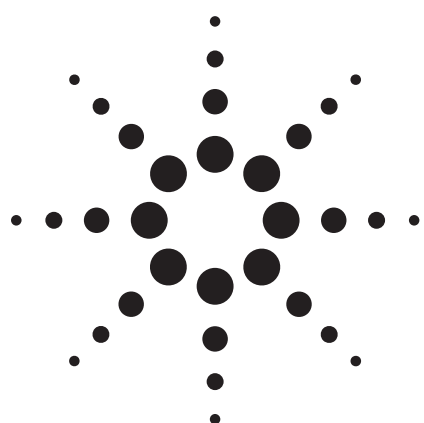




# コリジョン/リアクションセル ICP-MS による 同位体希釈法を用いた血清サンプル中の Zn、Cu、Se の分析

## アプリケーション

臨床

### 著者

Justine Turner, Linda Evans, and Ruth Hearn  
LGC, Queens Road  
Teddington, Middlesex, TW11 0LY  
UK

Andrew Taylor  
Royal Surrey County Hospital  
Guildford, Surrey, GU2 7XX  
UK

### 要旨

本報では、ヘリウムと水素の両モードで Agilent 7500ce コリジョン/リアクションセル (CRC) ICP-MS を用いた血清中の銅、セレン、亜鉛の測定について説明します。この手法は同位体希釈法を用いており、高い測定精度が得られます。サンプルにある特定の同位体を濃縮した溶液をスパイクし、スパイクした標準液とともに測定します。サンプル前処理には分解操作が必要ないため、最低限の処理で済みます。ISO および Eurachem ガイドラインに従って計算した不確かさの結果を示します。

### 緒言

イギリスでは、ラボで得られた結果の精度と確度をモニタリングする仕組みとして、外部品質評価システム (EQAS、技能試験スキームとしても知られる) が多くの分析分野で確立されています。このシステムでは、測定に参加するラボに検体が配られ、各ラボでは目標濃度と比較しながら分析結果を評価します。このシステムは、非営利団体、営利団体、研究機関などで組織されており、参加機関の教育や、分析を請け負うラボを認可する当局のためのツールとしての役割を担っています。EQAS へ参加するためには、多くの分野でラボとして認可されていなければなりません。

EQAS の導入以来、事務局は標準物質の濃度を設定するための多くの手法を開発してきました。ISO/IEC ガイド 43 [1] では、これらの値を設定するための方法が説明されています。例えば、値を認証する、認証標準物質 (CRM) とともに分析する、熟練したラボから結果の同意を得る、すべての参加団体から結果の同意を得ることなどです。これらの手順に従って値を測定する統計メソッドは、その標準不確かさとともに、ISO/DIS 13528:2005 [2] で詳しく述べられています。この文書では、同意により得られた値は信頼性が低いと示唆しています。しかし、実際にはこれらの手法は広く使用されており、認証標準物質のない多くの測定対象物質の値付けについては、実践的な代替方法はありません。合意により得られた値を使用する場合の欠点は、トレーサビリティがなく、測定値の正確性を評価できないことです。



Agilent Technologies

合意値に基づいて血液中の鉛について考察した研究が報告されていますが [3]、値を設定し、標準不確かさを計算するすべてのメソッドの体系的な比較についての報告はありません。EQAS 事務局である Occupational and Environmental Laboratory Medicine は、モデル血清中の銅、セレン、亜鉛の測定値を用いて、値を設定する手順について研究を行いました。この調査の一環として、LGC 社では高精度な同位体希釈法を用い、3 点の EQAS 血清サンプル中の銅、セレン、亜鉛に対する認証値を提供しました。

## 実験

採用した同位体希釈法は、Henrion [5] により提案され、Catterick ら [6] により改良された技術で、マスバイアス、検出器の直線性、不感時間（デッドタイム）、スペクトル干渉など、同位体比測定時の多くの問題に対応可能な、シンプルで実用的なメソッドです。サンプルに同位体濃縮溶液をスパイクし、またサンプル中の同位体の比率と一致するようにスパイクされた標準試料を調製し、両者を測定します。

