

Q1)元素の機器分析の前処理において、今後、分離剤を利用したマトリックス分離精製手法の需要がどのように推移していくのかに興味があります。

専門家の方々の見解をお聞かせいただけたらと存じます。

キレート樹脂を用いた無機分離剤は、環境、生体試料、放射性核種などの分野において大きく伸長しています。

今後は、レアメタル、貴金属精製、放射性核種、JISに加えて食品添加物中の重金属分析の分野で拡大され成長が期待されています。

現在、有機分析の固相抽出分離剤の市場規模は、アナリストの報告書では、日本国内全体で30億円と言われております。無機分離剤はここまではないかもしれませんが、今後の需要が大きく見込まれています。

2015筑波セミナー 質問コーナー

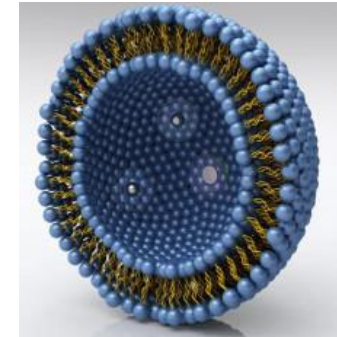
Q2) 現在、ICPを用いて一つの細胞中の元素を計測する装置を開発しています。その装置の性能を評価するため、細胞の標準試料もしくはそれに変わる疑似細胞試料をさがしています。どんなものを使えばいいか、アドバイスを頂けますでしょうか？

→梅村

沖野研の学生さん 質問ありがとう。

◆疑似細胞(リポソーム)を作製する。

◆酵母をちゃんとした環境で育てる！

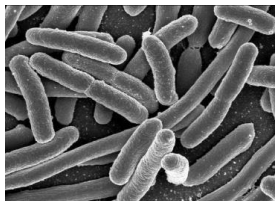


Q3) 生体などの細胞をICPで分析する場合、どのような処理が必要なのでしょうか。

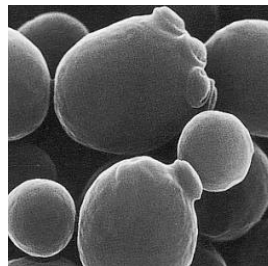
→梅村 2枚目と3枚目にマウス臓器の分析手順を示します。

1細胞分析(single cell analysis)を目指すときのポイントは4枚目以降に・・・

E. Coli
(大腸菌)



Yeast
(酵母)



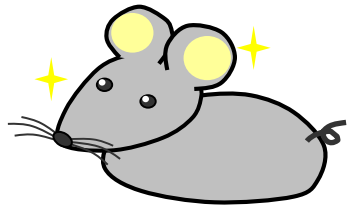
Euglena
(ミドリムシ)



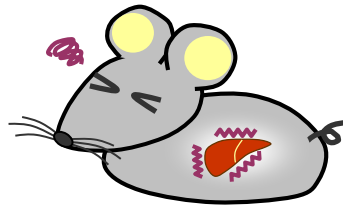
Fertilized salmon egg
(サケの受精卵)



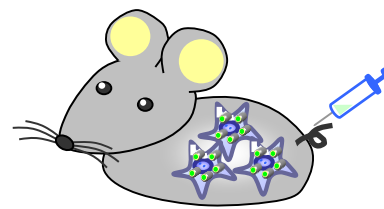
マウス臓器の前処理・試料調製



ノーマルマウス



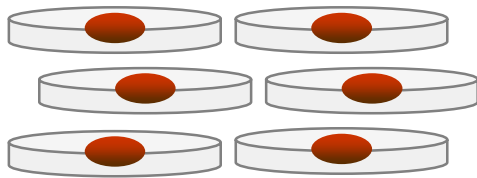
肝障害マウス



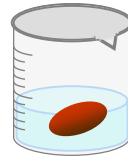
QD-ASCs静注マウス



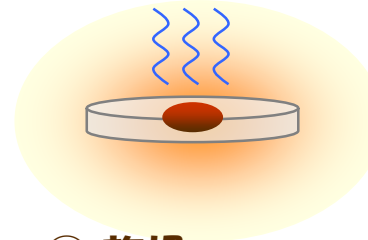
臓器・血液を採取



① 解剖・採取
部位ごとに分類する



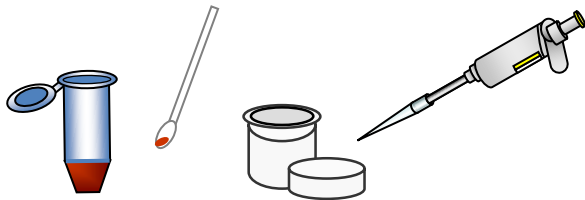
② 洗浄
血液や体液を洗う



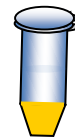
③ 乾燥
水分を飛ばす



④ 粉碎・攪拌
均一な粉末にする



⑤ 溶液化
マイクロ波酸分解する



⑥ 溶液調製
内標準元素を添加する



ICP-MS測定
元素濃度算出

生体試料のマイクロ波酸分解

	分解容器 容量	分解に適した 試料量	分解に要する酸の量 (最終的なサンプル量)	分解装置
標準ベッセル	 100 mL	100 mg	10 mL (100 mL)	マイクロ波 酸分解装置 
微量 インサート	 5 mL	10 mg	1 mL (10 mL)	電子レンジ  簡便、迅速
テフロン容器	A B  1 mL	1 mg 微量の試料 に対応	過度の希釈が必要ない 0.1 mL (1 mL)	

細胞を構成する物質(細胞はどんな元素で構成されるのか?)

文献を探してみると・・・

第1節 タンパク質 生物II>第1部 分子からみた生命現象>第1章
生物体内の化学反応と酵素>第1節 タンパク質

A 生物体を構成する化学物質

◆細胞の成分とタンパク質

タンパク質は、生物の主要な構成物質で、固形物のほぼ半分を占める(教科書p.表1)。細胞の成分でもっとも多いのは水で約70%である。固形物には、タンパク質のほかに、細胞膜の成分の脂質、エネルギー源の炭水化物、代謝に必要な無機イオン、遺伝にかかわる核酸などがある。

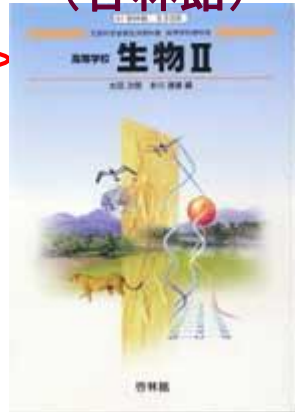
細胞の成分の分析は、細菌の大腸菌で詳細に行われている。純粋な細胞として容易に集めることができるからである。大腸菌では約3000種類のタンパク質が存在する。また、哺乳類の細胞では約10万種類ある。

大腸菌の構成物質(J.D.ワトソン：遺伝子の
分子生物学(第2版), 化学同人(1970)より)

