

HPLC-MS によるヒ素、セレン及びクロムのスペシエーション

群馬大学大学院理工学府 森 勝伸

1. はじめに

生体、水、土壤に含まれる元素は、存在する周辺の状態や共存化学種の組成等、複雑な干渉を受け、様々な化学形態で存在することが知られている。一般に、元素が水や土中でどのような形態で存在しているかを判断する方法には化学形態別分析（スペシエーション）がある。その中でよく取り上げられる元素としては、クロム (Cr^{III} , Cr^{VI}), ヒ素 (As^{III} , As^{V}), セレン (Se^{IV} , Se^{VI}), 水銀 (Hg^0 , Hg^{II}) 等があり、いずれも取りうる化学形態によって生体内への影響が大きく異なる。過去、これらの元素のスペシエーションは、バッチによる抽出と吸光光度法による測定により行ってきたが、ここ10年は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC), イオンクロマトグラフィー, ガスクロマトグラフィー等により分離した後、オンラインで誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) や ICP 発光光度分析 (ICP-AES) 等で高感度検出する方法が一般的になりつつある。

例えば、Elsevier の検索サイト Science Direct とアメリカ化学会の検索ページにおいて、“Chromatography”, “MS”, “Speciation” をキーワードに調べると、2012–2014 年の3年間だけでも1 000 報以上の論文がヒットする。その分野も化学や環境の他に、食品、生物、農学、医学等、多岐に渡る。分析対象とする元素は、ヒ素が最も多く（約400 報）、その内訳は、2012 年において、食品（25%）、尿、血液、細胞等の生体試料（18%）、土壌、底質等の固体試料（15%）の順となっていた[1]。また、クロムの場合は、公定法にもなっている Cr^{VI} の吸光光度分析との同定 [2] に、セレンの場合は、生体内での代謝経路の解明と共に化学形態別の毒性評価 [3] に、HPLC-MS が用いられることが多い。

当然上記の元素以外にも化学形態によって生態系に対する影響は異なることから、迅速かつ高精度なスペシエーション法の開発は、我々の生活を守る上でも欠かすことのできない研究項目となっている。

本稿では、HPLC-MS によるヒ素、セレン、クロムのスペシエーションに関して、最近3 か年での傾向を述べ、今後予測される傾向について概説する。

2. HPLC-ICP-MS によるスペシエーション

上述のように、ヒ素、セレン、クロムのスペシエーションでは、HPLC-ICP-MS (図1) が一般化し始めている [4–6]。これは HPLC と ICP-MS が共に装置の高度化や小型化が進み、まだ高価ではあるが、以前よりも購入しやすくなったこと、煩雑な前処理（抽出や濃縮等）を行わなくても高感度に分離定量できること、環境分野とともに医学、薬学、生化学分野での需要が上昇していること等が上げられる。

特に、ある元素が生体内に食物や飲料水の摂取により代謝された後、尿、血液、唾液などにどのような形態で存在しているかを解明する手段に HPLC-ICP-MS を用いた報告が多くなっている。例えば、Bhowmick らは、インドの西ベンガルで生活する唾液を年代別、性別、BMI (体格指標)、喫煙や皮膚障害の有無の別で採取し、その中に含まれるヒ素代謝物の形態別分析を行っている [7]。その結果、皮膚障害を持つ被検者は無機ヒ素に対し有機ヒ素の割合が低く、食物や飲料水に含まれる無機態のヒ素をメチル化し、毒性の低い有機態に変換する能力が低いのが一つの原因ではないかと考察している。また、HPLC-ICP-MS は、ロキサルソンを含む飼料を与えた鶏の肝臓 [8] やヒト尿 [9] のヒ素のスペシエーションにも適応されており、それぞれは分析手法の開発と共に、代謝経路予測やリスク評価から行っている。