### サンプル前処理

スパイク溶液は以下の同位体濃縮純金属から調整しました： $^{67}\text{Zn}$  を 93.11% に濃縮 (Oak Ridge National Laboratory、米国)、 $^{65}\text{Cu}$  を 91.20% に濃縮 (AEA Technology、英国)、 $^{77}\text{Se}$  を 68.69% に濃縮 (AEA Technology、英国)。各スパイク溶液は 1% w/w  $\text{HNO}_3$  (超高純度酸、ROMIL、英国) で重量法で希釈し、超純水 (18 M $\Omega$ 、Elga-Maxima、英国) で前処理し、それぞれ Zn 456 ng/g、Cu 999 ng/g、Se 58 ng/g を含むスパイク溶液を作成し、血清サンプルに添加しました。

その際、血清サンプル (0.5 g) に添加し、 $^{66}\text{Zn}$ :  $^{67}\text{Zn}$ 、 $^{63}\text{Cu}$ :  $^{65}\text{Cu}$ 、 $^{77}\text{Se}$ :  $^{78}\text{Se}$  の同位体の比率が約 1 になるようにスパイクしました。スパイク溶液の量は、サンプル中の測定対象化合物の濃度に応じて異なり、0.2 ~ 0.7 g の範囲でした。次に、スパイクしたサンプルを超純水を

用いて調製した 1% w/w  $\text{HNO}_3$  で希釈し、Zn、Cu 濃度が約 25 ng/g、の Se 濃度が約 2.5 ng/g になるように調製しました。

### 一次標準試料

キャリブレーションには、1% w/w  $\text{HNO}_3$  で 1992 ng/g に希釈（重量法）した Zn の認証溶液 (NIST SRM3168a)、1894 ng/g に希釈した Cu (NIST SRM3115)、199 ng/g に希釈した Se (NIST SRM3149) を使用しました。これらには、サンプルに用いたものと同じスパイク溶液  $^{67}\text{Zn}$ 、 $^{65}\text{Cu}$ 、 $^{77}\text{Se}$  を添加し、サンプル液の同位体比率に一致させました。

### QC (精度管理) 試料

サンプルの結果を検証するために、3 種類の QC 混合液を調製しました。これらは、 $920 \pm 70$  ng/g Zn、 $2,600 \pm 200$  ng/g Cu、 $136 \pm 9$  ng/g Se を含む血清 Seronorm (SERO AS、ノルウェー) (微量元素入り血清、レベル 2)、 $1,043 \pm 22$  ng/g Zn、 $1,092 \pm 6.4$  ng/g Cu、 $79 \pm 2.7$  ng/g Se を含むヒト血清 (International Measurement Evaluation Programme - IMEP17 material 1)、1,993 ng/g Zn、1,990 ng/g Cu、200 ng/g Se を含む QC 標準液 (高純度金属または塩から調製したものです)。

### 分析機器

測定は、コリジョン/リアクションセルを搭載した Agilent 7500ce (CRC-ICP-MS) を用いて行い、Cu と Zn の測定にヘリウムモード、Se の測定に水素モードを使用しました。標準的な操作条件を表 1 に示します。また、マトリクスによるプラズマへの影響を最小限に抑えるために、インテグレート試料導入システム (ISIS) を使用し、分析中と洗浄中のポンプスピードを 0.1 rps に設定しました。トーチには内径 2.5 mm のインジェクタを装備し、シールドトーチシステムを使用しました。各セルガスモード間の安定待ち時間は 30 秒としました。

