

報 文

誘導結合プラズマ質量分析法による生体試料中の
微量白金の定量北川晋士*, 田中秀治*, 岡本研作[®]**, 江藤 徹**, 松原道夫**Determination of trace levels of platinum in biological materials
by inductively coupled plasma mass spectrometry

Shinji KITAGAWA, Hideji TANAKA, Kensaku OKAMOTO*, Tohru ETOH and Michio MATSUBARA**

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima, 1-78, Shou-machi,
Tokushima-shi, Tokushima 770

** Seiko Instruments Inc., 1-8, Nakase, Mihama-ku, Chiba-shi, Chiba 261

(Received 12 January 1996, Accepted 8 February 1996)

A method for the determination of trace levels of Pt in biological materials by ICP-MS was studied. A matrix effect caused by high concentrations of NaCl markedly reduced the ion intensity of Pt. Using In as an internal standard compensated for the matrix effect in NaCl solution and bovine serum. For the bovine serum samples (10-, 100- fold dilution and acid-digestion followed by 10-fold dilution), the In internal standard method provided an accurate value of 1 ng ml^{-1} of Pt added to the serum. A polyatomic ion interference by HfO on the Pt determination was observed in the analysis of NIES Human Hair reference material, which contains a relatively high level of Hf. The proposed method was applied to the determination of Pt in liver, kidney and ascites fluid of a cis-platin administered rat. The analytical values were close to those obtained by ultrasonic nebulization-ICP emission spectrometry.

Keywords : ICP-MS; platinum determination; serum analysis; polyatomic ion interference; cis-platin.

1 緒 言

白金 (Pt) の地殻中の存在度は小さく約 0.001 ppm である。最近では、Pt は触媒として様々な化学工程や自動車排気ガスの分解などに用いられており、Pt の使用に伴う環境影響を評価する必要がある。医薬品の分野では、白金錯体 “シスプラチン (CDDP)”¹⁾ が制がん剤として使用されており、体内動態などの研究のために、Pt の正確かつ迅速な高感度分析法の開発が要求されて

いる。白金の分析対象となる試料は主として金属、地質試料などであり、現在では黒鉛炉原子吸光法が微量 Pt の定量法として広く使われているが²⁾、煩雑な試料前処理が必要であり、原子化条件の最適化が難しい。このほかに、誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES)³⁾、放射化分析法⁴⁾、蛍光 X 線分析法⁵⁾ などが Pt の定量に用いられているが、検出感度や便宜性などの点から問題点が多い。

高感度多元素同時分析法として近年著しい進歩を遂げている誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いた Pt の分析については、大気粉じん⁶⁾、自動車触媒⁷⁾、尿⁸⁾ について報告されている。ICP-MS は、検出限界が

* 徳島大学薬学部: 770 徳島県徳島市庄町 1-78

** セイコー電子工業(株): 261 千葉県千葉市美浜区中瀬 1-8

ppb ($\mu\text{g/l}$) から ppt (ng/l) と高感度であり, 多元素同時測定が可能のため, 生体試料中の超微量 Pt の定量に適していると考えられる. しかし, 本法は生体試料中の主成分によるマトリックス干渉を受けやすいため, 血清成分である塩化ナトリウムとグルコースが Pt のイオン強度に与える影響を調べ, マトリックス干渉を補正する方法としてインジウム (In) 内標準法を検討した. 次に実試料としてウシ胎児血清 (FBS) を用い, 血清の直接希釈液及び分解液に Pt を添加し, Pt の強度変化及び回収率を検討した. 更に, Pt の定量に対しては Hf の酸化物 (HfO) による分子イオン干渉が予想されるため, 標準溶液及び実試料を用いて分子イオンの生成を調べた.

白金錯体シスプラチンを腹くう (腔) 注射したラットの肝臓, じん臓, ひ臓, 腹水中の Pt を ICP-MS 及び ICP-AES を用いて定量したのでここに報告する.