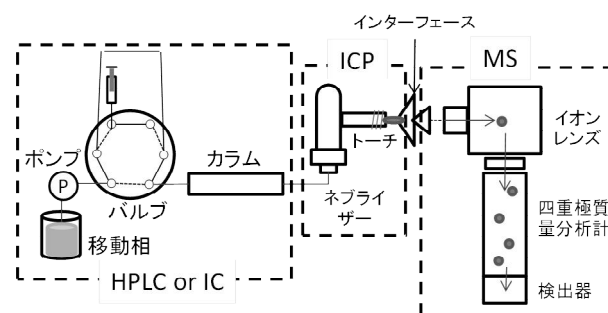


図1 HPLC-ICP-MSシステムの概略図

3. HPLC-ESI-MSによるスペシエーション

HPLC-ICP-MSは、微量元素の分析には有効であるが、ICP-MSが元素分析法であるため、ある元素の代謝反応に関わるタンパク質や標準物質のない未知の化合物を同定することができない。そのため、相補的にHPLC-エレクトロスプレーイオン化(ESI)-MS (いわゆるLC-MS) が利用されている。これは、ESI部のイオン化がマイルドなため、タンパク質や未知の化合物をそのままの形態で分析できるからである。例えば、Peng らはHPLC-ICP-MSと共にHPLC-ESI-MSを用い、鶏肝臓中のセレンの生体内の代謝経路の解明を行い、セレンが生体内で共有結合性の代謝物に変換されていることを報告している [10]。また、Preud'homme らは、酵母の増殖過程で合成されるセレン代謝物のスペシエーションにサイズ排除クロマトグラフィーによる前処理、超高速LC (UPLC) による分離、そしてICP-MSとESI-MSによる検出をオンライン化し、セレン代謝物のスクリーニング (ICP-MS) と同定 (ESI-MS) を同時に行う方法を報告している [11]。これは HPLC の分離条

件を変えることなく、ICP-MSとESI-MS両方に導入できる点を有効に活用している。他に、類似した分析として、HPLC-ESI-MS/MSによる海藻（コンブやノリ等）に含まれる*in vitro*での無機態、有機態のヒ素及びアルセノ糖の生物学的利用能（bioavailability）の調査[12]、nano LC-ESI-MSによる組み換えタンパク質の生産やアデノウイルス作製・増幅のための宿主に用いられているHEK293細胞中のセレン含有タンパクの同定[13]等、生物関連物質での報告もある。

このように、試料の種類が多様化し、小分子量の無機態と有機態だけでなく、目的の元素を含むタンパクや糖等の比較的高分子の分析が要求された場合、解析の精度を上げるため、HPLC-ICP-MSとHPLC-ESI-MSとの併用は有効である。

4 キャピラリー電気泳動（CE）-ICP-MS

上述したHPLC及びICの代りとなる分離場としてCEがある。CEを用いる優位点は、注入試料が数十 μ LオーダーのHPLCとICと比べ、数十nLオーダーと格段に少ないこと、カラム効率が高いため高理論段数が得やすいことがあげられる。Liuらは、CEで用いるキャピラリーの先端をESIのスプレー部に差し込み、これをインターフェースとしてICP-MS部に接続し、ヒ素及びセレンの同時スペシエーションに適用した（図2）[14,15]。これにより、HPLCに比べ高理論段（～数万段）及び高速分離（ヒ素化合物であれば6分程度）が可能となり、試料導入手量21.5 nLに対するヒ素の検出限界は、19–65 fgと極微量の元素を分析できる [14]。また、Kovachevらは、キャピラリーをICP部のスプレーチャンバーとのインターフェースに、10 μ m以下の微細液滴を90%以上で発生できるフローフォーカシングネブライザー（汎用のネブライザーは10%程度）を接続し、微量試料注入量でも高効率に液滴にすることで、 μ g/Lレベルのクロムのスペシエーションを可能にしている [16]。

CE同様に微量注入量で分離分析ができるマイクロチップ電気泳動（ME）によるスペシエーションも報告されている。例えば、Noblittらは、ポリジメチルシロキサンを基板とし、分離部（長さ72 mm、幅70 μ m及び高さ45 μ m）、試料槽、泳動液槽等の流路を設け、pH 4の泳動溶液下で400 V/cmの印加により、2分以内でセレン酸及び亜セレン酸及び無機陰イオン（ Cl^- 、 NO_3^- ）と同時分離に成功している[17]。このときの検出器は導電率を用いているが、マイクロチップの廃液層をキャピラリー等でICPに接続すれば、MSとのオンライン化できる。

なお、2011年以前のCEやMEを分離場にした元素スペシエーションの研究は、2000年頃から数多く報告されており、Timerbaevが総説[18]にまとめているので参照いただきたい。

このように、CEで分離されたイオンをICP-MSあるいはESI-MSにオンラインで導入する技術は、微量試料量かつ

低濃度でも生態系に影響する化学種の挙動解明に大きく貢献できるものと期待できる。

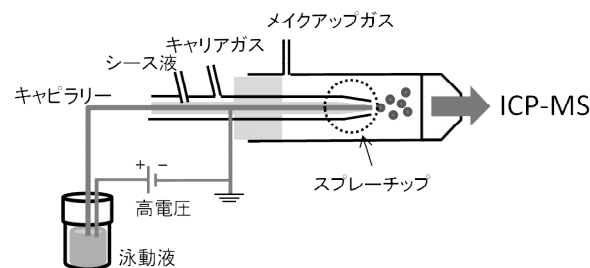


図2 CEとICP-MSとのインターフェースの概略図 [14, 15]

