

微量元素分析における解析手法の高度化に関する研究

若杉 郷臣, 富田 恵一

An Application of the Multivariate analysis to Trace Elements

Motoomi WAKASUGI, Keiichi TOMITA

抄 録

ICP質量分析法を用いた多元素同時分析における微量元素成分の効率的な前処理方法や測定手法、並びにケモメトリックスを活用した測定データの高度解析手法について、魚の耳石を対象に検討を行った。ポリプロピレン製の分解容器とヒートブロックを用いることで、パイレックス製容器を使用する場合と比べて汚染の影響をアルミニウムが $0.5\mu\text{g/L}$ 、亜鉛が $0.3\mu\text{g/L}$ など、大幅に低減しながら多数の試料を簡便に前処理可能であることがわかった。また、得られた分析結果を用いて多変量解析を行うことで、元素濃度の比較などでは見えづらかった試料間の差異や傾向が明確化することがわかった。

キーワード：微量元素, ケモメトリックス

1. はじめに

元素分析は研究開発、工程管理、環境保全など各分野に欠かせない基盤技術であるが、近年、ICP質量分析装置などの分析機器の発達により、従来は困難であった微量元素の迅速、正確な多元素同時分析が可能となり、微量元素の成分組成を把握できるようになった。しかし、分析機器が高感度になり、微量濃度を測定できるようになった分、試料の前処理時に混入する汚染の分析値への影響も相対的に大きくなり、従来よりも汚染の影響の少ない前処理方法を検討する必要性が出てきた。

また、近年多種類のデータの傾向を総括して取り扱う多変量解析などの情報応用技術を分析化学に応用するケモメトリックス（計量化学）が提唱され、環境分析、科学捜査、法医学、食品、医薬品、バイオテクノロジー、合成化学など、幅広い分野で活用されている。

そこで、本報では、ICP質量分析法を用いた多元素同時分析における微量元素成分の前処理方法や、ケモメトリックスを活用した多数の微量元素分析データの高度解析手法について報告する。

2. 実験方法

2.1 ICP質量分析法を用いた微量多元素分析における前処理法の構築

ng/Lレベルの濃度の検出が可能なICP質量分析装置のように、感度が非常に高い分析装置を用いて微量元素を分析する場合、試料の酸分解などの前処理時に実験室雰囲気などの環境や使用する容器・器具類、及び試薬に含まれる不純物からの汚染の影響を受けやすい¹⁾。一般的に試料の酸分解にはパイレックスなどのガラス製のビーカーが用いられるが、ガラスの主成分であるナトリウムやけい素、ほう素、アルミニウム、カリウムなどだけではなく、容器の使用状況や保管環境において器具表面が微量元素で汚染されていることがあり、それらにより微量元素の測定に影響を及ぼすことが多い。そのため、微量元素を測定する際にはガラス器具の使用を避けることが好ましい。また、試料を清浄なテフロン製分解容器



図1 使い捨て式ポリプロピレン製分解容器と、ヒートブロック式分解装置を用いた試料の分解

事業名：経常研究

課題名：微量元素の微量元素分析法の迅速・簡便化及び解析手法の高度化に関する研究

内に密閉して高温高压で酸分解するマイクロ波分解装置を用いることで、環境や器具からの影響を低減できるが、欠点として、分解プログラムの設定や装置への試料の設置が煩雑であり、分解中に試料の分解の様子を目視できない点や、処理後、容器を開放する前に十分に放冷するまで待たなければならないなど、開放系での酸分解に比べ不便な点もある。

そこで、100℃程度までの加温で容易に酸分解する試料について、図1に示すような定容及び保存容器も兼ねる使い捨て式のポリプロピレン製分解容器と、多数の試料を同時分解可能なヒートブロック式分解装置（SCP SCIENCE社 DigiPrep Jr）の使用を検討した。これらは同時に24試料を加熱分解可能な上、分解後の試料を保存用の容器に移し替える工程を省略できるため、試料の移し替えに伴う汚染と、ポリプロピレン製容器を用いることによって、ガラス製容器を用いる場合に比較して容器からの汚染の低減が期待できる。そこで、まず通常の分析に使用しているパイレックス製メスフラスコに定容した際の汚染混入について、図2に示す方法で試験を行い、ポリプロピレン製分解容器による空試験の結果と比較し、微量分析への適用の可能性について検討した。