構成物質	重量 [%]	平均分子量	種類数	細胞あたりの数
水	70	18	1	4×10^{10}
無機イオン*	1	40	20	2.5×10^8
炭水化物**	3	150	200	2×10^8
脂質**	2	750	50	2.5×10^7
アミノ酸**	0.4	120	100	3×10^7
ヌクレオチド**	0.4	300	200	1.2×10^7
その他の低分子	0.2	150	200	1.5×10^7
タンパク質	15	4×10^4	3000	10^6
核酸				
DNA	1	2.5×10^9	1	2
RNA	6	5×10^5	1000	10^5

* Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} など

化学の教科書 (啓林館)



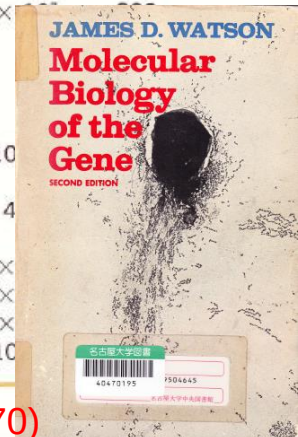
James D. Watson
ノーベル生理学・医学賞受賞
(1962年)



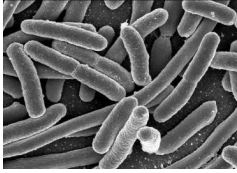
TABLE 3-3 Approximate chemical composition of a rapidly dividing *Escherichia coli* cell*

Component	Per cent of total cell weight	Average MW	Approximate number per cell	Number of different kinds
H ₂ O	70	18	4×10^{10}	1
Inorganic ions (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , etc.)	1	40	2.5×10^8	20
Carbohydrates and precursors	3	150	2×10^8	200
Amino acids and precursors	0.4	120	3×10^7	100
Nucleotides and precursors	0.4	300	1.2×10^7	200
Lipids and precursors	2	750	2.5×10^7	50
Other small molecules (heme, quinones, breakdown products of food molecules, etc.)	0.2	150	1.5×10^7	
Proteins	15	40,000	10^6	
Nucleic acids				
DNA	1	2.5×10^9	4	
RNA	6			
16s rRNA		500,000	3×10^4	
23s rRNA		1,000,000	3×10^4	
tRNA		25,000	4×10^4	
mRNA		1,000,000	10^5	

* Weight 10^{12} daltons. 2nd edition (1970)



大腸菌1細胞に含まれる元素の種類と個数(定量できた元素に関して…)

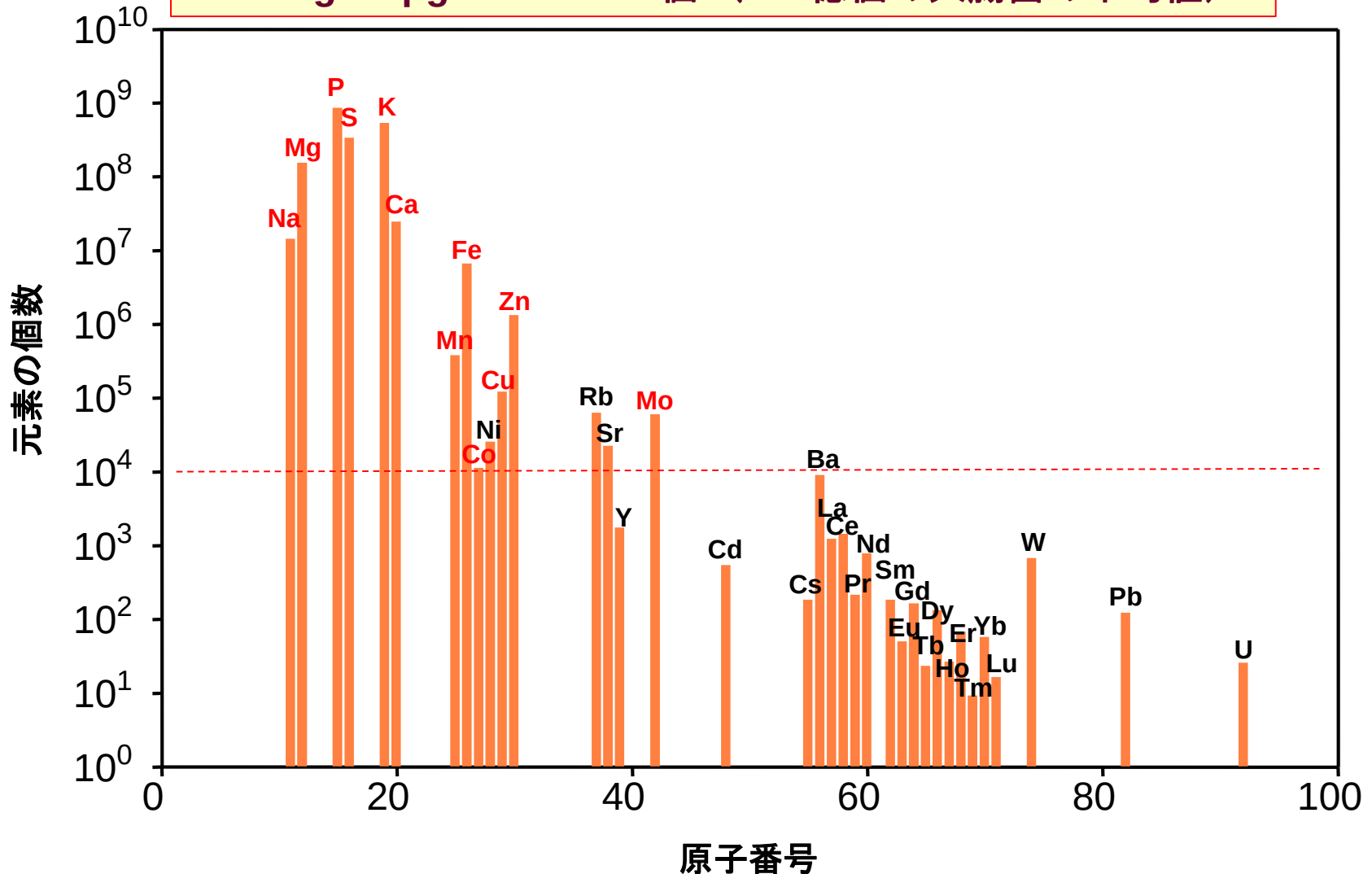


大腸菌1細胞あたりの元素個数

ICP-MSで
48元素を定量



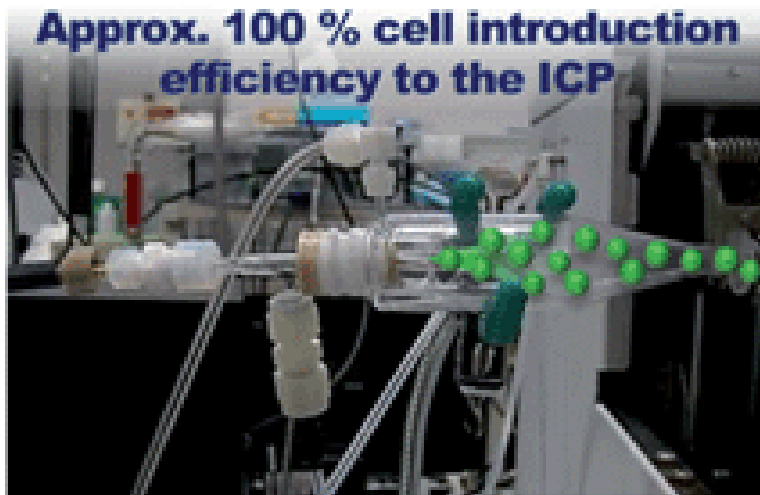
20 mg / 2 pg = 1×10^{10} 個 (100億個の大腸菌の平均値)



