈して使用した。硝酸、過酸化水素は関東化学株式会社製 Ultrapur グレードのものを用い、溶液調製の際の希釈には全てメルク株式会社製 Milli-Q Advantage により調製された純水を使用した。

3. 実験操作

ウマ溶血血液に化学分析用の Tl 標準溶液を約 250 ng/mL となるよう添加して模擬血液試料を作製した。添加濃度を確認するため、模擬血液試料に含まれる Tl を湿式分析により定量した。模擬血液試料 0.1 mL に対し、硝酸、過酸化水素各 1 mL と純水 4 mL を混合し、マイクロウェーブ試料前処理システムにより密封条件下で 600 W, 10 分間の加熱分解を行った。分解溶液を 10 mL に希釈し、溶液中の Tl の濃度を ICP-MS を用いて検量線法により測定した。ここで得た値から模擬血液試料中の Tl 濃度を算出した。定量値は 227 ng/mL であった。以後の試料作製には本模擬血液試料を用い、回収率の算出は本定量値を基準とした。

模擬血液試料 100 μ L を面積が一定となるよう蛍光エックス線分析用点滴ろ紙 (マイクロキャリア) に滴下し、室温で一晩放置し乾固させて血痕を想定する試料とした。試料の外観を Fig. 1 に示す。LA-ICP-MS の検量線を作成するため、マトリックスを水 (2% 硝酸水溶液) もしくはウマ溶血血液とする試料溶液 (Tl 濃度 0, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 ng/mL) を調製し、模擬血液試料と同様にマイクロキャリアに滴下、乾燥して対照試料を作製した。

乾固した試料の一部を約 5 mm 角の大きさにメスで切り出し、電子顕微鏡用カーボン製の試料台 (25 mm 径) に両面テープで保持して μ -XRF の測定用試料とした。 μ -XRF 測定終了後に同試料を炭素蒸着し、SEM/EDX の測定用試料とした。LA-ICP-

Fig. 1 Dried blood samples prepared for the present study.

MS の測定試料には、先の測定で切り取ったマイクロキャリアの残りを電子顕微鏡用カーボン製の試料台 (25 mm 径) に両面テープで保持したものを使用した。 μ -XRF および SEM/EDX では任意の点を分析するスポット分析で行い、LA-ICP-MS では照射部位 (測定部位) を掃引するライン分析を採用した。標準溶液を滴下乾燥させた試料も模擬血液試料と同様に分析した。

結果および考察

1. μ -XRF および SEM/EDX による元素分析

血液に Tl を添加し乾固した試料を、 μ -XRF で分析した。そのスペクトルを示す (Fig. 2(A))。血液に含有されるリン (P), 硫黄 (S), カリウム (K), 鉄 (Fe) に由来する特性エックス線が確認されたのに対し、添加した Tl に由来するピークは確認されなかった。標準溶液を希釈して 500 ng/mL とした溶液で同様にマイクロキャリアに滴下乾燥させて作製した試料を測定した。添加元素に由来するピークは確認されず (Fig. 2(B))、この方法では検出に必要な感度が不足していることが示された。

μ -XRF に使用した測定用試料を炭素蒸着し、SEM/EDX で分析した。炭素 (C), 酸素 (O), ナトリウム (Na), S, 塩素 (Cl), K, Fe に由来する特性エックス線が確認されたのに対し、添加した Tl に由来するピークは観測されなかった。Tl を添加した試料のスペクトルを示す (Fig. 3(A))。また、標準溶液を滴下乾燥させた試料を分析しても μ -XRF と同様に添加元素に由来するピークは確認されなかった (Fig. 3(B))。

Fig. 2 Analytical results using μ -XRF for (A) dried blood sample prepared by drying 100 μ L of blood containing 227 ng/mL of Tl; (B) standard sample prepared by drying 100 μ L of standard solution containing 500 ng/mL of Tl. Rhodium (Rh) originates from X-ray tube.

これらの結果から、 μ -XRF および SEM/EDX では 500 ng/mL に相当する濃度の Tl が滴下乾燥されたる紙から、Tl を検出することは困難であることが示された。

2. LA-ICP-MS による各試料の分析

LA-ICP-MS ではレーザーの照射により試料が溶発されるため、同一場所を連続的に照射するスポット分析にはある程度の厚みを持った試料が必要である。本実験の血液試料はろ紙の上に滴下乾燥しており、スポットでの測定には厚さが十分ではないと考えられたため、試料を一定速度で走査し照射位置を変えながら分析することで常に信号強度が得られる

Fig. 3 Analytical results using SEM/EDX for (A) dried blood sample prepared by drying 100 μ L of blood containing 227 ng/mL of Tl; (B) standard sample prepared by drying 100 μ L of standard solution containing 500 ng/mL of Tl.