表 1. Zn、Cu、Se 測定装置条件

|                  | Zn および Cu        |  | Se             |
|------------------|------------------|--|----------------|
| RF 出力 (W)        | 1500             |  |                |
| キャリアガス (L/min)   | 0.91             |  |                |
| メイクアップガス (L/min) | 0.25             |  |                |
| ネブライザ            | ガラス製同軸、MicroMist |  |                |
| スプレーチャンバー        | 石英製、2 °C に冷却     |  |                |
| コーン              | Ni               |  |                |
| セルガス             | He               |  | H <sub>2</sub> |
| セルガス流量 (mL/min)  | 3.1              |  | 3.6            |
| 引出電極 1 (V)       | 2.3              |  |                |
| KED              | 2V               |  |                |
| ポイント/ピーク         | 3                |  |                |
| 繰り返し回数           | 10               |  |                |
| 積分時間/質量 (秒)      | 0.3              |  | 1.5            |

各血清サンプルは n=3 で調製し、各 QC 物質は n=1 で調製しました。Catterick による「挟み込み測定法」[6]に従い、サンプル混合液の前後でキャリブレーション混合液を測定しました。

同位体希釈方程式

本研究で使用した二重一致同位体希釈質量分析法 (IDMS)の式は次のように表わされます。

$$C'_X = C_Z \cdot \frac{m_Y}{m_X} \cdot \frac{m_{Zc}}{m_{Yc}} \cdot \frac{R_Y - R'_B \cdot \frac{R_{Bc}}{R'_{Bc}}}{R'_B \cdot \frac{R_{Bc}}{R'_{Bc}} - R_z} \cdot \frac{R_{Bc} - R_z}{R_Y - R_{Bc}}$$

方程式 1

ここで、

$C'_x$       サンプル X 中の測定元素の質量分率

$C_Z$       一次標準試料 Z 中の測定元素の質量分率

$m_Y$       サンプル混合物 B (= X + Y) を調製するために  
サンプル X に添加したスパイク Y の質量

$m_X$       サンプル混合物 B (= X + Y) を調製するために  
サンプル Y に添加したスパイク X の質量

$m_{zc}$       キャリブレーション混合物 Bc (Bc = Y + Z)を  
調製するためにスパイク Y に添加した一次標準  
試料 Z の質量

$m_{Yc}$       キャリブレーション混合液 Bc を調製するため  
に一次標準溶液 Z に添加したスパイク Y の質量

$R'_B$       サンプル混合物 (X + Y) の測定同位体比

$R'_{Bc}$       キャリブレーション混合物 Bc の    測定同位体  
比

$R_{Bc}$       キャリブレーション混合物の同位体比の重量値

$R_z$       一次標準試料 Z の同位体比 (IUPAC 値)

$R_y$       スパイク物質の同位体比 (認証値)

各同位体のピーク強度 (カウント/秒) の生データを Excel にエクスポートし、必要に応じてブランク減算します。次に、カスタマイズされた IDMS スプレッドシートにこれをコピーして、ピーク強度から同位体比を計算し、その後、式 1 に組み込みます。

結果と考察

それぞれ n=3 で処理した 3 種類の血清サンプルの測定結果を示します。ここでは、包含係数を 2 としたときの拡張不確かさについても示しました。これにより、信頼の水準はおおよそ 95% となります。式 1 の要素をすべて考慮しつつ、ISO/IEC 17025 [8] と「測定の不確かさの表現の手引き」(GUM/Eurachem) [9] に従い、不確かさの評価を行いました。1 回の測定の不確かさに影響を及ぼす要因として、サンプルとキャリブレーション混合液

( $R'_B$  と  $R'_{Be}$ ) の測定同位体比の不確かさが挙げられます。これらの不確かさの寄与を計算するために、各溶液の測定同位体比の相対標準偏差を得る必要があります。以前の文献 [10] でも述べたように、ChemStation ソフトウェアのカスタムデータベースを利用してこれらの計算を行いました。この不確かさは、 $n=3$  で採取したサンプル混合液間の変動、すなわち標準偏差の評価も含んでいると考えられます。

表 2 では、3 種類のサンプルの濃度範囲における各測定元素の拡張不確かさを比較することができます。不確かさは Zn で 1.5 ~ 4.9%、Cu で 1.0 ~ 1.2%、Se で 3.4 ~ 3.6% となりました。この結果は、表 3 に示すとおり、参加団体の平均に基づく EQAS 事務局の提供値 (異常値を除外した後の値) にもよく一致します。

