

キャピラリー電気泳動法の環境分析への応用

*Application of Capillary Electrophoresis for Environmental Analysis*中島 陽一*
Yoichi Nakashima

(2005年6月8日 受理)

キーワード：キャピラリー電気泳動、環境分析、イオン分析、ポリオキソメタレート

1. はじめに

(1) キャピラリー電気泳動法¹⁾

キャピラリー電気泳動法(CE)は、電解液を満たしたキャピラリー(細管)両端に直流高電圧を印加し、分析対象物を電気泳動させることにより、分離分析を行う手法である。CE 測定装置(図1)は直流高圧電源(0~30kV)、紫外可視検出器、泳動液のバイアル、電極および熔融シリカキャピラリー(内径 20~100 μ m, 長さ 30~200cm)だけで構成され、非常に単純である。市販装置の多くは、これに加えてオートサンプラーとフォトダイオードアレイ検出器(多波長の光を同時に検出できる半導体検出器)を備えており、自動測定および泳動してきた物質の紫外可視吸収スペクトルをオンラインで測定することが可能である。CE 測定装置のほとんどは、その構成上の制約から熔融シリカキャピラリー自身に光を透過させ、吸光度を測定しているため、光路長は熔融シリカキャピラリーの内径で制限される。このことがCEの欠点の一つである検出感度の低さにつながっている。

イオンクロマトグラフィーとは異なり、CE法では分離のためにカラムを必要としない。このため、同一キャピラリーで陰、陽イオンの分析が可能である。また、荷電ミセルとの相互作用を利用した、ミセル動電クロマトグラフィー(Micellar electrokinetic chromatography: MEKC)においては、電荷のある溶質と同様に中性の溶質も分離分析が可能である²⁾。このように、CE法は

多種多様な測定条件が選択できるため、一般的なイオンに限らず、様々な分析が行えるという特長がある。また、本分析法では簡便かつ高分離能が容易に得られるため、急速にその応用範囲が広がり、現在ではイオンクロマトグラフィー同様、多くの研究機関、企業などでイオン分析などに用いられている。

(2) CE法による環境分析³⁾

環境分野におけるCE法の応用は徐々に広がりを見せているが、アメリカで無機陰イオン分析に公定法として採用されている以外は、実分析に应用されている例は少ない。これは、環境試料中の分析対象物が低濃度(ppmレベル以下)であること、共存する化学種が種々雑多であること、等に起因する。これらの問題点を克服するために、オンライン濃縮、質量分析装置の利用等、様々な検討がなされており、海水中の硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの定量⁴⁾や河川水中のフタル

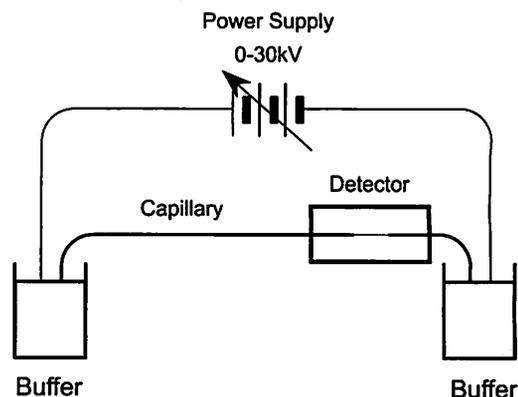


図1 キャピラリー電気泳動装置の概略図

* 化学環境部 環境・エネルギー・バイオ系

酸エステル類の分析⁵⁾等に応用されている。このような CE 法の環境分析への応用は今後の測定機器の発達によってさらに広がっていくものと考えられる。

(3) 本研究の目的と意義

上記の様に、CE 法を環境分析に適用するためには検出感度の向上が不可欠である。以前報告したように⁶⁾、筆者らは錯形成等の化学反応を用い、分析対象物をより大きなモル吸光係数を持つ物質へと変換することにより高感度化を図る手法について研究を行ってきた。具体的には大きな吸光度をもつヘテロポリオキソメタレート⁷⁾の生成反応を詳細に検討し、分離分析法に有用な錯形成反応系を見いだしてきた。本報では、これらの反応を CE 分析へ応用することにより、高感度化を図るとともに環境分析へ適用した結果について述べる。

