

HPLC/ICP-MSによる化学形態別分析と 多元素同時分析への利用

元素が持つ毒性の評価や生体内での代謝経路を明らかにするためには化学形態別分析が必要である。本稿では、化学形態別分析法として広く利用されているHPLC/ICP-MSの特徴を述べるとともに、環境学分野やメタロミクス分野の化学形態別分析によって得られている知見を紹介する。また、複数の元素を同時に測定する多元素同時化学形態別分析についても解説する。

岡 林 識 起

1 はじめに

地球上には様々な元素があり、生物や植物はそれらを取り込み、利用し、代謝して生きている。元素の中には生体に対して毒性を発現するようなものもあり、そのような元素の人為的な排出は環境に悪影響を与える可能性もある。そのような観点から、従来、元素が持つ毒性や生物学的利用能、代謝経路などが研究されてきており、生物、植物、環境水など様々な物質の元素濃度が測定されてきた。しかし、最近では、元素の毒性や生物学的利用能、代謝経路はその元素の化学形態と密接に結びついていることがわかってきている。そのため、元素濃度が同じであっても、各化学形態の存在割合が異なれば、生体や環境に与える影響が変化する可能性がある。すなわち、元素がもたらす生体への健康リスクや環境への影響を評価するためには、元素濃度測定だけでは不十分であり、その化学形態を知る必要がある。

近年、元素の化学形態別分析手法として広く使用されている手法の一つに、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) による化学形態分離と、誘導結合プラズマ質量分析法 (inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS) による高感度元素検出を組み合わせた HPLC/ICP-MS がある。この手法では化学種ごとの濃度を知ることができる他、HPLC の溶離液の組成を最適化することにより複数元素の化学形態を同時に測定することができるといった特徴がある。本稿では、環境化学やメタロミクス分野などで利用されている HPLC/ICP-MS について概説する。また、多元素同時化学形態別分析に着目し、その最近の動向などを解説する。

2 化学形態分析の必要性

これまでに様々な元素の化学形態別分析が行われているが、ここでは毒性、生物学的利用能、代謝経路の解明に着目し、化学形態別分析により得られている知見を紹介する。

2・1 毒性の評価

ヒ素 (As) は無機態と有機態とで毒性の大きさが異なることが知られている元素である。無機態の As はタンパク質のチオール基と結合することにより酵素の活性を阻害し、肝臓や腎臓の代謝を妨害する。無機態の As は曝露されることにより、皮膚がん、肝臓がん、膀胱がんのリスクが高くなる。特に、三価の無機態 As の毒性が大きいことが知られている。一方で、アルセノベタインなどの多くの有機態 As の毒性は極めて低い¹⁾²⁾。ヒジキやワカメといった海藻をはじめとする海産物中には比較的高濃度の As が含まれているが (~百数十 mg kg⁻¹)、そのほとんどがアルセノベタインのような毒性の低い有機態 As であり、海産物の摂食による As 中毒の例は報告されていない。

水銀 (Hg) もまた、毒性の高い元素として知られており、その化合物は金属水銀、無機水銀、有機水銀に分類される。有機水銀の一つであるメチル水銀は消化管から容易に吸収され、ヒトの神経毒となる。また、金属水銀が蒸発した水銀蒸気を慢性的に吸入すると、震えや認知能力の低下、睡眠障害を引き起こす³⁾。一方で、金属水銀の消化吸収効率は低く、経口的に摂取しても急性毒性が現れる可能性は低い。また、硫化水銀は水に溶けにくく化学的にも安定であり、ほとんど毒性を示さず、皮膚疾患の治療薬として利用されている⁴⁾。

クロム (Cr) は生体必須元素であると考えられてきた元素であり (ただし、近年ではその必須性に疑義が提唱されている⁵⁾)、その酸化状態によって毒性が変化す

ることがよく知られている元素である。六価クロム (Cr (VI)) はその強い酸化力によって毒性を発現する。呼吸器系や消化器官にダメージを与える可能性があり、また、皮膚に付着すると皮膚炎を引き起こす。さらに、DNA の損傷作用を持つ発がん性物質でもある。一方で、三価クロム (Cr (III)) はヒトにとってほとんど害はなく、糖代謝の維持や糖尿病の予防を目的としたサプリメントとしても販売されている。

