

# Agilent 8800 ICP-QQQ を用いた 非対称フロー FFF-MALS-ICP-QQQ による シリカナノ粒子の定量特性解析

## アプリケーションノート

材料、環境、食品

### 著者

Federica Aureli, Marilena D'Amato, Andrea Raggi, Francesco Cubadda, Istituto Superiore di Sanità - Italian National Institute of Health, Rome, Italy

Paolo Scardina, Peter Planitz and Sébastien Sannac, Agilent Technologies



### はじめに

合成非晶質シリカ (SAS) は、最も広く用いられているナノ材料の1つです。また、認証された食品添加物であり、ポリマー、塗料、布地から歯磨き粉、洗剤、化粧品に至るまでの幅広い産業製品および一般消費材にも含まれています。シリカナノ粒子 (NP) は、医学における診断、治療など多様なアプリケーションにおいても大きな可能性を秘めています [1]。

シリカ NP は長い間使用されてきましたが、人の健康や環境に対して長期的にどのような影響を与えるのかについては、十分には解明されていません。NP の同定、特性解析、定量を実行できる分析メソッド、および測定の品質保証用の参照物質の開発の必要性がますます高まっています [2, 3]。



Agilent Technologies

ナノ製品の品質とコンプライアンスを管理し、ナノ材料の安全性を評価できるようにするためには、今後予定されている規制に対応するメソッドが必要です [4]。合成非晶質シリカは食品中に存在するため、最新のリスク評価では人の健康に長期的に与える影響についての懸念が高まっており、詳細な調査を実施する必要に迫られています [5]。

フィールドフローフラクショネーション (FFF) を元素および粒子サイズの検出器と組み合わせることは NP の分離と特性解析における有望なアプローチですが [6]、ナノシリカにはほとんど適用されてきませんでした。この研究では、非対称フロー FFF (A4F)、多角度光散乱 (MALS)、およびシリカ検出にトリプル四重極 ICP-MS (ICP-QQQ) をオンラインで連結することにより、シリカ NP の定量特性解析を実施しました。Agilent 8800 ICP-QQQ を用いて元素固有の検出を実施し、FFF によりオンラインで分離されたサイズフラクションごとに Si 濃度を定量します。この新しいメソッドでは、ICP-QQQ を MS/MS モードにして酸素 (O<sub>2</sub>) セルガスと組み合わせることで使用することにより、*m/z* 28 ~ 30 に影響を与える多原子干渉を効果的に回避し、3 種類のケイ素同位体 (<sup>28</sup>Si、<sup>29</sup>Si、<sup>30</sup>Si) すべてのフラクトグラムを測定することができました。

## 分析方法

### 装置構成

長さ 280 mm のフラットフラクショネーションチャンネル (320 mm × 60 mm) を備えた金属フリーの Postnova Analytics AF2000 MT 非対称フロー FFF (A4F) システムを、Postnova 3621 MALS 検出器とオンラインで連結して使用しました。蓄積壁として、350 μm スペーサと分子量 10 kDa のカットオフ再生セルロースメンブレン (Postnova Analytics) を組み合わせて使用しました。

Si 同位体の検出には、オクタポールコリジョンリアクションセル (CRC) を備えた Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS (ICP-QQQ) を使用しました。ICP-QQQ はタンデム質量分析計構成で、CRC により分離された 2 つの四重極マスアナライザ (Q1 と Q2) が備えられています。この構成では機器は MS/MS モードで動作しており、両方の四重極をマスフィルタとして機能させることにより (分離能 1 amu)、セル内で発生する化学反応を正確に制御できます。Si の測定はマスシフトモードで実施し、リアクションガスとして O<sub>2</sub> (99.999 % 純度グレード) を使用しました。サンプル導入システムは、プラチナインジェクタ付きの取り外し可能トーチ、および 2 °C に冷却した

ダブルパス PFA スプレーチャンバ付きの PFA 同軸ネブライザを含む不活性コンポーネントで構成しました。MALS のアウトレットを ICP ネブライザのインレットに接続し、0.1 % 硝酸中に 2 μg/L Ge を含む内部標準溶液と FFF 溶出液を不活性 T ピースにより混合し、ICP-QQQ のペリスタルティックポンプで送り込みました。ICP-QQQ の操作パラメータと取り込みパラメータを表 1 に示します。サンプル処理と分析測定はすべて、クリーンルーム条件で実施しました。

