

研究紹介

生体試料中の金属元素濃度簡易定量法の開発

窪田 薫¹・白井厚太郎²・眞塩麻彩実^{3,4}・栗田 豊⁵

Development of an Easier Method to Quantify Minor and Trace Metal Composition of Biological Soft Tissue

Kaoru Kubota, Kotaro Shirai, Asami S. Mashio and Yutaka Kurita

(2016年4月22日受付, 2016年9月2日受理)

¹名古屋大学 宇宙地球環境研究所²東京大学 大気海洋研究所³静岡県立大学 食品栄養科学部環境生命科学科⁴現所属: 金沢大学理工学研究域物質化学系⁵水産研究・教育機構 東北水産研究所

連絡先: 窪田 薫, 神戸大学大学院 人間発達環境学研究所 人間環境学専攻

〒657-8501 神戸市灘区鶴甲3丁目11

E-mail: kubota@aquamarine.kobe-u.ac.jp

要旨

生体中の元素濃度の分析を通じて、生物地球化学・生態学研究が広く行われている。生体試料中の元素濃度を定量するためには試料を分解する過程が必要であるが、例えばマイクロ波を用いた従来法は大掛かりな実験機器類を必要とし高価であるという問題がある。そこで本研究では市販の遠沈管とヒーターを用いた、より簡便かつ安価な生体試料の酸分解法の確立を行った。イガいのフリーズドライ試料およびヒラメ筋肉試料を酸分解し、誘導結合プラズマ質量分析法を用いて微量金属元素濃度を定量するまでの一連の手順について紹介する。

Abstract

Analyses of elemental composition of biological samples have contributed to a broad area of geochemical and ecological studies. A quantification of elemental concentration in the biological samples requires decomposition process, but conventional methods such as using microwaves are expensive because of usage of sophisticated experimental apparatus. The present study established an easier and cheaper method to decompose biological samples in acid using commercially available centrifuge tube and heat controller. This study introduces a simple new method to decompose freeze-dried mussel tissues and wet muscle of sole fish in acid, and to quantify minor and trace metal composition using inductively coupled plasma mass spectrometry.

1. 緒言

生体中の元素濃度の時空間変動を把握することは、物質循環・食物連鎖・有害物質の生物濃集過程を理解する上で重要である。生体試料中の元素濃度を定量するためには、まずタンパク質・脂質といった有機物を分解する過程を経る必要がある。これまで、開放系・閉鎖系にわたって様々な手法が生体試料の分解のために開発されてきたが、中でもマイクロ波を用いた手法が迅速かつ高い反応性のため広く利用されている(中村 2003, 磯山ら 2008, 油谷 2016)。同手法では、生体試料と強酸をテフロン製容器に密封し、マイクロ波を照射することで高温・高圧状態を実現し、試料を分解する。同手法は迅速である一方で、使用する容器・機器共に比較的高価であるという問題がある。そこで本研究では市販の遠沈管と

ヒーターを用いた、より安価かつ簡便な生体試料の酸分解法の確立を行った。手法の妥当性を検証するために、生体試料の代表として、アメリカ標準技術局の提供する生体標準物質(NIST SRM2976: Mussel Tissue)であるムール貝のフリーズドライ試料を分析し、回収率・繰り返し再現性・検出限界などを評価した。さらに、ヒラメ(カレイ目ヒラメ科)の筋肉中のカリウム(K)およびセシウム(Cs)濃度を分析例として、同試料を酸分解し、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用いて元素濃度を定量するまでの一連の手順について紹介する。

2. 実験手順

2.1 使用する器具・試薬類

試料の酸分解には高純度の濃硝酸(68%) (多摩化学

Table 1. Concentration of standard solution used in the experiment.