2. 実験

大塚電子(株)製 CAPI-3200Q 型キャピラリー電気泳動装置を用いて測定を行った。キャピラリーには内径 75 μ m、全長 62.2cm の溶融シリカ管を用いた。泳動ピーク測定と同時にフォトダイオードアレイによるスペクトルの測定を行った。印加電圧は検出器側の電極を基準として表記した。

3. ポリオキソメタレート生成反応の CE 法への応用

ポリオキソメタレートとは、金属原子 (Mo(VI), W(VI), V(V), Nb(V) など) に酸素原子が六配位および四配位した MO₆ 八面体や MO₄ 四面体が基本単位となり、これが頂点や稜を共有することで構築される、大きさが 10~50Å、分子量が数千にもおよぶ金属酸化物である。本研究で用いた錯体種の構造を図 2 に示す。

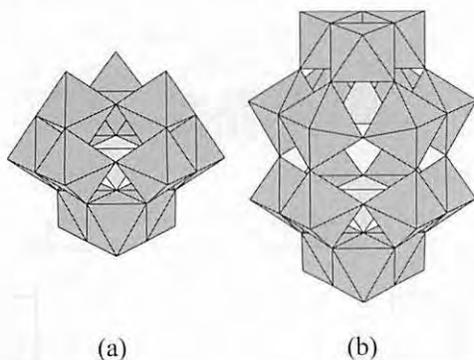


図 2 (a) ケギン型および(b)ドーソン型構造

正八面体、正四面体の頂点に酸素原子、中心に Mo、W もしくはヘテロ原子が存在する。

この種の錯体は、各種の均一および不均一触媒、顔料、表面処理剤など広い分野で用いられている^{7,8)}。このうち Mo(VI)や W(VI)は、酸性条件下でリン酸、ケイ酸などの酸素酸イオンと選択的に錯形成し、脱水縮合錯体すなわちヘテロポリオキソメタレートを生成することが知られている。この反応は、古くから現在に至るまで各種酸素酸の高感度かつ簡便な定量法として吸光度分析に応用されている。

このヘテロポリオキソメタレート生成反応の環境分析への応用について、Cr(III)と Mo(VI)の錯生成反応を利用することにより、Cr(III)の高感度 CE 分析が可能になり、さらに、Cr(III)、Cr(VI)の同時定量が容易に行えることは前報⁶⁾で詳しく述べた。同様の反応を利用すれば、I(V), I(VII)の同時定量⁹⁾、V(IV), V(V)の同時定量¹⁰⁾などが可能であるが、今回は割愛する。

(1) As(III), As(V)の高感度定量¹¹⁾

ヒ素(As)は毒性が強く、環境化学的に注目される元素である。加えて、その化学状態により、毒性の程度が異なることもよく知られているため、ヒ素の酸化状態別分析は重要度が高い。一方、高濃度領域において Mo(VI)と As(V)は安定なヘテロポリモリブデートを作ることは、古くから良く知られている。このような観点から、まず Mo(VI)と、分析対象となるような低濃度の As(V)との反応について検討を行った。両者の反応により生成する錯陰イオン [As^VMo₁₂O₄₀]³⁻は As(V)

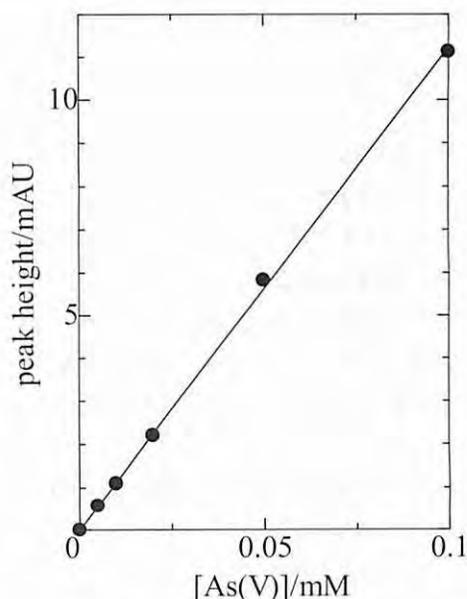


図 3 As(V)分析時の検量線

試料条件: 10mM Mo(VI)-60%(v/v) H₃CN-0.05M HCl
泳動液: 60%(v/v) CH₃CN-0.05M HCl
印加電圧: -13.5kV
(縦軸単位 AU は Absorbance Unit (吸光度単位) の略号)