表 1. 最適化された ICP-QQQ パラメータ

| パラメータ                              | 設定                              |
|------------------------------------|---------------------------------|
| RF 出力 (W)                          | 1550                            |
| キャリアガス流量 (L/min)                   | 0.90                            |
| O <sub>2</sub> リアクションガス流量 (mL/min) | 1.15                            |
| Q1 バイアス (V)                        | -1                              |
| Q2P バイアス (V)                       | -5.3                            |
| 取り込みモード                            | 時間分析                            |
| 質量あたりの積分時間 (秒)                     | 0.5                             |
| サンプリング周期 (秒)                       | 2                               |
| 合計取り込み時間 (分)                       | 50                              |
| 選択した質量ペア (Q1 → Q2)                 | 28 → 44、29 → 45、30 → 46、72 → 72 |

### 材料と試薬

公称粒径 20、50、80、100、120、140、160、および 180 nm の単分散で非機能的なシリカナノ粒子懸濁液 (「NanoXact」) を使用しました (Nanocomposix、サンディエゴ、カリフォルニア州)。ケイ素検量線用および内部標準溶液の前処理には、認証 Si および Ge 標準を 1000 mg/L (高純度標準、チャールストン、サウスカロライナ州) で使用しました。Aureli et al. の論文に従い、閉容器高周波分解中の試薬として超高純度 HNO<sub>3</sub>、HF (Carlo Erba Reagenti、ローダノ、イタリア)、および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ) を使用しました [7]。

### FFF-MALS-ICP-QQQ によるシリカ NP の粒子サイズおよび質量濃度の測定

1 桁異なるサイズ範囲 (流体力学直径 *d<sub>h</sub>*、~ 20 ~ 200 nm) で成分材料の回収率を最大にするような粒子の分離を制御するために FFF メソッドを開発しました。サイズおよび質量分離の観点から、公称粒径 20、50、80、100、120、160、180 nm のシリカナノ粒子懸濁液の特性解析には FFF-MALS-ICP-QQQ を使用しました。

粒子サイズは、MALS で取得した回転半径 ( $r_g$ ) を  $d_h$  に変換して計算しました。この際、使用した粒子が均一な球形状である場合に適用される、 $r_g/r_h = 0.775$  ( $d_h = 2r_h$ ) という関係を使用しました。結果は、メーカーが報告している  $d_h$  値と十分に一致しました (表 2)。そのため、粒子サイズキャリブレーションの参照値として、証明書の  $d_h$  値を使用しました。キャリブレーションは、単一近単分散シリカ懸濁液を注入し、得られた溶出時間に対して既知の粒子サイズをプロットすることにより実施しました。次に、テストサンプルで粒子サイズのキャリブレーションを実施するために、曲線適合式を決定しました。代表的な検量線を図 1 に示します。

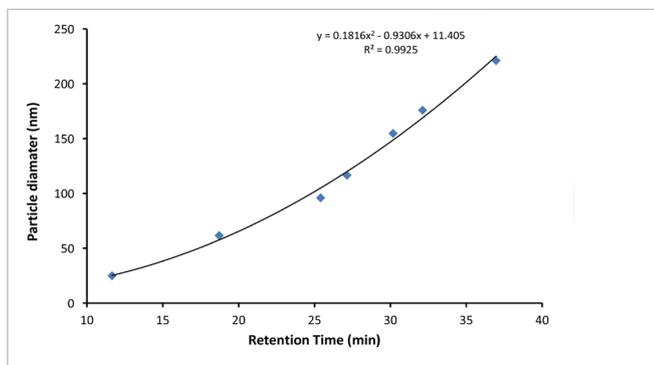


図 1. シリカナノ粒子の検量線

近単分散シリカ懸濁液の粒子質量濃度は ICP-QQQ で測定し、5.7 ~ 8.9 mg/mL の範囲内に収まっていることを確認しました。これらの値を使用して、テストサンプルで測定された粒子質量をキャリブレーションしました。