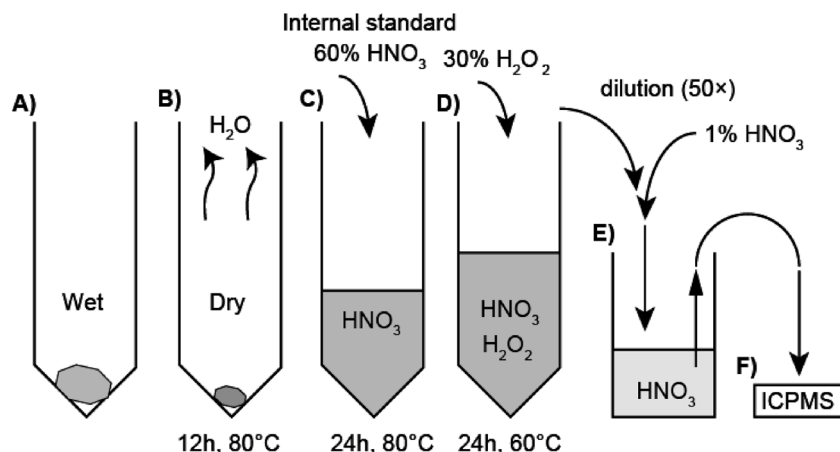
Element	Mother solution	1st dilution	2nd dilution
<i>Single element</i>			
K	1001.5 (ppm)	101.5 (ppm)	10.0 (ppm)
Ca	101.4 (ppm)	10.28 (ppm)	1.02 (ppm)
Sr	1.013 (ppm)	102.7 (ppb)	10.2 (ppb)
Cs	1.013 (ppb)	102.7 (ppt)	10.1 (ppt)
<i>ICP Multi Element Standard Sol. VI</i>			
	(ppm)	(ppb)	(ppb)
Ag	10.2	10.2	0.102
Al	10.0	10.0	0.100
As	99.0	99.0	0.990
B	99.0	99.0	0.990
Ba	10.1	10.1	0.101
Be	101.0	101	1.010
Bi	10.1	10.1	0.101
Ca	1012.0	1012	10.12
Cd	10.0	10.0	0.100
Co	10.0	10.0	0.100
Cr	10.1	10.1	0.101
Cu	10.0	10.0	0.100
Fe	99.0	99.0	0.990
Ga	9.9	9.90	0.099
K	10.0	10.0	0.100
Li	10.0	10.0	0.100
Mg	9.9	9.90	0.099
Mn	10.0	10.0	0.100
Mo	10.1	10.1	0.101
Na	9.9	9.90	0.099
Ni	10.0	10.0	0.100
Pb	10.0	10.0	0.100
Rb	10.0	10.0	0.100
Se	102.0	102	1.020
Sr	10.0	10.0	0.100
Te	10.1	10.1	0.101
Tl	10.1	10.1	0.101
U	10.1	10.1	0.101
V	10.1	10.1	0.101
Zn	100.0	100	1.000
<i>CLISS-1 Multi Element Internal Standard 1</i>			
	(ppm)	(ppm)	
Bi	9.92	1.24	
Ho	10.1	1.27	
In	9.99	1.25	
Li	9.93	1.25	
Sc	10.1	1.27	
Tb	10.1	1.27	
Y	9.97	1.25	

工業, Tamapure AA-100) および過酸化水素水 (30%) (和光, 精密分析用) を用いる. 酸分解にはガンマ線を用いて滅菌されたアズワン社の遠沈管 (15 mL, ポリプロピレン) を使い, その後の ICP-MS 分析の希釈溶液の調整にはマルエム社の 17 mL 平底容器を用いた. 前者を用いた理由は, 予備実験を通じてブランクが低いことが明らかになったためである. 後者を用いる理由は, 本測定で使用した東京大学大気海洋研究所に設置された ICP-MS (Agilent 7700) のオートサンプラーの規格に対応しているためである. これらの容器は内部が汚染されている可能性があるため, 予め希塩酸・希硝酸などの弱酸に一晩漬け置くなど, 洗浄しておくことが望ましい. 秤量はすべて相対秤量法で行い, 10 μ g の桁まで計測した (秤量台のゼロ点リセットを行わず, 重量の増加分を秤量に用いる).