これらの他に、アンチモン (Sb) もその酸化数によって毒性が異なることが知られており、三価の Sb は五価の Sb と比べて 10 倍の毒性を持つとされる⁶⁾。これらの例はすべて、元素が生物に与える毒性の影響を知るためには、その元素の濃度分析だけでなく、化学形態別分析によりどのような化学種がどのような割合で存在しているのかを知る必要があることを示している。

2.2 生物学的利用能の評価

鉄 (Fe) やマンガン (Mn)、銅 (Cu) など様々な元素が生体必須元素として認められているが、セレン (Se) もその一つである。Se は欠乏すると心筋障害や筋力低下などを引き起こす。また、抗酸化作用や抗がん作用があると考えられており、近年注目を集めている元素である。一方で、過剰に摂取することにより神経障害や胃腸障害などを引き起こすことも知られている。また、Se については欠乏症と過剰症の間の至適濃度範囲が狭い⁷⁾⁸⁾。そのため、Se を摂取する際には、元素濃度だけでなく、生体に取り込みやすい化学形態であるかといった化学形態の情報も考慮する必要がある。Se には無機化合物 (セレン酸、亜セレン酸) と有機化合物 (セレノメチオニン、セレノシステイン、セレノシスチンなど) がある。一般に無機化合物の毒性は有機化合物より高いとされている。また、生体への吸収効率は有機態の方が無機態よりも大きく、特にセレノメチオニンは Se の欠乏を防ぐのに効果的であると考えられている。

2.3 代謝経路の解明

生物や植物に取り込まれた元素の化学形態は、その代謝過程において変化していく。三価や五価の As をヒトが摂取した場合、モノメチルアルソン酸やジメチルアルシン酸といった毒性の低い化学形態へと代謝される⁹⁾。一方で、Hg はメチル化されて毒性の高いメチル水銀となる可能性がある¹⁰⁾。また、Se を蓄積しやすいタマネギやニンニクなどの植物中では、無機態の Se が取り込まれるとセレノシステインとなり、さらにメチル化されてメチルセレノシステインとなる¹¹⁾。これらの元素が最終形態に代謝されるまでの中間体については明らかになっていない点も多い。また、代謝過程でどのように生体に取り込まれ、どのように排出されるのかを完全に理解するためには、さらなる化学形態別分析の進展が必要

となる。

3 HPLC/ICP-MS の装置構成

HPLC/ICP-MS の基本的な構成を図 1 に示す。まず、送液ポンプにより溶離液を吸引し、カラムへと送液する。送液ポンプとカラムの間にはインジェクターが接続されており、試料溶液はここからシリンジを用いて注入される。注入された試料溶液は溶離液とともにカラムへと送られる。この際、カラム内の固定相への親和性が大きい成分ほどカラムからの溶出時間が遅くなるため、各成分ごとに溶出時間に差が生じることになる。各成分はカラムから溶出した順にチューブを通して直接 ICP-MS へと導入され、対象元素を測定することになる。HPLC/ICP-MS で実際に得られた As のクロマトグラムを図 2 に示す。

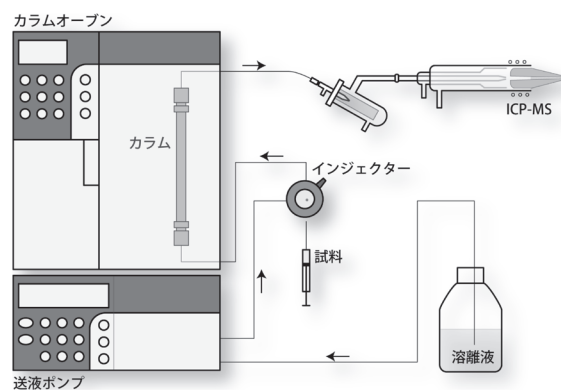


図 1 HPLC/ICP-MS の基本的な構成

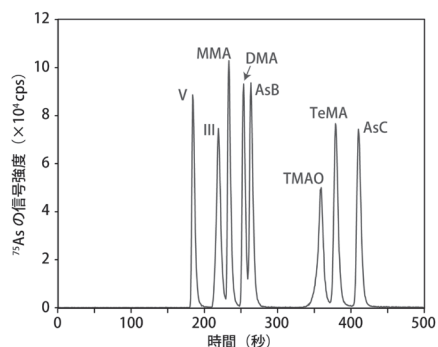


図 2 HPLC/ICP-MS で得られる As のクロマトグラム

V: As (V), III: As (III), MMA: モノメチルアルソン酸, DMA: ジメチルアルシン酸, AsB: アルセノベタイン, TMAO: トリメチルアルシンオキシサイド, TeMA: テトラメチルアルソニウム, AsC: アルセノコリン