高周波分解後、20 および 50 nm 粒子懸濁液の合計ケイ素含有量も測定しました。合計シリカ濃度 (分解後) と未分解粒子の濃度間の平均差異はわずか 2.4 % であり、これは、ICP-QQQ によるケイ素測定を定量するために、ポスト FFF に追加されたイオン性キャリブラントを使用できる可能性があることを示しています。また、例えば FFF チャンネルで発生する可能性のある損失について明らかにするために、粒子質量のプレチャンネルキャリブレーションを使用しました [8]。この際、20、50、100、180 nm NP 分散を濃度 1.2、2.5、6、12  $\mu\text{g/mL}$   $\text{SiO}_2$  で注入しました。

表 2. サイズキャリブレーションで使用したシリカ NP 懸濁液

| 公称サイズ <sup>a</sup> (nm) | TEM 直径 <sup>a</sup> (nm) | $d_h$ 参照値 <sup>a</sup> (nm) | $d_h$ 検出値 <sup>b</sup> (nm) |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 20                      | 23.2 ± 2.4               | 24.9                        | 31.2 ± 8.3                  |
| 50                      | 47.7 ± 3.7               | 61.6                        | 60.4 ± 10.6                 |
| 80                      | 82.6 ± 4.7               | 96.0                        | 103.0 ± 14.7                |
| 100                     | 101.7 ± 9.0              | 116.6                       | 111.2 ± 14.2                |
| 120                     | 119.9 ± 16.7             | 154.7                       | 152.8 ± 16.0                |
| 160                     | 156.0 ± 18.1             | 175.8                       | 167.0 ± 10.8                |
| 180                     | 186.8 ± 13.1             | 221.1                       | 203.1 ± 19.6                |

<sup>a</sup>メーカーの証明書に準拠した流体力学直径

<sup>b</sup>MALS で取得した  $r_g$  値を  $d_h$  に変換して評価した流体力学直径。この際、使用した粒子が均一な球形状である場合に適用される、 $r_g/r_h = 0.775$  ( $d_h = 2r_h$ ) という関係を使用

## 結果と考察

### ケイ素に対する干渉物の除去

シングル四重極 ICP-MS による高感度で正確なケイ素測定を妨げる要因として多原子干渉があり、これは自然に発生する 3 種類の同位体  $^{28}\text{Si}$  ( $^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$ 、 $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$ )、 $^{29}\text{Si}$  ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{14}\text{NH}^+$ 、 $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{12}\text{C}^{16}\text{OH}^+$ )、および  $^{30}\text{Si}$  ( $^{15}\text{N}^{15}\text{N}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{15}\text{NH}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{12}\text{C}^{17}\text{OH}^+$ ) に影響を与えます。この 3 種類の同位体の天然存在比はそれぞれ、92.2 %、4.7 %、3.1 % です。

MS/MS 機能を備えた Agilent 8800 ICP-QQQ は、マスシフトによって分析対象イオンを選択的に変化させ、元の質量における強いスペクトル干渉を排除します。酸素 ( $\text{O}_2$ ) MS/MS マスシフトモードでは、反応プロダクトイオンは、反応前の分析対象イオンに対して 0 原子付加反応により 16 amu だけ質量が増加するため、元のイオンに対する干渉を受けずに検出できます。今回のケースでは、Q1 を  $m/z$  28、29、および 30 に設定することにより、各 Si 同位体を順番にセルに注入し、 $\text{O}_2$  をセルに追加して  $\text{Si}^+$  イオンを  $\text{SiO}^+$  プロダクトイオンに変換しました。そして、対応する  $m/z$  44、45、および 46 (Q2) で測定を実施しました。図 2 に示されているように、 $m/z$  44、45、および 46 で取得した信号強度は Si の天然同位体比に従っており、リアクションセルでは質量バイアスが発生していないことがわかります。表 3 に、3 種類のケイ素同位体について LoD および BEC の観点から得られた良好な結果を示します。