2 実験

2.1 試薬及び標準試料

白金及びインジウム標準溶液: 関東化学製の原子吸光分析用標準原液 (1 mg/ml) をそれぞれ 0.1 M 硝酸で希釈して使用した.

ハフニウム標準溶液: Aldrich Chemical 製の原子吸光分析用標準原液 (1 mg/ml) を使用時に 0.1 M 硝酸で希釈して使用した.

シスプラチン: 日本化薬製のシスプラチン製剤であるランダ注を使用した.

硝酸: 多摩化学工業製の超高純度試薬 (Tamapure AA100) を使用した.

血清: ライフテックオリエンタル製の FBS を使用した.

水は, 日本ミリポア製 Milli-Q SP 型超純水製造装置で作製した超純水 (比抵抗 18 M Ω 以上) を, 非沸騰型石英蒸留装置 (藤原製作所) で更に精製して用いた.

生物標準試料: 国立環境研究所 (NIES) 製 Human Hair, Pepperbush, Chlorella, Tea Leaves, 米国標準技術研究所 (NIST) 製 Orchard Leaves, Pine Needles, Citrus Leaves, Oyster Tissue

2.2 装置と測定条件

本研究では, 四重極型誘導結合プラズマ質量分析計はセイコー電子工業製 SPQ-8000A 型 ICP-MS を使用した. Table 1 に白金の ICP-MS 定量における測定条件を示す. 装置の標準化は, Li, Co, Ba, Pb を各 1 ng/ml 含む標準溶液を用いて質量軸調整を行い, Pb の強度が

Table 1 ICP-MS operating conditions

Inductively coupled plasma		
Nebulizer	Meinhard C concentric glass	
Spray chamber		Scott-type
RF power		1.4 kW
Reflected power		<5 W
Plasma gas flow		14 l min ⁻¹
Auxiliary gas flow		1.0 l min ⁻¹
Nebulizer gas flow		1.0 l min ⁻¹
Sample delivery rate		1.2 ml min ⁻¹
ICP-MS interface		
Sampling cone	nickel, 1.1 mm orifice	
Skimmer cone	nickel, 0.35 mm orifice	
Cone-load coil distance		13 mm
Data acquisition parameters		
Mode	Jumping (In, Pt) Scanning (Hf, Pt)	
Mass range		110~200 a. m. u.
Number of channels		1024
Number of sweeps		30
Number of replicate		3
Dwell time (μs)		100

約 20000 カウントになるように調整した.

分析値の比較を行うために, ICP-AES による Pt の定量を行った. セイコー電子工業製 ICP 発光分析装置 SPS1700VR に, CETAC 製 U5000AT 超音波ネブライザーを装着して, 214.4 nm の発光線で Pt を測定した.

2.3 密封容器/マイクロ波加熱法による生体試料の分解

生体試料の分解には, 小型のテフロン容器の中に試料と硝酸を入れ, これをテフロン密閉容器の中に入れ電子レンジで加熱分解する二重テフロン密閉容器⁹⁾を用いた. テフロン PFA タフテナーバイアル (7 ml) 中に, サンプル約 300 mg をひょう量し, 硝酸 3 ml を加えて密栓する. このバイアルをテフロン PTFE 容器 (23 ml) に入れ, これを更にポリプロピレン製外筒に入れて密栓する. この分解容器 4 個と 50 ml の水を入れたピーカーを電子レンジ (コロナ DR-510) に入れ弱 (200 W) で 5 分間加熱する. ピーカーを取り出し更に 5 分間加熱する. 放冷後タフテナーバイアルを取り出し, ホットプレート上 (150°C) で蒸発乾固する. 硝酸 0.5 ml を加えて加熱して 0.2 ml 程度まで濃縮した後, 蒸留水少量を加えて固形物が完全に溶解したことを確認した後, ポリプロピレン容器中に移して 0.1 M 硝酸で適宜希釈する. 分解を行わない血清試料については, 0.1 M 硝酸を加えて直接希釈を行った. 本実験における希釈操作は, すべて化学はかりを用いて重量ベースで行った.