3.1 試料溶液の注入

試料溶液の注入には自動のインジェクターとマニュアルインジェクターがある。一般的なマニュアルインジェクターは図 3 のような六方切り替えバルブになっている。試料注入時には、ロード状態にして試料溶液を二

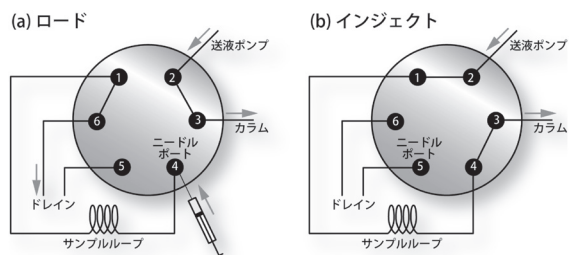


図3 マニュアルインジェクターによる試料溶液の注入

ドルポートから注入する(図3(a)). 注入された試料溶液はサンプルループに導入され、余剰な試料溶液はドレインとして排出される。この時、溶離液は送液ポンプにより直接カラムへと導入されており、試料溶液はサンプルループに留まったままである。次に、インジェクターをインジェクト状態にすると、溶離液がサンプルループを通りようになる(図3(b))。これにより、試料溶液がカラムへと輸送され、化学形態分離が行われる。この時、ニードルポートはドレインへとつながるため、シリンジから溶液が注入されたとしてもカラムには運ばれない。

マニュアルインジェクターによる試料導入では、サンプルループの容量を変えることにより試料の注入量を変えることができる。試料注入量が多ければ信号強度も大きくなるが、カラムの負荷が大きくなるためピーク割れ等が発生する可能性があり、注意が必要である。一般的には、数 μL から数十 μL のサンプルループが使用される。また、使用するシリンジの体積を変えることにより試料注入量を変えることも可能である。試料注入時にシリンジやニードルポート内に試料溶液が残存してしまうと、次の試料の測定時に残存試料がサンプルループに押し込まれてしまい、正確なデータを得られなくなる。そのため、新たな試料を注入する前にシリンジを洗浄するとともに、インジェクト状態でシリンジをニードルポートに挿入し、溶離液等を用いてニードルポートを洗浄する必要がある。

3.2 カラムによる化学形態の分離

HPLC/ICP-MSにおける化学形態の分離に用いられるカラムには様々な種類があるが、よく使用されるものとしてイオン交換カラム(陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム)、逆相カラム、サイズ排除カラムなどが挙げられる。

イオン交換カラムは、固定相としてイオン交換樹脂が充填されたカラムであり、主にイオン性化合物の分離・分析に用いられる(例えば^{12)~14)}。陰イオンと陽イオンの同時分析は困難であるため、分析対象となる化合物の特性に合わせて陰イオン交換カラムか陽イオン交換カラムのどちらかを適切に選択する必要がある。

逆相カラムは最も一般的に使用されているカラムであ

る。固定相として、シリカゲル担体にオクタデシルシリル基のような疎水性の官能基を結合させたものが使用される。また、溶離液(移動相)としてメタノール/水のような比較的極性の高い溶液が使用される。疎水性化合物がカラムに強く吸着されるため、化合物の疎水性の違いにより化学形態の分離が可能となる(例えば¹⁵⁾¹⁶⁾。また、逆相カラムに対して保持力の弱いイオン性化合物の保持力を向上させるために、溶離液にイオン対試薬を添加して用いることがある。

サイズ排除カラムは、分子サイズの違いを利用して化学形態を分離する手法である(例えば¹⁷⁾¹⁸⁾。カラム内の充填剤に細孔が多く存在しており、小さなサイズの分子は細孔の奥まで浸透しながらゆっくりと溶出する。一方で、大きなサイズの分子は細孔の奥まで入りきらないため溶出時間が早くなり、分離が可能となる。