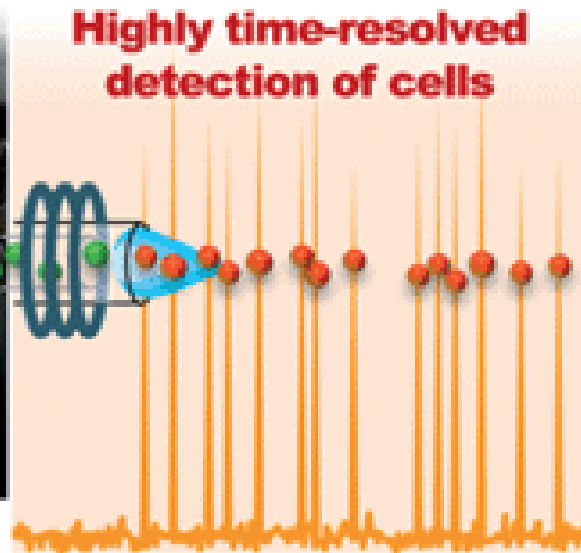
細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマにひとつずつ
放り込めるツールはあるの？
→産総研 宮下さん、重田さん

Highly Efficient Single-Cell Analysis by ICP-MS

Approx. 100 % cell introduction
efficiency to the ICP



Highly time-resolved
detection of cells



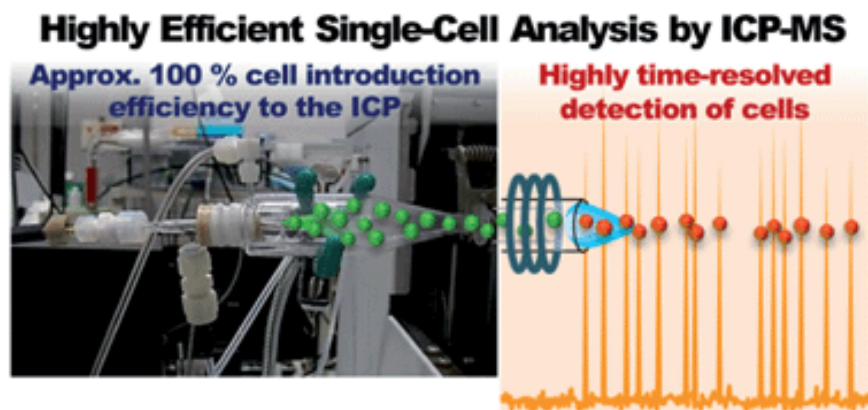
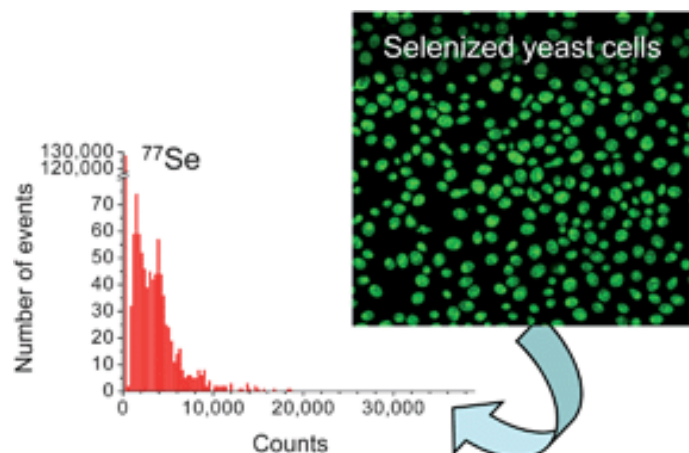
[*J. Anal. At. Spectrom.*, 2014,29, 1598-1606](#)

細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマに放り込めるツールは完成した？

産総研 宮下さん&重田さん

1. →完成していません。そもそも、稲垣さんを中心に開発しているネブライザーは、「細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマに放り込む」ことを狙っていないため、プラズマに導入される細胞の間隔は異なっています。その代りに、細胞濃度の最適化(互いに重なり合わない濃度に調製)と、検出システムの時間分解能の向上(互いの間隔が近くてもそれぞれを区別して検出できるだけの短い積分時間設定の実現)を達成したことで、一細胞分析が可能になっています([J. Anal. At. Spectrom., 2014,29, 1598-1606](#))。
2. 一方、重田さんらが開発されたドロプレットジェネレーターは、原理上、「細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマに放り込む」ことになりすし、それを達成されています([J. Anal. At. Spectrom., 2013,28, 646-656](#))。
3. ドロプレットジェネレーションによるプラズマへの細胞導入については、マイクロチップの活用例があります([Anal. Chem., 2014, 86 \(12\)](#), pp 6012–6018)。彼らの論文に基づき、「1) 何Hz(何秒間隔で細胞を導入できるのか)」に回答するのであれば、90 Hz～300 Hzです。

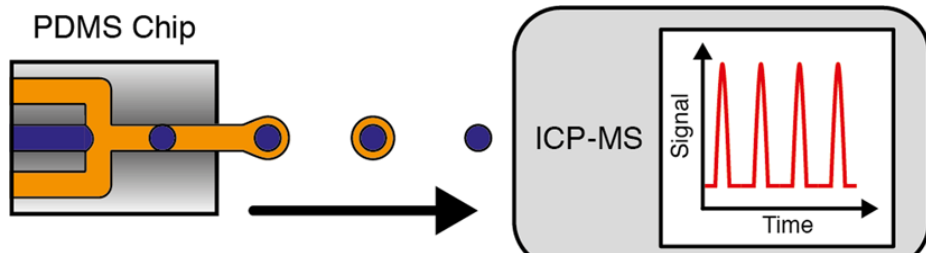
細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマに放い込めるツールは完成した？



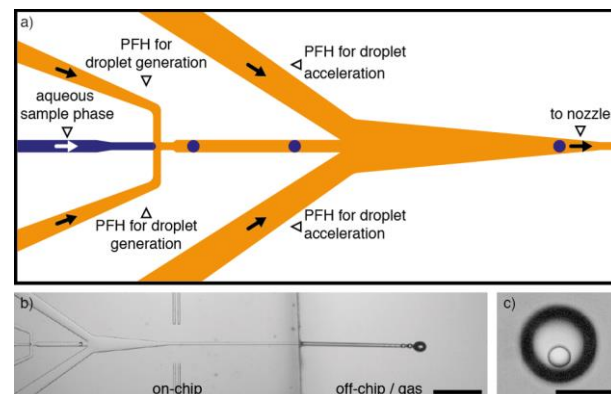
[J. Anal. At. Spectrom., 2013,28, 646-656](#) [J. Anal. At. Spectrom., 2014,29, 1598-1606](#)

ドロップレット(液滴)に1個 細胞が入っていればいいな～

質量分析計の時間分解能を上げればなんとかなるだろー



[Anal. Chem., 2014, 86 \(12\), pp 6012–6018](#)