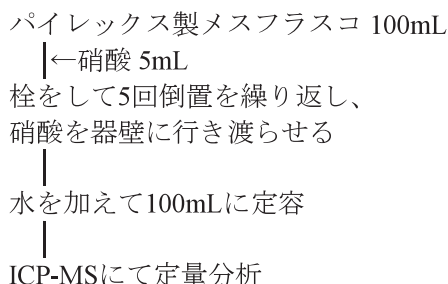


図2 パイレックス製メスフラスコによる汚染混入の確認

2.2 微量元素分析及多変量解析による評価

2.2.1 耳石の微量元素分析

実試料には、分解が容易な炭酸カルシウムを主体とする魚の耳石を用いた（図3）。A及びBの2つの地域で同時期に漁獲した同種類の魚種の計64個体の耳石について、図4に示すフローにて前処理を行った。その後、ICP質量分析装置（アジレントテクノロジー(株) Agilent 7700x）による半定量分析を実施して試料の概略組成を分析後、測定可能な元素のうち、カルシウム、マンガン、亜鉛、ストロンチウム及びバリウムを選択し、定量分析を行った。このうち、微量濃度のマンガン、亜鉛、ストロンチウム及びバリウムについてはICP質量分析装置で、また、高濃度で含有するカルシウムは50倍希釈し、ICP発光分光分析装置（(株)島津製作所 ICPS8100）にて定量分析を行った。それぞれの元素ごとの測定条件について表1、2に示す。



図3 試験に使用した魚の耳石

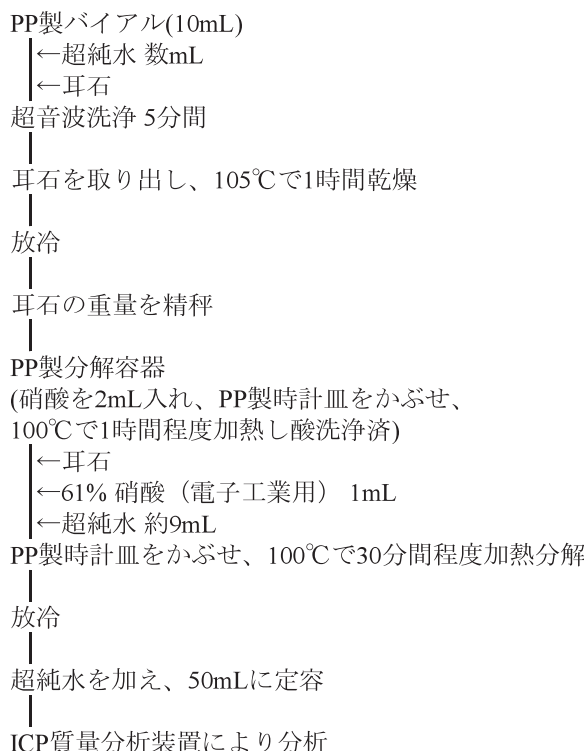


図4 耳石の前処理フロー

表1 ICP質量分析法の測定条件

分析元素	Mn	Zn	Sr	Ba	
測定質量数(m/e)	55	66	88	137	
コリジョン・リアクションセルガス種類	He				
定量法	内標準を用いた検量線法				
内標準	元素	Sc	Sc	Y	Cs
	濃度	100µg/L 自動添加(混合比1:16)			
	測定質量数(m/e)	45	45	89	133

表2 ICP発光分光分析法の測定条件

分析元素	Ca	
分析線波長(nm)	363.366	
定量法	内標準を用いた検量線法	
内標準	元素名	Y
	濃度(mg/L)	2mg/L
	分析線波長(nm)	371.029

2.2.2 多変量解析による評価

塩濃度や水温、または海水や河川など、魚の生育した環境により、カルシウムとストロンチウムの濃度比など、耳石に含有する元素の比率が変化することが知られている²⁾。そこで、2.2.1項にて実施した分析結果について、それぞれの元素濃度の比較や、互いに関係のある多数のデータの特徴を要約・統合して可視化する多変量解析を用い、漁獲した地域間の差異などについて検討した。多変量解析については解析ソフト（アジレントテクノロジー(株) Mass Profiler Professional）を用い、解析方法には、多くの変数を持つデータから情報の損失を最小限にしつつ、少ない変数に置き換えてデータを見やすい形に可視化する主成分分析を用いた。