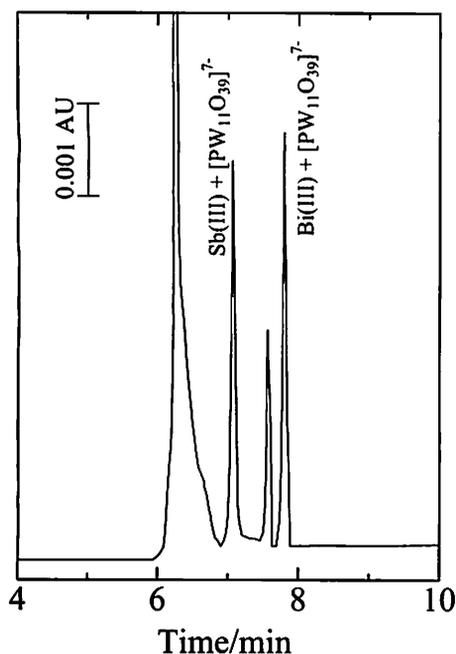


図4 Sb(III)とBi(III)の同時分析

試料条件: $1 \times 10^{-4} \text{M}$ $[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}]^{7-}$ - $1 \times 10^{-5} \text{M}$ Sb(III) - $1 \times 10^{-5} \text{M}$ Bi(III) - 10mM マロン酸緩衝溶液 (pH2.4)
泳動液: 50mM マロン酸緩衝溶液 (pH2.4)
印加電圧: -15.0 kV

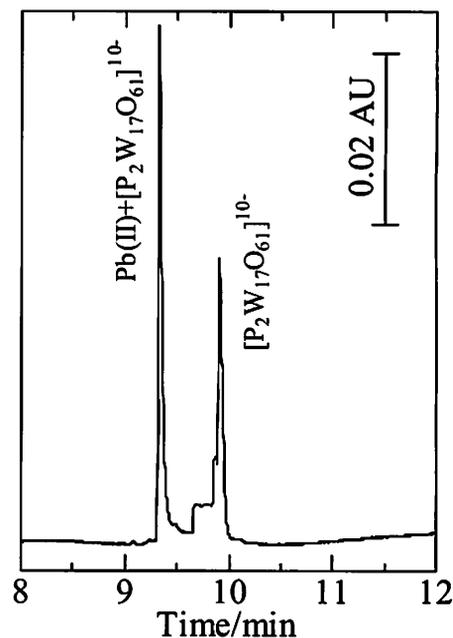


図5 Pb(II)の分析

試料条件: $5 \times 10^{-5} \text{M}$ $[\text{P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}]^{10-}$ - $2 \times 10^{-5} \text{M}$ Pb(II) - 50mM NaNO_3 - 50mM 酢酸緩衝溶液 (pH 5.2)
泳動液: 50mM マロン酸緩衝溶液 (pH5.2)
印加電圧: -13.5kV

の濃度が低いため、水溶液中では不安定であるが、系にアセトニトリルなどの有機溶媒が共存すると安定化することがわかった。このため、従来用いていた泳動液(水溶液)はこの錯体には利用することができなかったが、水-有機混合溶媒を泳動溶液としたCE分析について研究したところ、良好な結果を得た(図3)。このときのAs(V)の検出限界は $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (S/N=3)に達した。