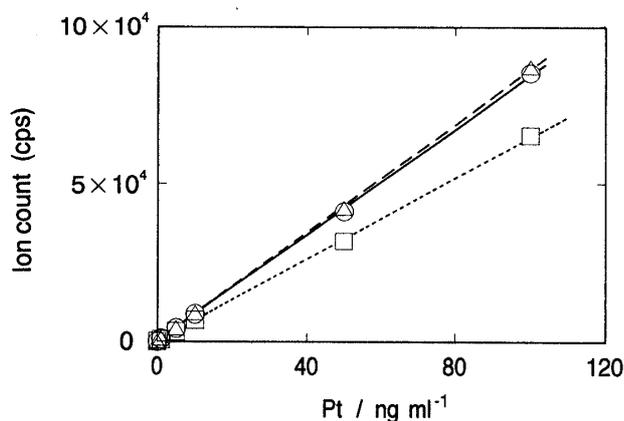


Fig. 1 Calibration curves of Pt
○: ^{194}Pt ; △: ^{195}Pt ; □: ^{196}Pt

3 結果及び考察

3.1 検量線と同位体組成

検量線用標準溶液 (0, 1, 5, 10, 50, 100 ng/ml Pt) は標準原液を 0.1 M 硝酸で希釈して作製した。Fig. 1 に Pt の検量線を主要な同位体 ^{194}Pt , ^{195}Pt , ^{196}Pt について示す。得られた検量線はいずれも相関係数 $r=0.999$ 以上の良好な直線性を示し、再現性も良好であった。検出限界を空試験シグナルの標準偏差の 3 倍に相当する濃度として表すと、検出限界はいずれの Pt 同位体についても約 14 ppt であった。

Table 2 に ICP-MS で測定した標準溶液中の Pt 同位体組成を示す。白金の同位体組成は、測定値と文献値¹⁰⁾でよく一致しており、Table 1 に示した実験条件で正確な同位体組成が求められることが標準溶液について示された。質量数 194 (32.9%), 195 (33.8%), 196 (25.3%) の同位体が全体の 92% を占めるので、本実験では ^{194}Pt , ^{195}Pt , ^{196}Pt を用いて定量を行った。

3.2 マトリックス干渉の検討

血液や体液などの生体試料中にはタンパク質、糖類、無機塩などが % レベルで含まれている。ICP-MS で生体試料中の微量元素を定量する場合、共存する主成分により目的元素のイオン強度が減少するマトリックス干渉が問題となる¹¹⁾。血清中には塩化ナトリウム 0.9%, グルコース 0.3~0.4% が含まれており、これらの成分が Pt の ICP-MS 測定に与える影響を調べた。血清の ICP-MS では通常 10 倍以上の希釈を行うため、塩化ナトリウム、グルコースはそれぞれ 0.001, 0.01, 0.1% となるように変化させた。これらの溶液中の Pt 濃度は 1

Table 2 Isotopic abundance of Pt measured by ICP-MS

Pt (m/z)	Isotopic abundance, %	
	Measured	Literature ¹⁰⁾
190	0.02	0.01
192	0.81	0.79
194	32.7	32.9
195	33.7	33.8
196	25.4	25.3
198	7.3	7.2