3. 結果と考察

3.1 容器からの汚染の検討

バイレックス製メスフラスコによる汚染について、影響が大きかった元素の結果を図5に示す。加熱せず、単に酸を入れて定容しただけでも、微量元素分析に支障が出るほどの汚染を受けており、バイレックス製メスフラスコは微量元素分析に使用できないことがわかった。

一方、使い捨てポリプロピレン製容器を用いて図4のフローにて空試験を実施したところ、ほとんどの元素において検出限界以下で、汚染が大きかった元素でも、アルミニウムが0.5 μg/L、亜鉛0.3 μg/Lと十分に低く、使い捨て式ポリプロピレン製分解容器と、ヒートブロック式分解装置を用いた分解法は微量元素分析の前処理法として可能と判断した。

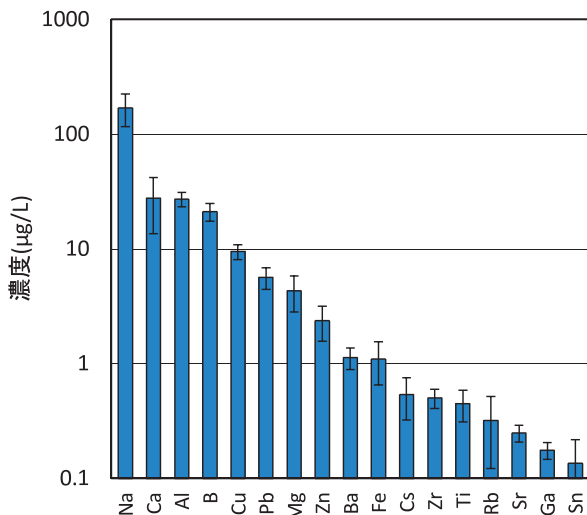


図5 バイレックス製メスフラスコによる汚染
 ※0.1 μg/L以上の元素について表示
 ※エラーバーの範囲は±標準偏差(n=5)

表3 耳石の分析結果

地域	試料番号	Ca (%)	Sr (%)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Ba (mg/kg)
A地域	1	37.9	0.391	6.77	25.7	2.41
	2	37.3	0.412	5.39	20.8	2.21
	3	37.7	0.422	4.80	17.7	1.42
	4	38.3	0.388	7.80	23.9	2.02
	5	38.4	0.432	6.61	23.2	1.48
	6	37.9	0.406	8.58	25.1	2.15
	7	37.6	0.390	10.33	24.4	2.58
	8	37.1	0.415	8.00	19.9	2.50
	9	38.1	0.394	6.18	19.6	3.59
	10	38.1	0.373	8.84	20.0	2.54
	11	37.8	0.383	7.83	28.6	2.92
	12	37.5	0.421	4.36	19.8	2.01
	13	38.6	0.400	7.44	25.8	2.14
	14	38.1	0.380	7.23	20.0	2.35
	15	38.1	0.388	8.52	21.2	2.30
	16	38.2	0.405	14.66	20.3	2.27
	17	38.4	0.396	6.82	27.1	3.27
	18	37.9	0.418	10.44	21.9	2.00
	19	37.6	0.413	5.88	23.0	1.48
	20	38.0	0.411	8.58	17.8	2.46
	21	38.6	0.415	5.21	29.4	1.79
	22	38.0	0.410	12.79	25.0	3.70
	23	38.3	0.422	5.72	23.8	1.52
	24	37.7	0.414	7.47	24.2	7.22
平均	38.0	0.404	7.76	22.8	2.52	
変動係数(%)	1.00	3.86	31.3	14.1	46.6	
B地域	1	38.6	0.388	5.62	27.5	2.36
	2	38.6	0.397	6.14	24.9	2.76
	3	38.5	0.358	7.22	27.6	2.99
	4	37.7	0.380	5.63	26.7	3.22
	5	37.8	0.374	4.05	26.8	3.16
	6	37.5	0.346	6.29	25.9	2.82
	7	37.7	0.341	7.34	28.4	2.66
	8	37.9	0.375	5.16	28.7	3.01
	9	37.9	0.346	5.45	29.9	3.20
	10	37.5	0.328	5.28	23.2	3.03
	11	38.3	0.386	6.30	23.1	3.20
	12	37.5	0.391	4.20	26.1	3.33
	13	38.2	0.384	5.41	26.2	2.41
	14	37.5	0.421	5.44	29.6	2.83
	15	38.6	0.375	4.68	26.4	2.55
	16	37.8	0.371	4.25	24.0	2.57
	17	38.0	0.355	3.85	25.7	2.94
	18	38.1	0.365	4.16	26.3	2.22
	19	38.1	0.402	4.75	25.4	3.08
	20	38.1	0.389	3.97	27.8	2.50
	21	37.5	0.343	6.15	23.2	2.26
	22	38.2	0.382	5.76	27.5	2.48
	23	37.7	0.392	3.56	26.8	2.53
	24	38.3	0.387	3.72	28.3	2.74
25	39.0	0.380	3.68	27.8	2.74	
26	38.7	0.358	6.14	24.6	2.73	
27	38.8	0.363	5.53	27.4	2.53	
28	38.0	0.367	4.11	26.3	2.57	
29	38.4	0.391	6.08	32.1	2.20	
30	36.9	0.363	4.96	23.9	2.28	
31	38.4	0.398	4.10	25.8	2.52	
32	38.1	0.380	2.60	28.9	2.47	
33	38.3	0.370	4.25	28.1	3.16	
34	38.0	0.362	4.61	29.0	2.23	
35	37.8	0.363	3.46	28.3	2.11	
36	36.8	0.406	4.43	30.3	2.38	
37	37.4	0.379	4.06	27.9	2.34	
38	37.0	0.398	3.98	27.3	1.93	
39	37.3	0.369	4.28	24.3	2.70	
40	37.6	0.395	3.98	27.0	2.57	
平均	38.0	0.375	4.87	26.9	2.66	
変動係数(%)	1.35	5.29	22.2	7.59	13.2	