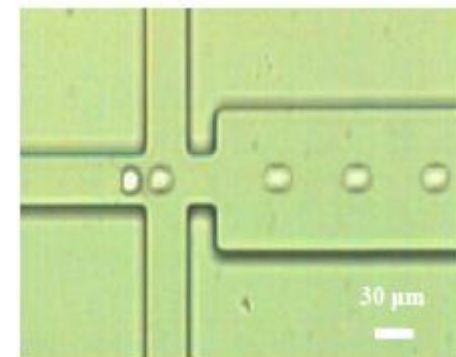
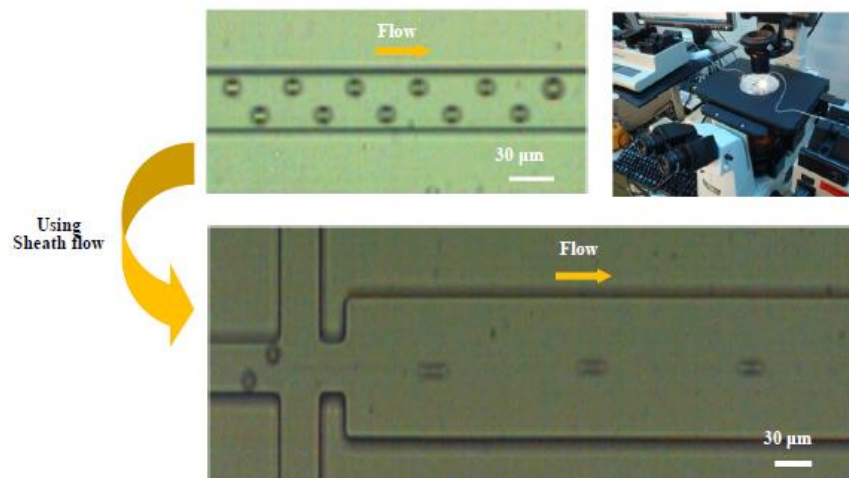
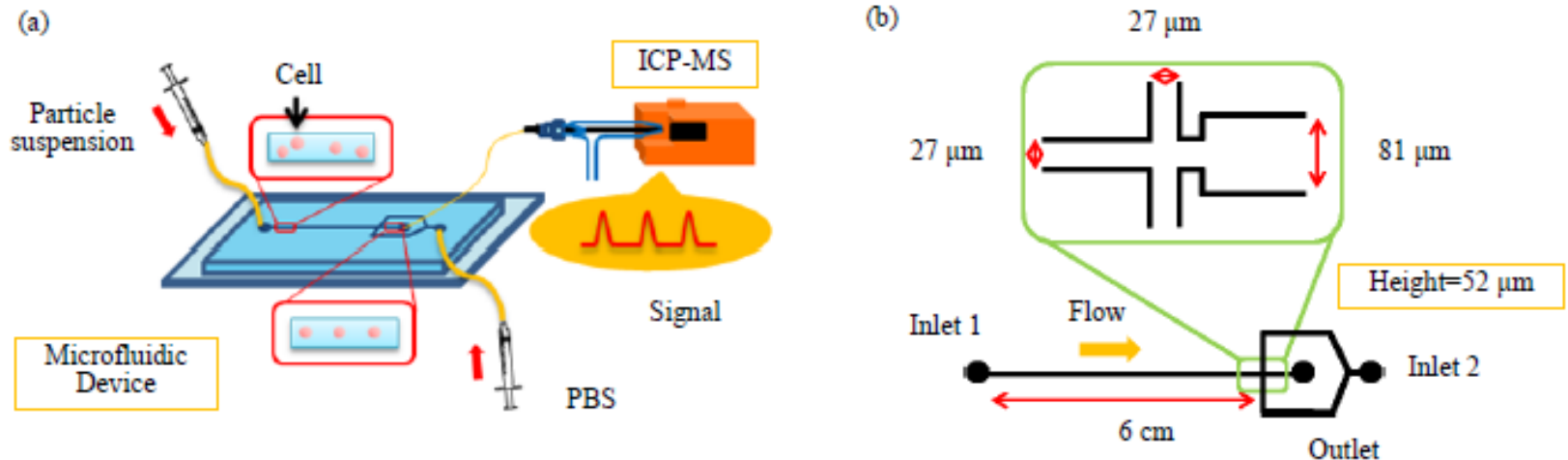


細胞を規則正しく整列させてゆっくいと送液するデバイスの開発

Micro Total Analysis Systems 2012, 2012, 767-769.

DETECTION OF METALLIC ELEMENTS IN A SINGLE CANCER CELL USING MICROFLUIDIC DEVICES COUPLED WITH ICP-MS

Yoshiyuki Miyazaki^{1,2}, Takao Yasui^{1,2}, Kazumi Inagaki³, Yukihiro Okamoto², Noritada Kaji^{1,2},
Tomonari Umemura¹, Manabu Tokeshi^{2,4}, and Yoshinobu Baba^{1,2,5}