ICP-MS 測定における検量線作成の手順は以下の通りである. 主要元素については Single element 標準溶液 (Merck Millipore 社) を Table 1 の濃度になるように希釈した. Merck VI (Merck Millipore 社) は Ca が 1000 mg/L, As · B · Be · Fe · Se · Zn が 100 mg/L, Ag · Al · Ba · Bi · Cd · Co · Cr · Cu · Ga · K · Li · Mg · Mn · Mo · Na · Ni · Pb · Rb · Sr · Te · Tl · U · V が 10 mg/L の濃度で含まれており, これを 10^3 倍, および 10^6 倍に希釈して用いた (Table 1). 2段階の希釈標準溶液と希硝酸 (1%) (多摩化学工業, Tamapure AA-100) の3点で検量線を作成し, 相対感度係数を見積もった. なお, 主要元素と微量元素を同時に定量する際, 主要元素用の標準溶液の純度が十分でないと微量元素が干渉する事があるため, 目的元素によっては注意が必要である. そのような場合, 本研究のように主要元素・微量元素でそれぞれ相対感度係数を求める事が望ましい. 実験ブランクは試料に使用するものと同じ容器に同じ量の試薬類を入れ, 同一の手順で実験を行うことで評価した. また, 予期せぬ回収率の低下や装置の感度変化の影響があった場合に後から補正できるよう, 試料に内標準を添加しておくことが望ましい. 本研究では, CLISS-1 (SPEX CertiPrep 社) の原液を 10 倍に希釈した溶液をそれぞれ 50 μ L ずつ各試料に添加した. CLISS-1 の原液には Bi · Ho · In · Li · Sc · Tb · Y が 10 μ g/mL で含まれている (Table 1).

2.2 秤量

約 100 mg になるよう NIST SRM2976 を遠沈管に秤量した. 100 mg という量は, 使用する容器のサイズ, 作

**Fig. 1.** Schematics of the experimental procedures.

業効率、目的元素の定量に必要な濃度（後述）から決定した。NIST SRM2976はフリーズドライ試料だが、実際の生体試料の場合では目的に応じて規格化する重量を乾燥重量と湿重量とで使い分ける必要がある。乾重量を求める際には乾燥の手順が別途必要となる。そこで実試料であるヒラメ筋肉試料に対する乾燥の手順について紹介する。まず切除したヒラメの筋肉を比抵抗値が18.2 M Ω 以上の超純水で濯ぎ、遠沈管に入れ湿重量を測定する（Fig. 1）。この際、キムワイプなどで試料を拭くと試料表面が汚染される可能性があることに留意する。湿重量は450~550 mgの範囲に収まるよう秤量する（504 \pm 41 mg, 1 σ , N=305）。その後、80度に設定した対流式オープン内で12時間以上放置し、乾燥後すみやかに乾重量を測定する。試料重量はこれにより約80%減少する（93 \pm 41 mg, 1 σ , N=305）。ここで、450~550 mgという湿重量を選択した理由は、NIST SRM2976と同程度の乾燥重量にするためである。予備実験で500 mgの湿重量をもつヒラメ筋肉試料を乾燥した際の重量変化を24時間にわたり追跡したところ、12時間以上経過すればその後の質量変化が見られなくなることが分かったため、すべての試料に対して乾燥時間は12時間以上に設定した。乾燥の際、酸分解までに試料を長期間放置すると、遠沈管の蓋をした状態でも空気中の水分を吸って乾重量が次第に変化するため注意が必要である。実際、本研究の実験条件では1日あたり約0.2 mg/日の割合で増加していった。この重量変化はその後の実験過程で数10 μ g レベルの秤量が必要になることを考慮すると決して無視できない。また試料によってその増加の程度は異なるため、放置期間から逆算して補正を行うことも難しい。重量変化を防ぐ対策として、試料を真空乾燥状態に保つ、酸分解直前に試料乾燥が終了するよう実験計画を調整する、などが必要である。秤量により生じる誤差が分析精度と比較して十分に小さくなるよう（例えば分析精度が数%の場合、0.1%以下が望ましい）、適切な天秤と秤量桁数を適切に選択する必要がある。