3.2 耳石の成分分析結果

耳石の分析結果を表3に示す。それぞれの元素の平均値について、カルシウムはA地域、B地域ともに38.0%，ストロンチウムはA地域0.404%，B地域0.375%，マンガンはA地域7.76mg/kg、B地域4.87mg/kg、亜鉛はA地域22.8mg/kg、B地域26.9mg/kg、バリウムはA地域2.52mg/kg、B地域2.66mg/kgであった。また、各元素について、F検定・t検定によるばらつき及び平均値の差の検定を実施したところ、95%信頼限界においてA地域とB地域でカルシウム、バリウムは有意差なし、ストロンチウム、マンガン、亜鉛は有意差ありであった。

3.3 元素成分によるグルーピングの検討

3.2節の分析結果を用いて、それぞれの地域のグルーピングが可能か検討した。図6～9にいくつかの元素の組み合わせによる濃度分布を示す。図6のカルシウム・ストロンチウムの組み合わせでは、それぞれの地域の分離が不十分であった。一方、図7～9のストロンチウム、マンガン、亜鉛の組

み合わせでは、A地域とB地域でそれぞれひとまとまりにプロットされているが、いずれも一部重なっており、元素濃度だけの組み合わせでは、各地域の分離は難しいことがわかった。

3.4 耳石分析結果の多変量解析

多変量解析ソフトを用いて耳石の分析結果の主成分分析を行った。使用データはカルシウム、ストロンチウム、マンガン、亜鉛、バリウム濃度を用いた。主成分分析により5次元のデータを3次元に縮約し、X軸を第一主成分、Y軸を第二主成分、Z軸を第三主成分とした3次元データとしてグラフに示した。図10に主成分分析により縮約した各元素の寄与を表すグラフを示す。ストロンチウムとマンガンがグラフの左側、亜鉛は右側、バリウムは上側、そしてカルシウムは誌面に対し垂直手前方向に位置しており、このグラフから、ストロンチウムは第一主成分に対して正に寄与し、逆に亜鉛は負に寄与、マンガンは第一主成分及び第二主成分に対して正に寄与、バリウムは第二主成分に対して正に寄与、カルシウ