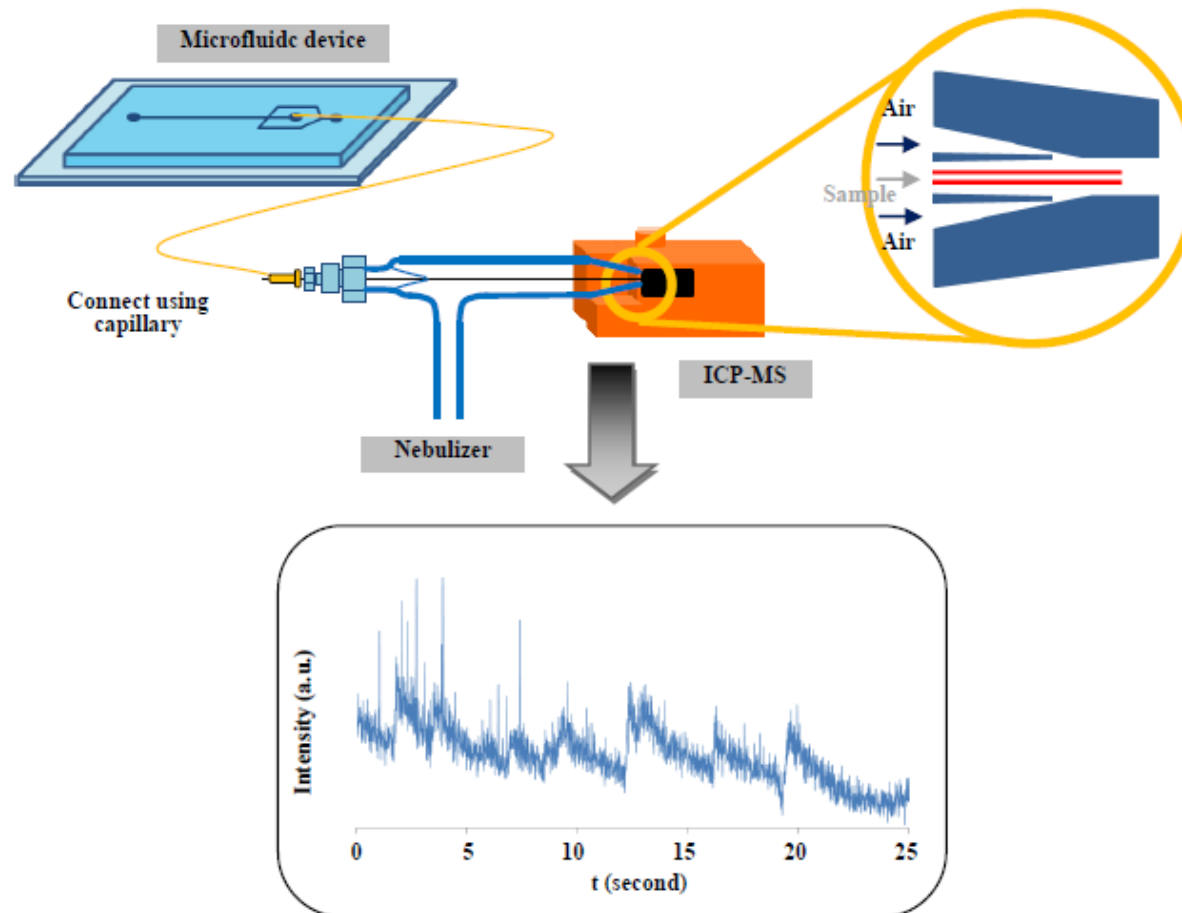


細胞を規則正しく整列させてゆっくいと送液するデバイスの開発

Micro Total Analysis Systems 2012, 2012, 767-769.

DETECTION OF METALLIC ELEMENTS IN A SINGLE CANCER CELL USING MICROFLUIDIC DEVICES COUPLED WITH ICP-MS

Yoshiyuki Miyazaki^{1,2}, Takao Yasui^{1,2}, Kazumi Inagaki³, Yukihiro Okamoto², Noritada Kaji^{1,2},
Tomonari Umemura¹, Manabu Tokeshi^{2,4}, and Yoshinobu Baba^{1,2,5}

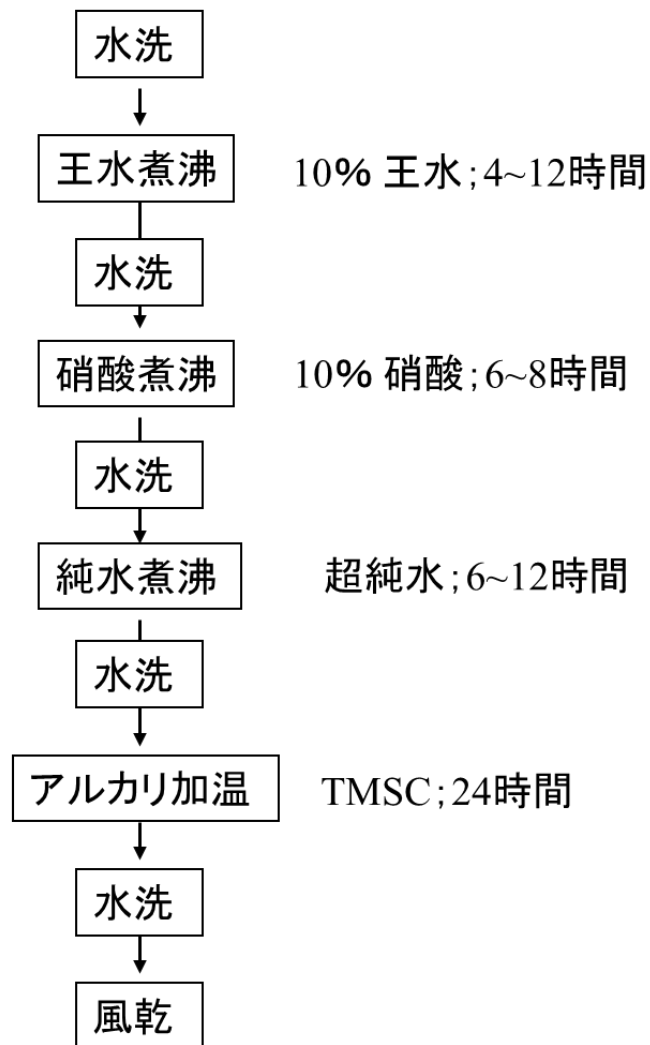


10 Hzぐらいで1つずつ細胞を送れてる！？

Q4)汚染を避けるためには容器の洗浄や保存でどのようなことに気をつけるべきですか。

器具洗浄

酸洗浄の例
(テフロン容器)



An example of Cleaning procedure

Polymer cleaning procedure

- Clean any residue from the polymer
 - Rinse with DDI water
 - Place in or fill with 1:4 HCl for at least 1 week
 - Rinse with DDI water
 - Place in or fill with 1:4 HNO₃ for at least 1 week
 - Rinse with DDI water
 - Dry in clean air environment
-

(引用元不明)

Teflon cleaning procedure

- Clean any residue from the Teflon
 - Rinse with DDI water
 - Place in 1:1 HCl acid bath (80-90°C) for at least 4h
 - Rinse with DDI water
 - Place in 1:1 HNO₃ acid bath (80-90°C) for at least 4h
 - Rinse with DDI water
 - Dry in clean air environment
-

(引用元不明)

容器は洗浄してから使用すべし

ガラス器具（ppb以下の使用不可）
プラスチック容器・石英製品について

- 2～3N の硝酸に浸漬－蒸留水洗浄
原子吸光・ICP 発光分析一般
徹底洗浄後の保存
- 加熱硝酸で煮沸
新品の器具洗浄（テフロン以外のプラスチックは煮沸不可）
顕著な汚れが見られるとき
- 加熱王水で煮沸（石英製品）
- 濃硝酸を少量、軽くフタをして常時加熱（テフロン容器）
- 徹底洗浄（全10日間の工程）
アルカリ洗剤－アセトン－熱濃硝酸－熱希硝酸

適切な洗浄がされないと正しい分析値、低いバックグラウンドは得られない

Q5)どんな場合にクリーンルームが必要になるのですか。

A)基本的に「超微量分析」と呼ばれるppt(pg/g)レベル以下の分析値が必要な時には、環境からの汚染を抑えるために「クリーンルーム」での前処理、場合によっては機器分析が必要になります。

主な用途としては、

- ・半導体関連材料（石英・シリコン）表面不純物分析
- ・高純度金属（5N以上）、セラミックスの微量不純物分析
- ・薄膜中不純物の深さ方向分析
- ・超純水、高純度試薬、ウェハ洗浄液中の陽イオン、陰イオン、微粒子、有機物分析
- ・高純度容器・材料からの溶出試験
- ・クリーンルームの雰囲気分析

汚染源の主なものとしては

- ・試薬
- ・分解容器
- ・保存容器
- ・測定者（化粧品、制汗剤、整髪剤）

クリーンルーム分析における汚染源の原因となる物質の分析事例

表1. 吸着マットに吸着された金属元素

元 素	ng/cm ²	元 素	ng/cm ²
Fe	1800	Mn	28
Na	1500	Cr	27
Ca	930	Sr	22
Zn	870	B	15
Al	400	Cd	<10
Mg	260	Co	<10
Si	200	Li	<10
Cu	81	Bi	<10
Ni	73	Mo	<10
Ba	58	V	<10
Pb	49	Be	<10
K	33		