これらのカラムの他に、近年では親水性相互作用クロマトグラフィー(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)カラムが使用されることもある(例えば¹⁹⁾²⁰⁾。HILICカラムは固定相にスルフォベタイン基やホスホリルコリン基といった高極性物質が結合したシリカゲルやポリマーが使用されている。溶離液としては比較的極性の大きいアセトニトリル/水が用いられることが多く、極性化合物を保持しやすい性質を有している。

化合物のピークの溶出時間や形状は、送液ポンプの流速、溶離液の組成やpH、カラム温度により変化する。そのため、新たな分離手法を検討する際にはこれらの値を調整する必要がある。カラム温度が変化すると、多くの場合、温度の上昇とともに保持時間は短くなる傾向がある。そのため、カラムをカラムオープン内に設置し、一定の温度で分析することが望ましい(図1)。

3.3 ICP-MSによる元素の検出

HPLCにおける送液ポンプの流速は $0.5\sim 1.5\text{ mL min}^{-1}$ であることが多いため、カラムから排出された溶離液や試料溶液は、チューブで繋がれたネプライザーへと直接導入することができる。そして、ネプライザーでスプレーチャンパー内に噴霧され、小さなエアロゾル粒子のみが選択的にICPへと導入され、イオン化されることによって測定対象元素が検出される。検出感度は極めて高く、pptオーダーでの測定が可能である。また、ICP-MSは9桁以上の広いダイナミックレンジを持っており、さらに複数元素を同時に測定することができるため、HPLCによる化学形態別分析の検出器として非常に有用である。

ICP-MSで血液や尿などマトリックス元素を多く含む試料を測定する際には、マトリックス効果や多原子分子の干渉が生じる可能性がある。しかし、HPLC/ICP-MSでは試料がカラムを通過する際に、測定対象の元素を含む化学種と、干渉の原因となる元素の溶出時間に差がで

きるため、これらの干渉を低減することが可能である。また、測定対象元素における複数の同位体をモニターすることにより、干渉による影響を確認することができる。

前述のカラムを用いて化学形態を分離する際に、溶離液としてメタノールやアセトニトリルといった有機溶媒が使用されることがある。ICP-MS に有機溶媒を多量に導入すると、不完全燃焼により発生したススがトーチやサンプリングコーン・スキマーコーンの先端部に付着して閉塞を起こし、プラズマの不安定化や ICP-MS の故障を引き起こす可能性がある。これを防ぐために、キャリアガス（アルゴンガス）に少量の酸素を混合することで、ススの燃焼を促し、装置への悪影響を抑えることができる。通常は、キャリアガス流量の 10~20 % の酸素が導入される。

カラムで分離された物質は時間差を持って ICP-MS へと導入される。ここで注意しなければならないのが、ICP-MS はあくまで各物質中の特定の元素（図 2 の例では As）を検出しているにすぎないということである。試料溶液の測定だけでは、クロマトグラム上でピークが出現したとしても、それがどのような構造を持った化合物であるのかを知ることはできない。そのため、各化学種の標準物質を事前に測定し、標準物質の溶出時間と試料測定時に出現したピークの溶出時間を照らし合わせる必要がある。HPLC/ICP-MS の測定では標準物質のない化学種の同定や定量は困難であることから、そのような場合は LC-ESI-MS などを相補的に用いて、化合物の構造を決定することが必要となる。しかし、ICP-MS と LC-MS の検出感度は大きく異なるため、これは決して容易ではない。

また、HPLC/ICP-MS では試料溶液と標準物質との間でのマトリクスの違いに起因する溶出時間の若干の変動が生じる可能性がある。そのため、化合物の同定の際には、試料溶液と標準物質の溶出時間の比較だけでなく、試料溶液への特定の標準物質の添加を行い、対象化合物のピーク面積や高さが增大するかどうかを確認することが有効である（図 4）。

多くの場合、検出された化学種の溶出ピーク面積はその化学種の濃度に比例する。そのため、濃度既知の標準

物質を用いて検量線を作成すれば、各化学種の定量が可能である。ただし、濃度が高すぎる場合は溶出ピークの形状が崩れてピーク割れのような現象が生じることもあるため、どのような濃度範囲で検量線の直線性が保たれるのかを確認しておく必要がある。