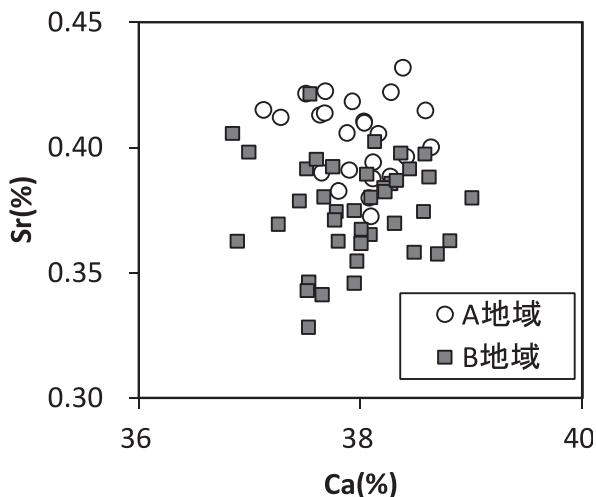


図6 耳石のカルシウム・ストロンチウム濃度分布

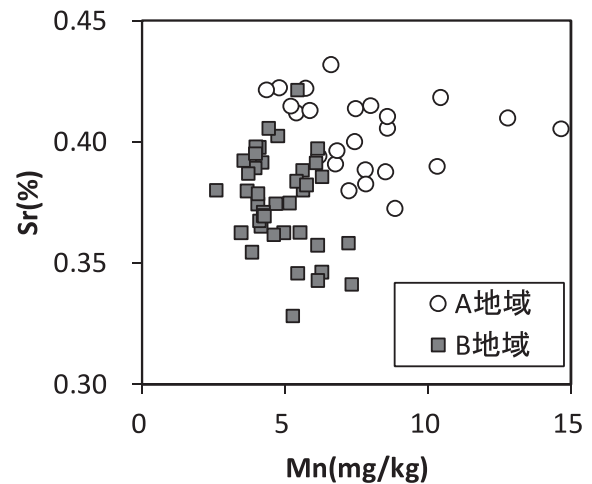


図7 耳石のマンガン・ストロンチウム濃度分布

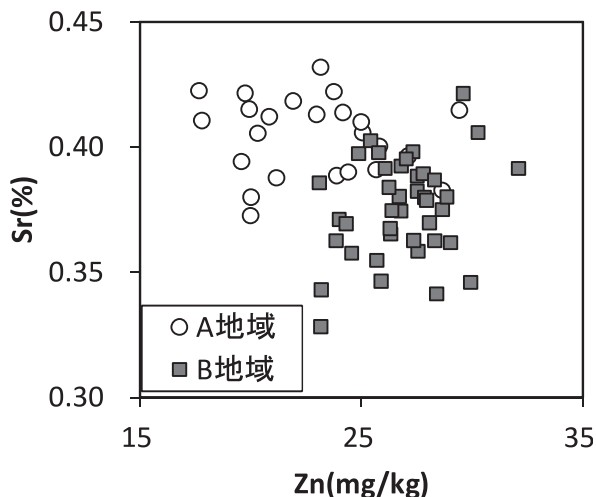


図8 耳石の亜鉛・ストロンチウム濃度分布

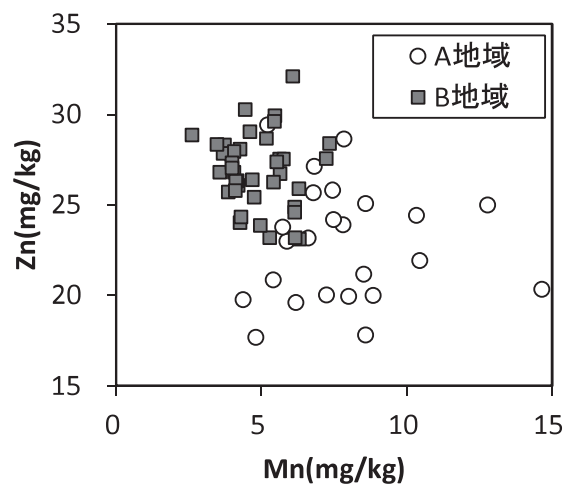


図9 耳石のマンガン・亜鉛濃度分布

ムは第二主成分及び第三主成分に対して正に寄与していることが読み取れるとともに、それらの元素濃度が高くなるとプロットがその位置に近づくことを示している。図11に主成分分析結果を示す。A地域のデータはグラフ左側に寄り、B地域のデータはグラフ右側に固まっており、図6～9と比較して地域別の差異がはっきりと視覚的に表されている。その理