表 2. 3 種類の血清サンプル L、M、H の IDMS の同位体希釈法測定結果

| 亜鉛                    | サンプル L      | サンプル M      | サンプル H      |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| 結果 1 ng/g             | 636         | 1488        | 1996        |
| 結果 2 ng/g             | 677         | 1515        | 2127        |
| 結果 3 ng/g             | 627         | 1511        | 2058        |
| <b>濃度平均 ng/g</b>      | <b>647</b>  | <b>1505</b> | <b>2060</b> |
| 平均不確かさ ng/g           | 3.5         | 7.1         | 10.8        |
| 混合液間の変動               | 15.5        | 8.4         | 37.9        |
| 合成標準不確かさ ng/g         | 15.9        | 10.9        | 39.4        |
| 拡張不確かさ ng/g ( $K=2$ ) | 31.8        | 21.9        | 78.9        |
| <b>拡張不確かさ %</b>       | <b>4.9</b>  | <b>1.5</b>  | <b>3.8</b>  |
| 銅                     | サンプル L      | サンプル M      | サンプル H      |
| 結果 1 ng/g             | 862         | 1360        | 1855        |
| 結果 2 ng/g             | 867         | 1364        | 1863        |
| 結果 3 ng/g             | 875         | 1372        | 1876        |
| <b>濃度平均 ng/g</b>      | <b>868</b>  | <b>1365</b> | <b>1865</b> |
| 平均不確かさ ng/g           | 3.9         | 6.1         | 9.3         |
| 混合液間の変動               | 3.6         | 3.4         | 5.9         |
| 合成標準不確かさ ng/g         | 5.3         | 7.0         | 11.0        |
| 拡張不確かさ ng/g           | 10.5        | 13.9        | 22.0        |
| <b>拡張不確かさ %</b>       | <b>1.2</b>  | <b>1.0</b>  | <b>1.2</b>  |
| セレン                   | サンプル L      | サンプル M      | サンプル H      |
| 結果 1 ng/g             | 59.0        | 122         | 252         |
| 結果 2 ng/g             | 60.7        | 121         | 255         |
| 結果 3 ng/g             | 59.1        | 122         | 246         |
| <b>濃度平均 ng/g</b>      | <b>59.6</b> | <b>122</b>  | <b>251</b>  |
| 平均不確かさ ng/g           | 0.9         | 2.0         | 3.5         |
| 混合液間の変動               | 0.5         | 0.5         | 2.9         |
| 合成標準不確かさ ng/g         | 1.1         | 2.1         | 4.5         |
| 拡張不確かさ ng/g           | 2.1         | 4.2         | 9.0         |
| <b>拡張不確かさ %</b>       | <b>3.5</b>  | <b>3.4</b>  | <b>3.6</b>  |

表 3. EQAS 同意値によるデータの比較

| 亜鉛       | サンプル L | サンプル M | サンプル H |
|----------|--------|--------|--------|
| 測定値 ng/g | 647    | 1505   | 2060   |
| 予想値 ng/g | 650    | 1511   | 2032   |
| 回収率 (%)  | 100%   | 100%   | 101%   |
| 銅        |        |        |        |
| 測定値 ng/g | 868    | 1365   | 1865   |
| 予想値 ng/g | 881    | 1361   | 1861   |
| 回収率 (%)  | 99%    | 100%   | 100%   |
| セレン      |        |        |        |
| 測定値 ng/g | 59.6   | 122    | 251    |
| 予想値 ng/g | 58.4   | 121    | 246    |
| 回収率 (%)  | 102%   | 101%   | 102%   |