おわりに

上述した報告には、LC及びCEとMSの装置の前後に、試料中のマトリックス除去を目的に固相抽出やサイズ排除クロマトグラフィー等の試料処理システムもオンラインで行っているものが多い。また、対象となる元素は、上述の他に、水銀（ Hg^I 、 Hg^{II} 、メチル水銀及びエチル水銀）[3,19]、アンチモン（主に Sb^{III} 、 Sb^V ）[20]、白金（無機態及び有機結合態）[21]等があり、HPLC-ICP-MSによる元素スペシエーションが一つの研究領域になりつつある。

今後は、複雑な環境中の物質循環や生体内の元素挙動を解明していく上で、複数の元素を同時分析する方法も多くなっていくものと予想する。

参考文献

- [1] M. M. Nearing, I. Koch, K. J. Reimer, *Spectrochim. Acta Part B*, **99**, 150 (2014).
- [2] B. Markiewicz, I. Komorowicz, A. Sajnog, M. Belter, D. Baralkiewicz, *Talanta*, **132**, 814 (2015).
- [3] W. Maher, F. Krikowa, M. Ellwood, S. Foster, R. Jagtap, G. Raber, *Microchem. J.*, **105**, 15 (2012).
- [4] J. Sun, L. Ma, Z. G. Yang, L. Wang, *J. Sep. Sci.*, **37**, 1944 (2014).
- [5] T. Ukena, E. Matsumoto, T. Nishimura, J. C. S. Harn, C. A. Lee, L. Rojanapantip, N. Mayteyongpiriya, K. Suthilucksanavanish, Y. Yamada, *J. AOAC Int.*, **97**, 946 (2014).
- [6] Z. Nie, L. N. Zheng, W. Y. Feng, C. L. Liu, *Anal. Methods*, **6**, 8380 (2014).
- [7] S. Bhowmick, D. Halder, J. Nriagu, D. N. G. Mazumder, G. Roman-Ross, D. Chatterjee, M. Iglesias, *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 6973 (2014).
- [8] S. D. Conklin, N. Shockey, K. Kubachka, K. D. Howard, M. C. Carson, *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 9394 (2012).
- [9] B. B. Chen, B. Hu, M. He, X. J. Mao, W. Q. Zu, *J. Chromatogr. A*, **1227**, 19 (2012).
- [10] H. Peng, B. Hu, Q. Liu, Z. Yang, X. Lu, R. Huang, X. Li, M. J. Zuidhof, X. C. Le, *J. Chromatogr. A*, **1370**, 40 (2014).
- [11] H. Preud'homme, J. Far, S. Gil-Casal, R. Lobinski, *Metallomics*, **4**, 422 (2012).
- [12] C. Garcia-Sartal, S. Taebunpakul, E. Stokes, M. d. C. Barciela-Alonso, P. Bermejo-Barrera, H. Goenaga-Infante,

- Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 3359 (2012).
- [13] K. R. Chitta, J. A. Landero-Figueroa, P. Kodali, J. A. Caruso, E. J. Merino, *Talanta*, **114**, 25 (2013).
 - [14] L. H. Liu, B. He, Z. J. Yun, J. Sun, G. B. Jiang, *J. Chromatogra. A*, **1304**, 227 (2013).
 - [15] L. H. Liu, Z. J. Yun, B. Yun, G. B. Jiang, *Anal. Chem.*, **86**, 8167 (2014).
 - [16] N. Kovachev, M. Á. Aguirre, M. Hidalgo, K. Simitchiev, V. Stefanova, V. Kmetov, A. Canals, *Microchem. J.*, **117**, 27 (2014).
 - [17] S. D. Noblitt, L. C. Staicu, C. J. Ackerson, C. S. Henry, *Anal. Chem.*, **86**, 8425 (2014).
 - [18] A. R. Timerbaev, *Chem. Rev.* **113**, 778 (2013).
 - [19] H. Cheng, C. Wu, L. Shen, J. Liu, Z. Xu, *Anal. Chim. Acta*, **828**, 9 (2014).
 - [20] S. L.C. Ferreira, W. N.L. dos Santos, I. F. dos Santos, M. M.S. Junior, L. O.B. Silva, U. A. Barbosa, F. A. de Santana, A. F. de S. Queiroz, *Microchem. J.*, **114**, 22 (2014).
 - [21] A. Martinčič, M. Cemazar, G. Sersa, V. Kovač, R. Milačič, J. Ščančar, *Talanta*, **116**, 141 (2013).