ようにした。レーザー照射後の試料の様子を Fig. 4 に示す。

測定によって得られる信号強度が定量的な応答を示すか否かを検討した。先に述べたマトリックスを水もしくはウマ溶血血液とする試料溶液をマイクロキャリアに滴下乾燥させて作製した対照試料を LA-ICP-MS で測定した。得られた信号強度を Tl 濃度に対してプロットしたところ、いずれのマトリックスでも良好な直線関係が得られた (Fig. 5)。回帰直線を求めた際の R 二乗値はそれぞれ 0.99 以上を示した。すなわち、同じマトリックス内においては Tl 濃度と信号強度には相関があるため定量分析は問題なく行えると言える。しかし、マトリックスが

Fig. 4 Stereomicroscope image after laser ablation: (A) dried blood sample prepared by drying 100 μ L of blood without the addition of Tl; (B) standard sample prepared by drying 100 μ L of aqueous solution containing no Tl.

Fig. 5 Calibration curve using LA-ICP-MS for sample prepared by drying 100 μ L of (A) blood containing 0~500 ng/mL of Tl; (B) standard solution containing 0~500 ng/mL of Tl. The length of the vertical line on the graph corresponds to the range of the Mean $\pm$ SD.

Table 2 Calculated quantitative values for Tl in dried blood samples by LA-ICP-MS.

Matrix for calibration sample	Calculated concentration (ng/mL)	Recovery (%)
Water (2% HNO ₃)	111 $\pm$ 17	49.1
Blood	230 $\pm$ 39	101.6

(n = 5)

異なるこれらの検量線同士を比較した際、直線の傾きの違いすなわち同じ Tl 濃度から得られる信号強度に違いが生じていることが読み取れる。血痕を想定する試料を測定して得られた信号強度から、仮にそれぞれを検量線として Tl の含有量を算出したものを Table 2 に示す。マトリックスを水とする検量線を用いると定量値は低く算出された。一方、マトリックスを血液とする検量線を用いると定量値は模擬血液試料に含まれる Tl 濃度と良好な一致を示した。ここで検量線の傾きすなわち信号強度に違いが生じる理由を考えると、主な原因は試料がアブレートされる効率が異なるため、ICP-MS への試料導入量に差異が生じることが挙げられる。Fig. 4 のレーザー照射痕は、同条件で照射したにもかかわらず、血液試料では照射領域の全量を掘削するには至っておらず、試料導入量自体が少なかったことが確認される。一般に、LA-ICP-MS による定量分析が困難となる主な理由は、本実験により示されたような測定対象と検量線試料のマトリックスの差異によるものとされている¹⁸⁾。この問題を解決するために、揮散される量、試料導入効率など全ての因子を両試料の間で揃える、あるいはマトリックスの影響を補正するために内標準元素を利用するなど種々の方法が検討されているが¹⁹⁻²²⁾、現在のところ汎用性のある解決法は見いだされていない。

本手法は、多種多様な状態で回収される現場資料に対し、XRF や SEM/EDX で検出されない低濃度領域の有害元素である Tl 含有の有無を簡便、迅速に判定するスクリーニング検査に非常に有用であると位置づけられる。

結 語

有害元素である Tl を添加した模擬血液試料を乾

固させて LA-ICP-MS で分析したところ、添加した TI の検出が可能であった。これらは通常の元素分析で汎用される μ -XRF や SEM/EDX では検出されなかったことから、従来法で見落とされる可能性のあった低濃度の対象元素の分析が LA-ICP-MS により可能となることが示された。TI の濃度と信号強度との関係を調べるため、マトリックスの異なる 2 種類の検量線を作成したところ、それぞれのマトリックス内では良好な直線関係が認められた。しかし 2 種類の検量線間では直線の傾きが異なり、測定試料とマトリックス合わせをしていない検量線からの定量は困難であることが示された。仮に水をマトリックスとする検量線から算出すると、模擬血液中に含まれる TI 濃度より低く定量されたことから、実際の濃度は“算出された値以上の濃度”で含有されること示すことになる。本法では、溶液分析のような煩雑な前処理無しで TI 含有の有無を知ることができ、マトリックスを合わせることができればさらに定量まで行える点が利点であり、スクリーニングなどで法科学的検査へ応用できると考えられる。