4 HPLC/ICP-MS による多元素同時化学形態別分析

HPLC/ICP-MS の多くは一つの元素のみに着目したものである。しかし、複数の元素における化学形態別分析を行いたい場合、それぞれの元素に対する分離法を個別に確立する必要がある。また、測定したい元素の数だけ、同じ試料を用いた分析を何度も繰り返さなければならない。一般的に HPLC/ICP-MS は一度の測定に数十分を要するため、これを何度も繰り返すのには多大な時間と労力を要する。そのため、近年では多元素同時化学形態別分析法の開発と検討が積極的に進められており、分析時間の短縮や試料消費量の削減につながっている。

元素によっては、生体内で他の元素との相互作用によってその毒性や生物学的有用性が変化する可能性がある。これらの元素間での相互作用を解明し、生体へと与える影響を評価するためには、多元素同時化学形態別分析が有用である。例えば、Hg は生体内で細胞を損傷させるが、Se と結合することによりその毒性を著しく低減させることができるのではないかと考えられている。毒性低減の大きさは Se の化学種によって異なることが報告されている²¹⁾²²⁾。また、As と Se は互いの毒性を緩和し合う可能性も指摘されているが、この効果の大きさも元素の化学形態に依存していると考えられている²³⁾。

いくつかの多元素同時化学形態別分析の例を表 1 に示す。多くの先行研究では多元素同時化学形態別分析で測定される元素の数は二つであるが、五つ以上の元素の同時分析の報告例もある²⁴⁾。測定する元素数が増えることにより、溶離液の組成が複雑になる場合もある。多くの場合、単元素化学形態別分析のためにすでに確立されている溶離液組成を基にして、多元素分析用の溶離液組成を検討することになる。Narukawa *et al.* では、As の化学形態別分析用に開発された溶離液に L-システイン

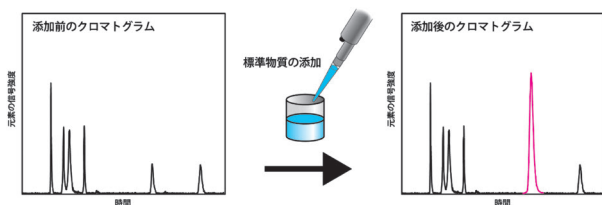


図 4 標準物質の添加による化合物の同定

試料溶液に特定の標準物質を添加することにより、特定のピークのみが増大する。これにより、化合物の同定が可能である。

表 1 HPLC/ICP-MS による多元素同時化学形態別分析の例

測定元素	試料	カラムのタイプ	文献
As, Hg	食用魚油	逆相カラム	25)
As, Se	尿	逆相カラム	27)
As, Se, Cr	環境水	陰イオン交換カラム	28)
As, Se, Pb	ハスの実	逆相カラム	29)
As, Se, Sb, Cr, Mo, V	セメントからの溶出物	陰イオン交換カラム	24)

を添加し、溶離液組成や pH を再調整することで As-Hg の同時化学形態別分析を可能としている²⁵⁾。また、多元素同時化学形態別分析では溶離液と測定化学種との反応に注意を払う必要もある。前述の As-Hg の例では Hg の測定のために L-システインを溶離液に添加しているが、中性-塩基性で L-システインと三価の As が結合し沈殿を生じる可能性があるため、溶離液の pH を酸性に保つ必要がある²⁵⁾²⁶⁾。

5 おわりに

本稿では、環境学分野やメタロミクス分野で利用されている HPLC/ICP-MS を概説するとともに、多元素同時化学形態別分析について簡潔に解説してきた。これまでに様々な生体試料や環境試料の化学形態別分析が行われてきた。近年では ICP-MS の高感度化に伴い、今まで研究対象とされてこなかった極微量元素にも注目が集まり、HPLC/ICP-MS による化学形態別分析を用いてその毒性や代謝経路が研究されている。本解説が、HPLC/ICP-MS を用いた化学形態別分析を行う際の参考になれば幸いである。