表3. 容器成型前のPFA粉末に含まれる金属不純物測定例

元素	ng/g	元素	ng/g
Al	7	Li	<5
Ba	<5	Mg	28
Ca	110	Mn	<5
Cd	<5	Na	22
Co	<5	Ni	5
Cr	21	Pb	<5
Cu	6	Sr	<5
Fe	23	Tl	<5
Ga	<5	V	<5
K	<5	Zn	9

Q6) <ホウ素のメモリー効果について>

現在、ICP-MSでガス試料中のホウ素の分析を行っているのですが、ホウ素のベースラインシグナルが下がりにくく、困っています。溶液試料であれば、洗浄液が使えるのですが、ガス試料の分析では、どのような洗浄方法が有効であるか、お教えいただけませんか。

ガス分析の詳細な内容がわかりませんので、十分な回答わかりませんが、下記に示します。

実際に、溶液を噴霧させた場合のBのメモリーは他の元素と比較し、大きい為、**サンプル間の洗浄を十分に行う**必要があります。

必要以上に高濃度の標準液を流さないことやわかる限り濃度の低いものから測定するなどが一般的な対策法となります。

一方、一般的にはガスで導入した場合、水溶液のような大きなメモリーは起こりにくいのではないかと思います。

もしも、メモリーということであれば**洗浄方法はBを含まないガスを導入し、ブランクレベルまで下がるまで洗浄すること**、つまり、溶液と同じだと思います。

今回のガスの導入方法についての詳細がわかりませんが、ガラス管のようなものを加熱し、導入しているのであれば、そこから出てくるBによりブランク値は高くなります。

メモリー効果は、サンプルまたは標準ガスを流す前には低く、流した後に下がらないということで、このような場合、前述のようにブランクガスにより洗浄することだと思います。

しかし、最初から、ブランク値が高いということであれば、導入系（システム）に問題があり、Bの分析用に対応したものかを確認する必要があると思います。

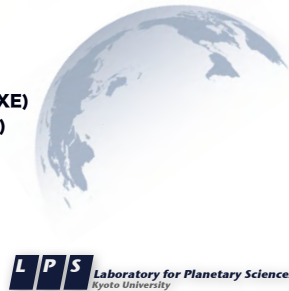
ある程度は、導入系の材質を変更するなど改善されると思いますが、それが可能か（市販されているか）です。



固体試料の直接分析に関して、他の元素分析装置と性能（感度や必要試料量、対象元素数、空間分解能など）の違いを比較しながらICP-MSのメリットを教えてください

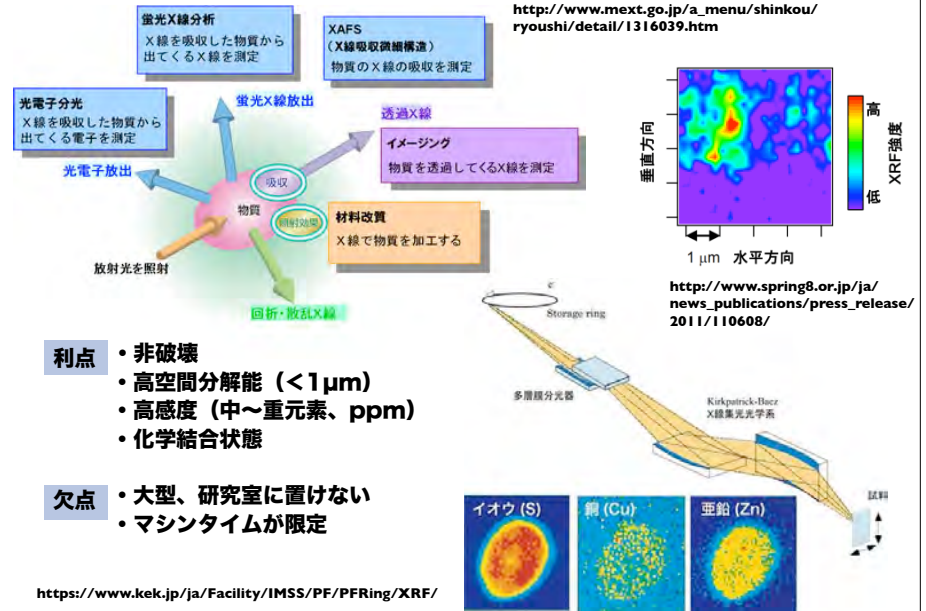
Outline

1. SR-MicroXRF (SRXRF)
2. Electron Probe Micro Analyser (EPMA)
3. Laser Induced Breakdown Spectrometry (LIBS)
4. Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS)
5. Particle-Induced X-ray Emission Spectroscopy (PIXE)
6. Laser Ablation-ICP-Mass Spectrometry (LA-ICPMS)