各 QC 物質の添加回収率の結果は非常に良好で、ほとんどの結果は認証/予測値の  $100 \pm 5\%$  以内でした。しかし、QC 混合液中の Zn と Seronorm 中の Se については、回収率は 111% で、また Seronorm 中の Zn では 134% の高い回収率を示しました。Seronorm CRM 中の Zn に対して回収率が高くなった理由としては、ブランク中の Zn の信号の再現性が良くなかったことが考えられます。回収率のグラフを図 1 に示します。

## 結論

このアプリケーションノートでは、血清中の Zn、Cu、Se を測定する高精度なメソッドについて紹介しました。He ガスと H<sub>2</sub> ガスの両モードを使用することで、サンプル中の 3 種類すべての測定対象元素を測定できました。3 種類の血清サンプルは、EQAS 事務局が将来的に使用する可能性があり、その場合は事務局が新しい検査物質を調製または購入する際の標準物質として補助的に使われることになります。これは、参加団体が分析した検体間のトレーサビリティの向上に役立ちます。LGC 社では、今後はこの手法を用いて、新しい血清 CRM を認証する予定です。

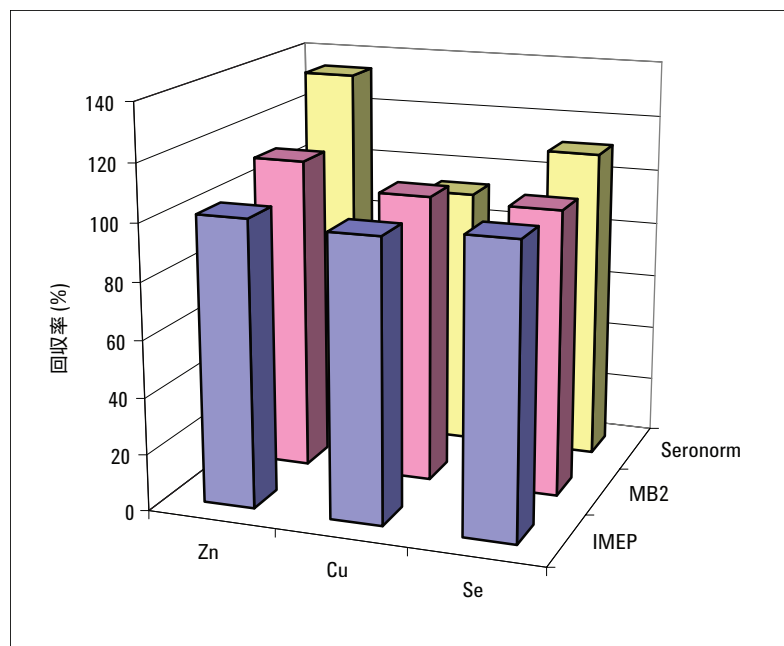


図 1. Seronorm、IMEP、QC 標準液における回収率

## 参考文献

1. ISO/IEC Guide 43-1:1997, Proficiency testing by interlaboratory comparisons, Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.
2. ISO/DIS 13528:2005, Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.
3. R. Braithwaite and A. Girling, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1988, 332, 704.
4. A. Taylor, J. Angerer, J. Arnaud, F. Claeys, R. L. Jones, O. Mazarrasa, E. Mairiaux, A. Menditto, P. J. Parsons, M. Patriarca, A. Pineau, S. Valkonen, J-P Weber, C. Weykamp, *Accred Qual Assur* 2006; 11: 435-439
5. A. Henrion. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, 350, 657.
6. T. Catterick, B. Fairman, C. J. Harrington. *J. Anal. At. Spectrom.* 1998, 13, 1109.
7. Institute for Reference Materials and Measurements 2003. International Measurement Evaluation Programme IMEP-17. Trace and minor constituents in human serum. EUR 20657. Reports Part 1, 2 and 3.
8. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
9. Eurachem, Quantifying uncertainty in analytical measurement. Laboratory of the Government Chemist. London 1995 (ISBN 0-948926-08).
10. J. Turner, *Agilent ICP-MS Journal*, 2007, **30**, 6. Publication number: 5989-6273EN

## 詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan  
July 11, 2008  
5989-7429.JAJP



**Agilent Technologies**