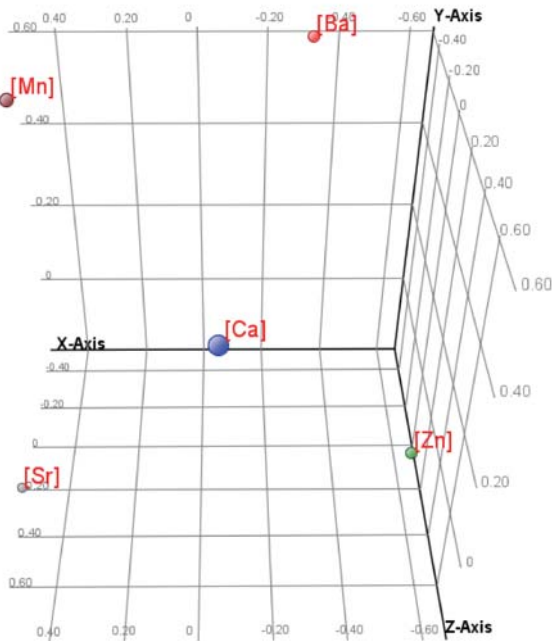


図10 耳石分析データの主成分分析における各元素の寄与
※プロットの点の大きさは視点からの距離を表す

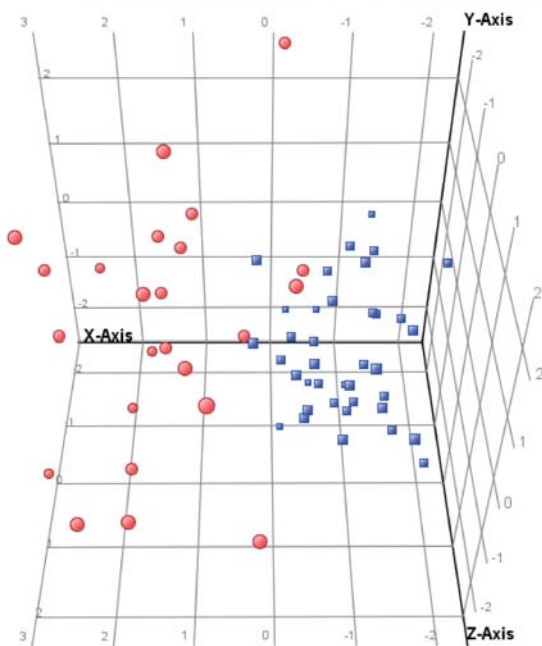


図11 耳石分析データの主成分分析結果
※プロットの点の大きさは視点からの距離を表す

由として、A地域は全体的にストロンチウムとマンガンの濃度が高いが亜鉛濃度は低く、しかも図9のようにマンガンと亜鉛のデータのばらつきが大きいプロットが左側にばらついている。一方、B地域はマンガン濃度が低い一方で、亜鉛濃度は高く、しかもばらつきが小さいため右側に固まっているが、実際にはカルシウム濃度のばらつきが大きいために図10のカルシウムのプロットの方向に細長く分布している。しかし、図10, 11のようにカルシウムの寄与が見えづらい角度にグラフを設定することで、B地域のデータがグラフ右側に固まってプロットされ、地域間の差異を際立たせることができた。これらの結果から、試料中の多数の微量元素の組成を多変量解析によって縮約し、試料間の差異を明確化することが可能であることがわかった。

4. おわりに

ICP質量分析法を用いた多元素同時分析における微量元素成分の効率的な前処理方法や測定手法、並びにケモメトリックスを活用した測定データの高度解析手法について検討した結果、以下のことがわかった。

- 1) 分解が容易な試料の場合、使い捨て式のPP製分解容器と、ヒートブロック式分解装置を用いることで、ピーカー等を用いた従来の前処理法と比べ、汚染の影響を減少し、分析の省力化が可能となった。
- 2) 分析データを多変量解析により解析することで、元素濃度だけでははっきりとわからなかった試料間の差異や傾向が明確になった。
- 3) これらの手法を用いることで、原料ロット間の差異や、不良の原因究明などにも活用することが可能となる。

謝辞

本研究で使用したICP質量分析装置、及びICP発光分光分析装置は公益財団法人JKAの機械振興補助事業により整備されました。記して感謝いたします。

引用文献

- 1) 日本分析化学会編, 現場で役立つ化学分析の基礎(2006), p58-78
- 2) 新井崇臣(2002), 魚類の回遊履歴: 解析手法の現状と課題, 魚類学雑誌, 49, p1-23