一方、Mo(VI)とAs(III)は水-有機混合溶媒中で $[\text{As}^{\text{III}}\text{Mo}_{11}\text{O}_{39}\text{H}_6]^{3-}$ を生成するが、この反応は高濃度領域でしかおこらなかった。このため、As(III)錯体のCE分析は行えなかったが、 H_2O_2 によりAs(III)をAs(V)へと酸化することにより、間接的に定量することは可能であった。これらの知見に基づき、As(III)、As(V)の酸化状態別定量を行った。具体的には、(i)試料をそのまま測定する(As(V)のみの定量値)、(ii)試料に H_2O_2 を加えた後、測定する(As(III)とAs(V)の合算値)、(iii) (ii)の結果から(i)の結果を差し引く(As(III)の定量値)といった逐次測定により、As(III)およびAs(V)の定量を行うことができた。

(2) P(V)、As(V)の高感度定量^{12,13)}

河川、湖沼、海洋等の富栄養化の原因となるP(V)は、As(V)同様、水-有機混合溶媒中で錯陰イオン

$[\text{P}^{\text{V}}\text{Mo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ を生成し、CE分析が可能であることはすでに報告した⁶⁾。この分析系についてさらに研究を進めた結果、P(III)、ピロリン酸等との同時分析が可能であることが示唆されている。

一方、同族元素であるP(V)、As(V)の同時分析を検討したところ、両錯体種の電気泳動移動度はほぼ等しいため、その分離は困難であった。このため、両錯体種の酸化還元挙動の違いを利用し、分離度を改善する手法について研究した。その結果、アスコルビン酸を用い両錯体種を還元すれば、P(V)の場合、 $[\text{H}_3\text{Pmo}_{11}\text{O}_{39}]^{4-}$ が、As(V)の場合、 $[\text{H}_5\text{AsMo}_{10}\text{O}_{37}]^{4-}$ が生じることが分かった。両錯体は、その構造が異なるため、電気泳動移動度も異なり、そのため、P(V)及びAs(V)の同時分析が可能であった。ピーク分離の改善法としては、泳動液の組成およびpH、電位勾配等の検討を行うことが一般的であるが、このような手法は他にほとんど報告がない。このため、新たなピーク分離の改善手法として今後の発展が期待される。

(3) Sb(III)、Bi(III)の同時定量¹⁴⁾

Mo(VI)同様、W(VI)も数多くのポリオキソメタレートを生じることが知られているが、一般的にポリオキソタングステートの生成速度は遅く、その分析化学的研究はほとんどなされていなかった。この問題を

解決するため、あらかじめ生成させた欠損ケギン型錯体($[PW_{11}O_{39}]^{7-}$)とヘテロ原子との反応について検討した。この検討の結果、数多くの1置換ケギン型錯体が速やかに生成し、 $[PW_{11}O_{39}]^{7-}$ が $[PMo_{11}O_{39}]^{7-}$ 同様分析化学的に有用であることを見いだした。従って、この場合の $[PW_{11}O_{39}]^{7-}$ は一種の配位子と考えることができる。ポリオキソタンゲステートは同様のポリオキソモリブデートよりも安定であり、このことはCE法へのポリオキソメタレート生成反応の応用範囲の拡大を可能とする。毒性が高く、環境に悪影響を与えるSb(III)及びBi(III)を例とし、この錯生成反応のCEへの応用を詳細に検討したところ、pH2.4において両者の同時定量が可能であり(定量範囲 $2 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-5} M$)、その検出限界は $1 \times 10^{-7} M$ (S/N=3)であった。さらに同じ測定条件でAl(III)もSb(III)、Bi(III)おのおのと分離し、定量することができた。

(4) Pb(II)の高感度定量

通常、環境水中の微量鉛(Pb(II))は、フレイムレス原子吸光法、ICP質量分析法などにより測定される。これらの方法は高感度であり広く用いられているが、その装置は一般に高価である。一方、Pb(II)はフレイム原子吸光法、ICP発光分析法などでも定量が可能である。しかし、両分析法は環境試料の分析に用いるには感度が低く、煩雑な前濃縮操作を必要とする。従って、より簡便でかつ感度の高い測定法が求められている。