文 献

- 1) A. Popowic, Q. Zhang X. C. Le : *Nat. Sci. Rev.*, **3**, 451 (2016).
- 2) M. F. Hughes : *Toxicol. Lett.*, **133**, 1 (2002).
- 3) K. M. Rice, E. M. Walker, M. Wu, C. Gillette, E. R. Blough : *J Prev Med Public Health*, **47**, 74 (2014).
- 4) J. Liu, J.-Z. Shi, L.-M. Yu, R. A. Goyer, M. P. Waalkes : *Exp Biol Med (Maywood)*, **233**, 810 (2008).
- 5) J. B. Vincent : *Proc. Nutr. Soc.*, **63**, 41 (2004).
- 6) M. Krachler, H. Emons, J. Zheng : *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **20**, 79 (2001).
- 7) E. M. Alissa, S. M. Bahijri, G. A. Ferns : *Med. Sci. Monit.*, **9**, (2003).
- 8) L. H. Foster, S. Sumar : *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **37**, 211 (1997).
- 9) C.-H. Tseng : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **235**, 338 (2009).
- 10) H. Li, X. Lin, J. Zhao, L. Cui, L. Wang, Y. Gao, B. Li, C. Chen, Y.-F. Li : *Bull Environ Contam Toxicol*, **102**, 597 (2019).
- 11) P. J. White : *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **1862**, 2333 (2018).
- 12) K. Müller, B. Daus, J. Mattusch, H.-J. Stärk, R. Wennrich : *Talanta*, **78**, 820 (2009).
- 13) J. A. Day, M. Montes-Bayón, A. P. Vonderheide, J. A. Caruso : *Anal Bioanal Chem*, **373**, 664 (2002).
- 14) J. J. Sloth, E. H. Larsen, K. Julshamn : *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 452 (2003).
- 15) T. Narukawa, K. Chiba, S. Sinaviwat, J. Feldmann : *J. Chromatogr. A*, **1479**, 129 (2017).
- 16) Y. Shibata, M. Morita : *Anal. Sci.*, **5**, 107 (1989).
- 17) K. Sommer, M. Sperling, U. Karst : *Chemosphere*, **300**, 134528 (2022).
- 18) M. H. M. Klose, A. Schöberl, P. Heffeter, W. Berger, C. G. Hartinger, G. Koellensperger, S. M. Meier-Menches, B. K. Keppler : *Monatsh Chem*, **149**, 1719 (2018).
- 19) P. Hemström, K. Irgum : *J. Sep. Sci.*, **29**, 1784 (2006).
- 20) M. Birka, C. A. Wehe, L. Telgmann, M. Sperling, U. Karst : *J. Chromatogr. A*, **1308**, 125 (2013).
- 21) L. Magos, T. W. Clarkson, S. Sparrow, A. R. Hudson : *Arch Toxicol*, **60**, 422 (1987).
- 22) F. Moreno, T. García-Barrera, J. L. Gómez-Ariza : *Analyst*, **135**, 2700 (2010).
- 23) I. Zwolak, H. Zaporowska : *Cell Biol Toxicol*, **28**, 31 (2012).
- 24) M. Mulugeta, G. Wibetoe, C. J. Engelsens, W. Lund : *J. Chromatogr. A*, **1217**, 6186 (2010).
- 25) T. Narukawa, T. Iwai, K. Chiba : *Talanta*, **210**, 120646 (2020).
- 26) D. Zhang, S. Yang, H. Cheng, Y. Wang, J. Liu : *Talanta*, **199**, 620 (2019).
- 27) F. Pan, J. F. Tyson, P. C. Uden : *J. Anal. At. Spectrom.*, **22**, 931 (2007).
- 28) Y. Martínez-Bravo, A. F. Roig-Navarro, F. J. López, F. Hernández : *J. Chromatogr. A*, **926**, 265 (2001).
- 29) D. Zhang, S. Yang, Q. Ma, J. Sun, H. Cheng, Y. Wang, J. Liu : *Food Chemistry*, **313**, 126119 (2020).



岡林 識起 (Satoki OKABAYASHI)

関西学院大学生命環境学部 (〒669-1330 兵庫県三田市学園上ヶ原1番)。京都大学大学院。博士 (理学)。《趣味》日本酒、旅行。

E-mail : s-okabayashi@kwansei.ac.jp