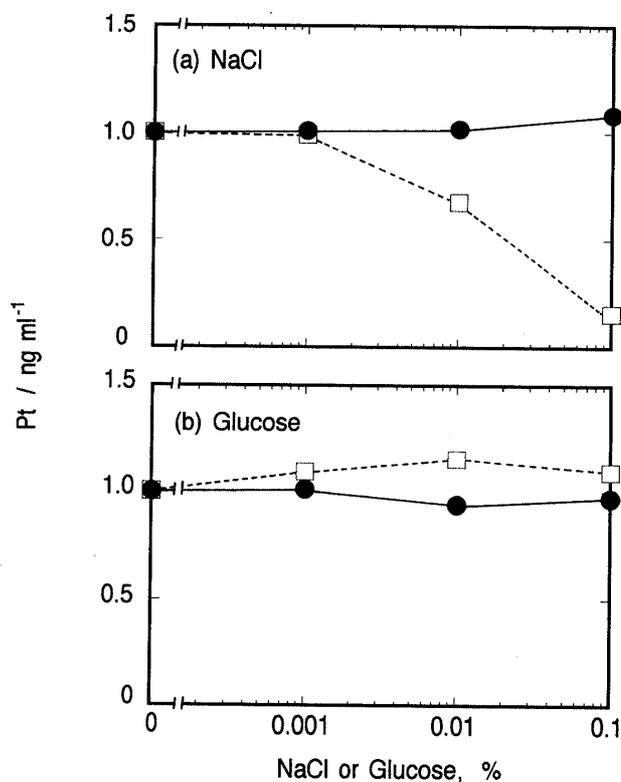


Fig. 2 Effect of NaCl(a) or glucose(b) on the intensity of 1 ng ml^{-1} Pt

□: calibration curve method; ●: internal standard (In) method

ng/ml となるように調製した。

Fig. 2 に Pt の ICP-MS 測定における塩化ナトリウムとグルコースの影響を示す。塩化ナトリウムの場合 (Fig. 2, a) は、高濃度になるにつれて Pt のイオン強度は直線的に減少した。イオン強度の減少は、高濃度 NaCl によるイオン化の減少、イオン透過率の減少、サンプリングコーンやスキマーコーンの目詰まりなどが考

えられる。一般に質量数の大きい元素ほど共存元素によるマトリックス干渉が大きいことが知られており、Ptの場合もこの傾向は顕著であった。一方、グルコースの場合 (Fig. 2, b) は、濃度変化にもかかわらず、Ptのイオン強度はほぼ一定であった。

Fig. 2に見られたPtのイオン強度の減少を補正するため、内標準法を検討した。内標準元素としては、生体試料中の含有量が少なく、プラズマ中で同じ挙動を示すと推定される ^{115}In を用いた。Fig. 2に、塩化ナトリウムとグルコースのPtに対する影響を、In内標準法で補正した結果を実線で示す。内標準法により $^{195}\text{Pt}/\text{In}$ の比として表すと、塩化ナトリウムの全濃度領域に対してイオン強度はほぼ一定となり、In内標準法によりマトリックス干渉は十分補正できることが判明した。グルコースの濃度変化に対しても、内標準法の場合は変動幅が更に減少した。以上の結果から、塩濃度の高い生体試料(血清、尿など)中のPtのICP-MS測定では、In内標準法を用いることが望ましい。

3.3 血清中の白金の定量

ヒト血清中のPt濃度は極めて低くICP-MSの検出限界以下であるため、市販の血清試料に極微量のPtを添加して分析条件を検討した。FBSを0.1M硝酸で直接10倍、100倍希釈した試料、及びマイクロ波加熱/酸分解後10倍希釈した試料に対してPtを1ng/mlとなるように添加し、この三つの試料溶液についてPtの回収率を調べた。

Fig. 3に、検量線法とIn内標準法で求めたPtの値を比較して示す。血清の10倍希釈液中のNaClは約0.1%となり、Fig. 2に示したように約30%のイオン化強度の減少が起こっていると考えられる。更に、タンパク質などによるマトリックス干渉も予想され、Fig. 3の10倍希釈血清では、検量線法を用いるとPtの回収率は約60%となっている。10倍希釈血清の場合でも、In内標準法を用いることにより、ほぼ100%の回収率が得られた。100倍希釈液血清ではマトリックス干渉は少なく、検量線法でも約90%の回収率が得られた。In内標準法では回収率が更に改善され、ほぼ100%のPtの値が得られた。酸分解後に10倍希釈した血清では、検量線法の場合は約45%と低い回収率となった。これは、酸分解によりタンパク質は分解されるものの、無機塩は10倍希釈血清と同濃度で存在しており、又分解液中に残存する硝酸の最終濃度を標準溶液と完全にマッチングさせることが難しかったためと考えられる。この酸分解-10倍希釈試料についても、In内標準法でほぼ