表 3. ICP-QQQ の O<sub>2</sub> マスシフトモードを用いたケイ素の直線性、感度、LoD、および BEC の測定結果

| 分析条件                       | プリカーサおよびプロダクトイオン   | Q1 → Q2 m/z | R      | 感度<br>cps/μg/L | b (ブランク)<br>cps | LoD<br>μg/L | BEC<br>μg/L |
|----------------------------|--|-------------|--------|----------------|-----------------|-------------|-------------|
| O <sub>2</sub> 1.15 mL/min | <sup>28</sup> Si → <sup>28</sup> Si <sup>16</sup> O <sup>+</sup> | 28 → 44     | 0.9998 | 4876           | 13472           | 0.09        | 2.8         |
|                            | <sup>29</sup> Si → <sup>29</sup> Si <sup>16</sup> O <sup>+</sup> | 29 → 45     | 0.9998 | 260            | 782             | 0.31        | 3.0         |
|                            | <sup>30</sup> Si → <sup>30</sup> Si <sup>16</sup> O <sup>+</sup> | 30 → 46     | 0.9994 | 183            | 1112            | 0.56        | 6.1         |

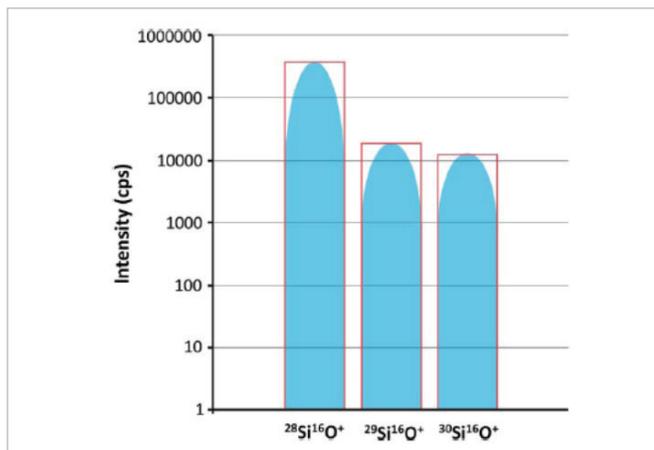


図 2. ケイ素同位体測定値 (青色のピーク) と理論的同位体アバundance テンプレートの重ね表示。The Royal Society of Chemistry の許可を得て転載

ケイ素の認証濃度値に対する生体マトリックス参照物質が存在しない場合は、内部の品質管理物質 ISS-BL (可溶性ケイ素が添加されたウシ肝臓サンプル) を前処理し、合計ケイ素測定の精度を確認しました [7]。8800 ICP-QQQ を酸素 MS/MS マスシフトモードで使用して Si を分析した結果を表 4 に示します。3 種類すべての Si 同位体から得られた SiO<sup>+</sup> プロダクトイオン (m/z 44、45、46) に基づいて測定した Si 濃度は、3 つの独立した手法 (ICP-DRC-MS、ICP-OES、および HR ICP-MS) により得られた目標値と十分に一致していました [7]。

表 4. ICP-QQQ による合計ケイ素測定の精度 (n = 5)

|                 | 目標値        | <sup>28</sup> Si <sup>16</sup> O <sup>+</sup> | <sup>29</sup> Si <sup>16</sup> O <sup>+</sup> | <sup>30</sup> Si <sup>16</sup> O <sup>+</sup> |
|-----------------|------------|---|---|---|
| Si 濃度測定値 (μg/g) | 20.4 ± 1.9 | 20.9 ± 1.8                                    | 21.2 ± 2.1                                    | 20.0 ± 1.8                                    |

### FFF メソッドの最適化

この研究で使用した最小の粒子サイズ (20 nm) から発生したピークとボイドピークを明確に分離するために、FFF のフォーカス時間とクロスフロー値を最適化しました。同時に、ボイドピークでの損失を最小化し、良好なピーク分離能を達成しました。

図 3 に、ICP-QQQ を用いて m/z 44 (<sup>28</sup>SiO<sup>+</sup>) で測定された、20 ~ 180 nm の 7 つの NanoXact シリカ粒子サイズ懸濁液 (表 2 参照) のフラクトグラムの重ね表示を示します。最大ピークはすべて分離されており、未知サンプル中の粒子径が 1 桁異なるサイズ範囲で正確に測定されています。特に、ナノ範囲 (≤ 100 nm) でのサイズフラクションの分離は適切に実行されています。