2.3 酸分解

NIST SRM2976の入ったそれぞれの遠沈管に対し、ピペットを用いて超純水で1 ppmになるよう希釈した内標準溶液を20 μ Lずつ、さらに濃硝酸（60%原液）を1 mLずつ加える（Fig. 1）。その後ヒーターを用いて温度を80度に維持し、24時間放置する。酸分解の過程でガスが発生し遠沈管の内圧が高まるため、蓋は緩めておきおおくのがよい。硝酸添加後、溶液中の固形物質は12時間経過後には確認できなくなったため、酸分解の時間は24時間に設定した。24時間放置後、遠沈管のヘッドスペースは褐色の二酸化窒素が充満していた。二酸化窒素は有毒であるためドラフト内で作業を行うなど、吸い込まないように注意する必要がある。また、乾重量で500 mgを上回る試料については、上述の15 mL容器に1 mLの濃硝酸を入れた条件下では、反応が激しく試料が蓋から試料が流出してしまった。試料の乾重量が250 mg以下のものについては安全に酸分解を行うことができた。従って、本研究で用いる酸分解の手法を行う際には、試料の乾重量を250 mg以下に抑える必要がある。

24時間放置後、しばらく放冷し、過酸化水素水（30%原液）を500 μ Lずつ添加し、さらにヒーターの温度を

60度に維持し、24時間放置する。ここで反応速度を中程度にするために、過酸化水素水による酸分解は60度とやや低めに設定した。過酸化水素水は反応の際、大量の酸素を放出するため、蓋は緩めておき過剰のガスを逃す必要がある。24時間温浴後、放冷し、溶液の総重量を秤量する。開放系での酸分解の場合、一部の揮発性物質が失われるため、分解後の溶液の総重量の秤量が必須である。

溶解液の保管の際には揮発性成分の蒸発に伴う濃度変化が生じないように、パラフィルムを巻いて蓋の密封度を強化する、さらなる密封容器に入れる、冷暗所に保管する、といった注意が必要である。

2.4 ICP-MS測定

ICP-MSで測定するのに適した濃度に調整するため、試料およびNIST SRM2976の溶解液は1%硝酸を用いて希釈する（Fig. 1）。平底容器に溶解液を20 μ L分取し、1%硝酸を10 mL加えることで約500倍に希釈する。溶液中の主成分濃度が高すぎる場合、マトリックス効果やICP-MSのネプライザーやコーンの目詰まりの影響で正しく分析できない可能性がある。一方、溶液中の主成分濃度が低すぎる場合、十分な感度が得られない場合がある。希釈率は目的とする元素の濃度に応じて決定する必要がある。標準試薬の濃度は測定試料の各元素の含有量のおよそ10倍になるよう調整する。

ICP-MSの溶液導入系（ペリポンプ・トーチなど）の洗浄には超純水と1%硝酸を用いる。超純水で0.5 mL/minの流速で30秒間の洗浄ののち、40秒間1%硝酸で洗浄する。サンプルは0.1 mL/minの流速で測定した。約20回のサンプルの測定のたびに標準試料を測定する事で分析精度を監視し、測定中に感度変化（ドリフト）が起きた場合、のちに補正できるよう計らう。ICP-MSの測定条件はTable 2の通りである。