文 献

- 1) Resano M., Aramendia M., Rello L., Calvo M. L., Beraíl S. and Pecheyran C., Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease. *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**, 98–106, 2013.
- 2) Vural H., Demirin H., Kara Y., Eren I. and Delibas N., Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **24**, 169–173, 2010.
- 3) He Q., Zhu Z., Jin L., Peng L., Guo W. and Hu S., Detection of HIV-1 p24 antigen using streptavidin-biotin and gold nanoparticles based immunoassay by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **29**, 1477–1482, 2014.
- 4) Bonnie M. W. F., Tak S. S., Joseph S. K. L. and Tam S., Determination of Mercury in Whole Blood and Urine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **31**, 281–287, 2007.
- 5) Trejos T. and Almirall J. R., Sampling strategies for the analysis of glass fragments by LA-ICP-MS Part I. Micro-homogeneity study of glass and its application to the interpretation of forensic evidence. *Talanta*, **67**, 388–395, 2005.
- 6) Trejos T. and Almirall J. R., Sampling strategies for the analysis of glass fragments by LA-ICP-MS Part II: Sample size and sample shape considerations. *Talanta*, **67**, 396–401, 2005.
- 7) Berends-Montero S., Wiarda W., de Joode P. and van der Peijl G., Forensic analysis of float glass using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): validation of a method. *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**, 1185–1193, 2006.
- 8) Suzuki Y. and Suzuki S., Forensic Discrimination of Tiny Glass Fragments with Non-flat Surface by Trace Elemental Analysis Using LA-ICP-MS. *Jpn. J. Forensic Sci. Tech.*, **15**, 95–103, 2010.
- 9) Sjøstad K.-E., Andersen T. and Simonsen S. L., Application of laser ablation inductively coupled plasma multicollector mass spectrometry in determination of lead isotope ratios in common glass for forensic purposes. *Spectrochim. Acta Part B*, **89**, 84–92, 2013.
- 10) 笠松正昭, 鈴木康弘, レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法によるセラミックス製品中の微量元素の分析と法科学的異同識別への応用. 日本法科学技術学会誌, **21**, 35–45, 2016.
- 11) Hobbs A. L. and Almirall J. R., Trace elemental analysis of automotive paints by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 1265–1271, 2003.
- 12) Deconinck I., Latkoczy C., Gunther D.,

- Govaert F. and Vanhaecke F., Capabilities of laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry for (trace) element analysis of car paints for forensic purposes. *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**, 279–287, 2006.
- 13) van Es A., de Koeijer J. and van der Peijl G., Discrimination of document paper by XRF, LA-ICP-MS and IRMS using multivariate statistical techniques. *Sci. Justice*, **49**, 120–126, 2009.
- 14) Gallo J. M. and Almirall J. R., Elemental analysis of white cotton fiber evidence using solution ICP-MS and laser ablation ICP-MS (LA-ICP-MS). *Forensic Sci. Int.*, **190**, 52–57, 2009.
- 15) Hsieh H. F., Chang W. S., Hsieh Y. K. and Wang C. F., Lead determination in whole blood by laser ablation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, **79**, 183–188, 2009.
- 16) Hsieh H. F., Chang W. S., Hsieh Y. K. and Wang C. F., Using dried-droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to quantify multiple elements in whole blood. *Anal. Chim. Acta*, **699**, 6–10, 2011.
- 17) Aramendia M., Rello L., Berail S., Donnard A., Pecheyran C. and Resano M., Direct analysis of dried blood spots by femtosecond-laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Feasibility of split-flow laser ablation for simultaneous trace element and isotopic analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, **30**, 296–309, 2015.
- 18) Miliszkiewicz N., Walas S. and Tobiasz A., Current approaches to calibration of LA-ICP-MS analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, **30**, 327–338, 2015.
- 19) Austin C., Hare D., Rawling T., McDonagh A. M. and Doble P., Quantification method for elemental bio-imaging by LA-ICP-MS using metal spiked PMMA films. *J. Anal. At. Spectrom.*, **25**, 722–725, 2010.
- 20) Pugh J. A. T., Cox A. G., McLeod C. W., Bunch J., Whitby B., Gordon B., Kalber T. and White E., A novel calibration strategy for analysis and imaging of biological thin sections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **26**, 1667–1673, 2011.
- 21) O'Reilly J., Douglas D., Braybrook J., So P. W., Vergucht E., Garrevoet J., Vekemans B., Vincze L. and Goenaga-Infante H., A novel calibration strategy for the quantitative imaging of iron in biological tissues by LA-ICP-MS using matrix-matched standards and internal standardisation. *J. Anal. At. Spectrom.*, **29**, 1378–1384, 2014.
- 22) Hoesl S., Neumann B., Techritz S., Linscheid M., Theuring F., Scheler C., Jakubowski N. and Mueller L., Development of a calibration and standardization procedure for LA-ICP-MS using a conventional ink-jet printer for quantification of proteins in electro- and Western-blot assays. *J. Anal. At. Spectrom.*, **29**, 1282–1291, 2014.