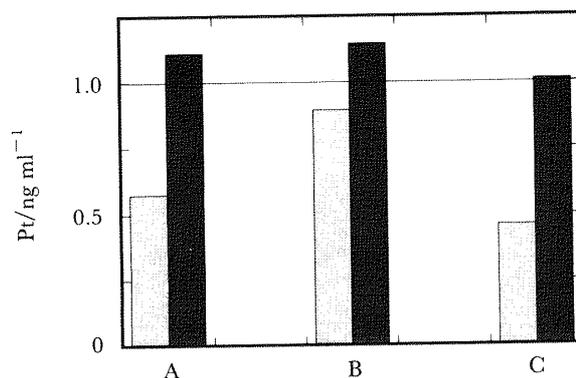


Fig. 3 Determination of 1 ng ml^{-1} of Pt in 10-fold diluted serum(A), 100-fold diluted serum(B) and acid digested-10-fold diluted serum(C)

□: calibration curve method; ■: internal standard (In) method

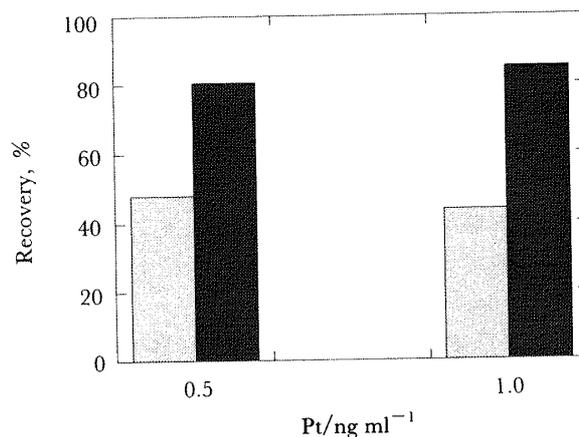


Fig. 4 Recovery of ultratrace level Pt added to serum

□: calibration curve method; ■: internal standard (In) method

100%の回収率が得られた。

次に、あらかじめPt濃度が0.5, 1.0 ng/mlとなるように添加した血清試料をマイクロ波加熱-酸分解後、10倍希釈して定量した結果をFig. 4に示す。検量線法によるPtの定量値は、Fig. 3の結果と同じく、予想値の約45%であった。In内標準法による分析値は予想値の約85%となったが、Pt濃度がppbレベル以下であることを考慮すれば、実用的なPtの分析法となりうる。血清、体液以外の生物試料では試料の酸分解が前処理として必要であり、pptからppbレベルのPtのICP-MS

定量でも, In 内標準法を採用することにより信頼性のある値が得られることが判明した.

3・4 白金の測定における分子イオン干渉

四重極型質量分析計を用いる ICP-MS では, プラズマ中で生成した多原子分子による分子イオン干渉がしばしば大きな問題となる. 白金のように質量数の大きい元素は分子イオン干渉を受けにくい, HfO がすべての Pt 同位体へ, W の酸化物の中で ^{182}WO が ^{198}Pt へ分子イオン干渉を及ぼす可能性がある. 本実験では測定に ^{194}Pt , ^{195}Pt , ^{196}Pt を使用しているため, これらの同位体に対する HfO による分子イオン干渉を調べた. なお, Hf の同位体存在度は, ^{174}Hf : 0.19%, ^{176}Hf : 5.19%, ^{177}Hf : 18.47%, ^{178}Hf : 27.15%, ^{179}Hf : 13.75%, ^{180}Hf : 35.22% である.

Fig. 5(a) に Hf 10 ppm 標準溶液の ICP 質量スペクトルを示す. Hf の質量スペクトルとほぼ同じ存在度で, 酸素の質量数 16 を加えた位置に HfO のスペクトルが現れており, Pt の質量数 (192~198) と重なることになる. HfO のスペクトル強度は Hf のシグナル強度の 30~40% に相当するため, Hf が共存するサンプル中では HfO による Pt への分子イオン干渉は極めて深刻な問題となることが分かる. 質量数 193 に見られるシグナルは ^{193}Ir の可能性も考えられるが, 同位体 ^{191}Ir にピークが見られないため, HfO のみによるスペクトルと考えられる.