まずブランクに対する各元素のカウントをそれぞれの試料の測定値から差し引く、その後、標準試料に対する相対感度を計算し、試料の各元素濃度を定量する。この際、標準試料の相対感度に有意な増減があるかどうかを確認し、ある場合はドリフト補正を行う。また、本研究で使用したAgilent7700では2つの検出器モード（アナログ/パルス）で各元素がカウントされるが、異なるモードでは感度が変化する可能性があるため、すべて同一のモードで検出されたデータを用いるのが良い（例えば、Kはパルスモード、Csはアナログモード）。さらに、試料濃度を含む範囲で相対感度係数が変化しない事を、試料より高濃度および低濃度の標準溶液の分析から確認する必要がある。

各元素の測定下限および定量下限はブランク濃度のそれぞれ3倍、10倍を採用した（Table 3）。

本研究の実験条件下で、NIST SRM2976の16回の繰り返し

Table 2. Operating parameters of ICP-MS used in this study.

Gas flow	
Coolant	0.38 L/min
Auxiliary	0.00 L/min
Sample	0.68 L/min
Detection modes	Analog/Pulse
Sample time	125 ms

Table 3. Results of major and trace element analyses of NIST2976 and its comparison to reference values or certified values.

Element	²³ Na*	²⁴ Mg	²⁵ Mg*	²⁶ Mg	²⁷ Al*	³⁹ K*	⁴³ Ca*	⁴⁴ Ca	⁴⁸ Ca	⁵¹ V*	⁵⁵ Mn*	⁵⁹ Co*	⁶⁴ Zn*
Detection limit (ppb)	3.1E+01	5.0E-01	5.3E-01	4.8E-01	5.1E-01	1.1E+02	3.4E+00	2.0E+01	2.5E+01	6.1E-03	6.1E-02	2.3E-03	2.0E-01
Quantification limit (ppb)	1.0E+02	1.7E+00	1.8E+00	1.6E+00	1.7E+00	3.6E+02	1.1E+01	6.8E+01	8.4E+01	2.0E-02	2.0E-01	7.6E-03	6.7E-01
Average (A: mg/g)	2.5E+01	5.0E+00	5.2E+00	5.1E+00	1.2E-01	1.1E+01	7.6E+00	7.9E+00	1.0E+01	8.7E-04	4.2E-02	7.0E-04	1.8E-01
Standard deviation (1σ)	3.2E+00	1.8E-01	1.8E-01	1.9E-01	7.8E-03	3.2E-01	6.2E-01	6.7E-01	8.6E-01	4.4E-05	1.4E-03	2.7E-05	1.1E-02
RSD (%)	13.0	3.6	3.5	3.6	6.4	3.0	8.2	8.4	8.6	5.1	3.3	3.8	5.8
Reported value (B: mg/g)	3.5E+01	5.3E+00	5.3E+00	5.3E+00	1.3E-01	9.7E+00	7.6E+00	7.6E+00	7.6E+00	—	3.3E-02	6.1E-04	1.4E-01
Standard error (1σ)	1.0E+00	5.0E-01	5.0E-01	5.0E-01	3.4E-02	5.0E-01	3.0E-01	3.0E-01	3.0E-01	—	2.0E-03	2.0E-05	1.3E-02
Certified/Reference	R	R	R	R	R	R	R	R	R	—	R	R	C
±Difference ((A-B)/B: %)	-29	-5	-2	-4	-9	+10	0	+4	+31	—	+29	+16	+34
Element	⁶⁶ Zn	⁷⁵ As*	⁸⁴ Sr	⁸⁵ Rb*	⁸⁸ Sr*	¹¹² Cd*	¹¹⁴ Cd	¹³³ Cs*	²⁰⁴ Pb	²⁰⁶ Pb	²⁰⁷ Pb	²⁰⁸ Pb*	²³⁸ U*
Detection limit (ppb)	1.9E-01	7.2E-03	1.7E+00	1.2E-03	1.4E-02	3.0E-03	2.8E-03	8.6E-05	3.2E-02	4.5E-02	3.9E-02	3.7E-02	2.5E-04
Quantification limit (ppb)	6.4E-01	2.4E-02	5.5E+00	3.9E-03	4.8E-02	9.9E-03	9.4E-03	2.9E-04	1.1E-01	1.5E-01	1.3E-01	1.2E-01	8.4E-04
Average (A: mg/g)	1.8E-01	1.6E-02	7.9E-02	4.6E-03	8.1E-02	1.0E-03	9.9E-04	2.2E-05	1.1E-03	1.4E-03	1.2E-03	1.2E-03	2.0E-04
Standard deviation (1σ)	1.5E-02	7.0E-04	7.0E-03	1.5E-04	6.9E-03	4.2E-05	4.7E-05	1.3E-06	8.6E-05	6.8E-05	5.5E-05	6.3E-05	1.1E-05
RSD (%)	8.2	4.5	8.9	3.4	8.5	4.2	4.7	5.7	7.9	4.9	4.4	5.2	5.8
Reported value (B: mg/g)	1.4E-01	1.3E-02	9.3E-02	4.1E-03	9.3E-02	8.2E-04	8.2E-04	2.7E-05	1.2E-03	1.2E-03	1.2E-03	1.2E-03	—
Standard error (1σ)	1.3E-02	1.8E-03	2.0E-03	9.0E-05	2.0E-03	1.6E-04	1.6E-04	1.0E-06	1.8E-04	1.8E-04	1.8E-04	1.8E-04	—
Certified/Reference	C	C	R	R	R	C	C	R	C	C	C	C	—
±Difference ((A-B)/B: %)	+32	+18	-15	+10	-13	+22	+21	-18	-7	+17	+5	+3	—