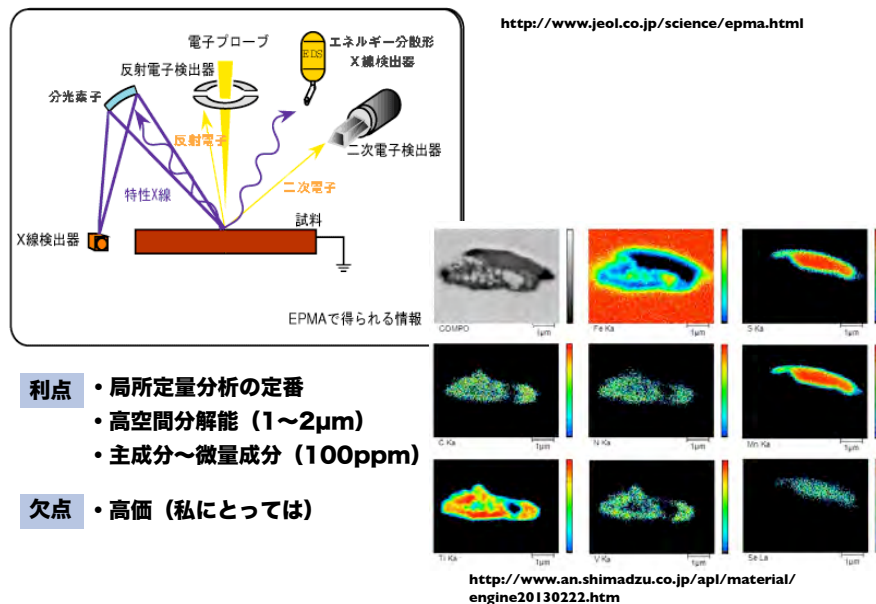


平田岳史 (京都大学大学院理学研究科)
 E-mail: hrt1@kueps.kyoto-u.ac.jp

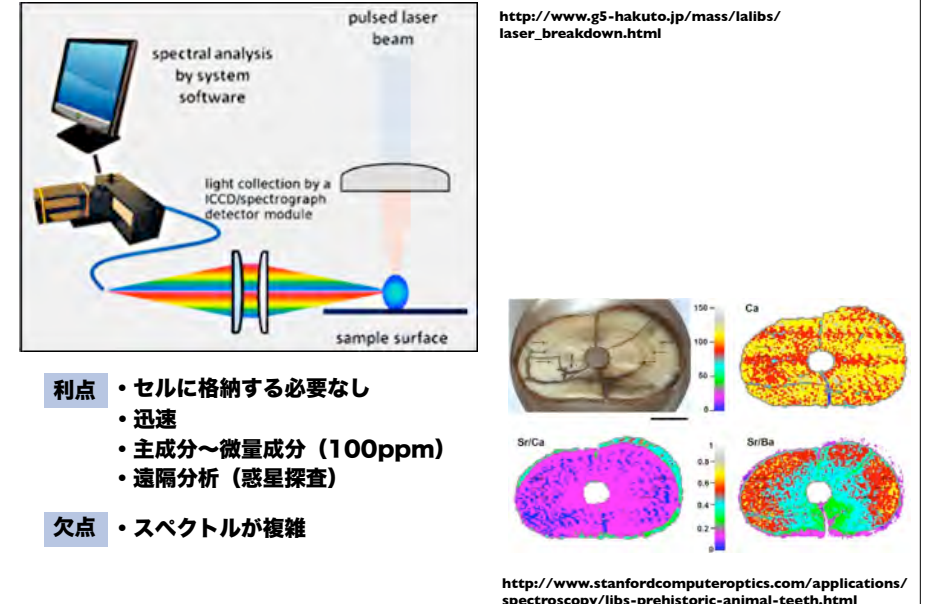
放射光蛍光X線分析 (SRXRF)



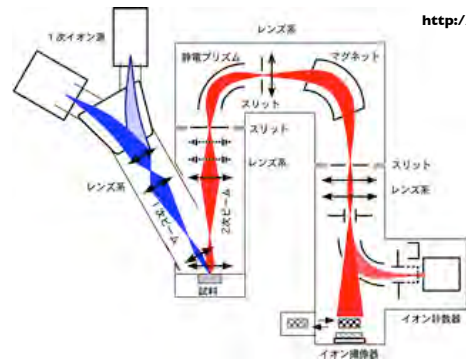
電子線マイクロプローブ (EPMA)



レーザーブレークダウン分光装置 (LIBS)



二次イオン質量分析計 (SIMS)

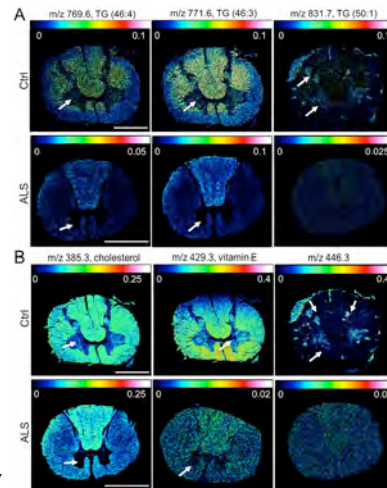


<http://iil.cris.hokudai.ac.jp/facilities.cgi>

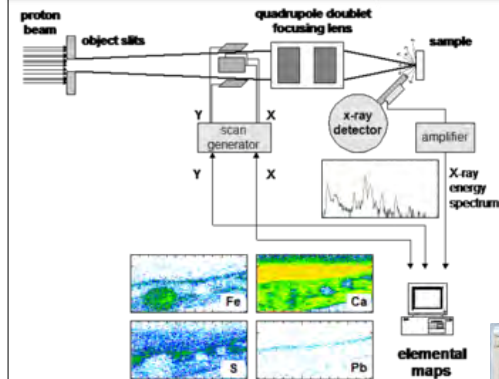
- 利点**
- ・高空間分解能 (0.1 μ m)
 - ・主成分～微量成分 (1ppm)
 - ・stigmatic (顕微鏡)

- 欠点**
- ・マトリックス効果大
 - ・装置が高価 (私にとっては)

<http://www.nature.com/srep/2014/140612/srep05266/full/srep05266.html>



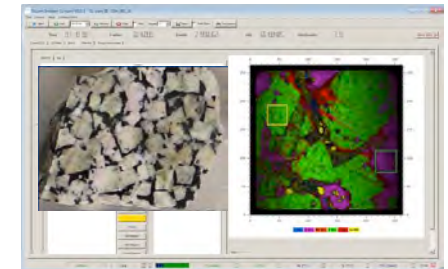
マイクロ粒子励起X線分析 (Micro-PIXES)



<http://www.irb.hr/eng/Research/Divisions-and-Centers/Division-of-Experimental-Physics/Laboratory-for-ion-beam-interactions/Nuclear-microprobe>

- 利点**
- ・高空間分解能 (1 μ m)
 - ・主成分～微量成分 (1ppm)
 - ・絶対定量 (標準物質不要)

- 欠点**
- ・装置が大型・高価

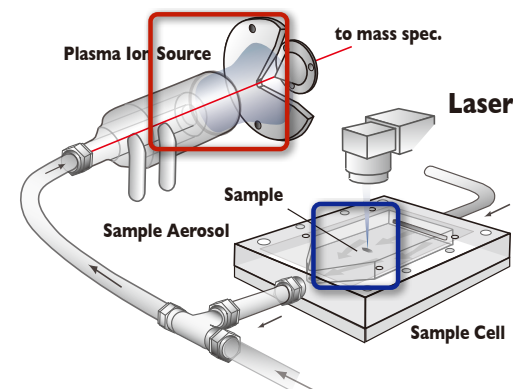


<http://slideplayer.com/slide/2869769/>

Laser Ablation-ICP-Mass Spectrometry

Coupling of laser ablation sampling technique with ICP-mass spectrometry for direct, sensitive and versatile elemental analysis

レーザーアブレーションICP質量分析法 (LA-ICPMS)



Sampling (Laser Ablation)

- Hard or Soft Sampling
- Various Drilling Rate



Hard Ionization

- Higher Ionization Efficiency
- Simpler Mass Spectrum
- Smaller Matrix Effect

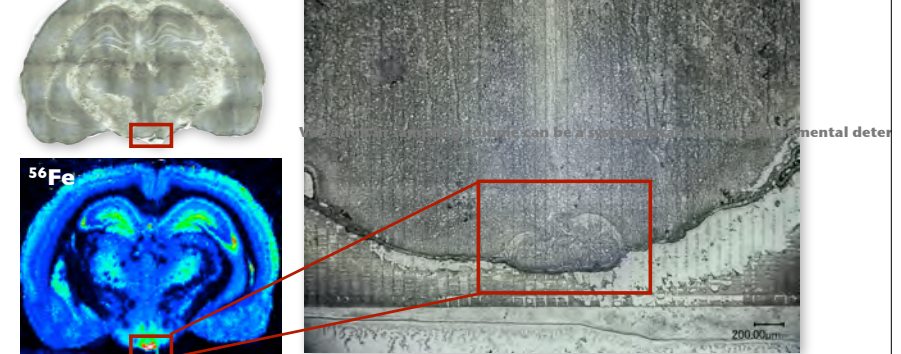
- 特長**
- ✓ 大気圧なので電子密度、励起温度が高い
 - ✓ 多元素同時イオン化、低マトリックス効果
 - ✓ 大気圧なので様々な試料導入法が適用可能