フラクトグラムのベースライン信号は比較的高く、これは FFF 溶離液中に Si 汚染物が存在することを示しています。m/z 44 での信号に関係している可能性のある他のイオンは、ICP-QQQ の O<sub>2</sub> マスシフトモードにより除去されるべきものでした。このバックグラウンド信号を調査するために、合計ケイ素含有物の純溶離液を分析しました。FFF 溶離液は、0.02 % v/v の FL-70 を含む 0.1 μm ろ過混合物から構成しました。これは、市販のアルカリ界面活性剤混合物です。界面活性剤には 64.2 μg/L Si が含まれていることがわかりました。これが高いバックグラウンド信号の原因です。溶離液中の Si 汚染物を減少させることにより、メソッドの分析性能が向上します。

### テストサンプルの分析

参照物質 ERM-FD100 と公称粒径 140 nm の NanoXact シリカ懸濁液という 2 つのテストサンプルの特性解析には、FFF-MALS-ICP-QQQ メソッドを適用しました。最初に、シリカ NP によるプレチャネルキャリブレーションと元素標準溶液によるポストチャネルキャリブレーションの両方を用いて、2 つのサンプル中の粒子質量の回収率について調査しました。イオン性ケイ素によるポストチャネルキャリブレーションを用いた定量は、シリカ NP によるプレチャネルキャリブレーションより精度が低くなりました。後者のアプローチでは、キャリブレーションはサンプルと同じ注入/分離手順を実行できるため、定量が正確になります。

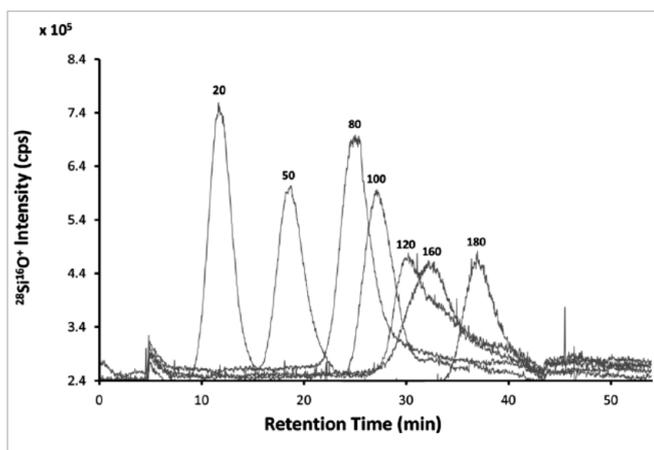


図 3. 個別の近単分散 NanoXact シリカ粒子溶液の FFF-ICP-QQQ フラクタムの重ね表示。ピークの上の数値は、各分離の公称サイズを nm 単位で表したものです。The Royal Society of Chemistry (RSC) の許可を得て再現しました。

2つのテストサンプル中のシリカ NP の流体力学直径は、回転半径 (MALS) とサイズキャリブレーション (FFF-ICP-QQQ) の両方を用いて計算しました。結果を参照値と比較したものを表 5 に示します。

全体的に、2つの実験的に測定された値と参照値は十分に一致していました。ここで注意する必要があるのは、ERM-FD100 の FFF-MALS 分析では、測定値は手法 [9、10] のサイズ検出限界に近い値であり、サンプル濃度を高くする必要があったことです。全体として、現在のメソッドで2つの測定アプローチを使用することにより、サイズ値の推定の信頼性が高まります。

表 5. 非対称 FFF-MALS-ICP-QQQ による2つのテストサンプルのサイズ特性解析

| テストサンプル             | 参照直径 (nm)               | FFF-MALS で測定された $r_h$ から計算した $d_h$ (nm) | FFF-ICP-QQQ のサイズキャリブレーションで取得した $d_h$ (nm) |
|---------------------|-------------------------|---|---|
| ERM-FD100           | 19.4 ± 1.3 <sup>a</sup> | 22.9 ± 4.2                              | 23.3 ± 3.8                                |
| NanoXact シリカ 140 nm | 150.4 <sup>b</sup>      | 142.3 ± 10.6                            | 167.4 ± 8.9                               |