*Isotopes that seem to be the most suitable for determining concentrations of each element.

返し測定によって得られた各元素の濃度の平均値・標準偏差・再現性はTable 3の通りである。NIST SRM2976の各元素の繰り返し測定の再現性は、実試料を測定する際の誤差と見なして差し支えない。本研究の実験条件においては、NIST SRM2976の各元素の測定結果は標準試料作成機関による保証値もしくは参考値と約30%の範囲で一致し、概ね正確な濃度となった (NIST 2008)。また、繰り返し再現性は3–13%以内であり、試料を定量的に測定できていると言って良い。今回、NISTによる報告のなかったバナジウム (V) とウラン (U) について、それぞれ 0.00084 ± 0.00004 mg/kg, 0.00020 ± 0.00001 mg/kg という結果が得られた。繰り返し測定の再現性・保証値/参考値からの差などをもとに、元素濃度定量にもっとも適した同位体を選出した (Table 3)。本研究では高い回収率と高い精度のICP-MS分析を実現できたため、内標準溶液に含まれる元素は安定した信号強度を示し、内標準と試料の信号強度との間に明瞭な関係性は見られなかった。回収率が低かったり、測定中のICP-MSの感度変化が起きたりした場合には、内標準として添加した元素を補正に用いる。

謝辞

小論を査読頂いた2名の匿名の査読者からは、本原稿改善のための貴重なご助言を頂いた。記して謝意を表します。

引用文献

- 油谷藍子・岸 映里・尾崎麻子・新矢将尚・大島智子・山野哲夫 (2016). ICP-MSによる食品中のミネラルおよび有害元素の一斉分析法の検討および妥当性評価. 食衛誌, 57: 57–65.
- 磯山直彦・及川真司・御園生淳・中原元和・中村良一・鈴木奈緒子・吉野美紀・鈴木千吉・佐藤 肇・原 猛也 (2008). 誘導結合プラズマ質量分析法により定量したマコガレイ筋肉中のセシウム濃度と成長の関連性. 分析化学, 57: 763–769.
- 中村 洋編 (2003). 分析試料前処理ハンドブック, 丸善.
- National Institute of Standards and Technology Standard Reference Database Number 2976. (2008). Mussel Tissue (Trace Elements and Methylmercury). NIST Chemistry WebBook.