高いイオン化能力：周期表の多くの元素を同時にイオン化できる

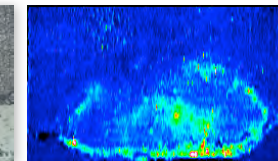
Elements being ionised >90% based on Saha-Langmuir Equation (Niu and Houk, 1996)																		He														
H											B		C	N	O	F	Ne															
Li	Be											Al		Si	P	S	Cl	Ar														
Na	Mg											Ga		Ge	As	Se	Br	Kr														
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	In	Sn	Sb	Te	I	Xe															
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn														
Cs	Ba		Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn															
Fr	Ra		Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Uut	Fl	Uup	Lv	Uus	Uuo															
																		La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
																		Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

生体試料中の微量元素イメージング分析

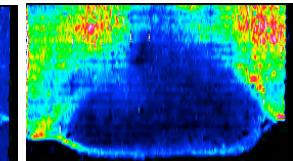
First Ablation (Imaging)



Second Ablation

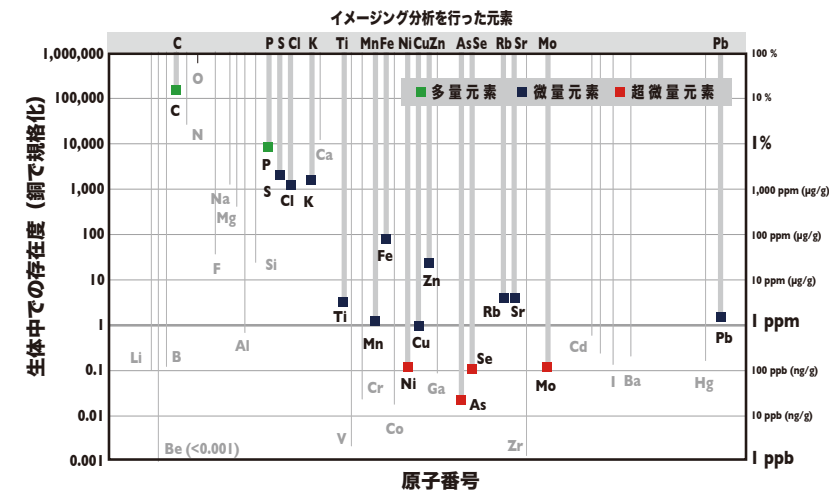


⁵⁶Fe



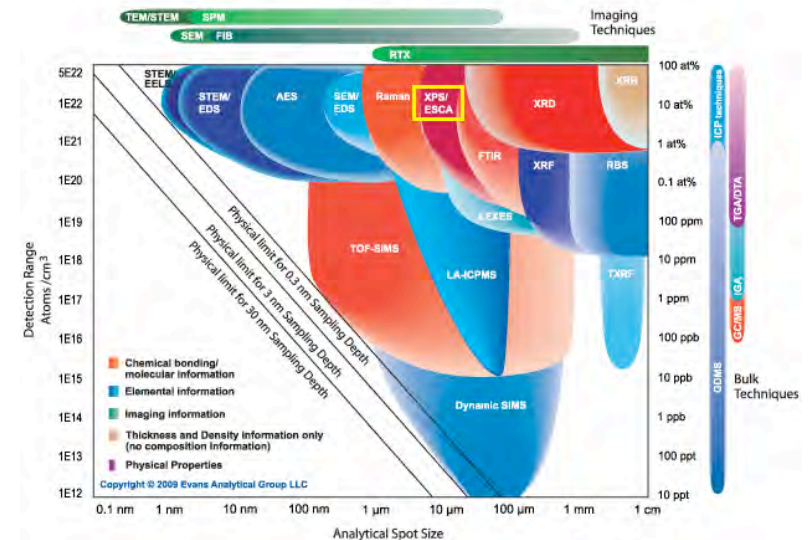
⁶³Cu

生体試料中の元素の存在濃度範囲



空間分解能と感度の比較

Analytical Resolution versus Detection Limit



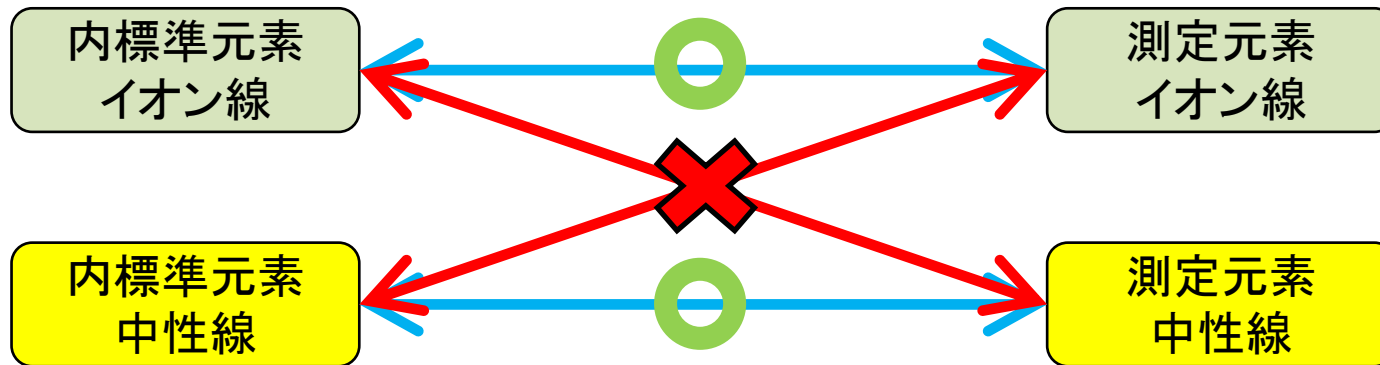
Q8)内標補正に関してですが、いま内標にYを使用して補正しているものからの変更を考えています。そこでYの代わりに使用出来る成分があれば教えて頂きたい。(条件は硝酸酸性の液でYは10mg/L測定成分としてはS,Ca,Mg,Fe,Naの5成分)

Y : 371.029	S : 182.562	Ca : 422.673
Mg : 280.270	Fe : 259.940	Na : 589.592

以上のような波長を使用しています。これまでにSc : 424.682 Cd : 214.439 を使用してみましたが、Y補正值より高目のバイアスを持ちます。完全に一致する事はないとは思いますが。より近いものがあれば。これ以外で使用出来そうな成分・その他の方法などありましたら御教え下さい。

A)回答は次スライド

ICP-AESにおける内標準法と波長選択



内標準元素

Y 371.029 nm イオン線
Sc 424.682 nm イオン線
Cd 214.439 nm イオン線

測定元素

S 182.562 nm 中性線
Ca 422.673 nm 中性線
Mg 280.270 nm イオン線
Fe 259.940 nm イオン線
Na 589.592 nm 中性線

Ca 317.933 nm イオン線

Yの中性線、S・Naのイオン線 → 適当なスペクトル線が存在しない。

イオン線

Y ⇔ Ca, Mg, Fe

中性線

Sc ⇔ S, Na

内標準元素と測定元素の挙動が全く一致することは無い。
感度に余裕があれば、希釈・マトリックマッチングなどで、干渉の低減を図ることが望ましい。