次に, 生物標準試料 NIST Orchard Leaves, Citrus Leaves, Pine Needles, Oyster Tissue, NIES Human Hair, Pepperbush, Chlorella, Tea Leaves をマイクロ波加熱/酸分解後, ICP-MS により Pt の定量を行った. これらの標準試料中の Pt について報告された分析値はないか, あっても広い範囲にわたっている. これらの標準試料中の Pt 濃度は定量限界 (14 ppt) 以下であり, NIES No. 13 Human Hair についてのみ, Fig. 5(b) に示すように, Pt の位置に 2 ng/g Pt に相当するスペクトルが得られた. しかし, Pt の質量数より 16 少ない位置に Hf のスペクトルが見られ {Fig. 5(b)}, しかも強度比が Fig. 5(a) の Hf 標準溶液とほぼ等しいことから, Fig. 5(b) の質量数 193~196 に見られるスペクトルは Pt ではなく, HfO であることが判明した. 中性子放射化分析法による NIES No. 13 Human Hair の分析では 8 ng/g Hf が報告されており¹²⁾, 本実験での ICP-MS の分析結果とよく一致していた. 従って, この Human Hair 中の Pt も検出限界以下となる.

このように Pt の ICP-MS では HfO による分子イオ

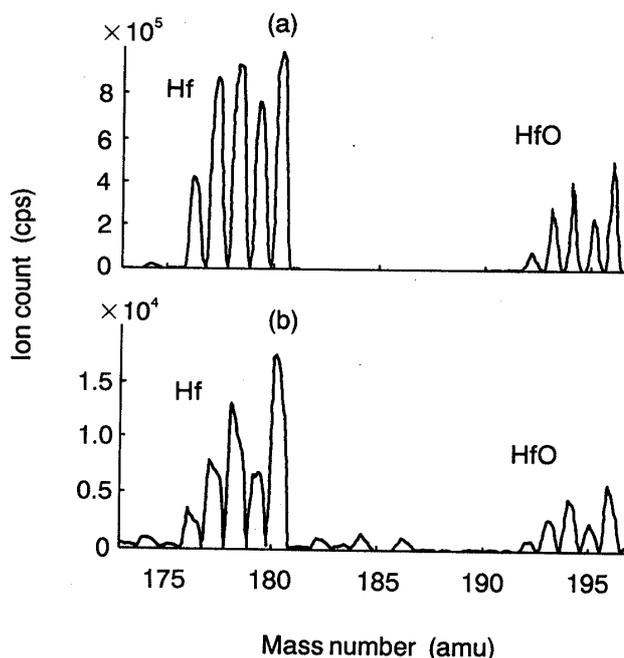


Fig. 5 ICP-MS spectra of (a) $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Hf standard solution, (b) digest of NIES Human Hair

ン干渉が深刻な問題となるので, ①質量数 173~197 を走査して, Hf の存在を調べる, ②分子イオン干渉が予想される場合には, 陰イオン交換樹脂で Hf を除く⁶⁾, などの操作が必要となる. ハフニウムの地殻存在度は Pt の数百倍大きいので, 鉍石, 粉じん, Hf を含有する生体試料については, Pt を Hf から分離して定量しなければならない.

3・5 シスプラチン投与したラット臓器中の Pt の定量

ラット (250 g) にランダ注 2.5 ml (シスプラチン 1.25 mg に相当) を腹腔注射 2 時間後, 各臓器 (肝臓, じん臓, ひ臓, 腹水) に分布する Pt を ICP-MS を用いて定量した. 臓器試料はマイクロ波加熱/密閉容器で酸分解後, 測定可能な限り 0.1 M 硝酸で希釈して試料溶液とした. ICP-MS による Pt 分析では検量線法及び In 内標準法を用いた. 本法による分析値の正確さを検討するため, ICP-AES で同一試料中の Pt 含有量を求めて比較した.