<sup>a</sup> 認証値は電子顕微分光により測定

<sup>b</sup> 参照値はメーカーの証明書で報告されている値で、ダイナミック光散乱により測定

## 結論

非対称フロー FFF を多角度光散乱および ICP-QQQ とオンラインで連結して使用することにより、シリカ NP の定量特性解析において良好な結果が得られました。サイズキャリブレーションによる ICP-QQQ 検出と MALS によるスタンダードレスサイジングの両方を用いて、FFF で分離された粒子の正確な寸法特性解析を実施しました。ICP-QQQ を使用して、FFF によりオンラインで分離されたサイズフラクションに存在するケイ素の元素固有の定量測定を実施しました。シリカ NP によるプレチャネルキャリブレーションと元素標準溶液によるポストチャネルキャリブレーションの両方を用いて、粒子質量をキャリブレーションしました。新しく開発した FFF-MALS-ICP-QQQ メソッドにより、良好な成分材料の回収率で1桁異なるサイズ範囲においてシリカ粒子の寸法と質量を測定しました。

Agilent 8800 ICP-QQQ を MS/MS モードで使用することにより、3種類のケイ素同位体をすべて SiO<sup>+</sup> プロダクトイオンとして測定することが可能になります。これはメソッドの重要な特長であり、同位体濃縮シリカ NP の使用、および同位体希釈 (ID) 分析によるシリカの絶対定量に関するアプリケーション分野に応用できます。このメソッドは現在、食品中のナノサイズシリカの検出に使用されています。

## 詳細情報

本アプリケーションは以下の論文でも紹介されています。  
[Quantitative characterization of silica NPs by asymmetric flow field flow fractionation coupled with online multi-angle light scattering and ICP-MS/MS detection](#), Federica Aureli, Marilena D' Amato, Andrea Raggi and Francesco Cubadda, *J. Anal.At.Spectrom.*, 2015, 30, 1266-1273.  
DOI:10.1039/C4JA00478G

## 謝辞

技術協力をしてくれた Thorsten Klein 氏と Evelin Moldenhauer 氏 (Postnova Analytics)、および Roberto Santoliquido 氏 (Alfatest) に感謝いたします。

## 参考文献

1. D. Napierska, L.C.J.Thomassen, D. Lison, J.A.Martens, P.H.Hoet, *Particle and Fibre Toxicology* 2010, 7, 39.
2. T.P.J.Linsinger, G. Roebben, C. Solans, R. Ramsch, *Trends Anal. Chem.*, 2011, 30, 18–27.
3. T.P.J.Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. von der Kammer, E.H.Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede, S. Weigel, *Food Chem.*, 2013, 138, 1959–1966.
4. L. Calzolari, D. Gilliland, F. Rossi, *Food Addit.Contam.*, 2012, 29, 1183–1193.
5. P.C.E. van Kesteren, F. Cubadda, H. Bouwmeester, J.C.H. van Eijkeren, S. Dekkers, W.H. de Jong, A.G.Oomen, *Nanotoxicology*, 2014, Epub ahead of print July 18, doi:10.3109/17435390.2014.940408.
6. F. von der Kammer, S. Legros, E.H.Larsen, K. Loeschner, T. Hofmann, *Trends Anal.Chem.*, 2011.30, 425-436.
7. F. Aureli, M. D' Amato, A. Raggi, M. Ciprotti, S. Nisi, A. Sorbo, F. Cubadda, 2016.In preparation.
8. O. Geiss, C. Cascio, D. Gilliland, F. Franchini, J. Barrero-Moreno, *J Chromatogr.A*, 2013, 1321, 100-108.
9. A. Zattoni, D.C. Rambaldi, P. Reschiglian, M. Melucci, S. Krol, A. M. Coto Garcia, A. Sanz-Medel, D. Roessner, C. Johann, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 9106-9112.
10. M. J. Spallek, A. Wallner, R. Jünger, Application Note 0028, Postnova Analytics GmbH.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

**email\_japan@agilent.com**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, May 27, 2016

5991-6786JAJP



**Agilent Technologies**