今回、Pb(II)と欠損ドーソン型錯体($[P_2W_{17}O_{61}]^{10-}$)との反応を研究し、pH5-6の範囲で錯形成が起こることを見いだした。この欠損ドーソン型錯体($[P_2W_{17}O_{61}]^{10-}$)も、上記の欠損ケギン型錯体($[PW_{11}O_{39}]^{7-}$)同様配位子として働いているものと考えられる。この錯形成反応をキャピラリー電気泳動法に応用し、環境水中のPb(II)の定量を検討した(図5)。CE法におけるピーク面積および形状に及ぼす泳動緩衝溶液のpHの効果を検討したところ、そのピークはpH5.0-6.0の範囲で出現し、pH5.2付近で最大になった。今回得られた定量範囲は、 $2 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-5} M$ 、検出限界は $1 \times 10^{-7} M$ (S/N=3)であった。

この測定系を水道水中の鉛の定量に応用することを試みた。今回は鉛を含有する水道水を見いだすことができなかつたため、水道水に一定量の鉛を添加したものを試料とした。上記の定量下限値は、水道水における基準値($5 \mu g/L$)には及ばないため、試料に硝酸を加えた後、10倍に濃縮し、定量した。 $5 \times 10^{-8} M$ (およそ $5 \mu g/L$)の鉛を含む水道水を用い、5回の操作を行ったときの

平均の回収率は102%であった。このことから、上記の高感度な測定装置を用いずとも、CEによる規制値レベルの水道水中の鉛の定量が可能であることを示すことができた。

4. 終わりに

本報文では、ヘテロポリオキソメタレートの生成反応をCE分析法への応用することにより高感度化が図れ、環境分析へ応用できることを中心に述べた。

本研究のような誘導体化法では分析対象物が限定されるという問題点は存在する。しかし、CE法という高分離能を有する分析法と組み合わせることにより、従来問題であった目的錯体種検出時の、他の錯体種の妨害が回避できた。さらにポリオキソメタレートの高いモル吸光係数のために、検出感度も向上し、環境試料のような高感度が求められる分析にも応用することができた。このように、錯形成による分析対象物の誘導体化は、CE法のみならず他の分離分析へも応用範囲が広がることが期待される。

参考文献

- 1) 本田 進, 寺部 茂: キャピラリー電気泳動—基礎と実際, 講談社(1995)
- 2) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichihara, A. Tsuchiya and T. Ando: *Anal. Chem.*, **56** (1984) p.111
- 3) 竹田さほり: *ぶんせき*, (2003) p.497
- 4) K. Fukushi, T. Miyado, N. Ishio, K. Saito, S. Takeda and S. Wakida: *Electrophoresis*, **23** (2002) p.1928
- 5) S. Takeda, Y. Tanaka, M. Yamane, Z. Siroma, S. Wakida, K. Otsuka and S. Terabe: *J. Chromatogr. A*, **924** (2001) p.415
- 6) 中島陽一: 大阪府立産業技術総合研究所報告, No.15 (2001) p.91
- 7) M.T. Pope: *Heteropoly and Isopoly Oxometalates*, Springer-Verlag, Berlin (1983)
- 8) 日本化学会(編): *ポリ酸の化学—金属酸化物分子と集合体の構造と機能* 季刊化学総説 (No.20), 学会出版センター (1993)
- 9) Y. Nakashima, H. Shen, K. Kusuyama and S. Himeno: *Anal. Sci.*, **15** (1999) p.725
- 10) I. Kitazumi, Y. Nakashima and S. Himeno: *J. Chromatogr. A*, **939** (2001) p.123
- 11) K. Sano and S. Himeno: *J. Separ. Sci.*, **25** (2002) p.438
- 12) Y. Nakashima, T. Goto, I. Kitazumi and S. Himeno: *Electrophoresis*, **22** (2001) p.3377
- 13) S. Himeno, K. Sano and Y. Nakashima: *J. Chromatogr. A*, **966** (2002) p.213
- 14) S. Himeno, I. Kitazumi, M. Takamoto and Y. Nakashima: *Talanta*, **61** (2003) p.59