Table 3 にシスプラチンを腹腔注射したラット臓器中の Pt 含有量を, 分解液中の濃度 (ng/ml) として表す. 白金錯体の投与により Pt 濃度が高いので, 試料溶液は通常より更に 50~100 倍希釈されているため, ICP-MS におけるマトリックス干渉は軽減されている. ICP-MS

Table 3 Determination of Pt in organs of a cis-platin-administered rat by ICP-MS and ICP-AES

	ICP-MS		ICP-AES
	Cal. curve	I. S. (In)	
Liver	165	190	210
Kidney	330	390	450
Spleen	29	27	30
Ascites fluid	16	19	17

Unit: ng ml⁻¹ in digest solution. Cal. curve: calibration curve method, I. S. (In): internal standard method using In

測定では、In 内標準法により肝臓とじん臓についてやや高めの値が得られた。ICP-AES では同軸型ネブライザーと超音波ネブライザーを検討し、超音波ネブライザーは測定感度が高いこと、相対標準偏差が小さいこと、本試料のように十分に希釈された試料の場合は干渉作用が見られないことから、超音波ネブライザーを用いた ICP-AES による分析値を採用した。

Table 3 に示すように、肝臓、じん臓、ひ臓、腹水中の Pt 濃度は比較的一致しており、特に In 内標準/ICP-MS による定量値が ICP-AES による値と近かった。従って、In を内標準とする ICP-MS により、シスプラチ

ン投与ラット臓器中の Pt を迅速かつ正確に測定できることが判明した。ICP-MS は測定感度が極めて高いこと、多元素同時分析が可能なことなどにより、生物試料中の超微量 Pt の分析に極めて有用と考えられる。

文 献

- 1) 桜井 弘, 田中英彦, 千熊正彦: “生体微量元素”, p. 257 (1995), (廣川書店).
- 2) 寺島 滋: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 511 (1987).
- 3) M. Grote, M. A. Kettrup: *Anal. Chim. Acta*, **201**, 95 (1987).
- 4) R. A. Nadkarni, G. H. Morrison: *Anal. Chem.*, **46**, 232 (1974).
- 5) S. Kallmann, P. Blumberg: *Talanta*, **27**, 827 (1980).
- 6) H. Mukai, Y. Ambe, M. Morita: *J. Anal. At. Spectrom.*, **5**, 75 (1990).
- 7) E. S. Beary, P. J. Paulsen: *Anal. Chem.*, **67**, 3193 (1995).
- 8) P. Schramel P, I. Wendler, S. Lustig: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **353**, 115 (1995).
- 9) 小島 功: ふんせき (*Bunseki*), **1992**, 14.
- 10) N. E. Holden, R. L. Martin, I. L. Barnes: *Pure. Appl. Chem.*, **56**, 675 (1984).
- 11) C. Vandecasteele, H. Vanhoe, R. Dams: *J. Anal. At. Spectrom.*, **8**, 781 (1993).
- 12) 鈴木章悟, 平井昭司, 三頭聡明: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 845 (1994).

要 旨

生体試料中の ppb レベルの Pt の定量に誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を応用した。共存成分によるマトリックス効果については、グルコースはほとんど影響を与えなかったが、塩化ナトリウムは高濃度になるに従って Pt のイオン強度を直線的に減少させた。塩化ナトリウムによるマトリックス干渉は、内標準元素として In を添加する内標準法の採用により補正できた。生体試料としてウシ胎児血清 (FBS) を用い、Pt が 1 ppb となるように 10 倍、100 倍希釈した血清、及び酸分解後 10 倍希釈した血清に添加し、In 内標準法でほぼ 100% の Pt の回収率が得られた。白金の ICP-MS 測定では HfO による分子イオン干渉が深刻であり、頭髮標準試料では HfO による見掛けの Pt シグナルが観察された。白金錯体シスプラチンをラットに腹くう (腔) 注射後、各臓器中の Pt の定量を ICP-MS と ICP 発光分析法を用いて行い、一致した Pt の分析値が得られた。